

# EPIDEMIOSURVEILLANCE DE L'ANTIBIORESISTANCE DES BACTERIES PATHOGENES CHEZ L'ANIMAL

---

J.L. MARTEL [1]

**RESUME :** Le CNEVA Lyon, Laboratoire de Pathologie Bovine anime un réseau national de surveillance de l'antibiorésistance basé sur une quarantaine de laboratoires départementaux de diagnostic vétérinaire.

Ces laboratoires ont recours à des méthodes hautement standardisées. Ce réseau permet de recueillir des données sur l'antibiorésistance des souches pathogènes isolées en médecine vétérinaire et de collecter des souches utilisées pour étudier les mécanismes de résistance aux antibiotiques.

Ce réseau pourrait être connecté à d'autres systèmes de surveillance compatibles, développés en médecine humaine ou dans les domaines de l'agro-alimentaire et de l'environnement, pour évaluer l'importance pour la santé publique de la résistance et de la diffusion des facteurs de résistance.

**ABSTRACT :** A national network based on 40 regional veterinary diagnosis laboratories is managed by a central reference laboratory in CNEVA Lyon.

Highly standardized methods are used in these diagnosis laboratories. This network collects up to date informations on antimicrobial resistance in veterinary isolates and gathers strains relevant for analysis of mechanisms of resistance to antibiotics. It could be connected to other compatible systems developed in other fields such as human medicine, food and environment, to evaluate importance of resistance and resistance factors spread for public health.



## I - INTRODUCTION

Il y a un demi siècle, la pénicilline venait d'être introduite en médecine humaine et ses premiers succès marquèrent la première phase de l'histoire de l'antibiothérapie qui est restée limitée à la médecine humaine pratiquement jusqu'à la fin des années quarante en raison essentiellement des difficultés, et donc du coût, de production.

L'antibiothérapie apparaît en médecine vétérinaire dès le début des années cinquante avec la diversification des familles de molécules anti-infectieuses.

Aujourd'hui, les antibiotiques représentent la première classe de médicaments et les deux médecines en tirent de très grands profits pour maîtriser les maladies infectieuses

de l'Homme et des animaux. L'utilisation des antibiotiques chez les animaux de rente a permis le développement de l'élevage moderne pour répondre à la demande croissante de protéines animales dans des conditions de sécurité alimentaire de plus en plus strictes : utilisés à des doses qui prennent en compte les concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour les bactéries pathogènes, ils occupent la première place dans le chiffre d'affaire des **médicaments vétérinaires** dans les pays développés (figure 1). Certains antibiotiques sont aussi utilisés à des doses beaucoup plus faibles comme **additifs alimentaires** en raison de leur effet promoteur de croissance.

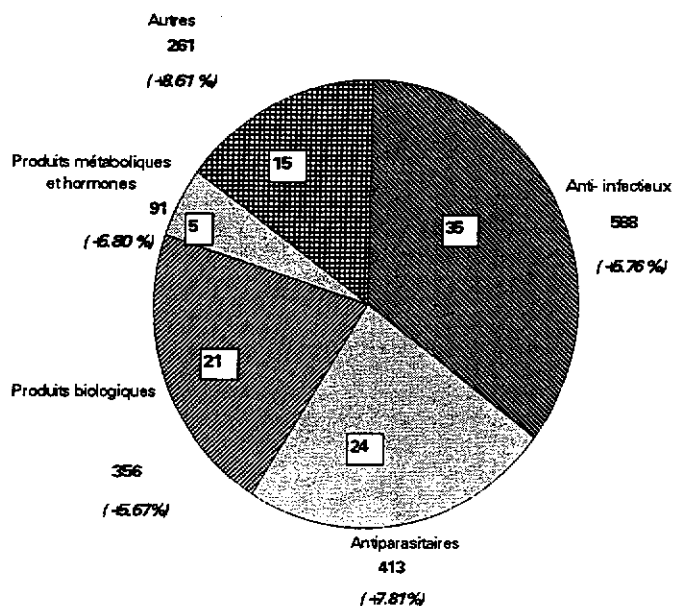
---

[1] Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires, Laboratoire de Pathologie Bovine, 31, avenue Tony Garnier - BP 7033, 69342 Lyon Cedex 07, France

FIGURE 1

**Importance des anti-infectieux dans le marché du médicament vétérinaire au sein de l'Union européenne  
 (Luxembourg et Grèce exclus)**

Chiffres d'affaires en millions d'Ecu en 1993  
 Augmentation annuelle (prix constants) entre 1989 et 1993  
 Source : FEDESA, Bruxelles, 1995



En France, premier pays d'élevage de l'Union européenne et dont le marché du médicament vétérinaire arrive largement en tête (tableau I), 75 p. cent des antibiotiques utilisés chez l'animal sont administrés aux bovins par différentes voies (figure 2).

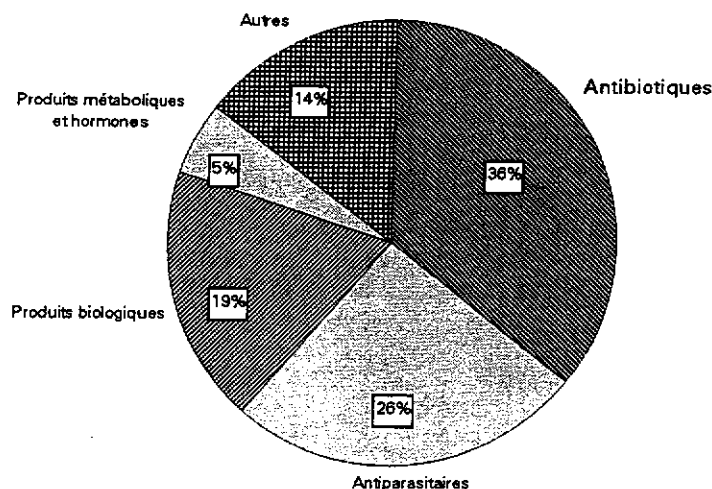
TABLEAU I

**Importance des antibiotiques dans le marché du médicament vétérinaire  
 au sein de l'Union européenne (Luxembourg et Grèce exclus)**  
 Chiffres d'affaires (en millions d'Ecu) et augmentation annuelle à prix constants (p. cent) entre 1989 et 1993  
 Source : FEDESA, Bruxelles, 1995

	CHIFFRES D'AFFAIRES (1993)	POURCENTAGE DE L'AUGMENTATION ANNUELLE A PRIX CONSTANTS
France	172	8,27
Allemagne	102	11,50
Espagne	77	0,58
Royaume Uni	71	13,12
Italie	71	-4,81
Pays-Bas	40	4,91
Belgique	18	5,59
Danemark	17	7,84
Irlande	13	14,34
Portugal	7	2,70
<b>Total U.E.</b>	<b>588</b>	<b>5,76</b>

FIGURE 2

**Importance des antibiotiques dans le marché français du médicament vétérinaire en 1984**  
**Chiffres d'affaires en millions de francs français et augmentation en francs constants entre 1993 et 1994**  
Source : SIMV, Paris, 1995



Mais l'utilisation des antibiotiques aux doses thérapeutiques conduit à la sélection, aussi bien chez l'animal que chez l'Homme, de souches résistantes et par conséquent, à des échecs thérapeutiques. Le problème de la sélection chez l'animal de souches résistantes de bactéries responsables d'infections zoonotiques potentiellement pathogènes pour l'Homme a été posé très tôt. Un groupe d'experts réunis en 1977 à Genève sous l'égide de l'OMS recommandait de surveiller la résistance des Entérobactéries en médecine vétérinaire.

Responsable de la surveillance des principales infections bactériennes des bovins en France, j'étais confronté à cette

époque à une explosion de salmonelloses septicémiques chez le veau de boucherie dues à des souches *S. dublin*, puis *S. typhimurium*, multirésistantes.

J'ai donc été amené à mettre en place un réseau d'épidémiologie de ce phénomène chez les principales bactéries pathogènes des bovins en France.

Je rappellerai ici la méthodologie choisie avant de présenter quelques résultats parmi les plus significatifs me permettant de discuter l'intérêt de cette démarche pour la santé publique.

## II - MATERIEL ET METHODES

Nous avons choisi une approche multicentrique [12, 13] s'appuyant sur le volontariat des laboratoires de biologie vétérinaire acceptant de nous communiquer les résultats des antibiogrammes qu'ils effectuent en routine lors des diagnostics bactériologiques. Cette adhésion implique évidemment la standardisation de la méthodologie employée par chacun des membres du réseau.

### A. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES BACTERIES PATHOGENES

Les méthodes conventionnelles de la bactériologie clinique sont mises en œuvre dans les Laboratoires vétérinaires départementaux (LVD) chargés habituellement du diagnostic

bactériologique en santé animale et qui constituent les principaux laboratoires de base du réseau.

Les espèces bactériennes choisies pour la surveillance sont responsables de la pathologie digestive (*E. coli* et *Salmonella enterica*), de la pathologie respiratoire (*Pasteurella multocida* et *Pasteurella haemolytica*) et de la pathologie mammaire (*Staphylococcus* et *Streptococcus*).

L'identification des espèces bactériennes est complétée par l'analyse antigénique des *Salmonella* et la recherche de l'expression du facteur K99 chez les *E. coli* isolés de diarrhées néonatale du veau. Les *Staphylococcus* sont classés en fonction de l'expression ou non d'une coagulase. L'identification des espèces de *Streptococcus* est facilitée par l'utilisation d'une mini galerie API 20 Strep (bioMérieux Lyon - France).

## B. ANTIBIOGRAMME

Les LVD mettent en œuvre la méthode de diffusion à partir des disques antibiotiques [8]. Deux systèmes sont largement commercialisés en France : le système bioMérieux qui permet de tester 12 antibiotiques dans des boîtes de Pétri rondes de 90 mm de diamètre et le système Sanofi Diagnostics Pasteur qui permet de tester 16 antibiotiques dans des boîtes de Pétri carrées de 120 mm de côté.

Le milieu de Mueller Hinton employé seul pour les *Enterobacteriaceae* peut être supplémenté par de l'extrait de levure à 3 pour mille pour les *Pasteurellaceae*, par 5 p. cent de sérum de cheval ou 5 p. cent de sang défibriné de mouton pour les *Pasteurellaceae* et les coques à coloration de Gram positive.

Le contrôle de la qualité de la méthodologie est assuré par la réalisation d'antibiogrammes de souches étalons *E. coli* et *Staphylococcus aureus* délivrées par le CNEVA Lyon.

## C. ENREGISTREMENT DES RESULTATS

Les LVD adressent régulièrement au CNEVA Lyon les résultats de leurs antibiogrammes au moyen de formulaires préétablis permettant la saisie informatique des données suivantes :

- localisation géographique, date et conditions cliniques de l'isolement des bactéries pathogènes identifiées,
- paramètres caractérisant la méthode de l'antibiogramme utilisée,
- résultats bruts de l'antibiogramme exprimés quantitativement en termes de diamètres des zones d'inhibition.

## D. ENREGISTREMENT ET TRAITEMENT DES DONNEES

La saisie informatique effectuée au CNEVA Lyon permet de constituer une banque de données intégrée dans un réseau

local de micro-ordinateurs calculant automatiquement un certain nombre de paramètres statistiques et permettant d'établir des bilans périodiques :

- Fréquence des résistances (critères thérapeutiques). L'interprétation des résultats en termes de sensibilité thérapeutique est faite en suivant les recommandations [6] du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM)). Une souche est considérée sensible quand la zone d'inhibition a un diamètre supérieur ou égal à la valeur seuil publiée régulièrement par le CA-SFM [9].
- Distribution des diamètres des zones d'inhibition (détection des résistances génétiques). Les histogrammes des fréquences des diamètres des zones d'inhibition permettent d'analyser leur mode de distribution et d'apprécier le comportement homogène ou hétérogène d'une population bactérienne définie taxonomiquement et d'en déduire éventuellement, en cas d'hétérogénéité, l'existence d'au moins un mécanisme de résistance à l'antibiotique étudié. Dans ce cas, les souches concernées sont réclamées aux LVD pour étude complémentaire.

## E. ETUDES COMPLEMENTAIRES

Elles sont effectuées par le CNEVA Lyon qui détermine les CMI par la méthode de dilution en gélose [7]. Si un nouveau phénomène de résistance est détecté, la diffusion et la persistance des souches sont recherchées dans l'élevage d'origine lorsque l'enquête rétrospective est possible.

Puis l'étude du mécanisme génétique et/ou biochimique est entreprise en général en partenariat avec des équipes spécialisées de l'INRA (Tours), du CNRS (Institut Pasteur), ou de l'Université (Faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand) dont les travaux sont cités en référence.

# III - RESULTATS

En juillet 1995, près de 14 000 antibiogrammes (190 000 données) dont 35 p. cent concernent des *E. coli*, ont été collectés d'une quarantaine de LVD couvrant les principales régions d'élevage bovin en France.

## A. ANTIBIOGRAMMES DES SOUCHES DE REFERENCE

Le tableau II présente les diamètres des zones d'inhibition obtenus avec la souche de référence *E. coli* 132, et le tableau III avec *Staphylococcus aureus* 7625.

Les résultats sont regroupés en fonction du système commercial utilisé.

TABLEAU II

Moyenne des diamètres des zones d'inhibition (m en millimètres) obtenus dans les laboratoires du réseau avec la souche de référence interne *E. coli* 0132

ANTIBIOTIQUES	METHODE				ANALYSE STATISTIQUE TEST DE STUDENT
	Sanofi diagnostics Pasteur		Bio-Mérieux		
	m	$\sigma$	m	$\sigma$	
Ampicilline	18.0	2.55	16.7	3.00	S <sup>1</sup>
Céphalotine	18.5	2.34	18.6	3.16	NS <sup>2</sup>
Gentamicine	23.3	2.48	23.2	2.80	NS
Apramycine	19.0	1.81	18.3	2.01	S
Colistine	18.7	1.60	14.3	1.60	HS <sup>3</sup>
Polymyxine B	17.6	1.52	15.3	2.01	S
Triméthoprime	18.5	2.53	17.3	1.38	S
Acide nalidixique	25.9	2.43	23.6	2.15	HS
Furanes	17.6	2.35	16.5	1.61	S

1 S : Différence significative (p : 0,05)  
 2 NS : Différence non significative  
 3 HS : Différence hautement significative (p : 0,01)

TABLEAU III

Moyenne des diamètres des zones d'inhibition (en millimètres) obtenus dans les laboratoires du réseau avec la souche de référence interne *S. aureus* 7625

ANTIBIOTIQUES	METHODE				ANALYSE STATISTIQUE TEST DE STUDENT
	Sanofi diagnostics Pasteur		Bio-Mérieux		
	m	$\sigma$	m	$\sigma$	
Pénicilline	31.1	3.33	30.5	4.09	NS <sup>2</sup>
Ampicilline	30.5	2.92	29.9	3.64	NS
Céphalothine	29.1	4.89	26.6	6.52	S <sup>1</sup>
Céphopérazone	26.5	2.14	25.4	2.87	S
Méthicilline	25.3	2.91	21.6	3.76	S
Streptomycine	19.0	2.26	19.4	2.83	NS
Tétracycline	25.8	3.49	23.5	4.35	S
Chloramphénicol	24.2	2.74	24.1	2.83	NS
Spiramycine	25.9	2.89	25.6	3.81	NS

1 S : Différence significative (p : 0,05)  
 2 NS : Différence non significative

## B. COMPARAISON DES FREQUENCES DE RESISTANCE

Différentes populations de souches sauvages ont été choisies pour comparer les fréquences de résistance (critère thérapeutique) selon :

- l'âge des animaux infectés par *E. coli* (tableau IV),
- l'expression (ou non) de l'antigène K99 par les *E. coli* isolés de diarrhée de veaux (tableau V),
- le sérovar des salmonelles isolé des bovins malades (tableau VI),
- l'espèce de *Pasteurella* isolée de l'appareil respiratoire des bovins malades (tableau VII).

**TABLEAU IV**  
**Comparaison des fréquences de résistances de *E. coli* en fonction de l'âge**

ANTIBIOTIQUES	CMI <sup>1</sup>	ANIMAUX INFECTES			
		VEAUX		ADULTES	
		n <sup>2</sup>	Pourcentage <sup>3</sup>	n <sup>2</sup>	Pourcentage <sup>3</sup>
Ampicilline	4	2736	76 (75-78)	2058	18 (16-20)
Streptomycine	8	2716	85 (84-87)	1609	23 (21-25)
Néomycine	8	1704	57 (55-59)	1258	09 (08-11)
Gentamicine	4	2884	12 (11-13)	1991	00 (00-01)
Chloramphénicol	8	2916	73 (71-74)	2055	16 (14-17)
Tétracycline	4	2667	88 (86-89)	2025	34 (32-36)
Sulphonamides	100	2022	86 (85-88)	1072	22 (20-24)
Sulphonamides/Triméthoprime	2/38	2343	36 (35-38)	1354	08 (07-10)
Furanes	25	2253	10 (09-11)	1573	01 (01-02)
Acide nalidixique	8	1998	21 (20-23)	1313	02 (01-03)

1. Concentration minimale inhibitrice (mg/l) seuil recommandé par le comité français de l'antibiogramme
2. Nombre de souches testées
3. Pourcentage de souches résistantes (intervalle de confiance)

**TABLEAU V**  
**Comparaison des fréquences de résistance de *E. coli* isolées sur des veaux malades en fonction de la présence ou de l'absence de l'antigène K99**

ANTIBIOTIQUES	CMI <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>			
		K99+		K99-	
		n <sup>2</sup>	Pourcentage <sup>3</sup>	n <sup>2</sup>	Pourcentage <sup>3</sup>
Ampicilline	4	1051	92 (90-94)	2736	76 (75-78)
Streptomycine	8	1095	95 (93-97)	2716	85 (84-87)
Néomycine	8	0633	70 (66-74)	1704	57 (55-59)
Gentamicine	4	1184	12 (10-14)	2884	12 (11-13)
Chloramphénicol	8	1133	88 (86-90)	2916	73 (71-74)
Tétracycline	4	1078	94 (92-95)	2667	88 (86-89)
Sulphonamides	100	0660	88 (85-90)	2022	86 (85-88)
Sulphonamides/Triméthoprime	2/38	0848	36 (33-39)	2343	36 (35-38)
Furanes	25	0698	29 (26-33)	2253	10 (09-11)
Acide nalidixique	8	0832	31 (28-34)	1998	21 (20-23)

1. Concentration minimale inhibitrice (mg/l) seuil recommandé par le comité français de l'antibiogramme
2. Nombre de souches testées
3. Pourcentage de souches résistantes (intervalle de confiance)

TABLEAU VI

Comparaison des fréquences de résistance de *Salmonella* isolées sur des bovins malades en fonction de leur sérovar

ANTIBIOTIQUES	CMI <sup>1</sup>	SEROVARS					
		<i>S. typhimurium</i>		<i>D. dublin</i>		Autres	
		n <sup>2</sup>	Pourcentage <sup>3</sup>	n <sup>2</sup>	Pourcentage <sup>3</sup>	n <sup>2</sup>	Pourcentage <sup>3</sup>
Ampicilline	4	804	64 (61-67)	332	17 (13-21)	208	05 (02-18)
Streptomycine	8	762	79 (76-82)	307	71 (66-76)	204	23 (17-29)
Néomycine	8	444	35 (31-39)	351	22 (18-26)	155	05 (02-08)
Gentamicine	4	823	04 (03-05)	336	00 (00-02)	218	00 (00-02)
Chloramphénicol	8	820	70 (67-73)	334	46 (41-51)	214	15 (10-20)
Tétracycline	4	809	85 (83-87)	335	46 (41-51)	189	36 (29-43)
Sulphonamides	100	753	52 (49-55)	272	59 (53-65)	163	28 (21-35)
Sulphonamides/Triméthoprime	2/38	619	25 (22-28)	357	03 (01-05)	135	04 (01-07)
Furanes	25	548	57 (53-61)	324	30 (25-35)	198	14 (09-19)
Acide nalidixique	8	717	21 (18-24)	291	09 (06-12)	193	13 (08-18)

1. Concentration minimale inhibitrice (mg/l) seuil recommandé par le comité français de l'antibiogramme
2. Nombre de souches testées
3. Pourcentage de souches résistantes (intervalle de confiance)

TABLEAU VII

Comparaison des fréquences de résistance de *Pasteurella* selon l'espèce bactérienne

ANTIBIOTIQUES	CMI <sup>1</sup>	PASTEURELLA			
		<i>haemolytica</i>		<i>multocida</i>	
		n <sup>2</sup>	Pourcentage <sup>3</sup>	n <sup>2</sup>	Pourcentage <sup>3</sup>
Ampicilline	4	424	61 (56-66)	316	11 (08-15)
Streptomycine	8	400	93 (90-95)	306	69 (64-74)
Néomycine	8	238	49 (43-55)	194	47 (40-54)
Gentamicine	4	424	17 (14-21)	322	17 (13-22)
Chloramphénicol	8	430	35 (31-40)	322	30 (25-35)
Tétracycline	4	417	71 (67-75)	320	48 (43-54)
Sulphonamides	100	383	79 (75-83)	290	59 (53-65)
Sulphonamides/Triméthoprime	2/38	280	39 (34-35)	218	17 (13-23)
Furanes	25	373	04 (03-07)	282	06 (04-09)
Acide nalidixique	8	304	31 (26-36)	183	21 (16-28)

1. Concentration minimale inhibitrice (mg/l) seuil recommandé par le comité français de l'antibiogramme
2. Nombre de souches testées
3. Pourcentage de souches résistantes (intervalle de confiance)

### C. DISTRIBUTION DES DIAMETRES DES ZONES D'INHIBITION

#### ➤ Distribution unimodale

La figure 3 donne deux exemples de distribution unimodale des diamètres des zones d'inhibition obtenues avec la colistine testée sur 3 238 souches de colibacilles et 826 souches de *S. typhimurium* isolées de veaux malades.

La figure 4 fournit un autre exemple de distribution unimodale obtenue avec la spiramycine testée sur 124 souches de *P. haemolytica*.

FIGURE 3

Distribution unimodale des diamètres des zones d'inhibition obtenue avec la colistine testée sur 3 238 souches de terrain de *E. coli* K99 négatif et 826 souches de terrain de *S. typhimurium* isolées sur des veaux malades  
*Salmonella* apparaît comme plus sensible que *E. coli*, mais aucun mécanisme spécifique de résistance acquise ne peut être détecté

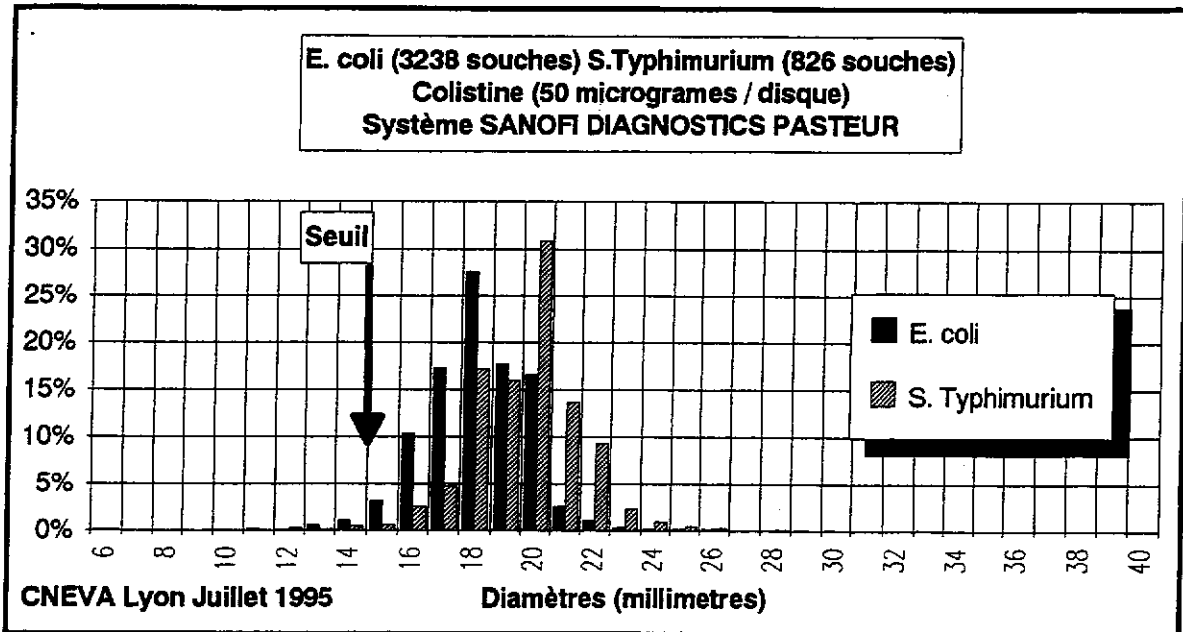
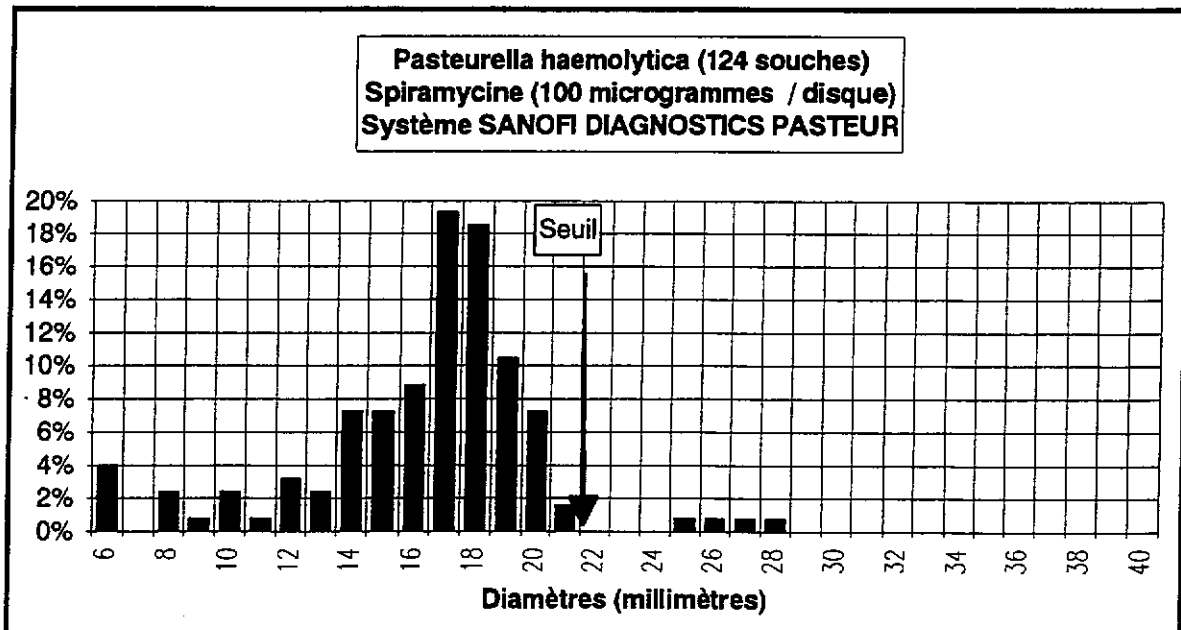


FIGURE 4

Distribution unimodale des diamètres des zones d'inhibition obtenue avec la spiramycine testée sur 124 souches de *P. haemolytica* isolées sur des veaux malades

Aucun mécanisme spécifique ne peut être détecté, mais les effets thérapeutiques prévisibles peuvent être considérés comme négatifs pour la grande majorité des souches dont le diamètre est supérieur au seuil. Cependant, cet antibiotique est très efficace pour traiter les malades.





### ➤ Distribution bimodale

La figure 5 présente la distribution bimodale des diamètres des zones d'inhibition obtenues avec l'ampicilline testée sur 804 souches de *S. typhimurium* isolées de bovins malades.

Les valeurs 6 mm correspondent à des souches poussant jusqu'au bord des disques en raison de l'acquisition d'une bêta-lactamase conférant la résistance à l'ampicilline.

Un autre exemple est présenté dans la figure 6 avec la méthicilline testée sur 410 souches de *Staphylococcus aureus*. Certaines souches donnant de faibles diamètres se révèlent sensibles lors de contrôles par la méthode de dilution, révélant ainsi des difficultés techniques liées à une instabilité de la méthicilline dans les disques de papier.

### ➤ Distribution multimodale

La figure 7 présente une distribution trimodale : deux sous-populations de colibacilles K99+ correspondant à deux mécanismes de résistance à la gentamicine sont ainsi individualisées, la troisième sous-population majoritaire correspondant aux souches sensibles.

Cette distribution a été détectée en 1985 et l'étude approfondie des souches représentatives de chacune des deux populations résistantes a permis d'identifier deux acétylases différentes (voir plus loin).

## D. ETUDES SPECIFIQUES DES MECANISMES DE RESISTANCE

Sur la base des épreuves de sensibilité aux antibiotiques et de la collection de souches représentatives de chaque phénomène de résistance génétique détectée à travers le réseau, différentes études approfondies peuvent être envisagées pour déterminer les mécanismes des résistances observées. Ce travail est en général conduit en partenariat avec des équipes spécialisées.

On peut citer les quelques exemples suivants :

- **Emergence en 1985, puis diffusion de 2 types de résistances aux aminoglycosides** (gentamicine et/ou apramycine) chez *E. coli* et *Salmonella* isolées des

veaux malades dans diverses régions d'élevages en France [11] :

- Résistance due à une 3 aminoglycoside acétyltransférase de type IV à déterminisme plasmidique [1] conférant la résistance à haut niveau à l'apramycine et à niveau intermédiaire à la gentamicine. Ce mécanisme de résistance a été sélectionné probablement chez l'animal par l'usage de l'apramycine, usage qui est limité à la médecine vétérinaire ;

- Résistance à haut niveau à la gentamicine due à une 3 aminoglycoside acétyltransférase de type II à déterminisme plasmidique également [3], mais inactive sur l'apramycine. Ce mécanisme est très fréquent en milieu hospitalier et a pu être largement sélectionné par l'usage de la gentamicine chez l'Homme.

L'étude de ces deux mécanismes au niveau moléculaire permet de suivre leur diffusion chez les souches retrouvées au sein des populations humaines et animales [2, 5].

- **Emergence et diffusion d'une bêta-lactamase chez *Pasteurella* au cours des années 80**

Contrairement aux souches de *Pasteurella multocida* d'origine canine et féline qui s'avèrent généralement très sensibles aux antibiotiques et qui peuvent être inoculées à l'homme lors de morsures et de griffures, les souches respiratoires de *P. multocida* et surtout de *P. haemolytica* d'origine bovine sont très fréquemment polyrésistantes (tableau VII).

Nous avons étudié la résistance aux bêta-lactamines : elle est due à une bêta-lactamase de type ROB 1 précédemment décrite aux USA chez des souches d'*Haemophilus influenzae* d'origine humaine [10]. Les relations entre ces deux populations bactériennes sont difficiles à établir, mais depuis la publication de nos études des souches d'origine bovine, plusieurs souches de *P. multocida* d'origine humaine présentant la même résistance ont été signalées en France.

FIGURE 5

**Distribution bimodale des diamètres des zones d'inhibition obtenue avec 804 souches de *S. typhimurium* isolées de veaux malades**

La sous population sensible correspond aux valeurs supérieures au seuil (valeur moyenne 25 mm).  
 Les souches résistantes ne sont pas inhibées (6 mm correspond au diamètre du disque).

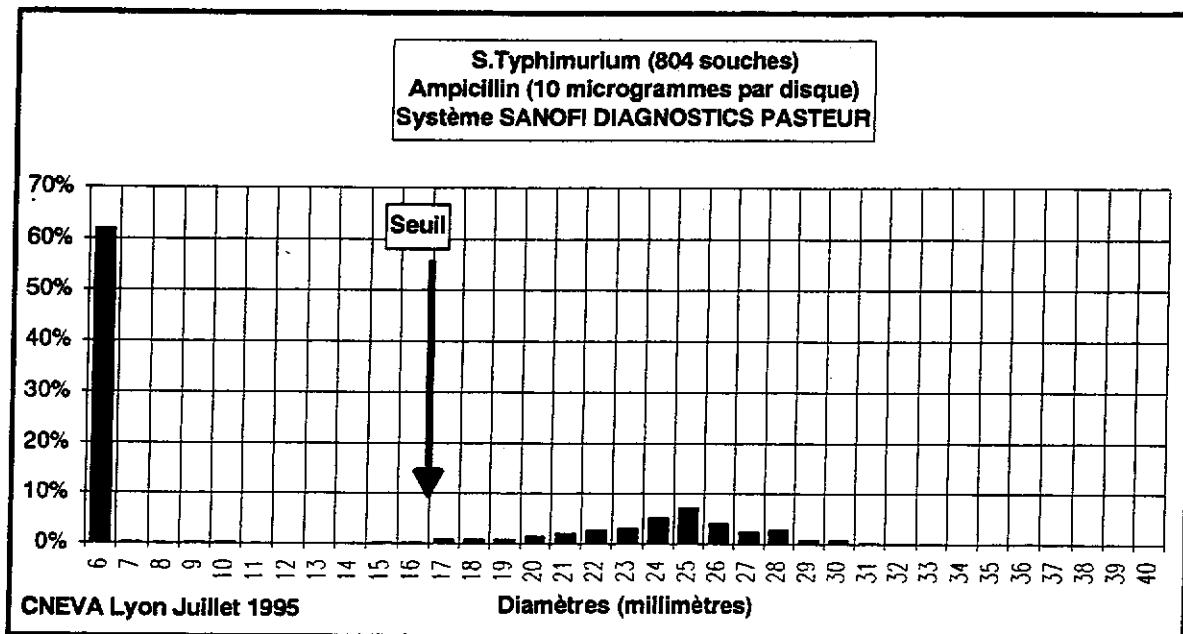


FIGURE 6

**Distribution approximativement bimodale des diamètres des zones d'inhibition obtenue avec la méthicilline testée sur 410 souches de terrain de *Staphylococcus aureus* isolées de mammites**

La population de souches sensibles correspond aux valeurs supérieures au seuil. Quelques souches interprétées comme résistantes avec cette méthode doivent être considérées comme sensibles selon les CMI obtenues avec la méthode de dilution en gélose (problème de stabilité des disques, cf. § résultats).

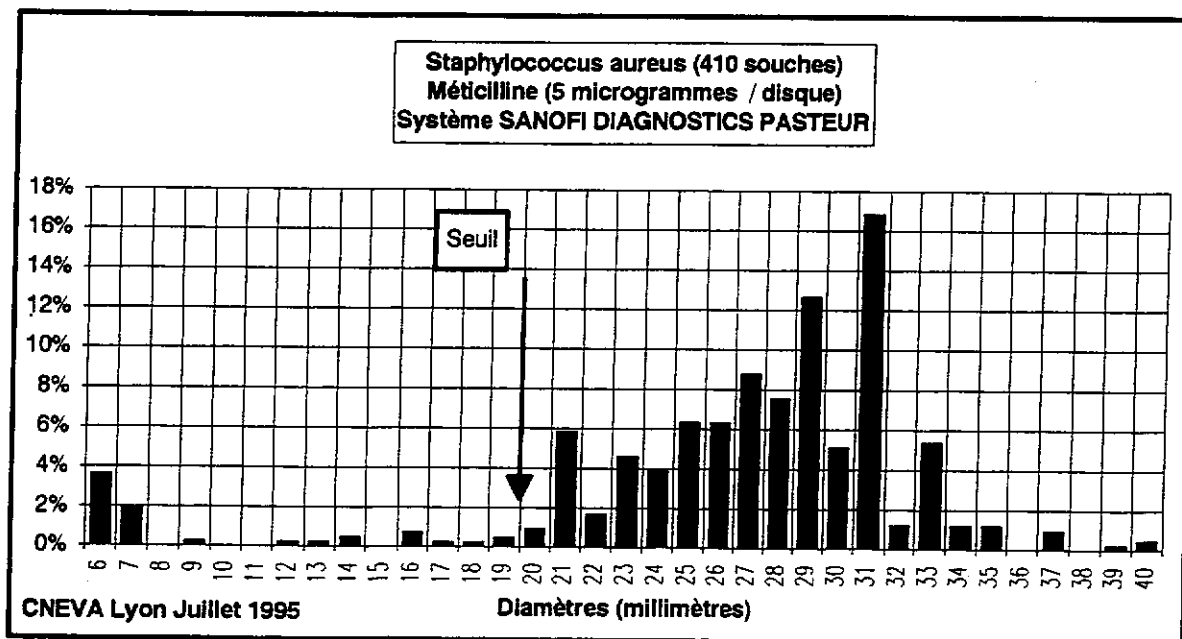
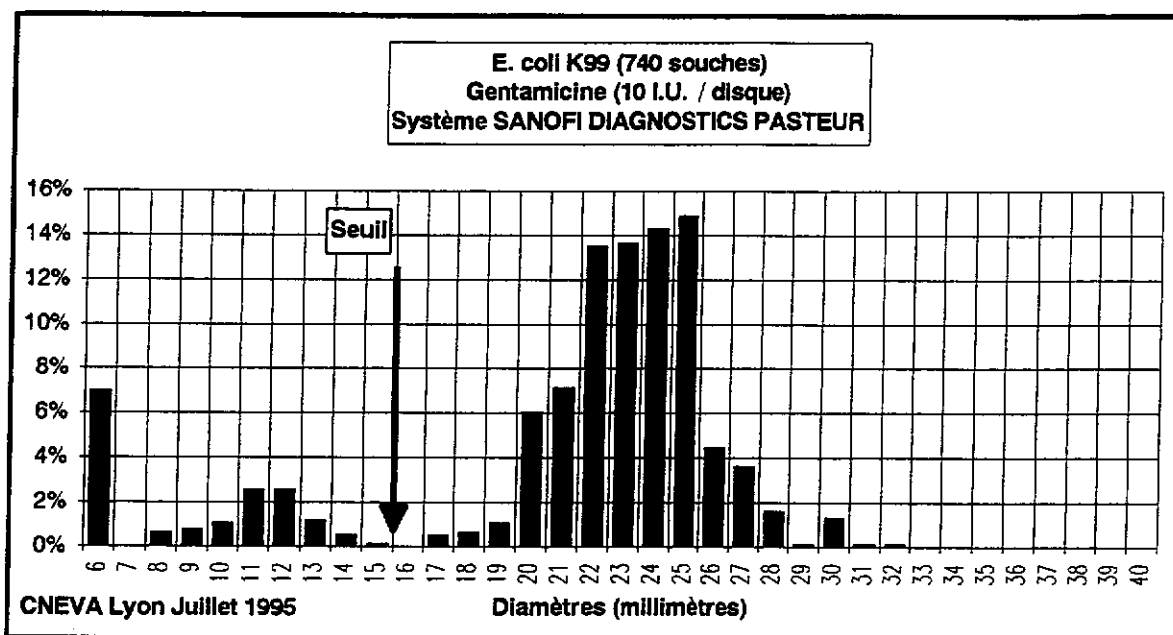


FIGURE 7

**Distribution multimodale des diamètres des zones d'inhibition obtenue avec la gentamicine testée sur 740 souches de *E. coli* K99 positif isolées sur des diarrhées de veaux**

On peut détecter deux sous populations dans les souches résistantes : l'une a un haut niveau de résistance (6 mm) et l'autre un niveau intermédiaire (entre 8 et 15 mm). La plus résistante exprime le haut niveau de résistance contre l'apramycine conférée par 3 aminoglycoside acétyltransferase de type IV (3) (cf. § résultats).



#### IV - DISCUSSION

Dans ses missions de veille épidémiologique en matière de santé et protection animales d'une part, mais aussi de santé publique et de sécurité alimentaire d'autre part, le CNEVA doit prendre en considération le phénomène d'antibiorésistance qui se révèle particulièrement préoccupant chez les bactéries à coloration de Gram négative, pathogènes chez les bovins.

Naturellement, le Laboratoire de pathologie bovine (CNEVA Lyon), chargé de l'épidémiosurveillance des maladies infectieuses du bétail en France, confronté à ce phénomène, a été conduit à mettre en place et à animer ce réseau depuis le début des années 80.

##### A. LA STANDARDISATION DE LA METHODOLOGIE

Le travail multicentrique suppose une standardisation rigoureuse des techniques mises en œuvre au sein de la quarantaine de LVD adhérents. La méthodologie de l'antibiogramme s'appuie sur les recommandations d'une autorité scientifique nationale, le CA-SFM, et est contrôlée à l'aide de souches étalons de référence interne. Cette excellence méthodologique sera confirmée prochainement par l'introduction des principes d'assurance qualité de l'ISO guide 25/standard Européen EN45001 et le développement du programme n° 116 d'accréditation du Comité français

d'accréditation (COFRAC) en matière de bactériologie en santé animale.

##### B. LES ESPECES BACTERIENNES CIBLES

Un des problèmes techniques majeurs est la sélection des espèces bactériennes à surveiller.

Dans un rapport de 1990, l'Organisation Mondiale de la Santé [16] recommande de prendre en compte les espèces bactériennes présentant un risque potentiel pour la santé publique : *Salmonella*, *E. coli*, *Campylobacter*, *Streptococcus* et *Staphylococcus*.

Les *Campylobacter*, peu fréquents en pathologie bovine en France, n'ont pas été retenus dans notre surveillance, mais nous avons introduit les *Pasteurella* qui représentent un groupe bactérien de première importance en pathologie respiratoire bovine. L'intérêt pour la santé publique demeure, même pour les souches non directement zoonotiques, en raison de l'importance des résistances plasmidiques en bactériologie clinique et des possibilités de transfert des facteurs de résistance d'une espèce à l'autre comme nous l'avons montré par exemple pour la bêta-lactamase ROB 1 de *Pasteurella sp* et d'*Haemophilus influenzae*.

### C. LES ANTIBIOTIQUES A EPROUVER

Un autre problème est le choix des antibiotiques à utiliser dans cette surveillance. Notre système étant basé sur les antibiogrammes réalisés en routine par les LVD, la liste des antibiotiques testés doit être strictement limitée pour des raisons pratiques et compatible avec les molécules autorisées en médecine vétérinaire.

Par souci d'efficacité, nous recommandons d'inclure dans l'antibiogramme type la molécule la plus ancienne, donc *a priori* la moins active de chaque famille d'anti-infectieux. La détection d'une résistance peut être précisée dans un deuxième temps en ayant recours aux molécules les plus récentes de la même famille lorsqu'un nouveau mécanisme est suspecté.

La surveillance de base est permanente et peut être complétée par une surveillance approfondie lors de l'introduction d'une nouvelle molécule. C'est ainsi que nous avons mis en place des systèmes de surveillance financés par des firmes privées après la mise sur le marché d'une nouvelle céphalosporine, le ceftiofur (Upjohn), active sur les pasteurelles résistantes aux autres bêta-lactamines ; d'une nouvelle fluoroquinolone, l'enrofloxacin, introduite par Bayer ; enfin, tout récemment le florfenicol qui a été introduit par Schering Plough en remplacement du chloramphénicol pour le traitement des infections à *Pasteurella* et qui est actif sur les pasteurelles résistantes au chloramphénicol.

### D. PRINCIPAUX RESULTATS

Très peu d'études de souches isolées d'animaux sains sont disponibles et notre approche pragmatique présente un biais important à signaler: notre surveillance concerne les souches pathogènes ayant motivé une recherche bactériologique en raison de la gravité des symptômes. Par conséquent, il est probable qu'une proportion importante des souches isolées dans ce contexte aient été soumises à une pression de sélection par des antibiothérapies antérieures.

En fait, la principale loi qui peut être dégagée de notre surveillance énonce que plus une espèce bactérienne ou un sérovar sont rencontrés en pathologie, plus les fréquences de résistances sont élevées.

Ceci peut être illustré par les salmonelles bovines surveillées dans notre réseau. *S. typhimurium* est à la fois prédominante en pathologie bovine et hautement multirésistante (tableau VI). *S. dublin*, de plus en plus rarement rencontrée en pathologie bovine au cours des années 80, présente des fréquences inférieures à *S. typhimurium*, mais supérieures aux autres sérovares.

Toutefois, plus récemment, l'apparition de foyers de salmonelloses cliniques sévères chez les bovins adultes,

dues à divers sérovares et la raréfaction des cas dus à *S. dublin* ont tendance à inverser cette situation (tableau VIII).

La surveillance ne doit pas se limiter à enregistrer les fréquences de résistance mais envisager également l'importance des échanges entre les écosystèmes.

### E. CIRCULATION DES FACTEURS DE RESISTANCE

Des considérations écologiques doivent évidemment être prises en compte pour évaluer l'impact pour la santé publique de l'utilisation des antibiotiques chez les animaux :

➤ La nature de l'écosystème détermine des paramètres importants sur l'interaction des bactéries entre elles et la pression exercée par les antibiotiques.

Les *Enterobacteriaceae* ont une capacité évidente d'acquérir et d'échanger des plasmides porteurs de facteurs de résistance et la flore intestinale fournit une extraordinaire opportunité pour la circulation des informations génétiques entre bactéries. Nos résultats confirment bien que les bactéries de l'intestin sont les plus résistantes.

Au contraire, les staphylocoques de la glande mammaire sont des bactéries peu fréquemment résistantes. Ceci est *a priori* surprenant quand on considère, d'une part, l'importance et la fréquence de l'administration locale des anti-infectieux pour le traitement et la prévention des mammites de la vache laitière et, d'autre part, les problèmes préoccupants de résistance des souches hospitalières. Une explication écologique peut être proposée : la mamelle normale est stérile, et par conséquent, aucune flore bactérienne résidente ne permet de pérenniser des facteurs de résistance dans cet organe, contrairement à ce qui est observé dans la flore intestinale. Entre ces deux cas extrêmes, l'arbre respiratoire occupe une place intermédiaire avec une flore résidente de *Pasteurellaceae* limitée à la muqueuse des premières voies respiratoires.

➤ Finalement, la dernière étape de l'épidémiologie concerne les échanges de facteurs de résistance entre écosystèmes animaux et humains.

En effet, ces échanges potentiels peuvent revêtir deux aspects. D'une part, les bactéries zoonotiques elles-mêmes représentent les éléments des échanges : le principal exemple est celui des salmonelles dont le monde animal constitue le principal réservoir. L'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire exerce une pression de sélection favorable aux souches résistantes qui peuvent alors infecter l'Homme, soit directement, soit par l'intermédiaire de l'environnement et des aliments d'origine animale.

Les échanges de bactéries résistantes constituent la seule option possible pour les résistances par mutation (cas des quinolones par exemple).

TABLEAU VIII

Comparaison des fréquences de résistance de *Salmonella* isolés de bovins adultes malades en fonction de leur sérovar  
Un nouveau phénomène épidémiologique peut être observé : quelques fréquences de résistance dans les autres sérovares  
sont plus élevées que celles observées chez *S. dublin*.

ANTIBIOTIQUES	CM <sup>1</sup>	SEROVARS					
		<i>S. typhimurium</i>		<i>S. dublin</i>		Autres	
		n <sup>2</sup>	Pourcentage <sup>3</sup>	n <sup>2</sup>	Pourcentage <sup>3</sup>	n <sup>2</sup>	Pourcentage <sup>3</sup>
Ampicilline	4	332	49 (44-54)	164	02 (00-04)	108	03 (00-06)
Streptomycine	8	306	58 (52-64)	149	30 (23-37)	104	22 (15-31)
Néomycine	8	301	04 (02-06)	105	02 (00-05)	81	05 (00-10)
Gentamicine	4	369	01 (00-02)	166	00 (00-03)	111	00 (00-05)
Chloramphénicol	8	369	48 (43-53)	166	08 (01-12)	112	15 (08-22)
Tétracycline	4	363	74 (69-79)	161	18 (12-24)	98	37 (27-47)
Sulphonamides	100	298	69 (64-74)	79	24 (15-33)	84	29 (19-39)
Sulphonamides/Triméthoprime	2/38	285	19 (14-24)	105	03 (00-06)	62	08 (01-05)
Furanes	25	274	29 (24-34)	162	03 (00-06)	101	10 (04-16)
Acide nalidixique	8	271	12 (08-16)	138	03 (00-06)	97	18 (10-26)

1. Concentration minimale inhibitrice (mg/l) seuil recommandé par le comité français de l'antibiogramme
2. Nombre de souches testées
3. Pourcentage de souches résistantes (intervalle de confiance)

Mais nous l'avons déjà rappelé, la majorité des facteurs de résistance ont un déterminisme plasmidique et à l'épidémiologie bactérienne se superpose l'épidémiologie plasmidique.

Il faut bien reconnaître que l'évaluation de l'importance de ces échanges reste la partie la moins explorée de l'épidémiologie de la résistance.

Cependant, leur connaissance est essentielle pour apprécier l'impact réel du phénomène pour la santé publique. Dans ce domaine, la biologie moléculaire ouvre de belles perspectives en permettant de mettre en évidence des marqueurs épidémiologiques sûrs et très efficaces pour suivre la diffusion des facteurs de résistance [2, 5, 14].

## V - BIBLIOGRAPHIE

1. CHASLUS-DANCLA E., MARTEL J.L., LAFONT J.P., COURVALIN P. ~ Emergence of aminoglycoside 3-N-acetyltransferase IV in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* isolated from animals in France. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1986, 29, 239-243.
2. CHASLUS-DANCLA E., GERBAUD G., MARTEL J.L., LAFONT J.P., COURVALIN P. ~ Probable transmission between animals of a plasmid encoding aminoglycoside 3-N-acetyltransferase IV and dihydrofolate reductase I. *Vet. Microbiol.*, 1987, 15, 97-104.
3. CHASLUS-DANCLA E., GERBAUD G., MARTEL J.L., LAGORCE M., LAFONT J.P., COURVALIN P. ~ Detection of a second mechanism of resistance to gentamicin in animal strain of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1987, 31, 1274-1277
4. CHASLUS-DANCLA E., GLUPCZYNSKI Y., GERBAUD G., LAGORCE M., LAFONT J. P., COURVALIN P. ~ Detection of apramycin resistant *Enterobacteriaceae* in hospital isolates. *FEMS Microbiol.*, 1989, 61, 261-266.
5. CHASLUS-DANCLA E., POHL P., MEURISSE M., MARIN M., LAFONT J. P. ~ High genetic homology between plasmids of human and animal origins conferring resistance to the aminoglycosides gentamicin and apramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1991, 35, 590-593.
6. Comité de l'Antibiogramme de la Société française de microbiologie (C.A.-S.F.M.) ~ Recommandation n°1 : Définition des Catégories Thérapeutiques. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 19., 8, 161.
7. Comité de l'Antibiogramme de la Société française de microbiologie (C.A.-S.F.M.) ~ Recommandation n°2 : Méthode de détermination de la concentration minimale inhibitrice (C.M.I.) en milieu solide pour les bactéries aérobies à croissance rapide. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 1993, 8, 156-161.
8. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (C.A.-S.F.M.) ~ - Recommandation n°3 : Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé pour les

- bactéries aérobies à croissance rapide. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 1993, 8, 161-166.
9. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (C.A.-S.F.M.) ~ Communiqué 1994. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 1995, 10, 17-21.
  10. LIVRELLI V., DARFEUILLE-MICHAUD A., RICH C. D., JOLY B., MARTEL J. L. ~ Genetic determinant of the ROB-1  $\beta$  lactamase in bovine and porcine *Pasteurella* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1988, 32, 1282-1284.
  11. MARTEL J.L., CHASLUS-DANCLA E., BORDAS C., CHIROL C., LOZES J.P., MARTIN S., PORTEJOIE Y., SENDRAL R., LAFONT J.P. ~ Détection de diverses entérobactéries résistantes à la gentamicine et à l'apramycine dans les foyers d'entérites des veaux. *Bull. Soc. Vét. Prat. de Fr.*, 1985, 69, (5), 297-320.
  12. MARTEL J.L., COUDERT M. ~ Bacterial resistance monitoring in animals : the French national experiences of surveillance schemes. *Veterinary Microbiology*, 1993, 35, 321-338. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
  13. MARTEL J.L., CHASLUS-DANCLA E., COUDERT M., POUMARAT F., LAFONT J.P. ~ Survey of antimicrobial resistance in bacterial isolates from diseased cattle in France. *Microbial Drug Resistance*, volume 1, number 3. Mary Ann Liebert, Inc., 1995, 273-283.
  14. PERRIN B., SOLSONA M., CHASLUS-DANCLA E., MARTEL J.L. ~ Utilisation de sondes non radioactives pour la détection du gène de la 3-aminoside-acétyltransférase type IV chez des souches de *Escherichia coli* et *Salmonella spp.* *Res. Microbiol.*, (Ann. Inst. Past.), 1989, 140, 27-32.
  15. THRELFALL E. J., ROWE B., FERGUSON J.L., WARD L.R. ~ Characterization of plasmid conferring resistance to gentamicin and apramycin in strains of *Salmonella Typhimurium* phage type 204c isolated in Britain. *J. Hyg. Camb.*, 1986, 97, 419-426.
  16. W.H.O. Guidelines for surveillance and control of antimicrobial resistance, 1990, 50 pages.

25

REMERCIEMENTS : Je voudrais remercier les directeurs et les bactériologistes des laboratoires vétérinaires départementaux qui nous fournissent régulièrement leurs résultats et leurs souches en nous permettant ainsi de mener à bien cette épidémiosurveillance dans les meilleures conditions possible d'efficacité.

Nous sommes également très reconnaissants aux scientifiques cités en référence qui participent aux études spécifiques et nous font ainsi bénéficier de leurs compétences.

Je remercie également la FEDESA (Fédération européenne de la santé animale) et le SIMV (Syndicat de l'industrie du médicament vétérinaire) d'avoir bien voulu mettre à notre disposition leurs statistiques les plus récentes en nous autorisant à les publier.