

## SENSIBILITE IN VITRO DE LA TILMICOSINE VIS A VIS D'ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE: INFLUENCE DU pH ET DU CO<sub>2</sub>

Zadjian Catherine<sup>1</sup>, Bostvironnois C.<sup>2</sup>, Leorat J.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> LILLY France, 13 rue Pagès, 92158 Suresnes, France

<sup>2</sup> LILLY Benelux, 52 rue de l'Etuve, B-1000 Bruxelles, Belgique

<sup>3</sup> Groupe Chêne Vert, Z.I. Bellevue, rue Blaise Pascal, 35220 Chateaubourg, France

### RESUME

Entre janvier 2005 et mars 2008, 959 antibiogrammes d'*Ornithobacterium* Rhinotracheale (ORT) ont été réalisés sur écouvillons trachéaux de dinde en France, dans 11 laboratoires. Le pourcentage moyen de résistance des souches d'ORT isolées est de 20% à la tilmicosine. L'élément d'alerte étant une très grande variabilité entre laboratoires (+/- 12%). Or, la méthodologie de réalisation des antibiogrammes sur l'ORT montre aussi des différences entre les laboratoires, en particulier la réalisation de la culture sous atmosphère enrichie en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Ce constat, associé à la publication de James A. Retsema (1999), nous a amené à tester 18 souches d'ORT terrain dans des conditions de pH ou de CO<sub>2</sub> contrôlées. En moyenne, la différence de diamètre d'inhibition entre des conditions d'aérobiose et d'anaérobiose (10% de CO<sub>2</sub>) est de 16mm. Et pour une unité de pH supplémentaire l'augmentation du diamètre lu est d'environ 12mm. Le choix du milieu et les conditions d'atmosphère ont une influence majeure sur l'interprétation de la sensibilité in vitro d'*Ornithobacterium* à la tilmicosine.

### ABSTRACT

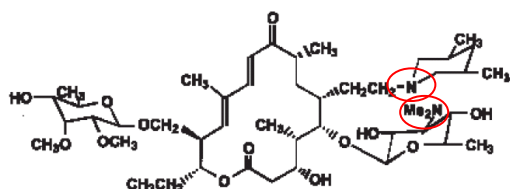
Between January 2005 and March 2008, 959 antibiograms for *Ornithobacterium* rhinotracheale (ORT) were done from turkey's tracheal swabs in 11 French laboratories. Mean percentages of resistance for ORT strains is 20% for tilmicosin. The surprising point was an important variability between laboratories (+/- 12%). Well, the cultural method in order to realize the ORT's antibiograms showed differences between laboratories, particularly in order to obtain cultural atmospheric conditions under CO<sub>2</sub>. This observation, associated to the James A Retsema (1999) 's publication, get us to test 18 field ORT strains under controlled pH and CO<sub>2</sub> atmospheric conditions. On average, inhibition's diameters between aerobic and anaerobic (10% of CO<sub>2</sub>) atmospheric conditions are 16 mm. And for each additional pH 's unit, the inhibition diameter is higher for around 12 mm. Culture medium and atmospheric conditions choice have a high influence on the in vitro interpretation for the *Ornithobacterium* sensibility for tilmicosin.

## INTRODUCTION

La tilmicosine est un macrolide. De ce fait elle est constituée, comme tous les macrolides, d'un groupe amine ionisable.

La particularité de la tilmicosine, comme celle de l'azithromycine, est la présence d'un deuxième groupe amine (illustré figure 1).

**Figure 1** : Structure de la tilmicosine.



Ce deuxième groupe amine lui confère un pKa plus élevé, ce qui augmente le risque d'ionisation des groupes amines en présence d'un pH bas. De même, la présence de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère d'incubation amène la baisse du pH par production d'acide carbonique (par réaction avec l'eau atmosphérique).

*Ornithobacterium* Rhinotracheale (ORT) est une bactérie dont la culture in vitro est facilitée sous atmosphère enrichie en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Cependant, l'analyse des antibiogrammes fournis par 11 laboratoires vétérinaires privés, nous a alerté par une grande variabilité des résultats de sensibilité d'ORT vis-à-vis de la tilmicosine. Ces relevés émanent de la collecte de 959 antibiogrammes sur une période d'un peu plus de 3 ans (de janvier 2005 à mars 2008). Le pourcentage moyen de résistance des souches d'ORT isolées sur le terrain vis-à-vis de la tilmicosine est de 20%, avec des minima de 8% et des maxima de 32%. Suite à ce constat une première étude empirique est menée. Elle consiste à recontrôler une série d'isolats d'ORT sous atmosphère enrichie à 5% de CO<sub>2</sub> et en atmosphère normale. Ce premier pas a permis de confirmer une grande différence des diamètres de sensibilité à la tilmicosine. En effet, 80% des 20 isolats testés sont résistants à la tilmicosine lors de culture sous CO<sub>2</sub>, et plus que 15% en atmosphère normale.

En médecine humaine, James A. Retsema (1999), avait fait le même constat en étudiant les effets du pH et de l'atmosphère de culture sous CO<sub>2</sub>, vis-à-vis de l'azithromycine (macrolide de structure très proche de la tilmicosine).

Suite aux informations précédentes, nous avons étudié l'effet du pH du milieu de culture et de l'atmosphère de culture, vis-à-vis de la sensibilité de l'ORT pour la tilmicosine.

Ces deux paramètres sont réunis dans cette étude du fait de leur lien : une forte teneur en CO<sub>2</sub> dans un milieu en fait diminuer le pH.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Matériels

#### 1.1.1. Souches d'*Ornithobacterium* Rhinotracheale.

Pour l'étude de l'effet du taux de CO<sub>2</sub> lors de la réalisation de l'antibiogramme, 18 souches d'ORT ont été utilisées.

Elles ont été choisies aléatoirement à partir d'isollements terrain par mise en culture d'écouvillons trachéaux ou d'organes de dindes.

En comparaison, une souche ORT de référence, la souche ATCC51463, a également été contrôlée selon les mêmes méthodologies.

Pour le contrôle de l'influence du pH du milieu de culture sur la réalisation de l'antibiogramme, une souche de référence *Staphylococcus aureus* (ref. ATCC25923) est utilisée.

#### 1.1.2. Milieux et disques:

Des géloses enrichies à 5% de sang de mouton, sont utilisées pour l'étude de l'influence de l'atmosphère d'incubation. Elles sont composées d'un mélange de peptones (23 grammes), d'amidon (1 g), de chlorure de sodium (5 g), d'agar (10 g) et de sang (50 mL).

Et des géloses Mueller Hinton sont utilisées dans le cadre de l'étude sur l'influence du pH du milieu.

Elles sont réalisées à partir d'une infusion de viande de bœuf (300,0 ml), de peptone de caséine (17,5 g), d'amidon de maïs (1,5 g) et d'agar (17,0 g). Le pH standard est de 7,4.

Les disques sont chargés à 15µg de tilmicosine.

### 1.2. Méthode

La méthode retenue répond aux exigences culturelles de la bactérie (Euzéby, 1999).

Il s'agit de la diffusion à partir d'un disque imprégné de tilmicosine sur gélose au sang dans le cadre de l'étude liée à l'atmosphère et de gélose Mueller Hinton dans le cadre de l'étude liée au pH. Le CA-SFM (2008) indique les diamètres critiques suivants pour la tilmicosine sur les germes des volailles :

Sensible ≥ 11 mm et résistant < 11 mm.

La lecture des diamètres d'antibiogramme est réalisée après 24h d'incubation à 37°C. Le résultat correspond à la moyenne de deux répétitions.

Dans l'étude, les variables sont l'atmosphère d'incubation dans la partie évaluant l'influence du

CO<sub>2</sub> et le pH du milieu de culture dans un second temps (à atmosphère constante).

La détermination des teneurs en CO<sub>2</sub> pour l'atmosphère d'incubation est réalisée par l'utilisation d'une étuve à CO<sub>2</sub>.

Les atmosphères testées sont :

En atmosphère normale puis avec des teneurs en CO<sub>2</sub> de 2,5% ; 5% ; 7,5% et 10%.

Lors de la réalisation du milieu, le pH est ajusté par introduction de soude ou d'acide. Le milieu liquide est ensuite stérilisé. Le pH final, après stérilisation, est contrôlé sur un aliquote par un pH-mètre électronique étalonné quotidiennement.

Les pH testés sont de 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 et 8 unités.

## 2. RESULTATS

### 2.1. Influence de l'atmosphère d'incubation :

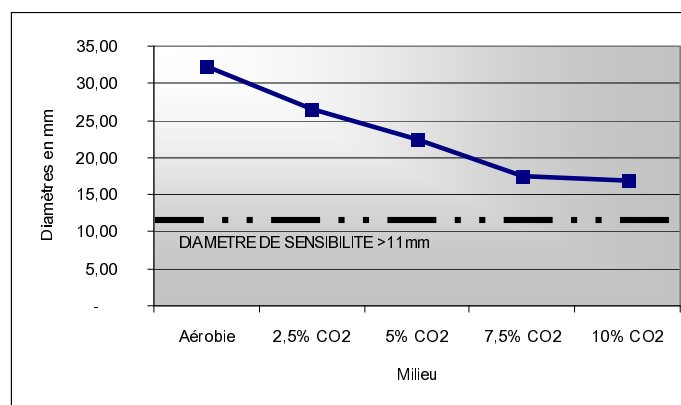
#### 2.1.1 Variation des diamètres en fonction de la teneur en CO<sub>2</sub>

Les moyennes des diamètres obtenus (en millimètres) sur les 18 souches terrain testées sont illustrées en fonction des atmosphères d'incubation dans la figure 2.

Sous influence du CO<sub>2</sub>, le diamètre de sensibilité à la tilmicosine diminue de manière quasi linéaire jusqu'à un taux de CO<sub>2</sub> de 7,5%. Pour chaque palier de 2,5% de CO<sub>2</sub> le diamètre perd entre 4,2 et 5,7 mm.

Au-dessus de 7,5% de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère d'incubation le diamètre diminue peu (0,7mm).

**Figure 2** : évolution des diamètres de sensibilité à la tilmicosine en fonction de l'atmosphère d'incubation.

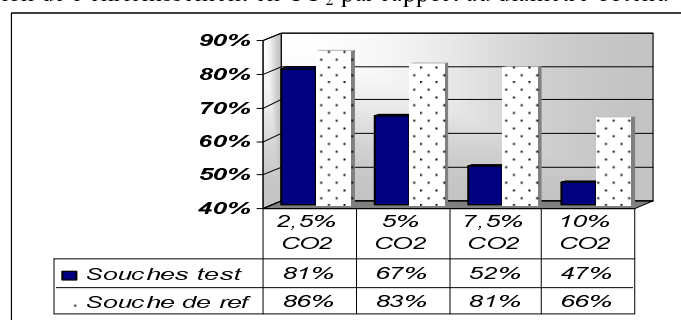


#### 2.1.2 Ecart des diamètres d'inhibition par rapport à l'incubation sous atmosphère normale (aérobiose).

La figure 3 permet d'illustrer, pour chaque concentration de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère d'incubation, le pourcentage de conformité des diamètres moyens par rapport au diamètre moyen en condition d'aérobiose.

Cette figure illustre la diminution des diamètres en corrélation avec l'enrichissement de l'atmosphère d'incubation en CO<sub>2</sub>. L'augmentation de l'écart entre les diamètres sous une atmosphère normale et sous les différents enrichissements en CO<sub>2</sub> est régulière.

**Figure 3** : pourcentage moyen de différence entre les diamètres de sensibilité à la tilmicosine des souches (test et de référence) en fonction de l'enrichissement en CO<sub>2</sub> par rapport au diamètre obtenu en atmosphère normale.

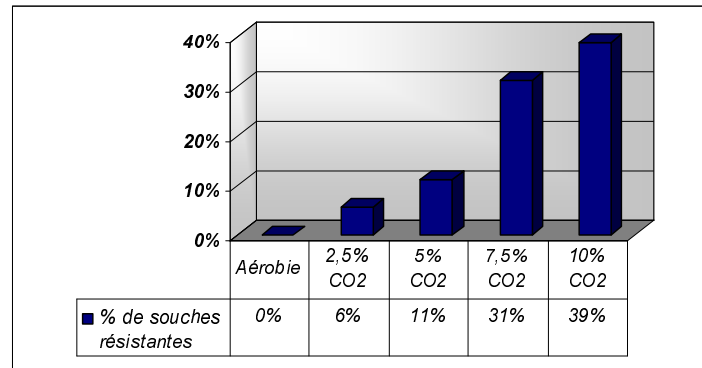


Du fait de la diminution des diamètres d'inhibition, les souches ayant un diamètre proche du diamètre critique en condition d'aérobie (qui est de 11mm) sont lues comme résistantes en atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>.

Le pourcentage de souches résistantes, pour chaque atmosphère, sur les 18 souches testées est illustré en figure 4.

Au fur et à mesure de l'enrichissement en CO<sub>2</sub> de l'atmosphère d'incubation, le nombre de souches classées résistantes est en croissance régulière.

**Figure 4** : pourcentage de souches d'ORT classées résistantes à la tilmicosine en fonction de l'atmosphère.



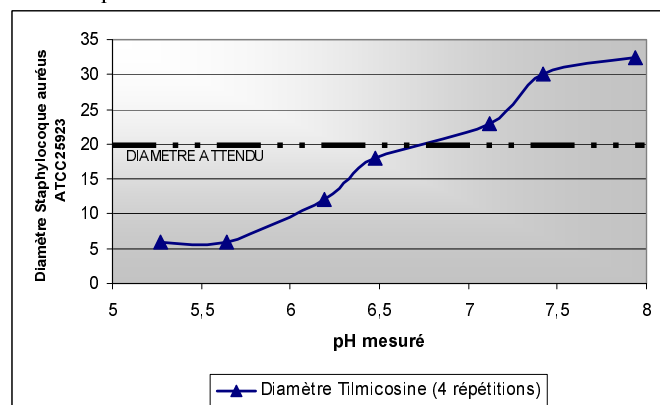
## 2.2. Influence du pH du milieu de culture

Le diamètre pour chaque pH résulte de la moyenne des diamètres obtenus lors de 4 répétitions. Seule une variation de diamètre de 1 mm est vue entre les répétitions au pH de 8.

La figure 5 illustre une augmentation des diamètres corrélée à une augmentation du pH.

Le diamètre attendu pour la souche de référence testée (*S. aureus* ATCC25923) est de 19mm. Il est obtenu pour un pH de milieu supérieur à 6,5 et inférieur à 7.

**Figure 5** : Influence du pH du milieu de culture sur le diamètre de sensibilité à la tilmicosine.



### 3. DISCUSSION

Ce travail a permis d'identifier une corrélation importante entre le pH du milieu et les diamètres d'interprétation des sensibilités *in vitro* à la tilmicosine.

Il est donc important de contrôler le pH du milieu utilisé, d'autant plus si le milieu est fabriqué directement dans le laboratoire d'analyse vétérinaire.

Le pH du milieu ne doit pas descendre sous les 6,5. Un pH proche de la neutralité (voire légèrement supérieur est souhaitable), ce qui est le cas des géloses au sang actuellement disponibles dans le commerce.

L'enrichissement en CO<sub>2</sub> et le pH étant liés, cette même corrélation est faite pour l'influence de l'enrichissement en CO<sub>2</sub> de l'atmosphère d'incubation sur les diamètres de sensibilité lors de la réalisation de ces antibiogrammes.

Il est important de le prendre en compte lors de la réalisation et de l'interprétation des résultats de lecture des antibiogrammes vis-à-vis de la tilmicosine.

L'incubation sous atmosphère normale semble être la meilleure sécurité. Or, même si elle est parfois possible (selon les souches), les caractéristiques culturelles d'ORT rendent l'obtention d'un antibiogramme lisible très aléatoire.

Il est donc préférable de trouver un compromis correct entre les besoins culturels de la bactérie et l'obtention d'un diamètre, pour la souche d'ORT contrôlée, au plus proche du diamètre indiqué par le CA-SFM (2008).

Au niveau du terrain la présence d'une étuve à CO<sub>2</sub> dans les laboratoires est très rare. Il s'agit d'un équipement "lourd".

De manière courante, la réalisation de l'atmosphère enrichie est permise par l'utilisation d'une jarre hermétique dans laquelle est allumée une bougie (exemple bougie chauffe-plat). L'enrichissement se faisant par le remplacement d'une partie de l'oxygène présent dans la jarre en CO<sub>2</sub> par combustion. Dans ce cadre la teneur en CO<sub>2</sub> est très variable et difficile à standardiser.

Une voie d'amélioration sur cette méthode est, lorsque la jarre est peu remplie, l'ajout de boîtes de Petri vides qui vont capturer du volume d'oxygène non disponible pour la combustion. On limite ainsi le CO<sub>2</sub> produit.

Il existe sur le marché des consommables, des générateurs d'atmosphère (ou sachets à CO<sub>2</sub>). Ils permettent un enrichissement annoncé allant de 2,5% de CO<sub>2</sub> à l'anaérobiose sur 24 h d'incubation. Cependant pour un générateur donné la tranche de concentration en CO<sub>2</sub> est large (exemple de 2,5% à 9,5% annoncé pour un modèle de sachet).

La mise en pratique, au niveau des laboratoires, d'un compromis entre pousse de la bactérie et diamètre d'inhibition de la tilmicosine est donc complexe.

Il pourrait alors être envisageable de doubler l'antibiogramme vis-à-vis de la tilmicosine avec une incubation en atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> (pour assurer la culture de l'ORT) et une incubation en atmosphère normale (pour un diamètre plus juste lors d'une pousse normale de la bactérie).

### CONCLUSION

Les conditions liées de pH et d'atmosphère d'incubation ont bien une influence sur les diamètres d'inhibition de la tilmicosine.

La perte de millimètres à la lecture est quasi linéaire entre 6 et 7,5 unités de pH. Entre un milieu à pH de 6 et un milieu à pH de 7, le diamètre est augmenté de 12mm.

Le pH du milieu de culture pour la détermination de la sensibilité *in vitro* à la tilmicosine doit être contrôlé (surtout pour les milieux "faits maison") de manière à être maintenu à la neutralité.

Plus l'atmosphère d'incubation sera riche en CO<sub>2</sub>, plus le diamètre de sensibilité sera faible, jusqu'au plateau après 7,5% de CO<sub>2</sub>. Pour un enrichissement de 2,5% on perd en moyenne 5 mm à la lecture du diamètre.

La mise sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> étant un biais majeur pour l'interprétation des diamètres de sensibilité à la tilmicosine, il convient de travailler à une concentration inférieure à 5% de CO<sub>2</sub>. La teneur de 2,5%, plus difficile à obtenir en routine, est le meilleur compromis entre besoin culturel et sensibilité *in vitro*.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Comité de l'antibiogramme – société française de microbiologie, recommandations janvier 2008, [www.sfm.asso.fr](http://www.sfm.asso.fr)  
 Euzéby J.P., Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, MAJ mai 1999, <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/oo/ornithobacterium.html>  
 Retsema J. A., Int J Antimicrob Agents, 1999 Mar;11 (Suppl 1),S15-21.