

**ANTIBIORESISTANCE DES SOUCHES
BACTERIENNES D'ORIGINE EQUINE**

**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE
ET EXEMPLE DE L'HOPITAL VETERINAIRE DE ST-HYACINTHE**

LISTE DES ENSEIGNANTS

REMERCIEMENTS

A M. le Professeur MONTASTRUC
Professeur des Universités
Praticien Hospitalier
Pharmacologie médicale et clinique

Pour avoir eu l'amabilité d'accepter de présider notre jury de thèse.

A M. le Docteur BOUSQUET-MELOU
Maître de conférence
U.M.R. de physiopathologie et toxicologie expérimentales
E.N.V. TOULOUSE

Pour nous avoir supporté tout au long de la réalisation de ce travail,
Hommage respectueux et sincères remerciements.

A M. le Docteur VERWAERDE
Maître de conférence
Service d'anesthésie et de réanimation
E.N.V. TOULOUSE

Pour avoir aimablement accepté de faire partie de notre jury de thèse.

A ma mère,

A mon père,

A mes amis,

Aux québécois de St-Hyacinthe,

Et à tous ceux qui me sont chers.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS	3
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS	12
GLOSSAIRE	13
INTRODUCTION	15
A] PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	17
1) LA RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES	18
<i>1.1) Résistance naturelle et résistance acquise</i>	18
1.1.1) Résistance naturelle	18
1.1.2) Résistance acquise	21
1.1.2.1) Résistance par mutation chromosomique	21
1.1.2.2) Résistance par acquisition de matériel génétique exogène	21
a) Conjugaison.....	21
b) Transformation.....	22
c) Transduction.....	22
<i>1.2) Mécanismes</i>	22
1.2.1) Résistance par diminution de la pénétration ou par augmentation de l'excrétion d'un antibiotique	22
1.2.2) Résistance par modification de la cible	23
1.2.3) Résistance par inactivation enzymatique de l'antibiotique	23
1.2.4) Résistance par modification du métabolisme	23
<i>1.3) Evaluation de l'antibiorésistance</i>	24
1.3.1) Les tests de sensibilité.....	24
1.3.1.1) Méthode par dilution.....	25
a) Méthode par dilutions successives en milieu solide	25

b)Méthodes par dilutions successives en milieu liquide	26
1.3.1.2) Méthode par diffusion.....	27
a)Principe	27
b)Etablissement de la courbe de corrélation et définition des catégories ...	27
c)Mise en œuvre	29
d)Avantages et inconvénients.....	30
1.3.1.3) Contrôle de qualité.....	31
1.3.1.4) Causes d'erreur.....	31
a)Causes techniques	31
b)Causes bactériennes	31
c)Les limites de l'interprétation	32
1.3.2)Comparaison entre test quantitatif et test qualitatif	32
1.3.3)Sélection des antibiotiques à tester	33
1.4)Prévention de l'antibiorésistance	33
1.4.1) Les enjeux	33
1.4.2) Sources de l'antibiorésistance et moyens d'action	33
1.4.2.1) Limiter l'utilisation des antibiotiques	34
1.4.2.2) Faire un meilleur usage des antibiotiques.....	34
2)ETAT DES LIEUX DE LA RESISTANCE DES SOUCHES D'ORIGINE EQUINE.....	37
2.1)Principaux antibiotiques utilisés en médecine équine	37
2.1.1)Les β -lactamines	38
2.1.1.1)La pénicilline G.....	38
2.1.1.2)L'ampicilline.....	38
2.1.1.3)Le ceftiofur.....	39
2.1.2)Sulfonamides et triméthoprim.....	39
2.1.3)L'érythromycine	40
2.1.4)La rifampicine	40
2.1.5)Les tétracyclines.....	40
2.1.6)Le métronidazole	41
2.1.7)Les aminosides.....	41
2.1.8)Les fluoroquinolones	42
2.1.9)Le chloramphénicol	42
2.2)Principales bactéries infectieuses du cheval	43
2.2.1) <i>Streptococcus</i> spp.....	43

2.2.2) <i>Actinobacillus</i> spp.....	44
2.2.3) Les staphylocoques	44
2.2.4) Les entérobactéries.....	45
2.2.5) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
2.2.6) <i>Rhodococcus equi</i>	45
2.3)Données bibliographiques sur le niveau de résistance.....	46
2.3.1)Résistance des souches de Streptocoques	46
2.3.2)Résistance des souches de <i>Actinobacillus</i> spp.	47
2.3.3)Résistance des souches de Staphylocoques	47
2.3.4)Résistance des souches d' <i>E.coli</i>	47
2.3.5)Résistance des souches d' <i>Enterobacter</i> spp.....	47
2.3.6)Résistance des souches de <i>Pseudomonas</i> spp.....	48
2.3.7)Résistance des souches de <i>Rhodococcus equi</i>	48
BJ PARTIE EXPERIMENTALE	53
1)INTRODUCTION	54
2)MATERIEL ET METHODES	54
2.1) <i>Bactériologie</i>	54
2.2) <i>Etude statistique</i>	55
3)RESULTATS ET DISCUSSION	55
3.1) <i>Résistance des souches de Streptocoques</i>	58
3.2) <i>Résistance des souches de Actinobacillus</i> spp.	60
3.3) <i>Résistance des souches de Staphylocoques</i>	62
3.4) <i>Résistance des souches d'E.coli</i>	64
3.5) <i>Résistance des souches d'Enterobacter</i> spp.	65
3.6) <i>Résistance des souches de Pseudomonas</i> spp.....	66
4)CONCLUSION DE LA PARTIE EXPERIMENTALE.....	67
CONCLUSION.....	69
BIBLIOGRAPHIE	71
ANNEXE I	79

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Illustrations

Illustration A.1 : gélose avec disques d'antibiotiques p : 27

Figures

Figure A.1 : les dates marquantes de l'antibiothérapie p : 20

Figure A.2 : mécanismes de résistances au TMS p : 24

Figure A.3 : détermination de la CMI par dilutions sériées p : 26

Figure A.4 : exemple de courbe de concordance p : 28

Figure A.5 : principaux paramètres pharmacocinétiques p : 35

Figure A.6 : le rapport AUC/CMI p : 36

Graphiques

Graphique B.1 : évolution de la sensibilité des souches de streptocoques p : 59

Graphique B.2 : évolution de la sensibilité des souches d'*Actinobacillus* p : 61

Graphique B.3 : évolution de la sensibilité des souches de staphylocoques p : 63

Graphique B.4 : évolution de la sensibilité des souches d'*E.coli* p : 65

Graphique B.5 : évolution de la sensibilité des souches d'*Enterobacter* p : 67

Graphique B.6 : évolution de la sensibilité des souches de *Pseudomonas* p : 69

Tableaux

Tableau A.1 : les principales résistances naturelles p : 19

Tableau A.2 : critères de classement des souches bactériennes p : 29

Tableau A.3 : les différents milieux de culture p : 30

Tableau A.4 : comparatif test qualitatif / test quantitatif p : 32

Tableau A.5 : antibiotiques usuels p : 37

Tableau A.6 : principales bactéries pathogènes du cheval p : 43

Tableau A.7 : sensibilité des souches de streptocoques p : 49

Tableau A.8 : sensibilité des souches d'*Actinobacillus* spp p : 49

Tableau A.9 : sensibilité des souches de staphylocoques p : 50

Tableau A.10 : sensibilité des souches d'*E.coli* p : 50

Tableau A.11 : sensibilité des souches d'*Enterobacter* spp p : 51

Tableau A.12 : sensibilité des souches de *Pseudomonas* spp p : 51

Tableau A.13 : sensibilité des souches de *Rhodococcus equi* p : 52

Tableau B.1 : sensibilité des souches bactériennes en fonction des antibiotiques à
l'hôpital vétérinaire de St-Hyacinthe p : 62

GLOSSAIRE

- **AUC** « Area Under the Curve », aire sous la courbe des concentrations plasmatiques.
- **AMM** Autorisation de Mise sur le Marché.
- **CFU** « Colony Forming Unity », une CFU est capable de donner une colonie bactérienne sur un milieu approprié.
- **CMI** Concentration Minimale Inhibitrice.
- **HVE** Hôpital Vétérinaire d'Enseignement de St-Hyacinthe.
- **LPS** LipoPolySaccharide, couche externe des bactéries Gram négatif
- **NCCLS** « National Committee on Clinical Laboratory Standards », organisme américain chargé de définir les normes de biologie clinique.
- **SFM-CA** Société Française de Microbiologie-Comité de l'Antibiogramme
- **TMS** « Triméthoprine-sulfonamides », l'association exacte utilisée à l'HVE de St-Hyacinthe est le triméthoprine-sulfaméthoxazole.

INTRODUCTION

Les antibiotiques sont utilisés dans la lutte contre les infections bactériennes depuis la découverte de la pénicilline en 1929 et des sulfamides en 1935. Les nouvelles molécules sont d'abord utilisées en médecine humaine puis leur emploi est étendu à la médecine vétérinaire.

L'utilisation de ces antibiotiques s'accompagne inéluctablement de l'apparition de résistances acquises, par les souches d'origine humaine ou animale, rendant l'efficacité des thérapeutiques plus aléatoire.

Pour évaluer le degré de résistance d'une bactérie, différents tests de sensibilité ont été mis au point, ayant pour but pour la plupart de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'un antibiotique vis à vis d'une bactérie, ce qui permettra de classer cette bactérie en sensible, intermédiaire ou résistante.

En médecine équine, peu de rapports décrivent de manière exhaustive le niveau de résistance des bactéries rencontrées. Pourtant la connaissance des schémas de résistance est toute aussi importante que dans les autres espèces étant donné la dégradation rapide de l'état de santé du cheval à la suite d'une infection, le coût et les risques de toxicité, notamment gastro-intestinaux, plus élevés que chez les monogastriques.

L'objectif de cette thèse est de faire un état des lieux du niveau de résistance des bactéries les plus fréquemment rencontrées dans les processus pathologiques chez le cheval puis de dégager de grandes tendances dans l'évolution de cette résistance à l'hôpital vétérinaire de St-Hyacinthe, Université de Montréal (HVE).

Dans une première partie, nous décrivons les mécanismes de la résistance bactérienne, les tests de sensibilité avec leurs limites, puis après avoir étudié les principales bactéries pathogènes du cheval et les principaux antibiotiques utilisés, nous dresserons un état des lieux pour chaque bactérie en fonction des données de la littérature.

Dans une seconde partie, les données obtenues sur les échantillons bactériens d'origine équine recueillis à partir des cas de l'HVE de St-Hyacinthe dans les années 1996 à 1998

seront comparées avec les données obtenues 10 ans auparavant pour essayer de dégager de grandes tendances dans l'évolution locale de l'antibiorésistance. Nous essaierons également de déduire quelles en sont les conséquences possibles en thérapeutique.

A] PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1)La résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance des bactéries aux antibiotiques est connue depuis fort longtemps et son importance clinique survient très peu de temps après le début de l'antibiothérapie (cf. figure A.1). Elle fait l'objet de publications et de revues nombreuses qui rendent compte de sa constante évolution. Ses mécanismes sont mieux connus grâce aux progrès de la connaissance de la morphologie et du métabolisme bactériens.

1.1)Résistance naturelle et résistance acquise

1.1.1) Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque correspond à la capacité de résister à la présence d'un antibiotique pour toutes les souches d'une espèce ou d'un genre bactérien. La Société Française de Microbiologie (SFM) définit la résistance naturelle comme la caractéristique d'une espèce bactérienne qui se traduit par des concentrations minimales inhibitrices (CMI) supérieures à la concentration critique supérieure des tests de sensibilité pour l'antibiotique concerné (la définition de ces termes sera développée dans le chapitre des tests de sensibilité). Habituellement le support de cette résistance est chromosomique. Les mécanismes sont nombreux et décrits pour des cas particuliers par la suite.

Quelques exemples de résistance naturelle sont rassemblés dans le tableau A.1 pour les principales bactéries du cheval.

Figure A.1 : Principales dates importantes dans l'antibiothérapie (découverte de nouveaux antibiotiques, apparition de résistance). D'après Prescott [44].

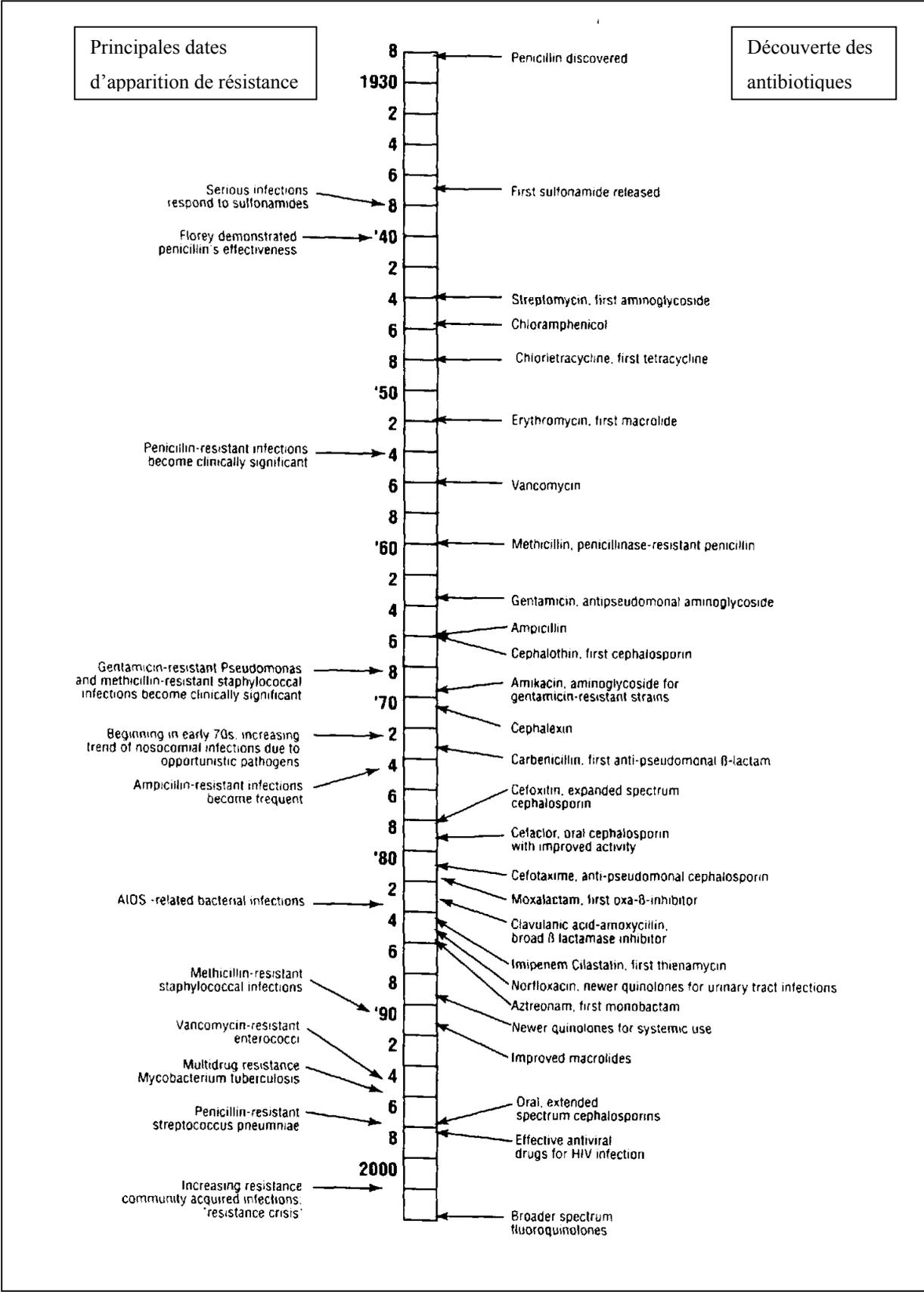


Tableau A.1

Principales résistances naturelles[10]	
<p><u>Coques Gram +</u></p> <p>-<i>Staphylococcus</i> spp.</p> <p>-<i>Streptococcus</i> spp.</p>	<p>mécillinam ; aztréonam ; quinolones classiques ; colistine ; polymyxine B.</p> <p>idem + aminosides (bas niveau)</p>
<p><u>Bacilles Gram+</u></p> <p>-<i>Rhodococcus equi</i></p>	<p>Streptogramines; mécillinam ; aztréonam ; quinolones classiques ; colistine ; polymyxine B.</p>
<p><u>Bacilles Gram négatif</u></p> <p>-tous</p> <p>-Entérobactéries</p>	<p>Oxacilline ; acide fusidique ; vancomycine</p> <p>Pénicilline G ; oxacilline ; macrolides ; lincosamides ; streptogramines ; acide fusidique ; vancomycine.</p>
<p><u>Bacilles Gram- non fermentaires</u></p> <p>-<i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>	<p>Aminopénicillines ; céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} générations ; tétracyclines ; chloramphénicol ; triméthoprime.</p>
<p><u>Bactéries anaérobies strictes</u></p> <p>-toutes</p> <p>-<i>Bacteroides fragilis</i></p> <p>-<i>Clostridium difficile</i></p>	<p>Aminosides ; triméthoprime ; quinolones.</p> <p>Idem + aminopénicillines ; céphalosporine de 1^{ère} génération ; colistine ; polymyxine B.</p> <p>Idem + céphalosporines.</p>

Les antibiotiques les plus utilisés pour la thérapie chez le cheval sont en gras.

1.1.2) Résistance acquise

On oppose à la résistance naturelle, propriété d'espèce ou de genre, la résistance acquise qui est une propriété de souche. Cette dernière correspond à la capacité de supporter une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée que celle supportée par les autres souches de la même espèce.

Elle peut s'acquérir soit par mutation chromosomique, soit par acquisition de matériel génétique exogène [45].

1.1.2.1) Résistance par mutation chromosomique

Ce phénomène spontané est rare et n'explique qu'une faible partie des résistances rencontrées en clinique. L'antibiotique n'induit pas la mutation mais si celle-ci survient l'antibiotique favorise la souche résistante qui est alors sélectionnée. La diffusion de ce type de résistance est liée à la diffusion de la souche mutante.

Généralement, l'augmentation de résistance se fait progressivement, par paliers. Cependant, on peut rencontrer des cas où une seule mutation chromosomique aboutit à une élévation de résistance très importante ; par exemple, la CMI vis à vis de la streptomycine peut être multipliée par 1000 par une unique mutation chromosomique [46].

La fréquence d'apparition des mutations est fonction de l'antibiotique. On observe les plus grandes fréquences de mutation pour la streptomycine et la rifampicine.

1.1.2.2) Résistance par acquisition de matériel génétique exogène

Ce type de résistance procède de l'acquisition de gènes de résistance par l'intermédiaire d'un plasmide ou de transposons à la faveur de 3 mécanismes d'échange possibles : conjugaison, transformation ou transposition. Généralement, on observe une augmentation brusque de résistance plutôt qu'une augmentation par paliers du niveau de résistance.

a) Conjugaison

Dans le phénomène de conjugaison, une bactérie donneuse transmet à une bactérie receveuse une copie de son plasmide porteur de gène de résistance (appelé plasmide R ou facteur R). Ce mécanisme peut s'effectuer entre bactéries de la même espèce, au sein d'un même genre ou parfois entre bactéries de genres différents d'où son efficacité. Par exemple, *Staphylococcus aureus* peut échanger du matériel génétique avec *E.coli*.

Un plasmide peut contenir différents gènes de résistance. L'utilisation d'un seul des antibiotiques contre lesquels le plasmide est efficace permet alors sa sélection et son maintien dans son intégralité.

b)Transformation

La transformation est le résultat d'un réarrangement de séquences d'ADN échangées entre 2 bactéries. On peut alors obtenir de nouveaux gènes de résistance. Ce processus se fait généralement entre bactéries de genre proche car il doit y avoir une forte analogie entre les séquences nucléotidiques pour permettre la recombinaison.

c)Transduction

Dans la transduction, un virus bactériophage incorpore une séquence d'ADN d'une bactérie et la transmet à une autre bactérie. Du fait de la spécificité des bactériophages, ce phénomène n'a lieu que pour les bactéries de la même espèce.

1.2)Mécanismes

1.2.1) Résistance par diminution de la pénétration ou par augmentation de l'excrétion d'un antibiotique

La diminution de la pénétration de l'antibiotique peut être la conséquence de différentes « stratégies » bactériennes [43]. Certaines bactéries sont capsulées (*Klebsiella* spp., Streptocoques...) ou peuvent sécréter une zoogléa qui les protège de l'action des antibiotiques par effet de barrière ou par modification de leur charge externe. Les antibiotiques très lipophiles, tels que les macrolides, ont beaucoup de mal à traverser la membrane externe des bactéries Gram - à cause de la présence protectrice de LPS. Quant aux molécules hydrophiles, elles doivent passer la couche de LPS à travers des porines plus ou moins spécifiques. La diminution ou le caractère non fonctionnel de ces porines (par exemple après mutation chromosomique) rendent la bactérie beaucoup moins sensible par une diminution de la diffusion. Si plusieurs antibiotiques utilisent la porine en cause, alors l'efficacité de tous ces antibiotiques s'en trouve altérée (on parle alors de résistances croisées). Ce mécanisme se retrouve essentiellement chez les entérobactéries et les *Pseudomonas*. Enfin, le passage de la membrane cytoplasmique nécessite parfois des enzymes appelées perméases « énergie-dépendantes ». Si le potentiel de membrane et/ou le transfert d'électron sont trop faibles alors ces perméases ne sont pas fonctionnelles et l'antibiotique ne peut pas pénétrer dans la

bactérie. Ce phénomène explique la résistance naturelle des bactéries anaérobies vis à vis des aminosides.

Des protéines membranaires peuvent induire une augmentation de l'excrétion de l'antibiotique. On rencontre ce mécanisme chez certaines entérobactéries résistantes aux tétracyclines. La résistance s'explique par une concentration intracellulaire insuffisante de cette famille d'antibiotiques. Un mécanisme similaire est décrit pour les fluoroquinolones.

1.2.2) Résistance par modification de la cible

Une mutation peut induire une modification de la cible de l'antibiotique utilisé. A cause d'une moindre affinité, l'efficacité sera réduite. On retrouve ce phénomène pour de nombreuses familles d'antibiotiques : méticilline et nouvelles PLP (protéines de liaisons des pénicillines), macrolides et méthylation de l'ARN, rifampicines et mutation de l'ARN polymérase ADN-dépendante.

Ce mécanisme de résistance est fréquent pour les quinolones : la bactérie résistante synthétise une ADN gyrase moins sensible.

1.2.3) Résistance par inactivation enzymatique de l'antibiotique

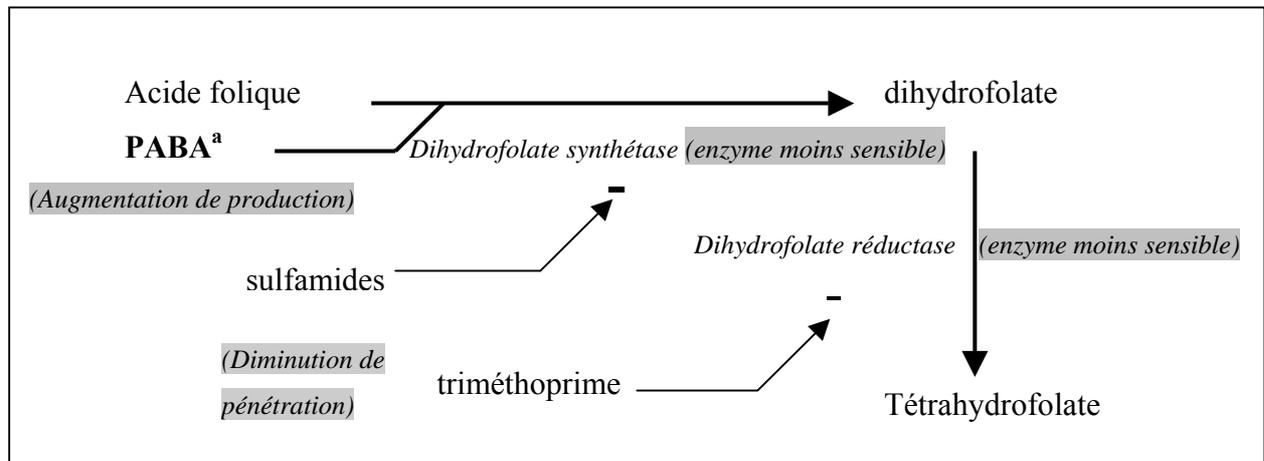
La synthèse de certaines enzymes peut réduire ou annuler l'efficacité d'un antibiotique. Ce mécanisme est décrit contre les β -lactamines, les aminosides et le chloramphénicol.

Dans le cas des β -lactamines, on peut distinguer des pénicillinases, ayant un support génétique essentiellement plasmidique et donc très répandues, et des céphalosporinases généralement chromosomiques et spécifiques d'espèces.

1.2.4) Résistance par modification du métabolisme

Ce mécanisme explique la résistance bactérienne aux TMS. Les sulfamides et le triméthoprime (ou équivalent) bloquent la voie de synthèse des bases nucléiques en inhibant certaines enzymes. En augmentant la synthèse des précurseurs, des enzymes ou en fabriquant des enzymes moins sensibles, la bactérie peut devenir résistante (cf figure A.2).

Figure A.2 : Schéma des mécanismes de résistance à l'action du TMS. Les enzymes sont en italiques, les mécanismes de résistance sont en italiques sur fond gris. (^a: acide para-aminobenzoïque).



1.3) Evaluation de l'antibiorésistance

Considérant que la résistance des bactéries aux antibiotiques est très variable et semble en augmentation, l'isolement et l'identification ne suffisent souvent plus aux vétérinaires pour mettre en œuvre une antibiothérapie efficace. Le vétérinaire peut alors faire appel aux laboratoires de bactériologie pour réaliser des tests de sensibilité.

1.3.1) Les tests de sensibilité

Les tests de sensibilité bactérienne les plus répandus ont pour but d'étudier l'effet bactériostatique des antibiotiques [12, 15, 28]. Pour chaque souche bactérienne, on peut définir une concentration minimale inhibitrice (CMI) qui correspond à la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance visible du germe. Elle est donc associée à un phénomène macroscopique, ce qui explique sa relative facilité d'obtention et son universalité. C'est une information intéressante et pertinente pour le praticien puisque dans la majorité des cas on recherche essentiellement une inhibition de croissance bactérienne pour permettre aux défenses immunitaires de combattre l'infection plus efficacement. La CMI est une valeur pour une souche bactérienne donnée, on peut aussi définir une CMI₅₀ (50% des souches ont une CMI inférieure à la CMI₅₀) et une CMI₉₀ (90% des souches ont une CMI inférieure à la CMI₉₀).

En parallèle, on peut chercher à évaluer le caractère bactéricide d'un antibiotique. On pourra alors déterminer une CMB (concentration minimale de bactéricidie) qui correspond à la concentration minimale en antibiotique pour obtenir la destruction de 99,99% des bactéries

en 18 heures. Cependant, étant donné que la détermination de la CMB est peu courante, la réalisation de cette technique ne sera pas développée. Son intérêt est malgré tout certain pour les patients à système immunitaire déprimé ou déficient (par exemple, poulain n'ayant pas bu de colostrum).

Il existe 2 grandes familles de tests pour étudier l'effet bactériostatique :

-ceux utilisant une méthode quantitative aboutissant à un résultat chiffré correspondant à une CMI : tests par dilution,

-ceux utilisant une méthode qualitative permettant de classer les bactéries en sensible(S), intermédiaire(I) ou résistante(R) : tests par diffusion.

Toutes ces méthodes doivent suivre des règles de standardisation rigoureuses pour pouvoir être reproductibles, interprétables et comparables au sein du laboratoire, du pays ou entre les Etats.

1.3.1.1) Méthode par dilution

Le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie(CA-SFM)[10] définit la CMI comme étant la plus faible concentration d'une gamme de dilution d'antibiotique de demi en demi qui inhibe la croissance visible du germe.

L'avantage des méthodes par dilution est leur relative souplesse d'utilisation puisqu'on peut compléter le milieu de culture pour des germes à besoin particulier et utiliser n'importe quel antibiotique pourvu qu'il soit disponible sous forme de poudre. De plus, les résultats peuvent être donnés sous forme de CMI et/ou sous forme de classification S/I/R.

Ces techniques de dilution, sur milieu solide ou en milieu liquide, sont les méthodes de référence.

a)Méthode par dilutions successives en milieu solide

Cette méthode consiste en l'ensemencement de géloses contenant des concentrations décroissantes en antibiotique. On recherche la plus faible concentration pour laquelle il y a inhibition macroscopique de la pousse bactérienne.

Les solvants et les diluants utilisables sont définis dans les documents de la SFM pour la France ou dans ceux du NCCLS pour l'Amérique de Nord.

La gélose de Mueller-Hinton est le milieu de culture de référence et se commercialise sous forme déshydratée. La teneur en cations bivalents, en thymine et le pH doivent être contrôlés. Pour l'étude des Streptocoques on rajoute parfois 5% de sang de cheval ou de mouton. Si l'on recherche la résistance d'un staphylocoque vis à vis de la méticilline ou l'oxacilline, on devra supplémenter le milieu avec 2% de NaCl.

L'inoculum bactérien doit être standardisé : on cherche à obtenir 10^4 CFU par spot sur la gélose. Pour cela, on peut ajuster la turbidité de l'échantillon avec le milieu McFarland.

Une fois l'inoculum absorbé par la gélose, les milieux sont incubés à 35°C pendant 16 à 20 heures à atmosphère normale. Pour certaines bactéries, on pourra augmenter la teneur en CO₂.

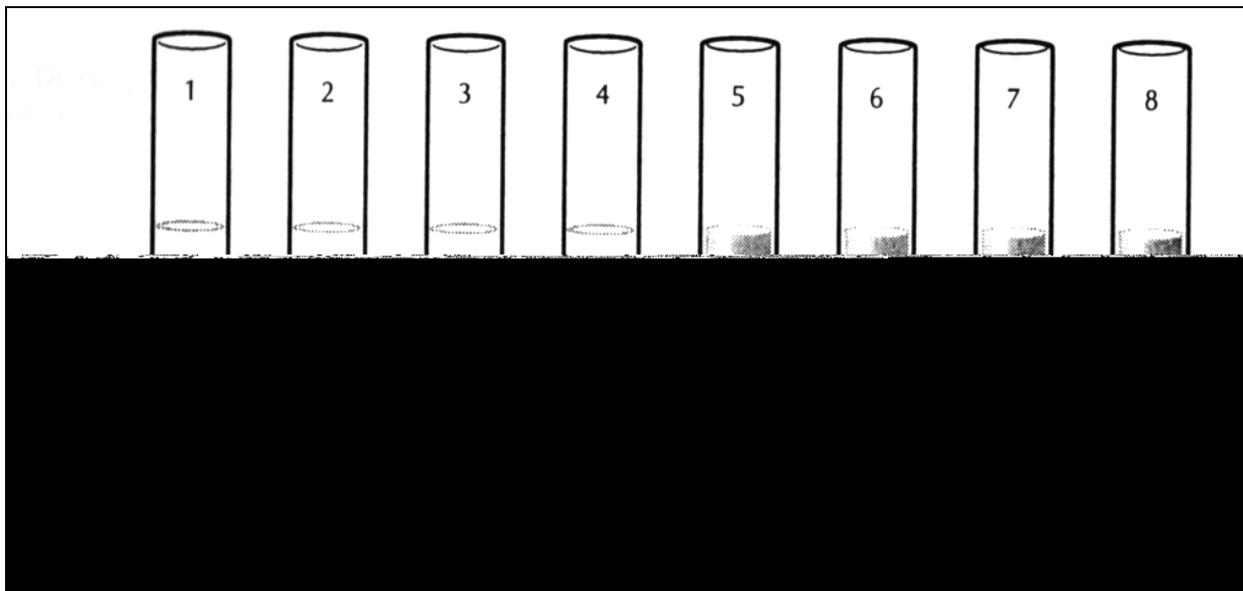
On recherche enfin la plus faible concentration pour laquelle la pousse est inhibée macroscopiquement : on obtient alors la CMI.

C'est une méthode de référence du fait de sa standardisation et qui permet d'évaluer les performances des autres tests mais sa mise en œuvre nécessite des moyens en temps et en personnels qui limitent son champ d'application.

b) Méthodes par dilutions successives en milieu liquide

Le principe est le même que pour le milieu solide sauf que l'on travaille en milieu liquide (cf figure A.3). On peut faire une distinction entre des méthodes de macrodilution et des méthodes de microdilution. Ces dernières sont plus utilisées car des kits sont commercialisés et le travail est automatisable.

Figure A.3 : schéma de la détermination de la CMI par la méthode des dilutions sériées.

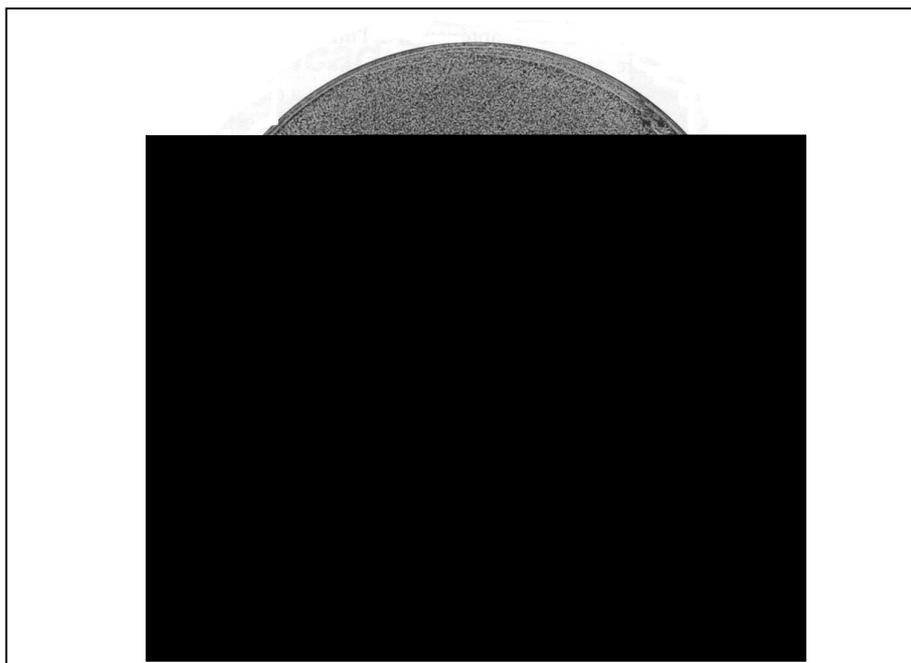


1.3.1.2) Méthode par diffusion

a)Principe

Ce test consiste en l'application de disques imprégnés d'antibiotiques sur une gélose préalablementensemencée par des bactéries. L'antibiotique va diffuser dans la gélose avec une concentration décroissante vers la périphérie. Dans la zone où la concentration est inhibitrice, on n'observera pas de pousse bactérienne. Avec la mesure du diamètre de la zone d'inhibition et grâce à des abaques, on pourra classer la bactérie en sensible(S), intermédiaire(I) ou résistante(R). L'analyse de l'efficacité de différents antibiotiques sur une souche bactérienne donne un antibiogramme.

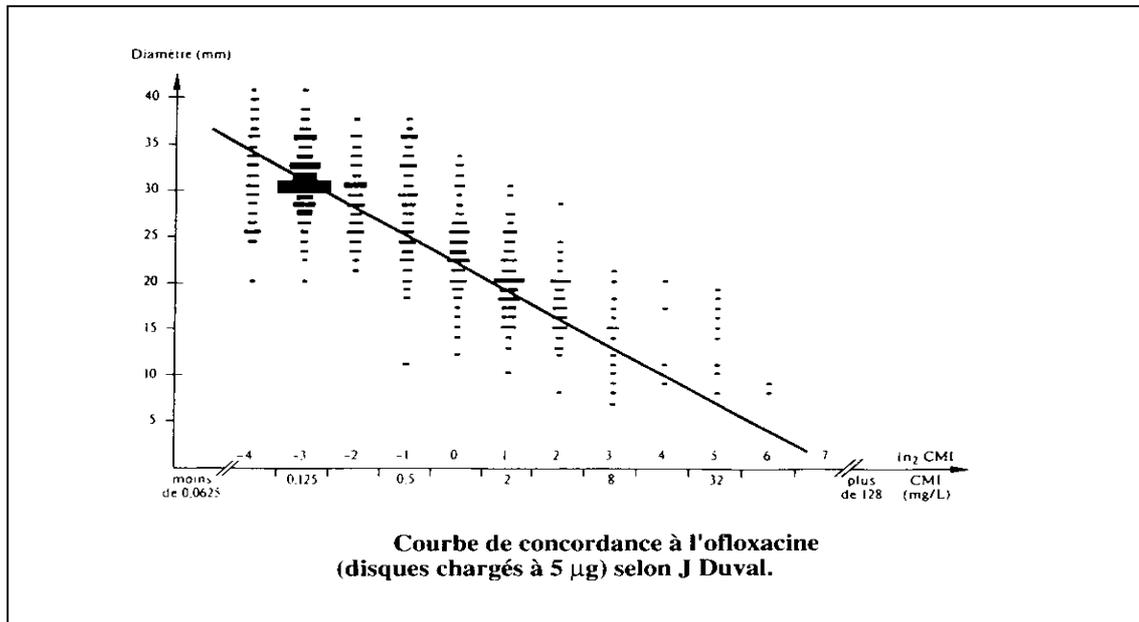
Illustration A.1 : exemple de gélose avec des disques d'antibiotiques et une souche bactérienne ayant une sensibilité variable aux antibiotiques testés.



b)Etablissement de la courbe de corrélation et définition des catégories

Pour un grand nombre de souches (au moins 300), on met en relation le diamètre d'inhibition avec la CMI obtenue par une des méthodes de dilution : on obtient un nuage de points dans un graphique représentant le diamètre en fonction du \log_2 de la CMI (cf figure A.4). On peut calculer alors une courbe de régression, appelée courbe de concordance, qui met en relation la CMI avec le diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne.

Figure A.4 : exemple de courbe de concordance[15]



Dans son communiqué 2000-2001[10], le comité de l'antibiogramme de la SFM définit les trois catégories de souches bactériennes:

- « Les souches sensibles sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée.
- Les souches résistantes sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quel que soit le type de traitement.
- Les souches intermédiaires sont celles pour lesquelles le succès est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel la seule valeur de la CMI n'est pas prédictive de succès thérapeutique :
 - i) Elles peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression *in vitro* est faible, pouvant entraîner leur classement dans la catégorie S. Cependant, *in vivo*, une partie de ces souches apparaissent résistantes à la thérapeutique ;
 - ii) Elles peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression n'est pas suffisante pour justifier un classement dans la catégorie R, mais qui favorise l'apparition de résistance *in vivo* en cours de traitement ;
 - iii) La catégorie intermédiaire est aussi une zone tampon qui tient compte des incertitudes techniques et biologiques.»

Pour classer les bactéries, on compare la CMI avec des valeurs critiques (valeur critique inférieure, valeur critique supérieure) qui dépendent de nombreux facteurs : concentration tissulaire et sérique avec un traitement à posologie habituelle, résultats cliniques, distribution des CMI pour les populations sensibles et résistantes, variabilité statistique...

tableau A.2 : critères de classement des souches pour les tests qualitatifs	
Données	interprétation
CMI < Valeur critique inférieure	sensible
V. c. inférieure < CMI < V. c. supérieure	intermédiaire
CMI > valeur critique supérieure	résistant

Ces valeurs critiques sont établies et mises à jour régulièrement par le NCCLS ou la SFM. Jusqu'à ces derniers temps, les normes calculées pour l'antibiothérapie humaine étaient utilisées pour l'antibiothérapie vétérinaire sans véritable validation. Récemment le NCCLS[41] a édité un certain nombre de valeurs établies pour les animaux.

L'annexe I présente quelques valeurs critiques en vigueur au laboratoire de bactériologie clinique de l'HVE à la date du 15 septembre 2000. Certaines valeurs sont adaptées selon l'espèce animale sur laquelle a été pratiqué le prélèvement.

c) Mise en œuvre

La quantité d'antibiotique dans les disques est standardisée de manière à obtenir une lecture facile, *i.e.* une zone d'inhibition <10 mm pour les bactéries résistantes ou >30 mm pour les sensibles si possible. Les paramètres de stockage sont définis par le fabricant.

Le milieu de culture recommandé en France et en Amérique du Nord est la gélose de Mueller-Hinton. Les milieux utilisés dans les autres pays sont décrits dans le tableau A.3 [39]. Les méthodes sont très similaires en France et aux USA et peuvent être considérées comme équivalentes. La supplémentation de ce milieu est délicate car elle peut modifier les paramètres de diffusion et donc les CMI obtenues.

Tableau A.3[39]

Pays	Milieu de culture	Commentaires
Grande-bretagne	Iso-sensitest	Non corrélé à la CMI
France	Mueller-Hinton	Identique à la NCCLS
Allemagne	Mueller-Hinton	
Suède	PDM-ASM ^a	
Pays-bas	Iso-sensitest	
Danemark	Mueller-Hinton	Utilisation de tablettes à la place de disques de papier imprégnés
Australie	Sensitest	Dichotomique (bactérie classée sensible ou résistante).

^a : PDM-Antibiotic Susceptibility Medium

L'inoculum doit être standardisé pour obtenir des colonies juste confluentes. On peut utiliser un photomètre ou la technique de comparaison au milieu McFarland. L'ensemencement est possible par flottage ou par écouvillonnage. On procède ensuite au dépôt des disques d'antibiotiques soit manuellement soit avec un distributeur automatique. Le temps d'incubation est de 18 à 24h dans une étuve à atmosphère normale et à 35-37 °C.

On mesure après incubation le diamètre d'inhibition avec une règle graduée ou un pied à coulisse. Des appareils automatisés ont été également développés pour faire cette mesure.

Grâce à des abaques, on interprète le diamètre obtenu en trois catégories. Le bactériologiste peut modifier l'antibiogramme initial et faire des commentaires. Par exemple une résistance à la méticilline de la part d'un staphylocoque doit faire étendre la résistance à toutes les β -lactamines ou encore une résistance croisée à la kanamycine et à la néomycine implique une résistance à l'amikacine etc. C'est la lecture interprétative de l'antibiogramme.

d)Avantages et inconvénients

L'avantage essentiel de la méthode par diffusion est sa facilité de mise en œuvre avec une lecture facile des résultats. Mais ce test n'est pas adapté pour les bactéries à pousse lente ou qui nécessitent une supplémentation car les abaques de décision ont été étalonnés pour des bactéries à pousse rapide et sur gélose non supplémentée. De plus certains types de résistance ne s'expriment pas pleinement avec cette méthode.

1.3.1.3) Contrôle de qualité

Quelle que soit la méthode utilisée, des contrôles de qualité réguliers doivent être faits [12, 28]. On utilise alors des souches bactériennes de référence pour lesquelles on doit obtenir des MIC à l'intérieur de fourchettes de valeurs pré-définies. Les souches fréquemment utilisées sont : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Il est recommandé [12, 28] de faire ces tests au moins une fois par semaine.

1.3.1.4) Causes d'erreur

a) Causes techniques

- La reproductibilité des résultats est fonction de l'application des standards. Les variations dans la composition du milieu de culture, la concentration de l'inoculum, la qualité des disques d'antibiotiques, les conditions d'incubation, etc..... sont autant de causes de résultats différents.
- Les valeurs critiques qui déterminent les catégories sont souvent déduites des valeurs humaines sans être validées pour les espèces animales.

b) Causes bactériennes

- Les conditions standards sont valables pour des germes aérobies et à croissance rapide (staphylocoques, entérobactéries, *Pseudomonas*). Pour des bactéries à croissance lente ou avec une supplémentation du milieu, on s'écarte des conditions standards. Par exemple certains additifs peuvent inhiber l'action de l'antibiotique et donc la zone d'inhibition sera plus petite. L'équilibre entre diffusion de l'antibiotique et croissance bactérienne est modifiée pour les bactéries à croissance lente.
- Certains résultats *in vitro* ne correspondent pas avec le résultat *in vivo*. Par exemple, les résultats divergent pour *Listeria* spp. et les céphalosporines. Les conditions du site infectieux peuvent également intervenir (anaérobiose, pH acide, ions, débris cellulaires en grande quantité). On retrouve ces mêmes problèmes d'environnement dans le cas des bactéries intracellulaires.
- L'inoculum utilisé est relativement faible et une population résistante sous-représentée peut passer inaperçue.

c) Les limites de l'interprétation

- La valeur de la CMI ne doit pas signifier pour le praticien plus que sa définition. En particulier, c'est une valeur donnée par un test *in vitro*, qui ne peut prendre en compte toute la complexité de l'interaction antibiotique-bactérie-hôte que l'on rencontre *in vivo*. Son interprétation et ses conséquences cliniques doivent se faire en toute connaissance de causes. Contrairement à ce que son nom pourrait laisser croire, des concentrations d'antibiotique inférieures à la CMI ont déjà un effet inhibiteur sur

1.3.3) Sélection des antibiotiques à tester

Le choix des antibiotiques à tester en routine est fonction de nombreux facteurs tel que la bactérie identifiée, la disponibilité de l'antibiotique et son utilisation possible (AMM) chez l'hôte, etc. et doit faire l'objet d'une discussion entre le praticien et le laboratoire.

1.4) Prévention de l'antibiorésistance

1.4.1) Les enjeux

La prévention de l'apparition de souches bactériennes résistantes à plusieurs antibiotiques est devenue un problème majeur tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Pour les médecins, l'apparition d'un réservoir de gènes de résistance transférables à des bactéries pathogènes pour l'homme ou bien la possible transmission de bactéries multirésistantes directement de l'animal à l'homme (zoonose) représentent une menace sérieuse. Pour les vétérinaires, la dissémination de l'antibiorésistance rend la thérapeutique classique moins efficace.

L'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire, et plus spécialement dans l'industrie agroalimentaire, alimente de nombreux débats [14, 19, 24, 25]. Wise [61] estime que 40 à 80% des antibiotiques sont utilisés à des fins pouvant être remises en cause. Etant donné que 80% des antibiotiques vétérinaires sont utilisés en prophylaxie ou comme promoteur de croissance, c'est dans ces domaines que l'effort de réflexion doit se porter.

La médecine équine est une médecine individuelle, caractérisée à ce titre par le non-usage de promoteur de croissance, et pour laquelle le marché des antibiotiques est inférieur à celui des carnivores ou des animaux de rente. La filière équine ne se trouve donc pas en première ligne dans le débat sur l'apparition d'antibiorésistances en médecine humaine liée à l'antibiothérapie animale. Cependant, le contrôle de l'apparition de nouvelles souches résistantes doit être pris en compte tant pour les conséquences possibles en santé publique que pour l'efficacité des traitements antibiotiques pour les animaux.

1.4.2) Sources de l'antibiorésistance et moyens d'action

Le développement de l'antibiorésistance provient du fait même de l'utilisation des antibiotiques mais certaines pratiques favorisent sa progression. C'est le cas de l'utilisation des antibiotiques alors que ce n'est pas nécessaire (par exemple, lors d'affections virales non surinfectées) ou de leur utilisation à des doses sub-efficaces [32, 57].

La limitation de l'expansion de la résistance bactérienne passe par une limitation et une meilleure utilisation des antibiotiques. Plusieurs actions sont possibles :

1.4.2.1) Limiter l'utilisation des antibiotiques

➤ Eduquer les éleveurs et les propriétaires

Il est nécessaire d'informer les personnes susceptibles de donner des antibiotiques aux animaux. Leur utilisation non raisonnée ne peut conduire qu'à des schémas thérapeutiques inadéquats. L'accent doit être mis sur les dangers d'une mauvaise utilisation, que ce soit pour la progression de l'antibiorésistance, les effets secondaires ou la toxicité.

➤ Favoriser l'hygiène et de bonnes conditions d'élevage

Une meilleure hygiène et des méthodes d'élevages contrôlées permettent de réduire le nombre d'infections et donc de traitements antibiotiques. De plus, une bonne hygiène limitera la dissémination des bactéries résistantes.

➤ Favoriser la vaccination

Le recours à la vaccination, lorsqu'elle est possible, doit être encouragé. La diminution de maladies virales permet d'éviter les surinfections bactériennes.

➤ Essayer d'éradiquer certaines maladies

En éradiquant certaines maladies virales favorisant les surinfections bactériennes ou les maladies débilitantes, on limite l'utilisation des antibiotiques.

1.4.2.2) Faire un meilleur usage des antibiotiques

Lorsqu'il n'est pas possible d'éviter l'usage des antibiotiques, leur utilisation doit se faire dans la mesure du possible en suivant certaines règles [3].

➤ Optimiser le schéma thérapeutique

Si la CMI permet une bonne évaluation de l'évolution de la résistance bactérienne au cours du temps, sa connaissance seule ne permet pas la meilleure adaptation possible de la posologie à la bactérie en cause dans une infection.

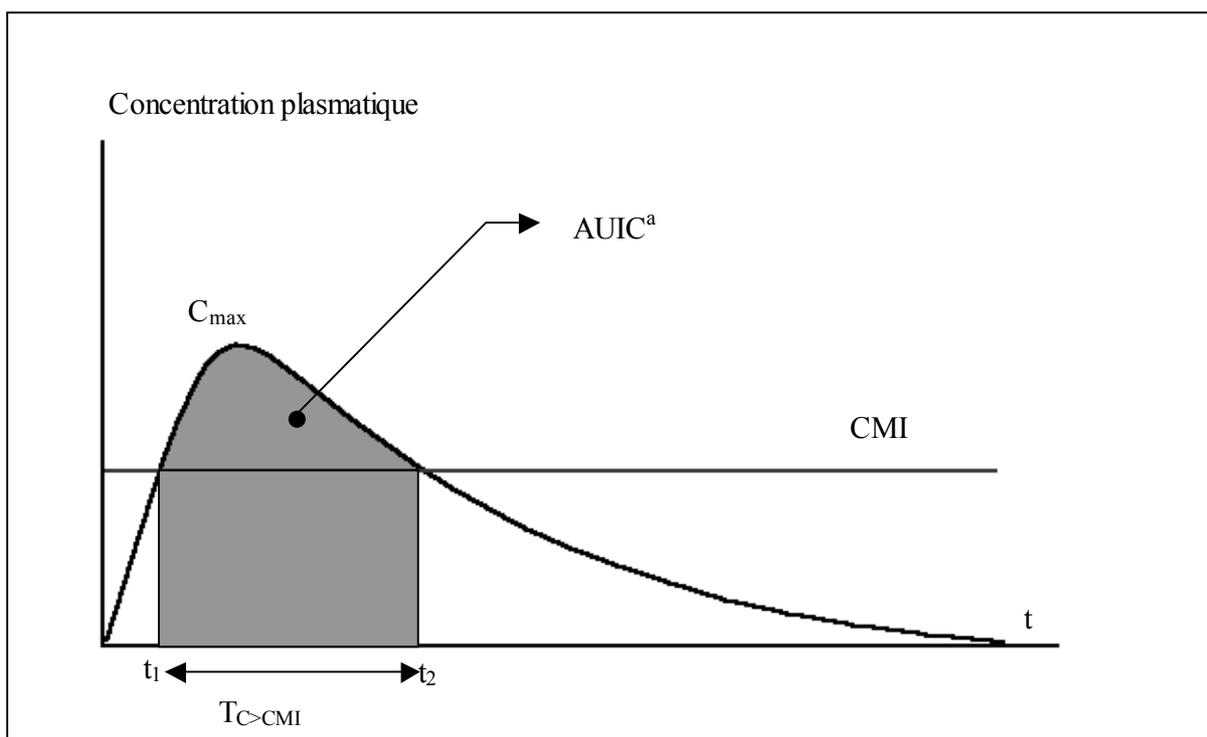
A l'heure actuelle, les progrès de la pharmacocinétique (PK) et de la pharmacodynamie (PD) ont permis la détermination d'indices ayant pour but de prédire l'efficacité d'un schéma posologique et sa capacité à limiter l'apparition de résistance. Ces indices sont développés plus spécialement en médecine humaine mais les bases théoriques sont identiques pour la médecine vétérinaire [50].

On peut distinguer 2 groupes d'antibiotiques [8] selon leur activité de bactéricide : des antibiotiques dits « concentration dépendant » dont l'activité augmente en parallèle avec l'augmentation de leur concentration, et des antibiotiques « temps-dépendants » dont l'activité n'augmente plus après un seuil, et pour lesquels le facteur déterminant de l'activité bactéricide devient le temps passé en contact avec les germes.

Pour les antibiotiques concentration-dépendant, comme les aminosides ou certaines fluoroquinolones vis-à-vis des germes Gram négatif, il est admis [8] qu'un ratio C_{max}/CMI supérieur à 8-12 est favorable pour obtenir une bonne efficacité clinique et diminuer l'apparition de résistance. (C_{max} est la concentration maximale d'antibiotique dans les conditions d'équilibre) [cf figure A.5].

Pour les antibiotiques temps-dépendant, comme les β -lactamines, le temps pendant lequel la concentration en antibiotique est supérieure à la CMI ($T_{C>CMI}$) semble être un bon indice de l'efficacité d'une thérapie [8].

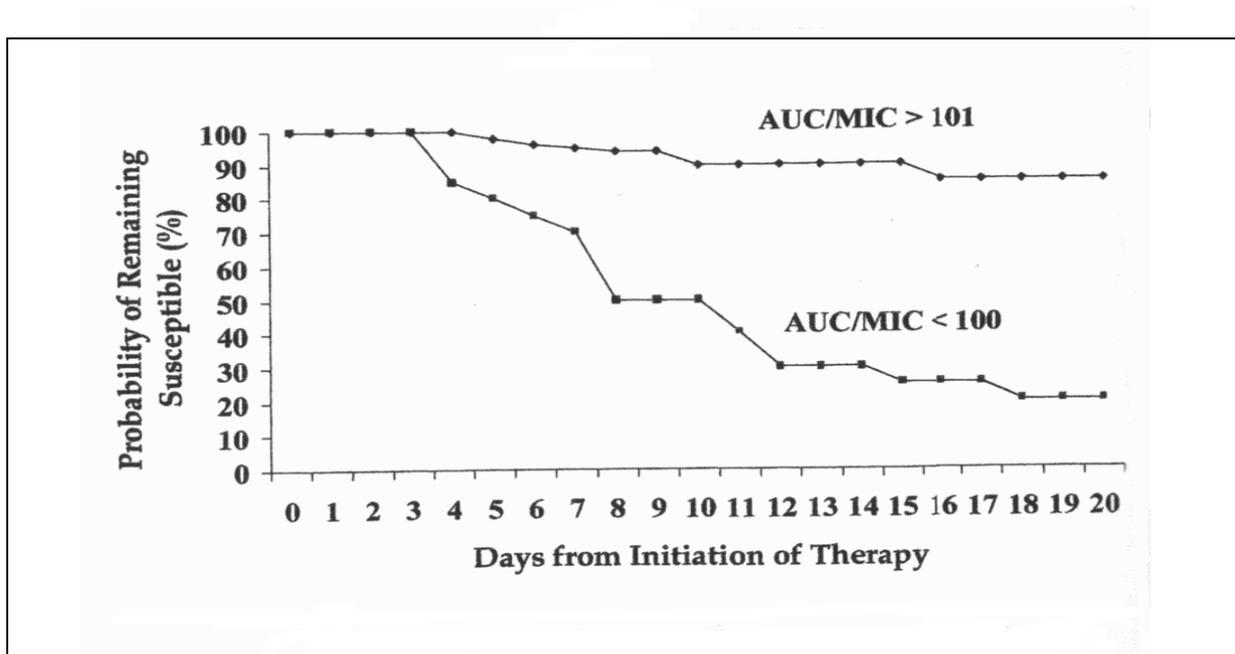
Figure A.5 : les principaux paramètres pharmacocinétiques utilisables pour optimiser un schéma thérapeutique.



^a : $AUIC = AUC_{[t1-t2]} / CMI$

Plus globalement, on a essayé de trouver un indice qui serait optimum et valable quel que soit la classe d'antibiotique. Thomas *et al.* [57] ont montré récemment que pour cinq schémas thérapeutiques différents, on observait une augmentation significative de la probabilité de voir apparaître une résistance si la valeur du rapport AUC/MIC était inférieure à 100 (cf figure A.6). Il a été également proposé le calcul de l'AUIC (aire sous la courbe des concentrations inhibitrices) [17, 51, 52]. Ces indices n'ont pas été validés à l'heure actuelle en médecine vétérinaire.

Figure A.6 : Exemple de pourcentage de bactéries restant sensibles en fonction de la durée de traitement et du rapport AUC/MIC pour une étude sur 107 patients humains atteints d'infections respiratoires profondes en phase aiguë [57].



➤ **Minimiser les contaminations de l'environnement**

En minimisant les contaminations environnementales en antibiotiques, on limite la possibilité de laisser en présence de bactéries des antibiotiques à des concentrations sub-éfficaces.

➤ **Etablir une banque de données**

La conservation de données sur le malade, la thérapeutique, la souche bactérienne etc... permet la réalisation d'études rétrospectives ayant pour but d'améliorer encore l'adaptation des schémas posologiques.

2)Etat des lieux de la résistance des souches d'origine équine

2.1)Principaux antibiotiques utilisés en médecine équine

Le nombre d'antibiotiques utilisables dans l'espèce équine est limité, d'une part à cause des effets secondaires possibles, notamment au niveau gastro-intestinal du fait de la grande sensibilité de la flore du cheval, et d'autre part parce que peu de molécules sont commercialisées avec une AMM pour les chevaux.

Le mode d'administration pourra être également limitant à cause de l'impossibilité hors d'une structure hospitalière d'administrer des antibiotiques par voie IV ou IM plus de deux fois par jour.

En général, les antibiotiques utilisés sont les β -lactamines, les sulfamides et pyrimidines, les aminosides, les macrolides (érythromycine), la rifampicine, les tétracyclines, le chloramphénicol, les fluoroquinolones et le métronidazole [28, 38, 46].

Les antibiotiques employés en fonction de l'identification de la bactérie sont résumés dans le tableau A.5 (modifié, d'après [38]).

Tableau A.5 [38]		
bactérie	Antibiotique de 1 ^{er} choix	Antibiotiques alternatifs
<i>Actinobacillus</i> spp.	TMS ^a	Ceftiofur, gentamicine, chloramphénicol
<i>Rhodococcus equi</i>	Erythromycine + rifampicine	TMS ^a ± rifampicine, chloramphénicol ± rifampicine
<i>Escherichia coli</i>	gentamicine	Amikacine, fluoroquinolones, ceftiofur, TMS ^a
<i>Enterobacter</i> spp.	gentamicine	Amikacine, fluoroquinolones, chloramphénicol
<i>Salmonella</i> spp.	TMS ^a	Gentamicine, amikacine, chloramphénicol, ampicilline
<i>Pseudomonas</i> spp.	gentamicine	Amikacine, fluoroquinolones, TMS ^a
Staphylocoques coagulase +	TMS ^a	Méticilline, oxacilline, céphalosporines, aminosides
Streptocoques hémolytiques	Pénicilline G	TMS ^a , céphalosporines, érythromycine, ampicilline
Anaérobies		
- <i>Bacteroides fragilis</i>	Métronidazole	Chloramphénicol
- autres	Pénicilline	Métronidazole, chloramphénicol

^a: triméthoprime-sulfonamides.

2.1.1) Les β -lactamines

Les β -lactamines ont pour cible la paroi bactérienne. Ce sont des antibiotiques temps-dépendant.

2.1.1.1) La pénicilline G

La pénicilline G est un antibiotique très actif sur beaucoup de bactéries anaérobies et les bactéries Gram+ aérobies, en particulier les streptocoques β -hémolytiques (*Streptococcus zooepidemicus*, *S. equi*...).

La pénicilline G est disponible sous forme de sels hydrosolubles permettant l'obtention de concentrations plasmatiques très élevées mais nécessitant des injections fréquentes (quatre fois par jour) et sous forme de pénicilline procaïne ou pénicilline benzathine (formes longue action) avec un plus grand intervalle d'administration mais avec obtention de concentrations plasmatiques moins élevées.

Le mécanisme de résistance le plus répandu résulte de la production de β -lactamases, enzymes qui détruisent le noyau β

2.1.1.3) *Le ceftiofur*

Le ceftiofur est une céphalosporine de 3^e génération ayant un bon spectre Gram+ et Gram - (à l'exception des bactéries du genre *Enterobacter*). Il a généralement une bonne activité sur les bactéries produisant des β -lactamases. Il est rapporté quelques cas de troubles digestifs lors de son utilisation.

Le ceftiofur, tout comme les autres antibiotiques de la classe des céphalosporines, possède une structure plus stable vis-à-vis des β -lactamases. Les trois principaux mécanismes de résistances sont une perméabilité réduite, une inactivation enzymatique et l'absence de PLPs ayant une affinité pour cette céphalosporine. On peut noter que certaines souches résistantes possédant une perméabilité réduite et des pompes à efflux montrent une résistance croisée avec les aminoglycosides, le chloramphénicol, les fluoroquinolones, les tétracyclines et le triméthoprime.

Le ceftiofur a montré son efficacité dans les infections respiratoires et peut être associé à un aminoglycoside (synergie) chez les poulains septicémiques.

2.1.2) Sulfonamides et triméthoprime

Les sulfamides et le triméthoprime agissent sur la voie de synthèse de l'acide folique, et donc des bases puriques de l'ADN bactérien, à 2 étapes différentes (cf figure A.2). L'action de ces 2 familles d'antibiotiques est synergique. Leur spectre est large (bactéries aérobies gram+ et gram -) et ils peuvent être administrés par voie orale ou intraveineuse lente. Par voie orale, on peut observer l'apparition de diarrhées quelques jours après le début du traitement. La voie intramusculaire est douloureuse.

L'utilisation de sulfadiazine ou de sulfaméthoxazole en association avec le triméthoprime donne les mêmes résultats cliniques. Ces molécules sont fréquemment utilisées comme antibiotiques à large spectre de première intention grâce à leur facilité d'administration par voie orale et au peu d'effets secondaires rencontrés. L'administration par voie parentérale est une intraveineuse stricte et lente.

Des mutations chromosomiques successives peuvent conduire à une augmentation progressive de la résistance en diminuant la perméabilité de la bactérie, en induisant la synthèse d'enzymes moins sensibles et en augmentant la synthèse d'acide para-amino-benzoïque (cf. figure A.2)

La résistance par acquisition de plasmide est la plus répandue et conduit à une diminution de la pénétration des antibiotiques et à la production d'enzymes peu sensibles. La résistance croisée entre les sulfonamides est complète.

2.1.3) L'érythromycine

L'érythromycine appartient à la famille des macrolides, qui inhibent la synthèse des protéines en se fixant à une sous-unité des ribosomes. Elle est essentiellement utilisée en association avec la rifampicine pour traiter les infections à *Rhodococcus equi* du poulain.

Son indication sur les chevaux adultes est très réduite à cause du développement possible de colites aiguës à *Clostridium* pouvant être mortelles [5].

La résistance à l'érythromycine peut résulter d'une mutation chromosomique unique, induisant une résistance de haut niveau, ou par acquisition d'un plasmide conduisant à la méthylation de la cible de l'antibiotique.

2.1.4) La rifampicine

La rifampicine appartient à la famille des rifamycines qui agissent en inhibant l'ARN polymérase. La rifampicine a un spectre essentiellement gram + et a la propriété de pénétrer facilement dans les abcès et dans les cellules. Son utilisation en monothérapie peut être associée au développement rapide d'une antibiorésistance par mutation chromosomique. Elle est donc utilisée le plus souvent en association avec l'érythromycine pour le traitement de la rhodococcose du poulain.

2.1.5) Les tétracyclines

Les tétracyclines inhibent la synthèse des protéines en se fixant sur une sous-unité des ribosomes. Ce sont des molécules bactériostatiques à spectre très large (gram+, gram -, rickettsies, mycoplasmes et *Ehrlichia* spp). L'élimination par voie biliaire de la majorité des métabolites est responsable de graves troubles de la flore du cheval pouvant être létaux, ce qui limite leur utilisation.

L'oxytétracycline est essentiellement utilisée contre l'ehrlichiose équine [13, 42].

Récemment, Bryant [7] a montré que l'utilisation de doxycycline par voie orale à la posologie de 10 mg/kg 2 fois par jour est efficace dans les cas d'affections à germes Gram+ ayant une CMI < 0.25 µg/mL. Les conséquences sur la flore de l'utilisation de la doxycycline semblent minimales ou nulles [2, 49].

Les mécanismes de résistances les plus souvent rencontrés sont une diminution du transport dans la bactérie, des protéines augmentant l'excrétion de l'antibiotique et la protection des ribosomes par une protéine cytoplasmique. De nombreux transposons ont été mis en évidence permettant aux bactéries de devenir résistantes.

2.1.6)Le métronidazole

Le métronidazole provoque des lésions sur l'ADN bactérien et inhibe ses enzymes de réparation.

On l'utilise en association avec d'autres antibiotiques pour son action sur les germes anaérobies (*Bacteroides* spp., y compris *Bacteroides fragilis*, *Clostridium* spp). Le métronidazole est utilisé avec succès sur les pleuropneumonies où des germes anaérobies sont mis en cause [34, 56].

Les effets secondaires sont rares : on parfois observe une anorexie passagère et réversible [34].

2.1.7)Les aminosides

Les aminosides agissent en bloquant la synthèse cellulaire des protéines. Leur spectre s'étend essentiellement sur les bactéries Gram -. Ils sont inefficaces sur les anaérobies, une partie des Gram+, et les bactéries intracellulaires. Ce sont des antibiotiques bactéricides concentration-dépendants. Pour compléter leur action, on leur associe souvent une β -lactamine (effet synergique).

Trois molécules sont principalement utilisées : la streptomycine, la gentamicine et l'amikacine.

La streptomycine rencontre une résistance importante et son intérêt clinique n'est pas clairement démontré. On lui préfère des aminosides plus récents comme la gentamicine et l'amikacine. Leurs indications sont les infections graves à Gram- et les septicémies. L'amikacine rencontre moins de résistances mais a un coût élevé et est donc souvent réservée aux poulains septicémiques.

La résistance aux aminosides résulte en majorité de la production d'enzymes à partir d'un plasmide R. Ces enzymes sont de trois catégories : les phosphotransférases, les adényltransférases et les acétyltransférases [36]. Au sein de chaque catégorie on dénombre différentes enzymes qui n'ont pas le même spectre d'activité. Une diminution de perméabilité est également rencontrée. La résistance par mutation chromosomique est rare sauf pour la streptomycine car une seule mutation peut engendrer une résistance de haut-niveau.

La toxicité des aminosides [21, 33] est essentiellement rénale (nécrose tubulaire) et s'exprime plus facilement chez les animaux déshydratés [59] et les poulains prématurés. Actuellement en médecine humaine, l'administration une fois par jour de la gentamicine est préférée à l'administration trois fois par jour pour limiter la toxicité rénale sans altérer le résultat clinique. A ce jour, aucune étude ne permet de savoir si l'administration unique chez le cheval a la même efficacité clinique qu'une administration tri-quotidienne.

2.1.8) Les fluoroquinolones

Les fluoroquinolones inhibent l'ADN-gyrase, enzyme nécessaire au super-enroulement de l'ADN.

Les fluoroquinolones sont des molécules à large spectre (mais inactives sur les bactéries anaérobies) et qui atteignent des concentrations tissulaires élevées. Elles ne possèdent pas d'AMM chez le cheval en France. L'enrofloxacin est utilisée en Amérique du Nord sur des bactéries multirésistantes hors AMM lorsqu'aucun autre antibiotique n'est possible.

Un effet secondaire possible des fluoroquinolones est une action toxique sur les cartilages de croissance. Elle a été démontrée pour de nombreuses espèces (rats, chiens, lapins) mais est encore incertaine chez le cheval. Cependant, par précaution, leur utilisation chez le poulain est souvent limitée au cas où aucun autre antibiotique ne serait efficace.

La résistance aux fluoroquinolones peut se faire selon trois mécanismes majeurs : une diminution de la perméabilité de la paroi bactérienne par modification des porines, une excrétion active de l'antibiotique par des pompes membranaires, ou la mutation de l'ADN-gyrase.

2.1.9) Le chloramphénicol

Le chloramphénicol agit en se fixant à une sous-unité des ribosomes ce qui inhibe la synthèse des protéines. Il possède un spectre d'action intéressant (bactéries Gram+, Gram- et anaérobies) mais son utilisation est très limitée à cause du danger potentiel qu'il représente pour le manipulateur : une anémie aplasique, non dose-dépendante, irréversible et mortelle est possible en effet chez l'homme (1 cas sur 25000 à 60000). Il n'y a plus à l'heure actuelle de spécialité vétérinaire à base de chloramphénicol.

2.2) Principales bactéries infectieuses du cheval

Chez le cheval adulte, les principales indications d'une antibiothérapie sont les infections respiratoires, de l'appareil reproducteur, du système myoarthrosquelettique et les infections de plaies [30, 38].

Chez les poulains, les infections néonatales (septicémies, pneumonies) sont les principales causes de l'administration d'antibiotiques.

Les bactéries les plus fréquemment rencontrées en fonction de l'affection sont rassemblées dans le tableau A.6 (d'après Moore[38]).

Tableau A.6[38]	
Type d'infection	Bactéries les plus probables
Pneumonie et pleuropneumonie	<i>E.coli</i> , <i>Actinobacillus spp.</i> , <i>Streptococcus zooepidemicus</i> , anaérobies.
Infection sous-cutanée	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium spp.</i>
Plaies chirurgicales	Streptocoques β -hémolytiques, staphylocoques, entérobactéries, <i>Pseudomonas</i> .
Plaies traumatiques	<i>Pseudomonas spp</i> , streptocoques
Arthrite septique iatrogène	Staphylocoques coagulases positifs
Arthrite septique traumatique	Streptocoques, staphylocoques, entérobactéries, <i>Pseudomonas spp.</i>
Ostéomyélite	Streptocoques, staphylocoques, entérobactéries, <i>Pseudomonas spp</i>
Cystite, pyélonéphrite	Enterobacteriaceae, <i>Corynebacterium renale</i>
Métrite	Streptocoques β -hémolytiques, Enterobacteriaceae, <i>Pseudomonas spp.</i>
Péritonite, abcès abdominaux	Streptocoques β -hémolytiques, anaérobies, Enterobacteriaceae, <i>Rhodococcus equi</i>
Entérocolite	<i>Salmonella spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i>
Kératite	<i>S.aureus</i> , <i>S. zooepidemicus</i> , <i>Pseudomonas spp.</i>

2.2.1) *Streptococcus spp*

Les streptocoques [30] sont des coques gram + anaérobies facultatifs. Les pathogènes majeurs sont ceux qui expriment une hémolyse de type β : *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*), *Streptococcus equi* subsp. *equi* (*S. equi*), et *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (*S. equisimilis*).

Les streptocoques sont retrouvés au niveau de la peau, des voies respiratoires supérieures et du tractus génital chez des porteurs sains. La transmission peut donc se faire par voie respiratoire, génitale ou par des aliments.

Streptococcus equi subsp. *equi* (*S. equi*) est l'agent infectieux de la gourme qui se traduit par de la fièvre, un écoulement nasal puis parfois la formation d'abcès dans les nœuds

lymphatiques de la tête. La morbidité est souvent importante. La mortalité reste faible en dehors des cas atypiques.

Streptococcus equi subsp *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) est la bactérie la plus fréquemment rencontrée lors des prélèvements pour bactériologie. Elle se rencontre dans les infections respiratoires (associée ou non avec des *Actinobacillus*) [55], des infections de plaies ou du tractus génital. On peut également la trouver dans des abcès de nœuds lymphatiques, des infections oculaires ou articulaires.

S. dysgalactiae subsp. *equisimilis* (*S. equisimilis*) est trouvé dans toutes les localisations précédentes mais en proportion bien moindre.

2.2.2) Actinobacillus spp.

Les actinobacilles sont des coccobacilles Gram – polymorphes dont l'identification précise peut être difficile, en particulier pour distinguer le genre *Pasteurella* du genre *Actinobacillus*. Ils sont généralement considérés comme des pathogènes opportunistes [11, 60].

L'espèce la mieux documentée comme pathogène du cheval est *Actinobacillus equuli*. On a décrit l'identification de bactéries aux caractéristiques biochimiques proches de *A.suis*, appelé alors *A.suis-like* [27]. Des infections rares à *A.lignieresii* sont également publiées [4, 6, 9].

L'origine des actinobacillus est essentiellement le tractus digestif et les infections se développeront souvent à partir de contaminations fécales ou par extension à partir de la muqueuse buccale.

Chez les poulains, on peut observer des entérites avec septicémies et des localisations secondaires dans les reins, les articulations ou l'arbre respiratoire [48].

Chez les adultes, *Actinobacillus* spp est retrouvé dans les infections respiratoires (souvent en association avec des streptocoques), les abcès et moins fréquemment lors d'endométrite, d'infections des poches gutturales ou des articulations. Des péritonites à *A.equuli* sont également décrites.

2.2.3) Les staphylocoques

Les staphylocoques sont des coques Gram +. Les principaux pathogènes du cheval sont coagulase positifs (*i.e.* produisent une enzyme qui fait coaguler le plasma) : *Staphylococcus aureus* et *S. intermedius* [30].

Globalement, les infections à staphylocoques sont peu fréquentes et le plus souvent iatrogènes. Certaines souches de staphylocoques résistants à la méticilline sont retrouvées lors d'infections ne répondant pas à la thérapeutique classique et dans ce cas une origine humaine est alors fortement suspectée [26].

Les staphylocoques peuvent être mis en évidence dans des infections articulaires, du cordon spermatique (après une castration), de l'utérus ou de plaies.

2.2.4) Les entérobactéries

Les entérobactéries les plus souvent rencontrées dans les processus infectieux du cheval sont : *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., et *Enterobacter* spp. Ce sont des bactéries Gram-présentes de manière normale dans le tube digestif.

L'origine des infections est souvent une contamination fécale ou par l'environnement.

Chez les poulains, les entérobactéries, et plus spécialement *E.coli*, sont les pathogènes les plus fréquents dans les septicémies néonatales avec des localisations secondaires comme les articulations ou le système nerveux central [48].

Chez l'adulte, on retrouve des entérobactéries dans les infections de l'utérus, de plaies, d'articulations, ou du système respiratoire mais dans ce dernier cas avec une fréquence moins importante que les *Actinobacillus* spp.

2.2.5) *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram- aérobique ubiquiste considérée comme pathogène opportuniste. Sa résistance supérieure aux autres bactéries vis-à-vis de certains désinfectants peut conduire à sa présence lors d'infections en milieu hospitalier. Elle conduit à des surinfections graves.

On la retrouve dans les infections de plaies, de l'utérus ou des poches gutturales, le plus souvent en association. *Pseudomonas aeruginosa* a également été identifiée à partir de prélèvements de synovie.

2.2.6) *Rhodococcus equi*

Rhodococcus equi est une bactérie Gram+ aérobique coccoïde que l'on trouve dans les fèces du cheval et d'autres herbivores qui contaminent alors le sol.

La contamination se fait essentiellement par inhalation de poussières ou par voie alimentaire lors de pâtures sur un sol contaminé ou de pica.

La rhodococcose est une des affections les plus importantes du poulain de 1 à 6 mois avec comme forme la plus fréquente une broncho-pneumonie suppurative avec formation de larges abcès où la plupart des antibiotiques diffusent mal [20]. On peut trouver également des formes digestives (entérocolite, typhlite, péritonite ...) et des formes ostéo-articulaires (arthrites, ostéomyélites). Chez l'adulte, la maladie est sporadique [20, 40].

2.3)Données bibliographiques sur le niveau de résistance

L'étude de l'antibiorésistance chez le cheval est difficile car peu de données sont disponibles. La plupart des rapports sont faits pour un échantillon bactérien de faible quantité (<50 souches) et les méthodes de bactériologies ne sont parfois pas comparables. Les critères d'inclusion peuvent varier. De plus, les résultats peuvent être donnés sous forme de CMI, CMI₅₀, CMI₉₀ [16] ou sous forme qualitative.

Par la suite, on se limite aux seuls prélèvements bactériens d'origine équine. Les bactéries dont les antibiogrammes sont le plus retrouvés dans la littérature sont *E.coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella pneumoniae*, *Actinobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus* , les *Pseudomonas* et *Rhodococcus equi*.

2.3.1)Résistance des souches de Streptocoques

Les données sont compilées dans le tableau A.7 [31, 37, 47, 55].

Pour les streptocoques β -hémolytiques, on observe un très faible taux de résistance pour la pénicilline, la méticilline, l'érythromycine, le chloramphénicol et l'ampicilline. Le TMS garde un taux de souches sensibles assez élevé sauf pour Prescott [47] qui trouve seulement 27% de souches sensibles.

Pour l'amikacine et la gentamicine, les résultats sont très variables d'une étude à l'autre, par exemple de 17% à 100% de souches sensibles pour la gentamicine. Ces résultats pourraient s'expliquer par une différence d'interprétation de l'antibiogramme. En effet, le CA-SFM indique qu'il faudrait placer toutes les souches comme résistantes vis à vis des aminosides à cause d'une résistance de bas niveau très répandue, mais peu exprimée *in vitro*.

2.3.2) Résistance des souches de *Actinobacillus* spp.

Globalement, les données des publications rassemblées dans le tableau A.8 montrent une faible résistance des bactéries du genre *Actinobacillus* [31, 37, 47, 54]. En particulier, la résistance est très faible contre l'amikacine et la gentamicine, le TMS, la TC, et le chloramphénicol. La résistance est plus élevée vis à vis de l'ampicilline, la pénicilline et la méticilline.

2.3.3) Résistance des souches de Staphylocoques

A partir des données rassemblées dans le tableau A.9 [31, 37, 47, 53-55], la résistance des staphylocoques est très faible vis à vis des aminosides (gentamicine et amikacine) et du chloramphénicol, faible contre le TMS, la tétracycline (TC), la méticilline ou l'oxacilline, et l'érythromycine. La pénicilline et l'ampicilline rencontrent une résistance importante.

Quelques cas isolés de staphylocoques résistants à la méticilline [26, 62] sont rencontrés.

2.3.4) Résistance des souches d'*E.coli*

Les données pour les *E.coli* sont retrouvées dans le Tableau A.10 [31, 35, 37, 47, 54, 55].

Globalement, on observe que les souches sont majoritairement sensibles aux aminosides et notamment à l'amikacine. La sensibilité est plus variable vis-à-vis de l'ampicilline, le TMS ou le chloramphénicol. Les tétracyclines rencontrent une résistance importante. La résistance à la pénicilline est quasi-systématique.

2.3.5) Résistance des souches d'*Enterobacter* spp

Les données sont rassemblées dans le tableau A.11 [31, 37, 54, 55].

Seule l'amikacine a un faible pourcentage de souches résistantes dans toutes les études. Les données sont plus variables pour la gentamicine qui a tantôt peu de résistance [54, 55], tantôt plus de 50 % des souches résistantes [31, 37]. Le TMS, la tétracycline et le chloramphénicol ont un taux de résistance variable mais plutôt élevé.

Notons que les *Enterobacter* sont considérés comme ayant une résistance naturelle à l'ampicilline [15].

2.3.6) Résistance des souches de *Pseudomonas* spp.

Les données sont rassemblées dans le tableau A.12 [31, 35, 37, 47, 54, 55].

Les souches de *Pseudomonas* sont d'une manière générale multirésistantes.

Seules l'amikacine et, à un moindre degré, la gentamicine rencontrent un faible taux de résistance. L'enrofloxacin a un pourcentage de souches sensibles très variable selon les études. Aucune hypothèse n'est avancée pour expliquer ce phénomène.

Les autres antibiotiques testés rencontrent des taux de résistance très élevés et le CA-SFM classe *Pseudomonas aeruginosa* comme ayant une résistance naturelle contre les aminopénicillines, les céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération, la kanamycine, les tétracyclines, le chloramphénicol, le triméthoprime et les quinolones de première génération [10].

2.3.7) Résistance des souches de *Rhodococcus equi*

Les données sont rassemblées dans le tableau A.13 [18, 20, 37].

Le pourcentage de souches sensibles aux aminosides (amikacine, gentamicine, néomycine mais pas kanamycine), à l'érythromycine et à la rifampicine est très élevé, proche de 100%. Le chloramphénicol et le TMS rencontrent assez peu de souches résistantes.

Le ceftiofur n'a que 50% de souches sensibles.

Les autres antibiotiques testés (ampicilline, kanamycine, et TC) ont un taux de résistance beaucoup plus élevé.

Tableau A.7 : pourcentage des souches sensibles de streptocoques β -hémolytiques en fonction des antibiotiques

Référence	période	amikacine	gentamicine	ampicilline	ceftiofur	TMS	Tétracycline	Chloramphénicol	pénicilline	Méticilline ou oxacilline	érythromycine
Moore et al 1992	1979-1989	0	17	100	ND	88	47	100	100	100	97
Prescott et al. 1984	1981-1982	ND	81	ND	ND	27	19	100	ND	83	99
Sweeney et al 1991	1981-1988	100 ²	100	87	ND	ND	0	97	83	ND	ND
Lavoie et al 1991 ¹	1986-1989	40	95	92	ND	82	47	100	100	ND	100

ND : données non disponibles

¹ :Données pour *Streptococcus zooepidemicus*

² :nombre de souches testées faible (<5)

Zone grisée : les streptocoques sont considérés comme possédant tous une résistance de bas niveau aux aminosides [10]

Tableau A.8 : pourcentage de souches d'*Actinobacillus* spp. sensibles à divers antibiotiques

Référence	période	amikacine	gentamicine	ampicilline	ceftiofur	TMS	Tétracycline	Chloramphénicol	pénicilline	Méticilline ou oxacilline
Snyder et al 1987 ¹	1974-1985	100	100	100	100	100	100	100	75	25
Moore et al 1992	1979-1989	71	86	50	ND	92	83	100	ND	ND
Prescott et al. 1984	1981-1982	ND	87	58	ND	97	97	100	52	52
Lavoie et al 1991	1986-1989	ND	93	83	ND	100	90	75	67	ND

ND : données non disponibles

¹ faible nombre d'échantillon (1 à 5)

Tableau A.9 : pourcentage de souches sensibles de Staphylocoques coagulase positif à divers antibiotiques

Référence	période	amikacine	gentamicine	ampicilline	ceftiofur	TMS	Tétracycline	Chloramphénicol	pénicilline	Méticilline ou oxacilline	érythromycine
Snyder et al 1987 ¹	1974-1985	100	62-100	62-100 ¹	87-100 ²	62	60-100	62-100	62-40	100-100 ¹	62-100 ¹
Moore et al 1992	1979-1989	100	71	27	ND	80	74	96	29	90	95
Prescott et al. 1984 ³	1981-1982	ND	100	21	ND	96	81	94	21	69	98
Sweeney et al 1991 ¹	1981-1988	100	100	20	ND	100	80	80	20	ND	ND
Shimuzu et al 1991	1985-1988	ND	100	ND	ND	ND	92	96	44	ND	81
Lavoie et al 1991	1986-1989	ND	96	ND	ND	100	100	100	30	ND	100

ND : données non disponibles

¹ faible nombre d'échantillon (1 à 5) ; ² souche testée avec une céphalosporine ; ³ *Staphylococcus aureus* seulement

Tableau A.10 : pourcentage de souches d'*E.coli* envers plusieurs antibiotiques sur différentes études.

Référence	période	amikacine	gentamicine	ampicilline	ceftiofur	TMS	Tétracycline	Chloramphénicol	pénicilline
Prescott et al. 1984	1981-1982	ND	98	32	ND	83	23	70	32
Snyder et al 1987 ¹	1974-1985	100	44-100	11-75	11-50 ²	33	23	12-100	0
Sweeney et al 1991	1981-1988	94	87	70	ND	64	41	85.5	43
McCUE et al 1991 ³	1984-1989	93	86	0	ND	71	0	78	0
Moore et al 1992	1979-1989	100	84	26	ND	64	45	73	ND
Lavoie et al 1991	1986-1989	89	87	37	ND	48	38	64	14

¹ : nombre de souches testées inférieur à 5 ; ² : sensibilité vis à vis de « céphalosporine » ; ³ : prélèvement sur des endométrites

Tableau A.11 : pourcentage de souches d'*Enterobacter* spp. envers plusieurs antibiotiques sur différentes études.

Référence	période	amikacine	gentamicine	ampicilline	ceftiofur	TMS	Tétracycline	Chloramphénicol
Snyder et al 1987 ¹	1974-1985	100	100	33-0	33-100 ²	50	33-66	66-100
Moore et al 1992	1979-1989	100	40	10	ND	10	10	10
Sweeney et al 1991	1981-1988	96	88	47	ND	78	58	59
Lavoie et al 1991	1986-1989	100	47	10	ND	40	30	39

ND : données non disponibles

¹ : nombre de souches testées inférieur à 5. ² : sensibilité vis à vis de « céphalosporine »

Les zones grisées correspondent aux antibiotiques pour lesquels les *Enterobacter* spp sont considérés résistants selon [15]

Tableau A.12 : pourcentage des souches sensibles de *Pseudomonas* spp. en fonction des antibiotiques

Référence	période	amikacine	gentamicine	ampicilline	ceftiofur	TMS	Tétracycline	Chloramphénicol	pénicilline	Méticilline ou oxacilline	entrofloxacine
Snyder et al 1987	1974-1985	83	71	0	ND	25	0	0	0	0	ND
Moore et al 1992	1979-1989	96	77	0	ND	6	0	0	ND	ND	ND
Prescott et al. 1984 ¹	1981-1982	ND	77	61	ND	27	ND	23	ND	ND	ND
Sweeney et al 1991	1981-1988	100	77	15	ND	31	31	27	14	ND	ND
McCue et al 1991	1984-1989	87	88	0	ND	0	0	0	0	ND	ND
Lavoie et al 1991	1986-1989	100	96	8	ND	4	17	13	20	ND	ND

¹ : valeurs pour *Pseudomonas aeruginosa*

Zones grisées : antibiotiques pour lesquels les *Pseudomonas aeruginosa* sont toujours considérés résistants. [10]

ND : données non disponibles

Tableau A.13 : pourcentage des souches sensibles de *Rhodococcus equi*. en fonction des antibiotiques

Référence	Période	ampicilline	Chloramphénicol	érythromycine	gentamicine	kanamycine	néomycine	Pénicilline	rifampicine	TC	amikacine	ceftiofur	TMS
Fuhrmann et al 1997	ND	74	95	100	100	52	100	26	100	21	ND	ND	ND
Giguère et al 1997	1985- 1996	18.3	67.7	86.7	96.7	ND	88.2	10.2	83.3	53.7	82.6	50	68.3
Moore et al 1992	1979- 1989	0 ¹	100	100	100	25	ND	0	100	66.7	100 ¹	ND	75

¹: nombre de souches inférieur à 5

ND : données non disponibles.

TC : Tétracyclines

B] PARTIE EXPERIMENTALE

1)Introduction

L'objectif de cette expérimentation était de déterminer l'état de l'antibiorésistance des souches bactériennes aérobies d'origine équine prélevées entre le 1^{er} janvier 1996 et le 31 décembre 1998 à l'hôpital vétérinaire de St-Hyacinthe, Québec, Canada.

Les résultats obtenus pourront être comparés avec ceux obtenus sur les souches des années 1986 à 1988, soit dix ans auparavant, et l'on pourra tenter d'en déduire des conséquences sur l'antibiothérapie.

2)Matériel et méthodes

2.1)Bactériologie

Les souches bactériennes ont été prélevées à partir de différents tissus (trachée, poches gutturales, utérus, plaies, abcès, sang, liquide synovial, abdominal ou thoracique) sur les chevaux présentés à l'Hôpital Vétérinaire d'Enseignement (HVE) de St-Hyacinthe, Université de Montréal, avec des signes cliniques ou hématologiques d'infections. Seuls les prélèvements pour recherche de bactéries aérobies ont été pris en compte.

Les échantillons ont été d'abord cultivés sur gélose trypticase-soja avec 5% de sang bovin et incubés à 37 °C et 5% d'humidité. Les géloses ont été examinées après 24 et 48 heures de culture. Si plusieurs types de colonies poussaient, chaque type était repiqué puis identifié selon la méthode décrite par Murray [39].

Lorsque la bactérie identifiée était jugée cliniquement importante, des antibiogrammes étaient réalisés selon la méthode Kirby-Bauer avec les normes standardisées décrites dans la partie bibliographique, c'est à dire une culture sur gélose Mueller-Hinton à l'exception des cultures de streptocoques pour lesquelles on utilisait une gélose Mueller-Hinton supplémentée avec des hématies de mouton.

Les chartes d'interprétation pour le classement de la souche en sensible, intermédiaire ou résistante en vigueur au laboratoire de bactériologie clinique de la Faculté vétérinaire de St-Hyacinthe sont compilées dans l'annexe I.

Une fois par semaine, le contrôle de l'antibiogramme était effectué avec trois souches bactériennes de référence (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Escherichia coli* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Douze antibiotiques ont été testés sur chaque souche bactérienne. Pour chaque antibiotique, la bactérie était classée résistante, intermédiaire ou sensible selon le diamètre de la zone d'inhibition. Dans la présentation des résultats, les bactéries de sensibilité intermédiaire et résistante ont été rassemblées dans la catégorie « résistante ».

2.2) Etude statistique

Les données obtenues ont été traitées avec le logiciel de statistique Systat 5.03 [1] et selon un test de Fisher exact. Les différences ont été considérées comme significative si $p < 0.05$.

3) Résultats et discussion

Vingt espèces de bactéries aérobies ont été identifiées sur la période 1996-98, représentant 421 antibiogrammes. Les espèces ayant moins de cinq échantillons ont été regroupées en fonction du genre bactérien. Seuls les groupes de bactéries (espèces ou genres) avec plus de cinq échantillons ont été conservés pour la présentation des résultats et la discussion. Finalement, 255 antibiogrammes ont été retenus pour six groupes bactériens : *Streptococcus zooepidemicus*, *Staphylococcus coagulase positif*, *Actinobacillus* spp, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp et *Pseudomonas* spp. Les résultats sont compilés dans le tableau B.1 avec les données obtenues par Lavoie *et al.* en 1986-1988 [31].

Les limites de l'utilisation de la méthode Kirby-Bauer, et plus généralement des tests de sensibilité par diffusion ont été exposés dans la partie bibliographique de cette thèse. La procédure pour la réalisation des antibiogrammes du laboratoire de microbiologie de l'HVE suit les standards du NCCLS sauf pour les tests sur les staphylocoques où il n'y a pas de supplémentation du milieu en chlorure de sodium. L'expression des pénicillinases peut s'en trouver alors amoindrie.

	<i>streptococcus zoo.</i>		<i>actinobacillus spp.</i>		<i>staphylococcus spp.</i>		<i>E. coli</i>		<i>Enterobacter spp.</i>		<i>Pseudomonas spp.</i>	
	86-88	96-98	86-88	96-98	86-88	96-98	86-88	96-98	86-88	96-98	86-88	96-98
	6/15	2/9		35/36		23/24	8/9	58/58	5/5	20/22	5/5	25/26
Amikacine	40%	22%		97%		96%	89%	100%	100%	100%	100%	96%
Ampicilline	92%	100%	24/29	38/46		15/20	17/46	38/58	2/20	2/22	2/24	4/27
Ceftiofur		100%		47/47		41/46		38/56		19/24		3/26
chloramphénicol	5/5	100%	3/4	19/19	100%	15/16	27/42	25/34	7/18	5/10	3/23	6/14
Enrofloxacin		67%		47/47		44/45		58/58		21/22		23/27
Erythromycine	7/7	100%	20/23	31/46	67%	41/46		0/57		0/22	0/3	0/26
Gentamicine	18/19	95%	27/29	46/47	98%	39/46	41/47	47/58	9/19	10/22	24/25	15/26
Oxacilline		100%		31/35	89%	18/19		0/4		0/12		2/13
Pénicilline	18/18	100%	20/30	7/26	27%	7/23	1/7	0/41	0/19	0/12	1/5	0/15
Tétracycline	8/17	47%	26/29	45/48	94%	33/46	18/48	32/58	6/20	9/21	4/24	10/27
TMS	14/17	82%	30/30	38/46	83%	31/46	23/48	35/57	8/20	8/21	1/25	4/22

Tableau B.1: Nombre et pourcentage de souches bactériennes sensibles en fonction des antibiotiques. Comparaison des périodes 1986-88 et 1996-98.

Les valeurs sur fond blanc correspondent au nombre de souches sensibles sur le nombre de souches testées. Les pourcentages sont sur fond gris clair. Les valeurs en gras correspondent aux valeurs significativement différentes entre les deux périodes avec un test de Fisher exact et $\alpha=5\%$.

Les pourcentages de souches résistantes obtenus à l'HVE sont sans doute sur-estimés par rapport à leurs proportions réelles lors d'infections bactériennes chez le cheval auxquelles est confronté le vétérinaire de terrain. Deux raisons peuvent être avancées :

- Un biais est lié aux chevaux prélevés qui sont tous des cas référés. Ainsi ils sont atteints de pathologies infectieuses trop sévères pour être soignées dans un contexte non hospitalier ou pour lesquelles une première antibiothérapie fut un échec. On peut penser que les résistances bactériennes sont plus fréquemment rencontrées dans ce contexte.
- Une partie des souches résistantes observées peuvent résulter d'infections nosocomiales. Koterba *et al.* [29], dans une étude portant sur 105 chevaux, a observé que 22% d'entre eux ont développé une infect

3.1) Résistance des souches de Streptocoques

Toutes les souches de streptocoques identifiées entre 1996 et 1998 restaient sensibles à la pénicilline (graphique B.1). Ce résultat est largement répandu dans la littérature [31, 37, 58], cependant Sweeney *et al.* [55] ne rapportent que 83% de souches sensibles sur 30 échantillons testés entre 1981 et 1988.

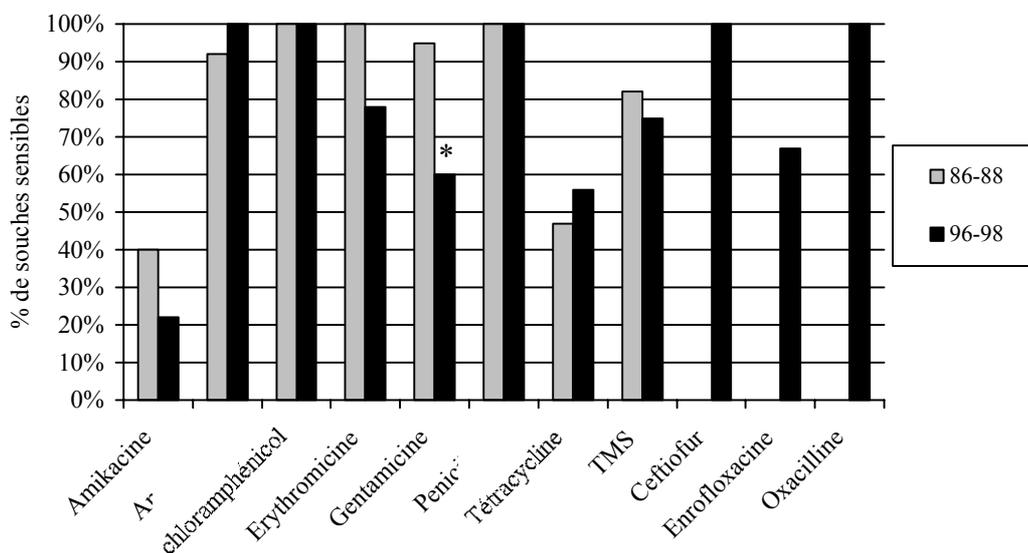
Les pourcentages de souches sensibles aux autres antibiotiques à l'HVE étaient comparable aux données de la littérature et non significativement différentes de ceux décrits par Lavoie [31] sauf pour la gentamicine ($p=0.036$). Pour cet antibiotique, le pourcentage est descendu de 95% de souches sensibles (soit 18 souches sur 19 testées) à 60 % de souches sensibles (soit 6 sur 10 testées).

On remarque également une diminution importante du pourcentage de souches sensibles à l'amikacine (de 40 à 22%) et à l'érythromycine (de 100 à 78%) mais ces résultats ne sont pas significativement différents, probablement à cause du faible nombre d'échantillons disponibles.

Le choix de la pénicilline G lorsqu'on suspecte une infection par des streptocoques β -hémolytiques est donc toujours judicieux. Comme alternative, on pourra utiliser le TMS, l'ampicilline, le ceftiofur ou encore l'érythromycine, bien que pour cette dernière la tendance à un moindre pourcentage de souches sensibles soit à considérer.

L'augmentation de résistance observée vis-à-vis de la gentamicine ne paraît pas cliniquement préoccupante car la gentamicine est utilisée pour son action sur les gram – et que lorsqu'on suspecte une infection mixte, on fait appel à une association gentamicine et une β -lactamine qui, elle, garde une excellente efficacité sur les streptocoques.

Graphique B.1 : évolution du pourcentage de souches de Streptocoques sensibles à divers antibiotiques à l'HVE de St-Hyacinthe entre 1986-1988 (données de Lavoie [31]) et 1996-1998.



* : différence significative avec $p < 0.05$

3.2) Résistance des souches de *Actinobacillus* spp.

D'une manière générale, les souches d'*Actinobacillus* spp. ont montré peu d'antibiorésistance (graphique B.2), conformément à la littérature [31, 37, 47, 54].

Toutes les souches étaient sensibles au ceftiofur, et une très grande majorité (plus de 90% des souches) était sensible à l'amikacine (97%), au chloramphénicol (100%), à l'enrofloxacin (100%), à la gentamicine (98%) et aux tétracyclines (94%).

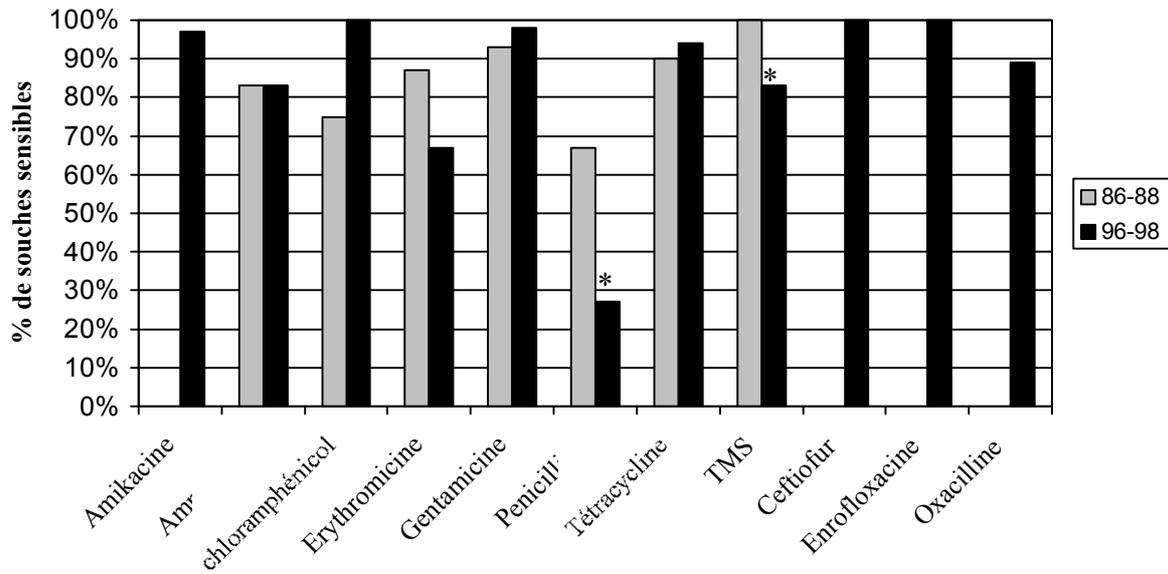
Cependant, on observe entre les données de 1986-88 et celles de 1996-98, une diminution importante du pourcentage de souches sensibles à la pénicilline et au TMS, en passant respectivement de 67% à 27% et de 100% à 83%. Ces différences sont statistiquement différentes avec $p=0.004$ pour la pénicilline et $p=0.002$ pour le TMS.

Pour le chloramphénicol et l'érythromycine, des variations importantes sont observées en terme de pourcentage de souches sensibles mais ces variations ne sont pas statistiquement significatives ($p=0.17$ et $p=0.41$ respectivement) en raison d'un trop faible nombre d'échantillons.

La diminution de sensibilité vis-à-vis de la pénicilline a peu de conséquence sur la thérapeutique car son utilisation vise essentiellement les streptocoques et que la suspicion de la présence de Gram- comme des *Actinobacillus* engendrait l'association avec un autre antibiotique ou l'utilisation d'un antibiotique à large spectre.

Par contre, la diminution du pourcentage de souches sensibles au TMS, antibiotique considéré comme antibiotique initial de choix lors de la suspicion de la présence d'*Actinobacillus*, est plus préoccupante et devrait avoir des conséquences sur la thérapeutique. L'utilisation de TMS dans les infections où les actinobacilles sont fréquents (infections respiratoires, abcès, actinobacillose du poulain...) ne devrait pas être entreprise sans un antibiogramme préalable pour les cas référés à l'HVE.

Graphique B.2 : évolution du pourcentage de souches d'*Actinobacillus* spp. sensibles à divers antibiotiques à l'HVE de St-Hyacinthe entre 1986-1988 (données de Lavoie [31]) et 1996-1998



* : différence significative avec $p < 0.05$

3.3) Résistance des souches de Staphylocoques

Les données de Lavoie et al [31] montraient que 100% des souches étaient sensibles à une majorité d'antibiotique (*i.e.* chloramphénicol, érythromycine, tétracycline, et TMS) entre 1986 et 1998. En 1996-1998, davantage de souches résistantes ont été mises en évidence (graphique B.3) mais seulement trois antibiotiques ont des variations significativement différentes : la pénicilline G ($p=0.04$), la tétracycline ($p=0.006$) et le TMS ($p=0.001$).

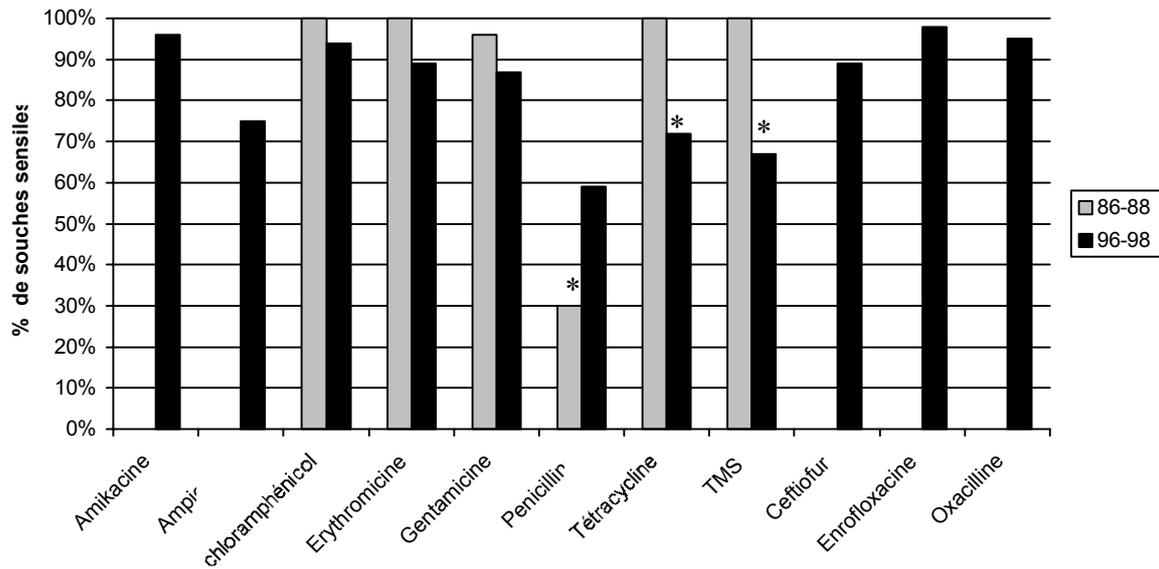
La diminution du pourcentage de souches sensibles à la tétracycline, antibiotique très peu utilisé en médecine équine au Canada, pourrait être le reflet de l'augmentation de résistance des staphylocoques en médecine humaine puisque, comme exposé précédemment, les infections à Staphylocoques sont essentiellement d'origine iatrogène.

En 10 ans, le pourcentage de souches sensibles au TMS passe de 100% (24 souches sur 24) à seulement 67% (31 souches sur 46). D'après ces résultats, il faut s'attendre à une augmentation des échecs thérapeutique en utilisant le TMS comme antibiotique initial. Les alternatives possibles pourraient être les céphalosporines ou encore les aminoglycosides.

Par contre, on remarque une augmentation du pourcentage de souches sensibles à la pénicilline G. La littérature ne fait pas mention d'une telle évolution. Cependant malgré cette évolution, le pourcentage de souches sensibles à la pénicilline G reste inférieur à celui du triméthoprime-sulfamides.

En 1996-98, une seule souche de staphylocoques a été classée résistante à l'oxacilline à l'HVE mais son identification n'a pas donné lieu à d'autres études de laboratoire pour déterminer toutes ses caractéristiques et la source de contamination possible.

Graphique B.3 : évolution du pourcentage de souches de Staphylocoques sensibles à divers antibiotiques à l'HVE de St-Hyacinthe entre 1986-1988 (données de Lavoie [31]) et 1996-1998.



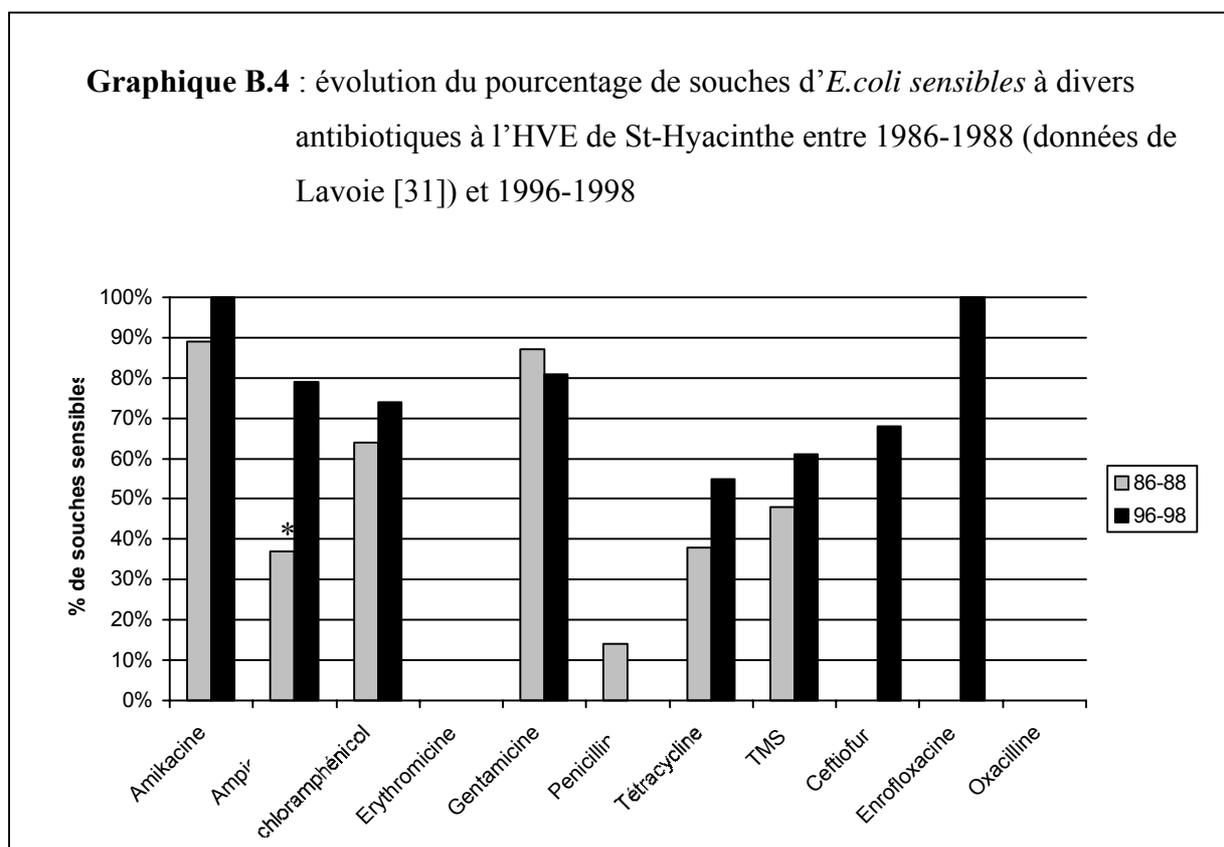
* : différence significative avec $p < 0.05$

3.4) Résistance des souches d'*E.coli*

L'antibiorésistance est très répandue pour les souches d'*E.coli*. Seules l'amikacine et l'enrofloxacin étaient efficaces sur toutes les souches testées (graphique B.4). La gentamicine était efficace sur 81% des souches, les autres antibiotiques l'étaient sur moins de 75%.

La seule différence significative se situe pour le pourcentage de souches sensibles à l'ampicilline : il a été observé une plus grande proportion de souches sensibles sur la période 1996-1998 (66%) que sur la période 1986-1988 (37%). Une des hypothèses serait une moindre utilisation de cet antibiotique en médecine équine par crainte des effets secondaires potentiels et ainsi une moindre sélection des souches résistantes.

Compte tenu de la grande diffusion de gènes d'antibiorésistance chez les *E.coli*, la réalisation d'un antibiogramme après identification est essentielle. En première intention, on peut utiliser un aminoglycoside ou l'enrofloxacin malgré les risques de toxicité ou leur coût élevé.



* : différence significative avec $p < 0.05$

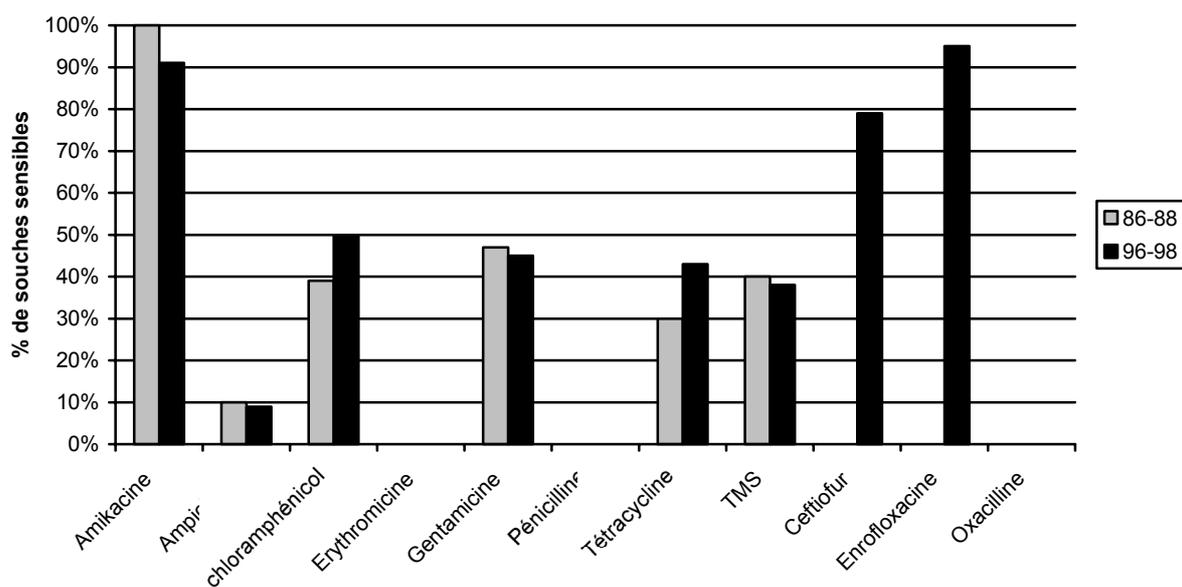
3.5) Résistance des souches d'*Enterobacter* spp.

L'antibiorésistance est encore plus répandue chez les *Enterobacter* que pour les *E.coli* (graphique B.5). Seuls l'amikacine et l'enrofloxacin avaient plus de 90% de souches sensibles. Le ceftiofur était efficace sur 79% des souches. La gentamicine, parfois considérée comme antibiotique de 1^{ère} intention n'était efficace que sur 45% des souches testées.

Aucune différence significative n'a été mise en évidence avec les résultats de Lavoie *et al.* [31].

Comme pour les *E.coli*, la réalisation d'un antibiogramme est indispensable pour une antibiothérapie efficace sur les *Enterobacter*. Une utilisation rationnelle de l'amikacine et de l'enrofloxacin est essentielle pour limiter la diffusion de la résistance et ne pas rendre inefficaces les deux derniers antibiotiques vétérinaires qui le sont encore. L'utilisation de la gentamicine en première intention doit se faire en sachant que moins d'une bactérie sur deux y était sensible à l'HVE entre 1996 et 1998.

Graphique B.5 : évolution du pourcentage de souches d'*Enterobacter* sensibles à divers antibiotiques à l'HVE de St-Hyacinthe entre 1986-1988 (données de Lavoie [31]) et 1996-1998

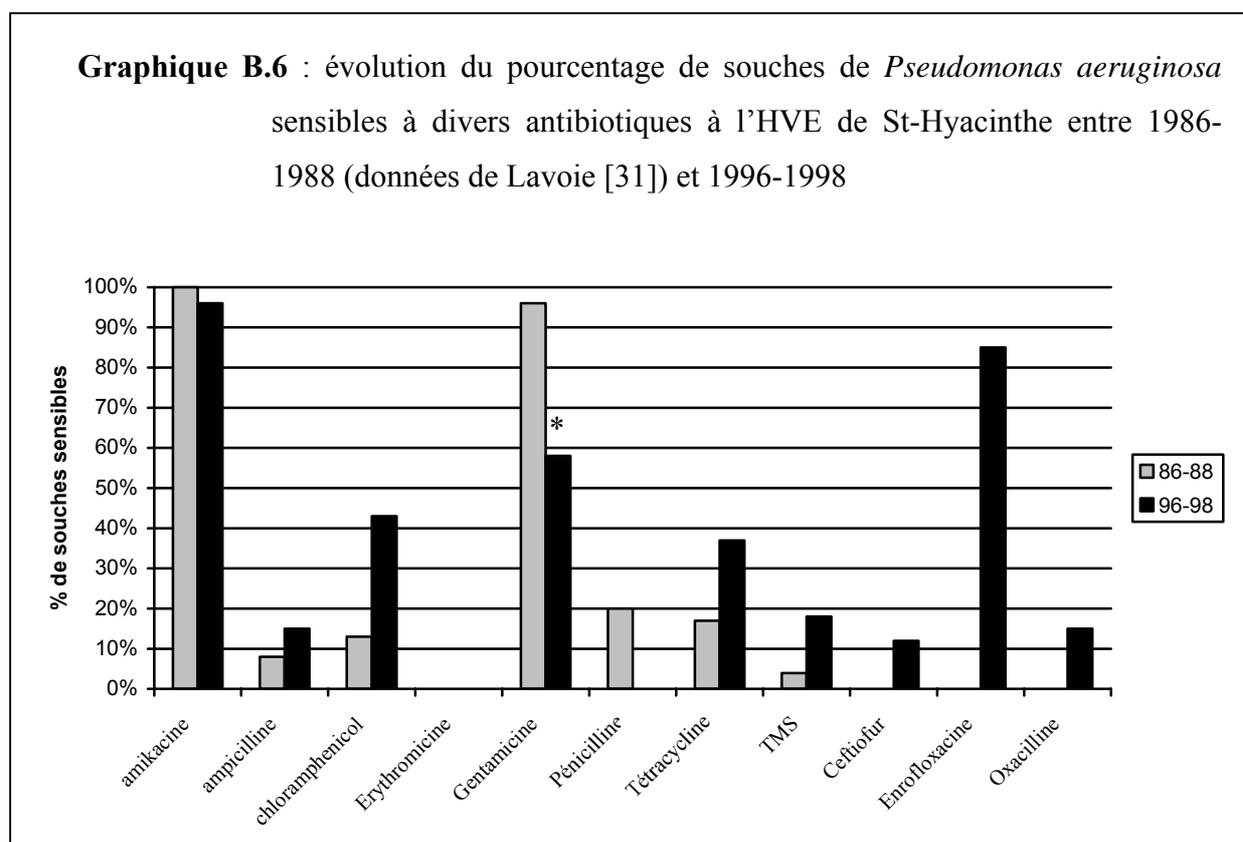


3.6) Résistance des souches de *Pseudomonas* spp.

Les souches de *Pseudomonas* spp, en particulier *P.aeruginosa*, sont bien connues pour leur résistance à de nombreux antibiotiques. Le CA-SFM [10] considère que *P.aeruginosa* est résistant à l'ampicilline, au ceftiofur, au TMS, à la tétracycline, au chloramphénicol, à la pénicilline G et la méticilline. Les résultats de 1996-1998 à l'HVE sont en accord avec cette considération (graphique B.6).

Les aminosides sont considérés dans la littérature comme efficaces, avec une légère supériorité de l'amikacine. En 1996-98, seulement 58 % des souches étaient sensibles à la gentamicine contre 96% en 1986-88 pour Lavoie *et al* [31] (différence significative avec $p=0.02$). L'enrofloxacin était efficace sur 85% des souches.

L'utilisation de la gentamicine est donc moins sûre qu'auparavant et il convient de mettre l'accent sur les mesures d'hygiène à prendre pour limiter les cas d'infections nosocomiales à *Pseudomonas* contre lesquelles l'antibiothérapie est difficile.



* : différence significative avec $p<0.05$

4) Conclusion de la partie expérimentale

Au total, 255 antibiogrammes ont pu être analysés et comparés à des données obtenues 10 ans auparavant par le même laboratoire et pour les mêmes types de prélèvements. On observe, conformément à la littérature, une variabilité importante dans la résistance bactérienne en fonction de l'espèce ou du genre bactérien rencontré : les souches d'*E.coli* ou d'*Enterobacter* présentent une résistance acquise pour nettement plus d'antibiotiques que les streptocoques ou les actinobacilles. Au sein d'une même espèce ou genre, à 10 ans d'intervalle, la sensibilité des souches prélevées à l'HVE de St-Hyacinthe a subi des modifications significatives pour des antibiotiques très largement utilisés tels que la pénicilline G vis à vis d'*Actinobacillus* spp., la gentamicine vis à vis des streptocoques et de *Pseudomonas* spp. ou du TMS vis à vis des actinobacilles et des staphylocoques. Ainsi, ces antibiotiques pourraient présenter une moindre efficacité et le résultat de leur utilisation avant contrôle par un antibiogramme devient plus aléatoire.

Le test statistique utilisé permet une approche plus rigoureuse dans la signification des variations de sensibilité observées. Cependant les populations comparées n'ont pas pu être contrôlées pour savoir si elles sont tout à fait homogènes : des différences dans l'origine des prélèvements, l'expérience du clinicien qui les exécute, les pathologies rencontrées, l'antibiothérapie préalable des vétérinaires référant... sont autant de causes possibles de biais. De plus, comme dans la majorité des articles de la littérature, cette étude statistique souffre parfois du faible nombre d'échantillons disponibles. La comparaison des données de l'HVE avec celles de la littérature à l'aide de tests statistiques est impossible à cause de différences notables dans le choix des chevaux prélevés ou les méthodes de laboratoire employées.

On peut regretter que le Laboratoire de Bactériologie Clinique ne garde pas les résultats de CMI pour les souches testées afin que des études rétrospectives puissent étudier l'évolution du niveau de la résistance au sein d'une même catégorie de bactérie (*i.e.* sensible, intermédiaire ou résistante). La valeur de la CMI pourrait également permettre d'ajuster les schémas posologiques en fonction des données pharmacocinétiques.

Malgré la difficulté pour comparer des pourcentages de souches sensibles entre différentes périodes et les réserves précédentes, un état des lieux périodique semble néanmoins une démarche indispensable pour un établissement vétérinaire de type hospitalier comme celui de St-Hyacinthe.

CONCLUSION

Les mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques sont nombreux et variés. Des tests de sensibilité permettent d'évaluer *in vitro* l'efficacité de ces molécules, le plus connu étant l'antibiogramme qui donne des résultats sous forme qualitative en classant la bactérie comme sensible, résistance ou de sensibilité intermédiaire pour chaque antibiotique testé.

L'étude des antibiogrammes de bactéries prélevées sur des chevaux met en évidence une grande variation dans la diffusion de la résistance acquise et les données de la partie expérimentale de cette thèse montrent pour l'HVE une évolution significative dans le temps du pourcentage de souches sensibles à des antibiotiques très utilisés tels que la pénicilline G, la gentamicine ou le TMS.

En médecine équine, le choix de l'antibiothérapie est particulièrement ardu à cause du faible nombre de molécules disponibles et autorisées, des risques majeurs d'effets indésirables et du coût rapidement élevé. Il est donc essentiel de restreindre au minimum la diffusion de résistance acquise. Pour cela, l'utilisation raisonnée et prudente des antibiotiques est indispensable. En particulier, la détermination de valeurs critiques adaptées à chaque espèce animale pour les antibiogrammes et la prise en compte de paramètres de pharmacocinétique et de pharmacodynamie devraient se généraliser.

Notons que la détermination des valeurs critiques pour antibiogramme sur des souches bactériennes d'origine animale est en cours en Amérique du Nord. La Société Française de Microbiologie doit participer à cet effort afin d'affiner les outils disponibles pour le praticien. De la même façon, les laboratoires de bactériologie pourraient fournir la CMI de la souche bactérienne pour chaque molécule testée et pas seulement une classification S/I/R.

Aucune nouvelle famille d'antibiotique n'a été mise à la disposition des vétérinaires depuis deux décennies. Pour que notre arsenal thérapeutique actuel ne soit pas dépassé avant d'avoir de nouvelles molécules et/ou pour que la législation ne restreigne pas encore plus le nombre de molécules disponible pour cette profession, chaque praticien doit apprendre à utiliser au mieux les outils à sa disposition et le potentiel de ses antibiotiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Systat**, logiciel d'analyse de données, version "5.03 for windows", SPSS Inc., Chicago, Ill., USA.
2. **Aronson, A.L.** Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. *J Am Vet Med Assoc*, 1980, **176**(10 Spec No): p. 1061-8.
3. **AVMA**, American Veterinary Medical Association judicious therapeutic use of antimicrobials [en ligne]. consulté le 12 novembre 2000. Adresse URL : <http://www.avma.org/scienact/jtua/jtua98.asp>
4. **Baum, K.H., S.J. Shin, W.C. Redbun et al.** Isolation of *Actinobacillus lignieresii* from enlarged tongue of a horse. *J Am Vet Med Assoc*, 1984, **185**(7): p. 792-3.
5. **Baverud, V., A. Franklin, A. Gunnarsson et al.** *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mares when their foals are treated with erythromycin and rifampicin for *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Vet J*, 1998, **30**(6): p. 482-8.
6. **Benaoudia, F., F. Escande and M. Simonet.** Infection due to *Actinobacillus lignieresii* after a horse bite. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1994, **13**(5): p. 439-40.
7. **Bryant, J.E., M.P. Brown, R.R. Gronwall et al.** Study of intragastric administration of doxycycline: pharmacokinetics including body fluid, endometrial and minimum inhibitory concentrations. *Equine Vet J*, 2000, **32**(3): p. 233-8.
8. **Burgess, D.S.** Pharmacodynamic principles of antimicrobial therapy in the prevention of resistance. *Chest*, 1999, **115**(3 Suppl): p. 19S-23S.
9. **Carmalt, J.L., K.E. Baptiste and J.M. Chirino-Trejo.** *Actinobacillus lignieresii* infection in two horses. *J Am Vet Med Assoc*, 1999, **215**(6): p. 826-8.

10. **Comité de l'antibiogramme - Société française de microbiologie**, communiqué 2000-2001 [en ligne], consulté le 13 novembre 2000. adresse URL : <http://www.sfm.asso.fr>
11. **Chapman, P.S., C. Green, J.P. Main et al.** Retrospective study of the relationships between age, inflammation and the isolation of bacteria from the lower respiratory tract of thoroughbred horses. *Vet Rec*, 2000, **146**(4): p. 91-5.
12. **Chengappa, M.M.** Antimicrobial agents and susceptibility testing, in *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology*. 1990, Academic Press. p. 479-492.
13. **Dowling, P.M. and A.M. Russell.** Pharmacokinetics of a long-acting oxytetracycline-polyethylene glycol formulation in horses. *J Vet Pharmacol Ther*, 2000, **23**(2): p. 107-110.
14. **DuPont, H.L. and J.H. Steele.** Use of antimicrobial agents in animal feeds: implications for human health. *Rev Infect Dis*, 1987, **9**(3): p. 447-60.
15. **Eberlin, T et F. Renaud.** Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, in *Manuel de bactériologie clinique*. 1994, Editions Scientifiques Elsevier. p. 431-452.
16. **Ensink, J.M., B. van Klingeren, D.J. Houwers et al.** In vitro susceptibility to antimicrobial drugs of bacterial isolates from horses in The Netherlands. *Equine Vet J*, 1993, **25**(4): p. 309-13.
17. **Flaherty, J.F., L.C. Rodondi, B.J. Guglielmo et al.** Comparative pharmacokinetics and serum inhibitory activity of clindamycin in different dosing regimens. *Antimicrob Agents Chemother*, 1988, **32**(12): p. 1825-9.
18. **Fuhrmann, C. and C. Lammler.** [Characterization of *Rhodococcus equi* isolates from horse and man]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 1997, **110**(2): p. 54-9.

19. **Gersema, L.M. and D.K. Helling.** The use of subtherapeutic antibiotics in animal feed and its implications on human health. *Drug Intell Clin Pharm*, 1986, **20**(3): p. 214-8.
20. **Giguere, S. and J.F. Prescott.** Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Vet Microbiol*, 1997, **56**(3-4): p. 313-34.
21. **Godber, L.M., R.D. Walker, G.E. Stein et al.** Pharmacokinetics, nephrotoxicosis, and in vitro antibacterial activity associated with single versus multiple (three times) daily gentamicin treatments in horses. *Am J Vet Res*, 1995, **56**(5): p. 613-8.
22. **Greenwood, D.** In vitro veritas? Antimicrobial susceptibility tests and their clinical relevance. *J Infect Dis*, 1981, **144**(4): p. 380-5.
23. **Greenwood, D.** Antimicrobial susceptibility testing: are we wasting our time? *Br J Biomed Sci*, 1993, **50**(1): p. 31-4.
24. **Gustafson, R.H.** Use of antibiotics in livestock and human health concerns. *J Dairy Sci*, 1991, **74**(4): p. 1428-32.
25. **Gustafson, R.H. and R.E. Bowen.** Antibiotic use in animal agriculture. *J Appl Microbiol*, 1997, **83**(5): p. 531-41.
26. **Hartmann, F.A., S.S. Trostle and A.A. Klohnen.** Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a postoperative wound infection in a horse. *J Am Vet Med Assoc*, 1997, **211**(5): p. 590-2.
27. **Jang, S.S., E.L. Biberstein and D.C. Hirsh.** *Actinobacillus suis*-like organisms in horses. *Am J Vet Res*, 1987, **48**(7): p. 1036-8.
28. **Jorgensen, J.H., J.D. Turnidge and J.A. Washington.** Antibacterial susceptibility tests : dilution and disk diffusion methods, in *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American society for microbiology. p. 1526-1543.

29. **Koterba, A., J. Torchia, C. Silverthorne et al.** Nosocomial infections and bacterial antibiotic resistance in a university equine hospital. *J Am Vet Med Assoc*, 1986, **189**(2): p. 185-91.
30. **Kowalski, J.** Bacterial and mycotic infections, in *Equine internal medicine*, S.M. Reed, Editor. 1998, W.B. Saunders Compagny. p. 61-74.
31. **Lavoie, J.P., L. C.; Higgins, R ; Laverty, S.** Aerobic bacterial isolates in horses in a university hospital, 1986-1988. *Can Vet J*, 1991, **32**: p. 292-4.
32. **Li, R.C., M. Zhu, and J.J. Schentag.** Achieving an optimal outcome in the treatment of infections. The role of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials. *Clin Pharmacokinet*, 1999, **37**(1): p. 1-16.
33. **Magdesian, K.G., P.M. Hogan, N.D. Cohen et al.** Pharmacokinetics of a high dose of gentamicin administered intravenously or intramuscularly to horses. *J Am Vet Med Assoc*, 1998, **213**(7): p. 1007-11.
34. **Mair, T.S. and S.P. Yeo.** Equine pleuropneumonia: the importance of anaerobic bacteria and the potential value of metronidazole in treatment. *Vet Rec*, 1987, **121**(5): p. 109-10.
35. **McCue, P.M., J.P. Hughes, S.S. Jang et al.** Antimicrobial susceptibility patterns for equine endometrial isolates. *C V*, 1991, (1): p. 23-6.
36. **Mitsubishi, S.K.** Aminoglycosides resistance in bacteria, in *The Aminoglycosides : Microbiology, Clinical Use, and Toxicology*, a.N. Whelton, H.C., Editor. 1982, p. 97-122.
37. **Moore, R.M., R.K. Schneider, J. Kowalski et al.** Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from 233 horses with musculoskeletal infection during 1979-1989. *Equine Vet J*, 1992, **24**(6): p. 450-6.

38. **Moore, R.M.** Antimicrobial therapy in horses, in *Equine medicine and surgery*. 1999, p. 163-171.
39. **Murray, C.J.** Manual of clinical microbiology. 7th ed. 1999: American Society for Microbiology.
40. **Nay, T.S.** Extra-pulmonary *Rhodococcus equi* in a thoroughbred foal. *Can Vet J*, 1996, **37**(10): p. 623-4.
41. **NCCLS**, Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, june 1999. *Approved Standard; NCCLS document M31-A*, 1999.
42. **Palmer, J.E., R.H. Whitlock and C.E. Benson.** Equine ehrlichial colitis: effect of oxytetracycline treatment during the incubation period of *Ehrlichia risticii* infection in ponies. *J Am Vet Med Assoc*, 1988, **192**(3): p. 343-5.
43. **Peyret, M.** Mécanismes de résistance aux antibiotiques, in *Traité de microbiologie clinique*. p. 413-30.
44. **Prescott, J.F.** Antimicrobial Chemotherapy, in *Veterinary microbiology*, D.C. Hirsh, Editor. 1999, Blackwell Science, Inc. p. 29.
45. **Prescott, J.F.** Antimicrobial drug resistance and its epidemiology, in *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, J.F.B. Prescott, J. D.; Walker, R. D., Editor. 2000, Iowa State University Press. p. 27-49.
46. **Prescott, J.F., J.D. Baggot and R.D. Walker,** Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. third ed. 2000: Iowa State University Press. p. 509-14.
47. **Prescott, J.F., V.P. Gannon, G. Kittler and G. Hlywka.** Antimicrobial drug susceptibility of bacteria isolated from disease processes in cattle, horses, dogs and cats. *Can Vet J*, 1984, **25**: p. 289-92.

48. **Raisis, A.L., J.L. Hodgson and D.R. Hodgson**, Equine neonatal septicaemia: 24 cases. *Aust Vet J*, 1996, **73**(4): p. 137-40.
49. **Riond, J.L. and J.E. Riviere**. Pharmacology and toxicology of doxycycline. *Vet Hum Toxicol*, 1988, **30**(5): p. 431-43.
50. **Sanchez-Navarro, A. and M.M. Sanchez Recio**. Basis of anti-infective therapy: pharmacokinetic-pharmacodynamic criteria and methodology for dual dosage individualisation. *Clin Pharmacokinet*, 1999, **37**(4): p. 289-304.
51. **Schentag, J.J., D.E. Nix and M.H. Adelman**. Mathematical examination of dual individualization principles (I): Relationships between AUC above MIC and area under the inhibitory curve for cefmenoxime, ciprofloxacin, and tobramycin. *DICP*, 1991, **25**(10): p. 1050-7.
52. **Schentag, J.J., D.E. Nix, A. Forrest et al.** AUIC-the universal parameter within the constraint of a reasonable dosing interval. *Ann Pharmacother*, 1996, **30**(9): p. 1029-31.
53. **Shimizu, A., J. Kawano, J. Ozaki et al.** Characteristics of Staphylococcus aureus isolated from lesions of horses. *J Vet Med Sci*, 1991, **53**(4): p. 601-6.
54. **Snyder, J.R., J.R. Pascoe and D.C. Hirsh**. Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from equine orthopedic patients. *Vet Surg*, 1987, **16**(3): p. 197-201.
55. **Sweeney, C.R., S.J. Holcombe, S.C. Barningham et al.** Aerobic and anaerobic bacterial isolates from horses with pneumonia or pleuropneumonia and antimicrobial susceptibility patterns of the aerobes. *J Am Vet Med Assoc*, 1991, **198**(5): p. 839-42.
56. **Sweeney, R.W., C.R. Sweeney and J. Weiher**. Clinical use of metronidazole in horses: 200 cases (1984-1989). *J Am Vet Med Assoc*, 1991, **198**(6): p. 1045-8.

57. **Thomas, J.K., A. Forrest, S.M. Bhavnani et al.** Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, **42**(3): p. 521-7.
58. **Trolldenier, H., D. Klarmann, P. Krabisch et al.** [Sensitivity of bovine and equine streptococci to beta-lactam antibiotics (benzylpenicillin, ampicillin, oxacillin, cefotaxime) in the agar diffusion and E-test]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 2000, **113**(6): p. 234-45.
59. **Tudor, R.A., M.G. Papich and W.R. Redding.** Drug disposition and dosage determination of once daily administration of gentamicin sulfate in horses after abdominal surgery. *J Am Vet Med Assoc*, 1999, **215**(4): p. 503-6.
60. **Ward, C.L., J.L. Wood, S.B. Houghton et al.** Actinobacillus and Pasteurella species isolated from horses with lower airway disease. *Vet Rec*, 1998, **143**(10): p. 277-9.
61. **Wise, R.** Antimicrobial resistance is a major threat to public health. *Brit Med J*, 1998, **317**(7159): p. 609-10.
62. **Yasuda, R., J. Kawano, Onda H. et al.** Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from healthy horses in Japan. *Am J Vet Res*, 2000, **61**(11): p. 1451-5.

ANNEXE I

Charte d'interprétation des antibiogrammes en vigueur entre 1996 et 1998 au laboratoire de l'hôpital vétérinaire de St-Hyacinthe, Université de Montréal.

ANTIBIOTIQUE	DISQUE (charge)	Valeur limite du diamètre d'inhibition(Ø) (en mm) pour que la souche soit classée :		
		R (Ø<)	I (Ø=)	S (Ø>)
AM AMPICILLINE	10 µg			
-Enterobacteriaceae		13	14-16	17 ²
- <i>Act. pleuropneumoniae</i> (App) (HTM)*		18	19-21	22 ²
- <i>Staphylococcus</i> spp.		28	--	29 ²
- <i>Enterococcus</i> spp.		16	--	17 ²
- <i>Streptococcus</i> spp.**		18	19-25	26 ²
-Pour les Pasteurellaceae autres que App, utiliser les zones des Enterobacteriaceae ‡				
AMC AMOXYCILLINE/	20 µg/			
AC. CLAVULANIQUE	10 µg			
- <i>Staphylococcus</i> spp.		19	--	20 ¹
-Autres bactéries		13	14-17	18 ¹
AN AMIKACINE	30 µg	14	15-16	17 ²
AP APRAMYCINE	15 µg			
- <i>E. coli</i> du porc		11	12-14	15 ³
-Pour <i>Salmonella</i> spp utiliser les mêmes zones ‡				
CB CARBÉNICILLINE	100 µg	13	14-16	17 ²
C CHLORAMPHÉNICOL	30 µg			
- <i>Act. pleuropneumoniae</i> (App) (HTM)*		25	26-28	29 ²
- <i>Streptococcus</i> spp. **		17	18-20	21 ²
-Autres bactéries		12	13-17	18 ²
CC CLINDAMYCINE	2 µg			
(remplace lincomycine)				
- <i>Streptococcus</i> spp. **		15	16-18	19 ²
-Autres bactéries		14	15-20	21 ²

ANTIBIOTIQUE	DISQUE (charge)	Valeur limite du diamètre d'inhibition(\emptyset) (en mm) pour que la souche soit classée :		
		R ($\emptyset <$)	I ($\emptyset =$)	S ($\emptyset >$)
CF CÉPHALOTHINE	30 μ g			
FOX CÉFOXITINE				
CZ CÉFAZOLINE				
CAZ CEFTAZIDIME		14	15-17	18 ²
CFM CÉFIXIME	5 μ g			
-Haemophilus spp. *		(<21)	--	21 ⁴

ANTIBIOTIQUE	DISQUE (charge)	Valeur limite du diamètre d'inhibition(\emptyset) (en mm) pour que la souche soit classée :		
		R ($\emptyset <$)	I ($\emptyset =$)	S ($\emptyset >$)
G SULFISOXAZOLE	.25 mg	12	13-16	17 ²
GM GENTAMICINE	10 μ g	12	13-14	15 ²
IPM IMIPÉNÈME	10 μ g	13	14-15	16 ²
K KANAMYCINE	30 μ g	13	14-17	18 ²
N NÉOMYCINE	30 μ g	12	13-16	17 ⁴
NB NOVOBIOCINE	30 μ g	17	18-21	22 ⁴
OBX ORBIFLOXACINE	10 μ g	17	18-21	22
OX OXACILLINE	1 μ g			
	- <i>Staphylococcus aureus</i> .	10	11-12	13 ²
	- <i>Staph. coag. nég.</i>	17	--	18 ²
P PÉNICILLINE G	10 U			
	- <i>Staphylococcus</i> spp.	28	--	29 ²
	- <i>Enterococcus</i> spp.	14	--	15 ²
	- <i>Streptococcus</i> spp. **	19	20-27	28 ²
	-Pour les Pasteurellaceae noter les même résultats que l'ampicilline ‡			
P10 PENICILLINE/				
	NOVOBIOCINE 10U/30 μ g			
	- <i>Staph. aureus/ Strep. agalactiae/</i>			
	<i>S. dysgalactiae</i> et <i>S. uberis</i>	14	15-17	18 ¹
	-Autres bactéries	16	--	17 ¹
PB POLYMYXINE B		8	9-11	12 ⁴
	-Pour bactéries à Gram nég. seulement			

ANTIBIOTIQUE	DISQUE (charge)	Valeur limite du diamètre d'inhibition(Ø) (en mm) pour que la souche soit classée :		
		R (Ø<)	I (Ø=)	S (Ø>)
PRL PIRLIMYCINE	2 µg	12	--	13 ¹
RA RIFAMPIN	5 µg	16	17-19	20 ²
SAM SULBACTAM/ AMPICILLINE	10 µg/ 10 µg			
-Enterobacteriaceae/ - <i>Staphylococcus</i> spp.		11	12-14	15 ²
- <i>Act. pleuropneumoniae</i> (App) (HTM)*		19	--	20 ²
-Pour les Pasteurellaceae, autre que App, utiliser la zone des Enterobacteriaceae ‡				
SP SPECTINOMYCINE	100 µg			
-Pathogènes du syst. resp. bovin		10	11-13	14 ⁶
-mammité ‡				
SXT TRIMÉTHOPRIME/ SULFAMÉTHOXAZOLE	1.25 µg/ 23.75 µg	10	11-15	16 ²
-Pour les Streptococcus, utiliser gélose M-H supplémenté de 5% sang en CO ₂ ²				
Te TÉTRACYCLINE	30 µg			
- <i>Act. pleuropneumoniae</i> (HTM)*		25	26-28	29 ²
- <i>Streptococcus</i> spp.**		18	19-22	23 ²
-Autres bactéries		14	15-18	19 ²
TIA TIAMULINE	30 µg			
-Pathogènes du syst. resp. porcin (sauf <i>Act. pleuropneumoniae</i>)		10	11-12	13 ⁷
-Streptococcus suis, utiliser les mêmes zones même si en CO ₂ ‡				

ANTIBIOTIQUE	DISQUE (charge)	Valeur limite du diamètre d'inhibition(\varnothing) (en mm) pour que la souche soit classée :		
		R ($\varnothing <$)	I ($\varnothing =$)	S ($\varnothing >$)
TIL TILMICOSINE				
-Path. resp. bov. & porc	15 μ g	10	11-13	14 ^{1&8}
NN TOBRAMYCINE	10 μ g	12	13-14	15 ²
XNL CEFTIOFUR	30 μ g			
-Bovins				
<i>M. haemolytica</i> / <i>P. multocida</i> / <i>H. somnus</i>		17	18-20	21 ¹
-Porcs				
<i>A. pleuropneumoniae</i> / <i>P. multocida</i> / <i>Salm. spp</i> / <i>Strep. suis</i>		17	18-20	21 ¹

-Pour les autres bactéries, utiliser les mêmes zones. Il semble que le CO₂ n'influence pas la zone. Il n'y a pas de spécification dans le NCCLS ‡

¹ Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, June 1999. Approved Standard; NCCLS document M31-A; Vol. 19 No. 11.

² Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing; January 1999, Ninth Informational Supplement. NCCLS document M100-S9, vol. 19, No. 1. (valeur humaine)

³ Supplementary Package Insert. L-PI14-42, March 1997. Difco Laboratories, Detroit, MI

⁴ Disques Sensi-Disc BBL Pour antibiogramme. 88-4062-1. Révisé : 12-97

⁵ Supplement to package insert 1442. L-01442-01D. Nov. 1992. Difco Laboratories, Detroit, MI.

⁶ Pharmacia & Upjohn Animal Health, correspondance à Serge Larivière, le 7 sept. 1999

⁷ Neo-Sensitabs. J.B. Casals and N. Pringler, Rosco Diagnostica, Taastrup, Denmark. 9th Ed. 1991

⁸. Valeurs proposées par Elanco

‡ Pas de référence, décision interne

*Valeurs d'*Haemophilus influenzae* transposées à *Act. pleuropneumoniae*.

N.B. Incubation en présence de 5% CO₂ et lecture après 16-18 heures.

**Incubation en présence de 5% CO₂. et lecture après 20-24 heures. Pour *Streptococcus pneumoniae*, il faut utiliser des données différentes qui sont retrouvées aux références 1 et 2.

Toulouse, 2001

NOM : PEYROU

PRENOM : MATHIEU

TITRE : ANTIBIORESISTANCE DES SOUCHES BACTERIENNES D'ORIGINE EQUINE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET EXEMPLE DE L'HOPITAL VETERINAIRE DE ST-HYACINTHE

RESUME :

Les principaux mécanismes bactériens de résistance aux antibiotiques, les tests d'évaluations utilisés et les niveaux de résistance observés dans la littérature pour des prélèvements d'origine équine sont étudiés dans une première partie.

Puis, les résultats de 255 antibiogrammes réalisés entre 1996 et 1998 au laboratoire de l'Hôpital Vétérinaire d'Enseignement de St-Hyacinthe sur des prélèvements d'origine équine sont décrits. Ils sont comparés aux résultats obtenus 10 ans auparavant. Trois antibiotiques largement utilisés en médecine vétérinaire (la pénicilline G, la gentamicine et le triméthoprime-sulfamide) ont un pourcentage de souches sensibles en diminution pour certaines espèces bactériennes.

MOTS CLES : Antibiogramme, Antibiotique, Résistance bactérienne, Cheval, Equin.

ENGLISH TITLE : ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF EQUINE BACTERIAL SPECIMENS : A REVIEW AND EVOLUTION IN A CANADIAN VETERINARY TEACHING HOSPITAL.

ABSTRACT :

Antimicrobial drug resistance mechanisms, antimicrobial susceptibility tests and a review of resistance patterns in literature for equine specimens are first described.

Then, results of 255 antimicrobial susceptibility tests, achieved between 1996 and 1998, at the Teaching Veterinary Hospital Laboratory of St-Hyacinthe are discussed. These results can be compared with results found between 1986 and 1988 in the same laboratory. Three common antibiotics (penicillin G, gentamicin and trimethoprim-sulfamids) have lower percentage of sensitive strains.

KEY WORDS : Antimicrobial susceptibility tests, antibiotics, Horse, Equine