

Etude récente sur la sensibilité de différentes souches de *Clostridium* prélevées sur des lapins avec signes cliniques d'EEL, vis-à-vis de la tiamuline

A.C. BOUVIER¹, C. JACQUINET², B. MANCO²

¹ Clinique Vétérinaire, 1 Square des Saulaies, 49080 Bouchemaine, France

² Ceva Santé Animale, ZI la Ballastière, 33501 Libourne, France

Résumé. Les sensibilités des souches de *Clostridium* prélevées en 2004 sur des lapins avec signes cliniques d'entéropathie épizootique du lapin (EEL) ont été étudiées vis-à-vis de la Tiamuline. Toutes les *Clostridies* isolées de caeca de lapins cliniquement atteints d'EEL sont sensibles à la Tiamuline, et une concentration de 0,8 µg/ml inhibe 90 % des souches. Cette étude confirme que l'efficacité de la Tiamuline est bonne, et ne s'est pas altérée au cours du temps.

Abstract - Recent study on minimum inhibitory concentration (MIC) determination of tiamulin for *Clostridia* isolates from rabbits affected by Rabbit Epizootic Enteropathy (REE). This study was intended to assess the MIC of Tiamulin for *Clostridia* isolates sampled in 2004 from rabbits affected by REE. All *Clostridia* isolates collected from rabbit caecal samples affected by REE clinical signs were sensitive to Tiamulin and 0.8 µg/ml inhibits 90 % of the strains. This study confirms that efficacy of Tiamulin is high, despite of large use during years.

Introduction

La Tiamuline est un anti-infectieux original appartenant à la famille des pleuromutilines. Historiquement, la Tiamuline est indiquée pour lutter contre les maladies respiratoires chroniques (mycoplasmes) des volailles et des porcs, ainsi que contre l'entérite hémorragique du porc. (Drews *et al.*, Stipkovits *et al.*). Elle possède également, depuis 1999, une AMM chez le lapin pour le contrôle de l'entéropathie épizootique du lapin (EEL).

Le but de cette étude est d'établir les concentrations minima inhibitrices (CMI) de souches de *Clostridium* dont *C. perfringens* prélevées sur des lapins avec signes cliniques d'EEL.

En effet, cette molécule est largement utilisée sur le terrain depuis les années 98-99. Bien qu'en raison des particularités constitutionnelles de la molécule il ne soit pas attendu de résistance, il nous est paru important de le vérifier vis-à-vis d'un pathogène reconnu pour son implication éventuelle dans la pathogénie de l'EEL, *Clostridium perfringens* (Dewree *et al.*, 2003 ; Le Normand *et al.*, 2003 ; Marlier *et al.*, 2003).

1- Matériels et méthodes

La mesure des CMI pour la Tiamuline a été réalisée par la méthode de dilution en gélose qui consiste à déposer des souches bactériennes à la surface de milieux gélosés contenant des concentrations croissantes de Tiamuline. La concentration minimale inhibitrice (CMI), est la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber la croissance bactérienne.

1.1 . Isolements et préparation des souches

Les isolements de *Clostridium* ont été réalisés dans 8 élevages, répartis dans 4 régions différentes, concernés par l'EEL (tableau 1). Le diagnostic d'EEL

s'est appuyé sur des critères cliniques et nécropsiques. Les lapins prélevés étaient âgés de 40 à 59 jours.

Tableau 1. Répartition des sites ayant donné lieu à des isolements de *Clostridium*

REGION	Nombre de sites
Bretagne	2
Pays de Loire	1
Poitou - Charentes	4
Midi – Pyrénées	1

Les animaux présentant des signes cliniques d'EEL ont été autopsiés dans les élevages, les caeca prélevés après ligature, et placés dans des flacons hermétiques immédiatement réfrigérés à -20°C pour transport et conservation jusqu'à l'analyse.

Au laboratoire, les échantillons de caeca ont été décongelés et 1 gramme de contenu caecal a été placé dans un tube contenant 9 ml d'eau peptonnée. Après homogénéisation, des dilutions décimales ont été réalisées et 100 µl ont été transférés sur la surface de géloses sélectives adaptées à la croissance des *Clostridia*. Les boîtes ont été incubées à 37°C en anaérobiose. Les souches isolées ont été identifiées en utilisant un système conventionnel de type API (ID32 A). 46 souches de *Clostridia* ont été ainsi identifiées et conservées à -80°C jusqu'à la détermination de la CMI.

1.2. Préparation de la dilution antibiotique

La poudre antibiotique se présente sous la forme de Tiamuline fumarate acide. Souhaitant exprimer la CMI de la fraction active de l'antibiotique, nous avons appliqué un facteur de correction en tenant compte de la teneur en sel et en eau.

Une solution mère de 2560 µg/ml de Tiamuline a été préparée par dissolution de la poudre dans de l'eau purifiée stérile. Cette solution mère a ensuite été

Tableau 2. CMI de la Tiamuline vis-à-vis de *Clostridia* isolées de lapins atteints d'EEL

Elevages	Date de prélèvement	Identification du lapin	Espèce bactérienne	CMI de Tiamuline (en µg/ml)
1	23/02/2004	112	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
	23/02/2004	121	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
	23/02/2004	122	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
	27/02/2004	134	<i>Cl. perfringens</i>	1
	27/02/2004	138	<i>Cl. perfringens</i>	0,125
2	07/04/2004	C25	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
	07/04/2004	C26	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
	07/04/2004	C27	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
3	07/05/2004	D32	<i>Cl. perfringens</i>	0,5
4	09/03/2004	G13	<i>Cl. sordellii</i>	0,5
	02/04/2004	G15	<i>Cl. perfringens</i>	0,5
5	07/04/2004	L29	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
	07/04/2004	L29	<i>Cl. difficile</i>	1
	07/05/2004	L31	<i>Cl. difficile</i>	1
6	07/04/2004	M19	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
	07/04/2004	M20	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
	07/04/2004	M22	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
	07/04/2004	M23	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
1	18/02/2004	17	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
	18/02/2004	19	<i>Cl. perfringens</i>	0,125
	18/02/2004	20	<i>Cl. perfringens</i>	1
	18/02/2004	22	<i>Cl. perfringens</i>	1
	18/02/2004	23	<i>Cl. perfringens</i>	0,125
	18/02/2004	24	<i>Cl. perfringens</i>	0,125
	18/02/2004	26	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
	18/02/2004	27	<i>Cl. perfringens</i>	0,125
	17/05/2004	66	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
	17/05/2004	67	<i>Cl. difficile</i>	0,5
	17/05/2004	68	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
	17/05/2004	69	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
	23/02/2004	88	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
	21/05/2004	97	<i>Cl. difficile</i>	1
	21/05/2004	97(bis)	<i>Cl. perfringens</i>	1
	21/05/2004	99	<i>Cl. difficile</i>	1
	21/05/2004	99(bis)	<i>Cl. perfringens</i>	1
7	23/02/2004	BP37541-1	<i>Cl. sordellii</i>	0,5
	23/02/2004	BP37541-3	<i>Cl. sordellii</i>	0,5
	23/02/2004	BP37541-3	<i>Cl. perfringens</i>	0,125
8	23/12/2004	348	<i>Cl. perfringens</i>	0,25
	23/12/2004	349	<i>Cl. perfringens</i>	0,5
	23/12/2004	350	<i>Cl. perfringens</i>	1
	23/12/2004	358	<i>Cl. perfringens</i>	1
	6/12/2004	30	<i>Cl. perfringens</i>	0,5
	6/12/2004	22	<i>Cl. perfringens</i>	0,5
	15/12/2004	236	<i>Cl. perfringens</i>	1
	23/12/2004	348	<i>Cl. difficile</i>	1

Tableau 3. Estimation des CMI 50 et 90 pour *Clostridium perfringens*

CMI inhibant moins de 50% des souches (a) = 0,125 µg/ml	% cumulé de souches en dessous de 50% (b) = 13,04 %	% cumulé de souches au dessus de 50% (c) = 52,17 %	CMI ₅₀ = 0,2 µg/ml
CMI inhibant moins de 90% des souches (d) = 0,5 µg/ml	% cumulé de souches en dessous de 90% (e) = 71,74 %	% cumulé de souches au dessus de 90% (f) = 100 %	CMI ₉₀ = 0,8 µg/ml

a = concentration antibiotique (en µg/ml) inhibant moins de 50% des souches, b = pourcentage cumulé de souches en dessous de 50%, c = pourcentage cumulé de souches au-dessus de 50%, d = concentration antibiotique (en µg/ml) inhibant moins de 90% des souches, e = pourcentage cumulé de souches en dessous de 90%, f = pourcentage cumulé de souches au-dessus de 90%.

diluée pour obtenir des solutions de travail selon le tableau de dilutions des normes NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Chaque solution de travail a été diluée par 10 en milieu gélosé (gélose Mueller-Hinton additionnée de 5% de sang de mouton). Chaque gélose a été homogénéisée et répartie dans 2 boîtes de Pétri par dilution. La gamme de concentrations testées était de 256 à 0,0625 µg/ml de Tiamuline. Deux autres boîtes de Pétri contenant de la gélose Mueller-Hinton dépourvues d'antibiotique ont également été préparées, afin d'avoir un contrôle positif de la croissance bactérienne.

1.3. Préparation de l'inoculum et inoculation

Les souches de Clostridia ont été sub-cultivées sur géloses supplémentées avec 5% de sang de mouton. Pour chacune des souches un inoculum a été réalisé à partir de quelques colonies dispersées dans du bouillon nutritif régénéré de manière à obtenir une densité équivalente à 1 McFarland (soit 10⁸ UFC/ml). Les géloses ont été ensemencées à l'aide d'un dispositif d'ensemencement multiple sur toutes les boîtes contenant une concentration de Tiamuline et sur les boîtes témoin de culture.

Chaque boîte a également été ensemencée avec la souche de référence de *Clostridium perfringens* ATCC 13124. Les boîtes ont été incubées 18 à 24 heures à 37°C en anaérobiose.

1.4. Lecture des résultats

La CMI est la plus faible concentration antibiotique qui inhibe complètement la croissance bactérienne, ne tenant pas compte de la présence d'une à trois colonies ou d'un voile de microcolonies à peine visible. La CMI₅₀ et la CMI₉₀ ont été calculées par extrapolation logarithmique :

$$CMI_{50} = a \times 2^{\frac{50-b}{c-b}} \Rightarrow \log CMI_{50} = \log a + \log 2 \times (50-b / c-b)$$

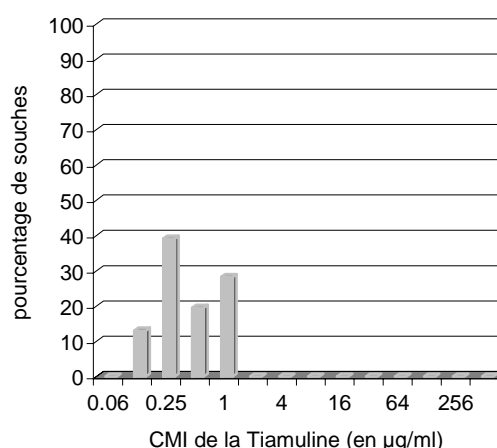
Où a = concentration antibiotique (en µg/ml) inhibant moins de 50% des souches, b = pourcentage cumulé de souches en dessous de 50%, c = pourcentage cumulé de souches au-dessus de 50%.

$$CMI_{90} = d \times 2^{\frac{90-e}{f-e}} \Rightarrow \log CMI_{90} = \log d + \log 2 \times (90-e / f-e)$$

Où d = concentration antibiotique (en µg/ml) inhibant moins de 90% des souches, e = pourcentage cumulé de souches en dessous de 90%, f = pourcentage cumulé de souches au-dessus de 90%.

2- Résultats

Figure 1. Représentation graphique de la répartition des CMI en classe de sensibilité à la Tiamuline pour *Clostridium perfringens* (prélevés sur lapins présentant des signes cliniques d'EEL)



Clostridium perfringens est plus fréquemment isolé chez les lapins intégrés dans cette étude (80%). *Clostridium difficile* (13% des isolats) et *Clostridium sordelli* (7% des isolats) sont plus rarement isolés, avec parfois coexistence avec *Clostridium perfringens* sur certains lapins. Les CMI sont présentées en détail dans le tableau 2 et sous forme synthétique en histogramme (figure 1). Le tableau 3 présente les calculs des CMI₅₀ et CMI₉₀ pour *C. perfringens*.

Pour les 46 souches étudiées, la CMI est comprise entre 0,125 et 1 µg/ml. Toutes les souches étaient donc sensibles. Pour *C. perfringens*, la CMI₅₀ était de 0,2 µg/ml, la CMI₉₀ était de 0,8 µg/ml.

3- Discussion et Conclusion

Bien que le rôle direct de l'une ou l'autre des bactéries isolées dans cette étude, comme agent étiologique de l'EEL, n'ait jamais été démontré, *C. perfringens* est celle qui est le plus souvent régulièrement isolée chez des lapins atteints d'EEL au niveau du terrain. La complexité et la méconnaissance de la flore digestive du lapin suggèrent que l'efficacité du traitement à base de tiamuline, vis-à-vis de l'EEL, peut également intéresser un autre germe non identifié à ce jour.

Dans cette étude réalisée selon les normes NCCLS, la Tiamuline se révèle d'une efficacité remarquable sur les clostridies.

Il est intéressant de rapprocher ces résultats de résultats plus anciens (1997-1998), (données du dossier d'AMM). A cette époque, les résultats publiés étaient les suivants :

- *Clostridium perfringens* : sur 28 souches testées, 23 sont sensibles (soit 82 %) et 5 sont résistantes (soit 18%) ; la moyenne des CMI est de 2,21 mg/l.

- *Clostridium spiroforme* : sur 42 souches testées, 40 sont sensibles (soit 95 %) et 2 sont résistantes (soit 5 %) ; la moyenne des CMI est de 0,17 mg/ml.

Les résultats actuels sont en cohérence avec ces résultats (et même meilleurs, sans qu'il soit possible d'en tirer une conclusion).

La Tiamuline confirme donc une efficacité contre les clostridies qui ont pu être mises en cause lors de syndrome d'EEL. Cette efficacité ne s'est pas altérée au cours du temps, confirmant la lenteur d'acquisition des résistances vis-à-vis de cette molécule.

Bibliographie

- DEWREE R., LICOIS D., COUDERT P., LASSENCE C., VINDEVOGEL H., MARLIER D., 2003. L'entéropathie épizootique du lapin (EEL) : étude du rôle des infections par *Clostridium perfringens* dans l'étiopathogénie de ce syndrome. *10èmes Journées de la Recherche Cunicole*. Paris, 19-20/11/2003, 251-254. . ITAVI Ed., Paris.
- DREWS J., GEORGIOPOULOS A., LABER G., SCHÜTE E., UNGER J., 1975. Antimicrobial activities of a new pleuromutilin derivative, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7 (5), 507-516.
- LE NORMAND B., LE GUENEC J., MOALIC P.Y., 2003. Contribution à l'étude toxinotypique des souches de *Clostridium perfringens* isolées dans l'entéropathie épizootique du lapin (EEL). Relation avec la clinique observée. *10èmes Journées de la Recherche Cunicole*, Paris, 19-20/11/2003, 243-246. . ITAVI Ed., Paris.
- MARLIER D., DEWREE R., LICOIS D., COUDERT P., LASSENCE C., POULIPOULIS A., VINDEVOGEL H., 2003. L'entéropathie épizootique du lapin (EEL): un bilan provisoire des résultats après 20 mois de recherches. *10èmes Journées de la Recherche Cunicole*. Paris, 19-20/11/2003, 247-250. ITAVI Ed., Paris.
- STIPKOVITS, L.; BURCH D, 1993. Antibiotic resistance of mycoplasmas of chickens and turkey origin,. *Proceedings Xth WVPA Congress*, Sydney, p179, Abs 121.