

IMPACT D'UNE SUPPLEMENTATION PAR LA PAROMOMYCINE SUR LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DE LA FLORE DIGESTIVE DE LA DINDE

KEMPF Isabelle^a, HELLARD Gwenaëlle^a, LE ROUX Aurélie^a,
RICHEZ Pascal^b et ETERRADOSSI Nicolas^c

^aAFSSA, UMB, Zoopole les croix, 22440 Ploufragan, France

^bTransPharm, BP 7, 34160 Saint Geniès des Mourgues, France

^cAFSSA, VIPAC, Zoopole les croix, 22440 Ploufragan, France

RESUME

Un antibiotique de la famille des aminoglycosides, la paromomycine, aurait un rôle protecteur vis-à-vis de l'histomonose, mais son administration sur des périodes prolongées chez la dinde risque de sélectionner des résistances à cette famille d'antibiotiques. Cet impact sur la flore digestive a été évalué lors d'un essai terrain de supplémentation de dindes futures reproductrices. Douze lots de dindes supplémentées par 100 ppm de paromomycine de l'éclosion (J0) à J120 ont été comparés à douze lots non supplémentés. Des prélèvements de fientes ont été effectués chaque mois de J0 à J180, et la sensibilité de deux bactéries indicatrices (*Escherichia coli* et *Enterococcus faecium*) et de deux bactéries zoonotiques (*Campylobacter spp.* et *Staphylococcus aureus*) a été analysée, soit par détermination des concentrations minimales inhibitrices, soit par diffusion en gélose. Les résultats ont montré que les *E. coli* isolés de dindes supplémentées étaient significativement plus fréquemment résistants à la paromomycine, la néomycine et la kanamycine, et ce jusqu'à un mois après l'arrêt de la supplémentation. Une apparente co-sélection de la résistance à l'amoxicilline ou à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole a été constatée. Pour *E. faecium*, les souches isolées de lots supplémentés étaient significativement plus fréquemment résistants à la kanamycine et à la streptomycine à J60 ou J90, le phénomène paraissant réversible en fin d'administration ou après l'arrêt de la supplémentation. Les souches de *S. aureus* d'oiseaux traités se révélaient significativement plus fréquemment résistants à la paromomycine, la kanamycine, la tobramycine et la néomycine. Le trop petit nombre de souches de *Campylobacter* isolées ne permet pas de conclure pour ce genre. Finalement cet essai démontre que la supplémentation par la paromomycine sélectionne fortement, mais de façon réversible après l'arrêt de la supplémentation, les bactéries résistants aux aminosides, en particulier pour *E. coli* et *S. aureus*.

ABSTRACT

Paromomycin, an aminoglycoside antimicrobial may have a prophylactic effect against histomoniasis but its long-term administration to turkeys during long periods may select for resistances to these antibiotics family. This effect-impact on the intestinal flora was assessed in a studied in a turkey future breeders supplementation field trial conducted in future breeder turkeys assay. Twelve turkey flocks supplemented from hatching (D0) until D120 were compared with 12 twelve non-supplemented flocks. Droppings/Feces were collected every each month from D0 until D180 and the susceptibilityensitivity of two indicator bacteria (*E. coli* and *Enterococcus spp.*) and two zoonotic bacteria (*Campylobacter* and *Staphylococcus aureus*) was studied by either according to determination of minimum inhibitory concentrations or the disk diffusion method. Results showed that *E. coli* strains isolated from supplemented turkeys were significantly more often resistant to paromomycin, neomycin and kanamycin, and this was observed up to one month after the end of the supplementation was withdrawnperiod. Apparently, co-selection was observed ofor resistance to amoxicillin and to trimethoprim-sulfamethoxazol was observed. For *E. faecium*, strains from the supplemented flocks were significantly more frequently resistant to kanamycin and streptomycin on D60 and D90, but this phenomenon was no longer observed at the end of or after the treatment period. *S. aureus* strains from treated birds were more often resistant to paromomycin, kanamycin, tobramycin and neomycin than those offrom non-un-treated birds. It was not possible to detect an effect on *Campylobacter* due to the small number of isolates obtained during

supplementation. Finally, this trial demonstrates that paromomycin supplementation strongly, but reversibly upon supplementation withdrawal, selects resistant bacteria to aminoglycosides, ~~in~~ particularly in *E. coli* and *S. aureus*.

Introduction

L'histomonose de la dinde est en recrudescence en France depuis l'interdiction du Nifursol intervenue en 2003, et constitue un important problème de santé animale. Un antibiotique de la famille des aminoglycosides, la paromomycine, pourrait avoir un rôle protecteur vis-à-vis de l'histomonose (Hafez et al., 2008), mais son administration sur des périodes prolongées chez la dinde risque de sélectionner des bactéries résistantes à cette famille d'antibiotiques. Nous avons donc souhaité évaluer cet impact sur la flore digestive lors d'un essai de supplémentation de dindes futures reproductrices, en ciblant deux espèces bactériennes indicatrices : *E. coli* et *Enterococcus faecium*, et deux espèces bactériennes zoonotiques : *Campylobacter* et *Staphylococcus aureus*. Pour cela la résistance d'isolats obtenus à partir de lots de dindes supplémentés a été comparée à celle d'isolats de lots non supplémentés.

Matériel et méthodes

Douze lots de dindes futures reproductrices reçoivent une alimentation supplémentée avec 100 ppm de paromomycine (HistoBloc®, Huvépharma, Antwerpen, Belgique) de J0 (arrivée dans l'élevage) à J120 (17 semaines) et sont comparés avec douze lots non supplémentés. Pour des raisons d'organisation, neuf élevages hébergent simultanément mais dans des bâtiments distincts, un lot traité et un lot non traité. Pour chaque lot suivi, un pool d'une quinzaine de matières fécales fraîches est récolté chaque mois et envoyé à l'AFSSA site de Ploufragan. Les prélèvements sont réalisés depuis J0 (arrivée des dindonneaux dans l'élevage, avant administration de l'aliment supplémenté ou non) jusqu'à 2 mois après la fin de l'administration (J180). Pour quelques lots, des prélèvements supplémentaires ont été effectués chaque semaine après la fin de la période d'administration.

Pour chacun des prélèvements, une recherche de *E. coli*, de *Enterococcus faecium*, de *Campylobacter* et de *Staphylococcus aureus* est menée en utilisant respectivement les milieux Mc Conkey, bile-esculine-azide, Karmali et milieu SA-Select (Biorad). Les souches sont identifiées à l'aide de galeries API20E (*E. coli*) ou par PCR (Depardieu et al., 2004, Denis et al., 1999, Zhang et al., 2004). Quand la recherche est positive, une colonie prise au hasard est conservée et sa sensibilité vis-à-vis d'aminosides et d'antibiotiques appartenant à d'autres familles est déterminée par diffusion en gélose selon le CA-SFM 2008 ou par détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) selon la norme e—CLSI correspondante (norme M31-A3).

Résultats

Escherichia coli

Le tableau 1 indique le nombre de souches testées et le nombre de souches résistantes (selon antibiogramme) pour les lots supplémentés (S) et les lots non supplémentés (NS).

Des différences significatives entre les répartitions de souches résistantes ou non résistantes des lots supplémentés ou non sont observées pour la néomycine et la kanamycine de J30 (premier prélèvement de la période d'administration) à J150 (un mois après l'arrêt de l'administration), pour la streptomycine à J60 et pour l'amoxicilline à J90. Quelques souches résistantes à la tobramycine, la nétilmicine ou la gentamicine sont isolées occasionnellement dans un lot traité et dans le lot non traité élevé sur le même site. Les différences de répartition ne sont plus significatives à J180 (deux mois après l'arrêt du traitement).

Les CMI de la paromomycine, la nétilmicine ou l'amikacine sont présentées dans le tableau 2. Jusqu'à J150, la plupart des souches isolées de lots traités sont résistantes à la paromomycine (CMI > 64 mg/l), mais des résistances sont également observées dans les lots non traités (de 1/12 à 6/12 souches). Le nombre de souches résistantes à la paromomycine est significativement différent entre les lots traités et non traités à J30, J90 et J120.

Les CMI de la nétilmicine sont inférieures ou égales à 2 mg/L pour tous les isolats à l'exception de quatre isolats obtenus à partir de 2 lots traités. Les CMI de l'amikacine sont inférieures ou égales à 4 mg/l à l'exception de quelques isolats obtenus après la période de traitement.

Ainsi pour la période J30 à J120, 21 des 47 isolats de lots non traités sont sensibles à toutes les molécules testées à l'exception de la tétracycline, alors que pour les isolats des lots traités, le profil de résistance le plus commun est paromomycine, néomycine, kanamycine, streptomycine et tétracycline.

Enterococcus faecium

Aucun Entérocoque n'est isolé à J0. Par la suite des souches de *E. faecium* sont obtenues à partir de la majorité des échantillons sauf à J180. Les antibiogrammes par diffusion montrent que les souches isolées d'oiseaux traités sont plus fréquemment résistantes à la kanamycine et à la streptomycine à J60 et J90 mais cette différence n'est plus observée par la suite. Aucune résistance de haut niveau à la gentamicine n'est observée (tableau 3).

S. aureus

Compte tenu du faible nombre de souches de *S. aureus* isolées, les souches obtenues lors de prélèvements supplémentaires réalisés les premières semaines après la fin du traitement ont été incluses dans l'analyse. Pour les lots non traités une souche est obtenue à J60 à partir d'un lot, huit autres souches sont isolées après J120 à partir de six lots différents. Pour les oiseaux traités, quinze isolats sont obtenus mais seulement cinq ont été isolés pendant la période de traitement. Ces souches proviennent de six lots traités. La sensibilité des souches est donnée dans les tableaux 4 et 5. Les neuf souches isolées de lots non traités sont sensibles à tous les aminosides testés, alors que des résistances sont observées pour les souches isolées de lots traités pour la néomycine (6/15), la kanamycine (8/15), la tobramycine (9/15) ou l'amikacine (4/15). Les souches résistantes à ces aminosides sont obtenues à partir du lot 1/05 à J90 et J120, du lot 1/13 (cinq isolats après la fin du traitement) et du lot 1/16 après la fin du traitement. Les distributions des souches résistantes à la néomycine, kanamycine ou tobramycine sont significativement différentes entre lots traités ou non traités. La détermination des CMI montre que la plupart des souches isolées de lots traités sont résistantes à la paromomycine, contrairement aux souches des lots non traités. Les douze isolats résistants à la paromomycine proviennent de cinq lots traités.

Campylobacter

Pour les lots non traités, seulement cinq souches sont isolées, deux pendant et trois après la période de traitement. Toutes ces souches sont sensibles aux antibiotiques testés (paromomycine, nétilmicine, amikacine, gentamicine, streptomycine, érythromycine, tétracycline et ciprofloxacine), à l'exception d'une souche résistante à la ciprofloxacine et de deux souches résistantes à la tétracycline. Pour les lots traités, seules trois souches sont obtenues après la période de traitement et sont sensibles aux antibiotiques testés, à l'exception d'une souche résistante à la ciprofloxacine et de deux souches résistantes à la tétracycline.

Discussion – conclusion

Cette expérience de supplémentation montre une nette sélection de souches de *E. coli* résistantes à la paromomycine, à la néomycine et à la kanamycine,

dès le premier prélèvement (un mois après le début du traitement) et jusqu'à un mois après la fin du traitement. Une ~~éventuelle apparente~~ co-sélection vis-à-vis de la streptomycine, de l'amoxicilline ou de l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole ~~devra être envisagée au vu des résultats montrant des augmentations isolées et sporadiques de résistance, notamment par des études de conjugaison est parfois notée et semble confirmée par les essais de conjugaison en cours.~~ Il ne semble pas y avoir de sélection vis-à-vis d'autres aminosides d'intérêt médical tels que gentamicine, tobramycine, nétilmicine ou amikacine. Pour *E. faecium* une sélection vis-à-vis de la kanamycine et de la streptomycine est observée en cours de traitement mais n'est plus significative après la fin du traitement. Pour *S. aureus*, les souches isolées de lots traités sont significativement plus souvent résistantes à la paromomycine, la néomycine, la kanamycine et la tobramycine et semblent persister au moins quelques semaines après la fin du traitement. Le faible nombre de souches de *Campylobacter* isolées ne permet pas d'évaluer l'impact de cette supplémentation sur ce genre.

Il est toutefois à remarquer que si les résultats d'antibiogramme pour la néomycine et la kanamycine ou de CMI de la paromomycine entre les *E. coli* de dindes traitées et ceux de dindes non traitées ne sont pas significativement différents à J180, les souches isolées de dindes traitées sont significativement plus souvent résistantes que des souches isolées de dindes à l'abattoir en 2006-2007 (4/12 souches résistantes à néomycine et kanamycine à J180 vs 1/32 souche résistante pour les isolats de 2006-2007 ; 6/12 souches résistantes à la paromomycine à J180 vs 1/34 pour les isolats de 2006-2007, I. Kempf données personnelles). Il est ~~possible~~ ~~probable~~ que la proximité des lots traités et non traités, souvent élevés sur le même site ait facilité la diffusion des résistances observées des lots traités vers les lots non traités. De plus la présence éventuelle sur certains plasmides de gènes de résistance vis-à-vis de la paromomycine associés à des gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques peut également avoir contribué à favoriser la persistance de souches multirésistantes après traitement des lots suivis par des molécules autres que la paromomycine. L'étude prochaine des mécanismes de résistance et de leurs supports génétiques devrait permettre de mieux comprendre les phénomènes de co-sélection ou de persistance observés.

REMERCIEMENTS : les auteurs remercient très sincèrement toutes les personnes qui ont participé à ce travail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bismuth, R. 2006. In : Antibiogramme. P. Courvalin, R. Leclercq and E. Bingen. Paris, Ed. ESKA : pp205-225.

Denis M, Soumet C, Rivoal K, Ermel G, Blivet D, Salvat G, et Colin P., 1999. Lett Appl Microbiol.,(29),406-10.
 Depardieu F, Perichon B, Courvalin P., 2004. J Clin Microbiol.(42),5857-5360
 Hafez H.M., Lotfi, A., Comte S., 2008. 7th International Symposium on Turkey Diseases, Berlin, pp18-19
 Lambert, T. 2006. In : Antibiogramme. P. Courvalin, R. Leclercq and E. Bingen. Paris, Ed.ESKA.pp227-246
 McDougald, L. R. 2008., In : Diseases of poultry, 12th edition. Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson et al.
 Ames, Iowa, USA, Blackwell Publishing: 1095-1105.
 Société française de microbiologie 2008. "Recommandations du comité de l'antibiogramme."
 Veyssier P., 1999, In : Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques, A Bryskier, Ellispes éditions.
 Zhang K., Sparling J., Chow B.L., Elsayed S., Hussain Z., Church D.L., Gregson D.B., Louie T., Conly J.M.,
 2004, J. Clin. Microbiol. 42(11): 4947-55

Tableau 1: antibiogramme des souches de *E. coli* isolées de lots supplémentés (S) ou non supplémentés (NS)

	LOT	N ^a	NEO	KAN	TOB	NET	GEN	AMK	STR	AMX	AMC	LEX	CTX	TET	CHL	NAL	CIP	SXT
J1	NS	12	0 ^b	1	0	0	1	0	2	2	0	0	0	8	3	0	0	0
	S	12	1	1	1	0	1	0	4	1	0	0	0	10	2	0	0	0
J30	NS	12	3*	3*	0	0	0	0	6	4	0	0	0	11	1	0	0	2
	S	12	10*	10*	1	1	1	0	6	5	0	0	0	12	2	1	0	4
J60	NS	12	3**	3**	0	0	0	0	2*	2	0	1	0	11	1	0	0	2
	S	12	11**	11**	2	0	2	0	8*	5	0	0	0	12	2	0	0	6
J90	NS	12	3*	3*	0	0	0	0	3	2**	0	0	0	12	0	1	0	3
	S	12	10*	10*	1	0	1	0	8	10**	0	0	0	12	2	0	0	8
J120	NS	11	3*	3*	0	0	0	0	5	4	0	0	0	11	0	0	0	3
	S	12	9*	9*	1	1	1	0	8	4	0	0	0	12	0	0	0	5
J150	NS	12	3*	3*	2	0	0	0	5	1	0	1	0	12	2	0	0	4
	S	12	9*	10*	1	1	0	0	8	5	0	0	0	12	1	0	0	3
J180	NS	12	0	0	2	1	0	0	2	2	0	0	0	12	0	0	0	2
	S	12	4	4	1	0	0	0	2	3	0	0	0	11	1	0	0	0

N^a: nombre de souches testées ; ^B : nombre de souches trouvées résistantes
 * différence significative (p<0,05) ; ** différence très significative (p<0,01)

Tableau 2 : concentrations minimales inhibitrices des souches de *E. coli* (en mg/L)

Jour	lot	N ^a	paromomycine					nétilmicine					amikacine				
			2	4	8	16	>64	0,2 5	0,5	1	2	4	8	1	2	4	8
J1	NS	12	2 ^b	9			1	4	5	2	1			1	8	4	
	S	12	3	9				5	6	0	1				4	8	
J30	NS	12	2	8	1		1*	3	8	1					7	5	
	S	12		1			11*	3	7	1	0	0	1 _a	1	8	3	
J60	NS	12		6			6	2	9	1				1	10	1	
	S	12		1			11	3	7	0	0	2 ^b			9	3	
J90	NS	12		7	1		2*		7	3					7	3	
	S	12		2			10*		11				1 _c		9	3	
J120	NS	10		3	4		3*		2	8					3	7	
	S	11		2			9*		5	5	1				3	7	1 ^d
J150	NS	12	1	5		1	5		3	12					9	2	1 ^e
	S	12		1	1		10		5	7					8	3	1 ^f
J180	NS	12		7	2	2	1		3	7	2				7	5	
	S	12		5	1		6		3	8		1			6	5	1

Na : nombre de souches testées ; B : nombre de souches pour la CMI ; *répartition significativement différente

Tableau 3 : antibiogramme des souches de *E. faecium*

jour		LOT	N ^a	KAN	GEN	STR	AMP	TET	CHL	SXT	VAN	TEC	ERY	LIN	PST
J30	NS		11	2 ^b	0	2	0	11	4	0	0	0	8	11	0
	S		11	6	0	5	0	10	2	0	1	1	9	11	2
J60	NS		12	1**	0	1*	0	11	2	1	0	0	8	10	0
	S		12	8**	0	7*	0	12	3	0	0	0	8	10	0
J90	NS		12	0*	0	0*	0	10	0	0	0	0	9	11	0
	S		12	6*	0	5*	0	12	1	1	0	0	7	10	0
J120	NS		11	2	0	4	0	11	3	0	0	0	7	10	0
	S		10	3	0	2	0	10	2	0	0	0	8	10	1
J150	NS		9	0	0	1	0	8	3	1	0	0	5	8	0
	S		10	4	0	4	0	10	0	0	0	0	9	8	0
J180	NS		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	4	0
	S		5	2	0	2	0	5	0	0	0	0	4	3	0

N^a : nombre de souches testées ; -^b : nombre de souches trouvées résistantes ; * différence significative (p<0,05) ; ** différence très significative (p<0,01)

Tableau 4: Antibiogramme des souches de *S. aureus*

lot	N ^A	NEO	KAN	TOB	NET	GEN	AMK	STR	P	FOX	TET	CHL	SXT	VAN	ERY	LIN	PST
NS	9 ^B	0*	0**	0**	0	0	0		6	0	8	0	0	0	0	1	0
S	15	6*	8**	9**	0	0	4	0	6	0	13	1	0/12	0	0	1	0

N^a : nombre de souches testées

-^b : nombre de souches trouvées résistantes

* différence significative (p<0,05) ; ** différence très significative (p<0,01)

Tableau 5: CMI des souches de *S. aureus* (en mg/L)

lot	N ^a	paromomycine					amikacine				nétilmicine					
		1	2	4	32	>=64	1	2	4	8	0.25	0.5	1	2	4	8
NS	9	3	5	1			1	4	4		4	5				
S	14		3			11		2	12		6	8				

- N^a : nombre de souches testées