

Modes d'élevage des porcs et prévalence de *E. coli* résistants aux antimicrobiens

Clémentine MIRCOVICH (1), Claire CHAUVIN (2), Pascal SANDERS (3), Marie-Hélène BAYON-AUBOYER (4), Sylvie DUBROCA (1), Yannick RUGRAFF (1) (5)

(1) Institut Technique du Porc, La Motte au Vicomte BP 35104, 35651 Le Rheu cedex

(2) AFSSA, Unité « épidémiologie porcine et assurance qualité », Zoopôle Les Croix, BP 53, 22440 Ploufragan

(3) AFSSA-LMV, BP 203, 35302 Fougères cedex

(4) LDA 22, 7 rue du Sabot, BP 54, 22440 Ploufragan

(5) Adresse actuelle : CAVAC, BP27, 85001 La Roche sur Yon cedex

Modes d'élevage des porcs et prévalence de *E. coli* résistants aux antimicrobiens

24 élevages porcins ont fait l'objet de prélèvements fécaux en fin d'engraissement afin d'estimer les pourcentages de *Escherichia coli* résistants vis-à-vis de 16 antimicrobiens. Ces élevages ont été choisis selon différents critères zootechniques et d'utilisation des antibiotiques dont les conséquences sur les taux de bactéries résistantes ont pu être observées. En élevage conventionnel, les taux de résistance aux antimicrobiens couramment utilisés sont élevés (tétracycline : 95 % ; sulfamides : 65 %), certains antibiotiques très utilisés dans le passé ont conservé des taux de résistance non négligeables (streptomycine : 62 %, chloramphénicol : 7 %), et peu ou pas de résistances ont été mises en évidence pour certains antibiotiques d'importance en santé humaine. Dans les élevages où le recours aux antibiotiques est exceptionnel, les résistances sont moins fréquentes mais rarement absentes. Enfin, dans les élevages où les porcs sont élevés selon des techniques moins intensives mais sans restrictions quant à l'utilisation des antimicrobiens, le profil global des résistances n'est que peu différent de celui des élevages conventionnels. Cette étude dresse un premier bilan de la situation des élevages français et établit un lien global entre les systèmes d'élevage et les niveaux de résistance aux antibiotiques.

Pig rearing methods and the prevalence of antimicrobial resistant *E. coli*

Faecal samples were collected from 24 pig farms at the end of the finishing period in order to assess the numbers of *Escherichia coli* which were resistant to 16 antimicrobial compounds. The farms were chosen according to animal husbandry criteria and the use of antimicrobials. The consequences of antimicrobial use on bacterial resistance rates were studied. In conventional farms, antimicrobial resistance rates for the commonly used compounds were high (tetracycline: 95%, sulfonamides: 65%), some antibiotics which had been used extensively in the past caused significant resistance rates to persist (streptomycin: 62%, chloramphenicol: 7%). Little or no resistance was observed for some compounds which are used in human medicine. In farms where antimicrobial use is exceptional, resistance is less frequent but is seldom completely absent. Finally, in farms where pigs were reared according to less intensive methods, but where there were no restrictions on antimicrobial use, the global resistance profile was only slightly different from that observed in conventional farms. In conclusion, this study provides an initial evaluation of the level of antimicrobial resistance in French farms and it establishes a general link between rearing methods and antimicrobial resistance levels.

INTRODUCTION

Le problème de la résistance aux antimicrobiens tend de plus en plus à être considéré comme un problème écologique global, les flores intestinales commensales des animaux étant considérées comme un réservoir hébergeant des bactéries résistantes aux antibiotiques et/ou des gènes de résistance, potentiellement transmissibles à l'homme (CHASLUS-DANCLA et al., 2000.). *Escherichia coli* (*E. coli*) est un hôte commun des réservoirs digestifs des hommes et des animaux, qui développe aisément des résistances lorsqu'il est mis en contact avec des antimicrobiens (JACKSON et al, 2000). Cette bactérie peut non seulement être pathogène pour l'homme et les animaux, mais elle peut surtout être un vecteur potentiel de gènes de résistance transmissibles à d'autres bactéries pathogènes (HUNTER et al, 1992 ; SUNDE et al, 2001). Elle est qualifiée pour ces raisons de « bactérie indicatrice ».

Le but de cette étude est d'estimer les prévalences d'*Escherichia coli* antibiorésistantes dans des populations d'élevages porcins français qui diffèrent par leurs pratiques et par leur mode d'utilisation des antimicrobiens.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Elevages

Les différents modes d'élevage étudiés ont été regroupés en 4 classes :

- Dans la classe 1, les élevages sont conduits de façon à éviter toute utilisation d'antimicrobien : les animaux sont élevés pendant 182 jours sur une surface minimale de 1,2 m² par animal, sur paille ou sur parcours extérieur. Les porcelets ne sont pas sevrés avant 40 jours. Une antibiothérapie thérapeutique reste autorisée lors d'accident pathologique mais en nombre limité pour chaque animal. Aucun porc de cette classe inclus dans l'étude n'a reçu de traitement antimicrobien.
- Dans la classe 2, une attention particulière est attribuée au respect du bien-être des animaux : les porcs sont élevés jusqu'à 182 jours sur une surface minimale de 1,2 m² par animal à partir de la 17^{ème} semaine, sur paille ou parcours extérieur. Les porcelets ne sont pas sevrés avant 28 jours. Seuls les antibiotiques promoteurs de croissance sont interdits.
- Dans les classes 3 et 4, les animaux sont élevés selon des techniques conventionnelles, mais les élevages ont été choisis parmi ceux appartenant aux tiers inférieur (classe 3) et supérieur (classe 4) des dépenses de santé selon la GTE.

Dans chaque classe, 6 élevages de porcs appartenant à au moins 4 organisations commerciales différentes ont été inclus dans l'étude, ce qui porte leur nombre total à 24. Les événements sanitaires survenus au cours de l'essai et les traitements antibiotiques effectués ont été relevés à l'aide d'un questionnaire.

1.2. Prélèvements

Les échantillons ont été prélevés entre avril 2001 et avril 2002. Dans chaque élevage, 30 porcs en fin d'engraisse-

ment ont été sélectionnés au hasard et prélevés par écouvillonnage rectal. En tout ce sont 720 prélèvements fécaux qui ont été réfrigérés, transportés et conservés à +4°C pour être traités en mélange généralement dans les 24 heures par le laboratoire. L'échantillon de base est le mélange constitué des 30 écouvillons rectaux. Ce mode d'échantillonnage apparaît en effet plus pertinent pour la détermination du niveau d'antibiorésistance d'un élevage que les prélèvements individuels (DUNLOP et al., 1999).

1.3. Isolement et identification des *Escherichia coli*

Les 30 écouvillons de chaque élevage ont ensuite été déchargés dans du tryptone-sel, formant ainsi l'échantillon unique composite avec lequel une gélose Mac Conkey est ensemencée. 35 colonies caractéristiques des *E. coli* y sont alors sélectionnées puis leur identification est confirmée successivement par culture sur tubes Kligler puis gélose BCIG.

1.4. Détermination de la résistance

La sensibilité de 30 isolats de *E. coli* confirmés provenant de chaque échantillon composite a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Müller-Hinton, selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) et de la ligne BA 20 du programme 116 du COFRAC.

16 antibiotiques ont été inclus en fonction de leur spectre naturel, de leur autorisation en production porcine en France (excepté le chloramphénicol) et de leur représentativité vis-à-vis de leur famille : amoxicilline (AMX), amoxicilline et acide clavulanique (AMC), céfalexine (CN), ceftiofur (XNL), néomycine (N), gentamicine (GEN), apramycine (APR), spectinomycine (SPT), streptomycine (S), tétracycline (TE), chloramphénicol (C), sulfamides (SSS), triméthoprim (TMP), acide nalidixique (NA), fluméquine (UB), enrofloxacin (ENR). La lecture des antibiogrammes a été effectuée à l'aide d'un pied à coulisse relié au système expert SIR (I2A). Les diamètres d'inhibition de culture ont été interprétés en termes de catégories cliniques « sensible », « intermédiaire » ou « résistant » aux différents antimicrobiens, conformément aux points critiques recommandés par la CA-SFM. Les isolats ainsi qualifiés d'« intermédiaire » ont été comptabilisés dans la catégorie « résistant » de façon à obtenir un résultat dichotomique tenant compte d'un début d'évolution vers la non-sensibilité.

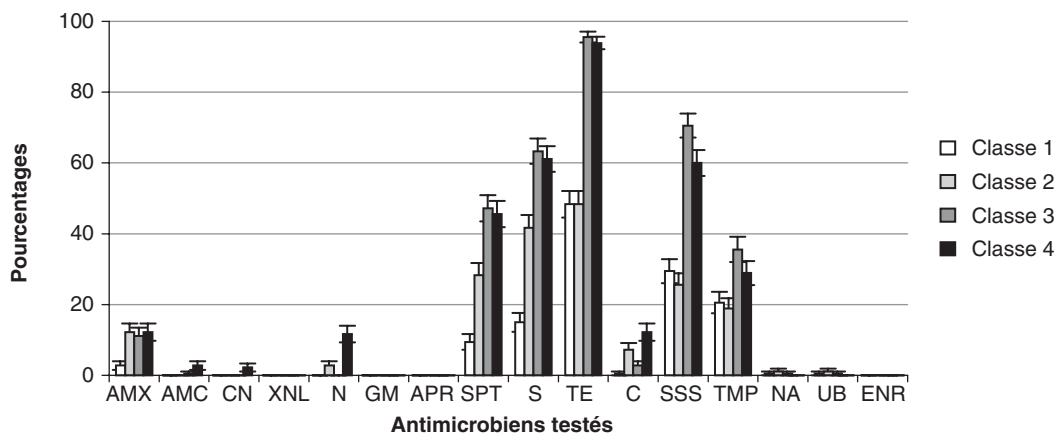
2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.2 Pourcentages de *E. coli* résistants en élevage conventionnel (classes 3 et 4)

Certaines résistances n'ont pas ou quasiment pas été observées. Des souches résistantes à la néomycine ont été isolées dans 3 élevages de la classe 4, mais aucune résistance n'a été constatée pour la gentamicine et l'apramycine. Dans la famille des céphalosporines, une seule souche intermédiaire vis-à-vis de la céfalexine a été mise en évidence dans un élevage de la classe 4. Cette souche était déjà résistante à

Tableau 1 - Nombre de *E. coli* résistants parmi les 30 colonies testées pour chaque échantillon composite d'élevage

Classe	Elevage	AMX	AMC	CN	XNL	N	GM	APR	SPT	S	TE	C	SSS	TMP	NA	UB	ENR
1	1	0	0	0	0	0	0	0	9	10	15	1	10	1	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	30	0	29	28	0	0	0
	3	2	0	0	0	0	0	0	4	7	15	0	4	1	1	1	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	1	1	14	0	0	0	0	0	0
	5	2	0	0	0	0	0	0	0	10	17	2	13	0	1	1	0
	6	3	0	0	0	0	0	0	0	3	8	13	0	10	7	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0	0	23	28	30	0	4	4	0	0	0
	2	10	0	0	0	0	0	0	12	12	21	10	12	10	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	2	3	2	1	3	2	0	0	0
	4	1	0	0	0	0	0	0	5	16	12	1	14	6	0	0	0
	5	11	0	0	0	5	0	0	9	16	22	1	13	12	2	2	0
	6	6	0	0	0	5	0	0	25	27	30	24	28	24	19	19	0
3	1	6	0	0	0	0	0	0	14	19	30	1	19	11	0	0	0
	2	10	1	0	0	0	0	0	4	21	30	1	20	17	0	0	0
	3	2	0	0	0	0	0	0	15	20	30	1	23	5	0	0	0
	4	1	0	0	0	0	0	0	11	11	30	0	18	1	0	0	0
	5	1	0	0	0	0	0	0	12	13	22	0	18	5	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	29	30	30	2	29	25	1	1	0
4	1	5	5	4	0	5	0	0	8	15	24	1	17	2	0	0	0
	2	7	0	0	0	1	0	0	19	23	26	8	13	7	0	0	0
	3	4	0	0	0	0	0	0	24	30	30	7	28	14	0	0	0
	4	0	0	0	0	15	0	0	4	4	29	1	17	16	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	10	18	30	0	12	4	0	0	0
	6	6	0	0	0	0	0	0	17	20	30	5	21	9	0	0	0

**Figure 1** - Pourcentages de *E. coli* résistants aux antimicrobiens

6 autres antimicrobiens testés. Aucune résistance au ceftiofur n'a été relevée. Parmi les quinolones, aucune résistance à l'enrofloxacin n'a été observée et la résistance simultanée à la fluméquine et à l'acide nalidixique a été rarement mise en évidence. Ces prévalences très faibles peuvent être mises en relation avec l'usage très limité de ces molécules qui sont des antibiotiques de choix en médecine humaine.

Par contre ces résultats montrent que pour certaines molécules, les prévalences de résistance peuvent être importantes. La résistance à la tétracycline est la plus fréquemment observée avec près de 95 % de souches non sensibles. Ce pourcentage élevé reflète la fréquence et l'ancienneté de leur utilisation. Elles conservent cependant une place prédominante dans les prescriptions vétérinaires, notamment pour le traitement des infections respiratoires. La résistance aux sulfamides chez *E. coli* est aussi importante avec 65 % de souches résistantes, mais la résistance au triméthoprime qui est tou-

jours utilisé en association avec les sulfamides n'atteint que 32 %. La résistance à la spectinomycine est également fréquente puisque près de 46 % des souches testées n'y sont pas sensibles.

Pour certains antibiotiques, les taux de résistance sont élevés par rapport à leur faible utilisation actuelle. Ainsi autour de 62 % des *E. coli* testés dans cette étude sont résistants à la streptomycine. Cette molécule a été très utilisée lors de son introduction dans le passé jusqu'à ce que sa toxicité et l'émergence rapide de résistances soient considérées comme problématiques et que son usage décline. Elle reste utilisée sous forme de dihydrostreptomycine associée à la pénicilline dans des formulations injectables. Le maintien de cette résistance pourrait également être dû à la présence de bactéries multi-résistantes. En effet, les transposons contenant une région spécifique appelée intégrom où plusieurs gènes de résistance peuvent s'intégrer et cohabiter, jouent un rôle

important dans la dissémination épidémique des résistances multiples (CHIEW et al, 1998). De plus, si la présence du gène de résistance n'a aucun coût biologique pour la bactérie, celle-ci se maintient même en l'absence de l'antimicrobien (SCHRAG et al, 1997). La mutation d'un second site peut ainsi compenser la perte de compétitivité supposée d'un *E. coli* porteur d'un gène de résistance à la streptomycine, et cette souche acquiert alors un avantage sélectif par rapport à une souche sensible. De même, près de 7 % des souches isolées sont résistantes au chloramphénicol. Cet antibiotique est interdit en France depuis 1994 en productions animales, mais une utilisation résiduelle anecdotique semble persister d'après le plan de contrôle des résidus mené par la DGAL (RUGRAFF, 2002). Le maintien de cette résistance pourrait s'expliquer par la résistance croisée avec le florfenicol (BELLOC et al, 2003) ou par l'association de ce gène avec d'autres gènes de résistance dans les plasmides ou tout autre élément génétique mobile, qui lui permettrait d'être co-sélectionné lors d'utilisation d'autres antibiotiques.

Avec un taux de près de 12 %, la résistance à l'amoxicilline paraît faible compte tenu de son utilisation en production porcine et seulement 1,7 % des isolats ne sont pas sensibles à son association avec l'acide clavulanique. Ces derniers ont été identifiés dans 3 élevages.

2.3. Influence des pratiques d'élevage sur les pourcentages de *E. coli* résistants

Les résistances retrouvées en élevage conventionnel sont globalement présentes dans toutes les classes.

Dans la classe 1, les prévalences sont significativement inférieures à celles des 3 autres classes. Cependant des résistances sont tout de même présentes de façon notable : 58 % pour les tétracyclines, 37 % pour les sulfamides et 21% pour la streptomycine et le triméthoprim. Ces résultats confirment donc le fait déjà démontré que la sélection de coliformes fécaux par l'antibiothérapie ou l'utilisation d'additifs antibiotiques ne peut pas être rapidement inversée par le retrait des antimicrobiens (LANGLOIS et al, 1986 ; CHASLUS-DANCLA et al, 1987 ; BELLOC et al, 2003). Contrairement à l'ère précédant la découverte des antibiotiques où les collections de *E. coli* étaient totalement sensibles (HOUNDT et al, 2000), les gènes de résistance sont aujourd'hui largement répandus parmi les bactéries intestinales, et sont mis en évidence même en l'absence d'utilisation d'antimicrobiens. Les résistances multiples permettent probablement des sélections croisées au moindre traitement et une longue période sans utilisation est nécessaire avant que les taux de résistances ne décroissent. Les gènes de résistance peuvent être transmis de génération en génération hors de toute pression de sélection si les bactéries ont profité d'une adaptation génétique leur permettant d'être aussi compétitives que les bactéries sensibles (SHRAG et al, 1997). L'état actuel des connaissances ne permet pas encore de comprendre tous les mécanismes influençant le développement et la persistance de la résistance antimicrobienne parmi les bactéries commensales.

Les classes 3 et 4 possèdent par contre le même profil de résistance. Cela prouverait que les dépenses de santé anté-

rieures des élevages ne sont pas de bons indicateurs pour estimer l'exposition aux antimicrobiens ; d'une part car elles concernent d'autres médicaments vétérinaires n'ayant rien à voir avec les antibiotiques (vaccins, antiparasitaires...) et d'autre part car elles ont été calculées sur des traitements concernant les bandes précédentes.

La classe 2 où les conditions d'élevage sont moins intensives comporte des taux inférieurs à ceux des classes 3 et 4 pour les tétracyclines et les sulfamides qui sont moins utilisés dans cette classe. Des résultats similaires ont été obtenus lors d'une étude comparant des porcs élevés en bâtiment avec ceux élevés sur parcours extérieur (LANGLOIS et al, 1986). Cependant dans notre étude, le profil global des résistances dans la classe 2 n'est pas statistiquement différent de celui des classes conventionnelles 3 et 4. Ce résultat montre ainsi qu'un taux accru de bactéries intestinales résistantes est essentiellement le résultat de leur exposition aux antimicrobiens et que les critères zootechniques n'ont que très peu d'influence.

CONCLUSION

Ces résultats montrent que des conditions d'élevage moins intensives ne sont pas suffisantes pour que les prévalences de bactéries résistantes diminuent significativement. Seule une limitation très stricte du recours aux antimicrobiens préserve la sensibilité de la majorité des souches. Ce constat est en accord avec les précédentes publications : une importante restriction de l'utilisation des antimicrobiens est susceptible de faire diminuer mais pas d'éliminer l'occurrence de germes résistants (MATHEW et al., 2001), et le retour à des prévalences plus faibles nécessite une longue période de retrait de ces produits (LANGLOIS et al, 1986). Les cas de la streptomycine et du chloramphénicol sont en contradiction avec l'idée que la résistance à un antimicrobien peu utilisé peut disparaître. Cette disparition ne peut peut-être avoir lieu que si aucune autre molécule ne sélectionne de co-résistance et si le gène de résistance n'est pas associé avec des éléments génétiques susceptibles d'aider à sa conservation (CHIEW et al, 1998). Or la conservation de l'efficacité des antibiotiques est un enjeu majeur car la gamme des antibiotiques vétérinaires ne va pas s'élargir.

Bien que la flore intestinale de certains animaux puisse être sur-représentée par l'analyse de prélèvements composites d'élevages, cette étude fournit une information globale cohérente compte tenu du nombre important de colonies testées. La distribution des pourcentages de *E. coli* résistants obtenus sur quelques élevages est en effet comparable à celle obtenue en 2000 et 2001 par le programme de surveillance de la résistance aux antibiotiques (SANDERS et al., 2002). Ce programme basé sur un isolement des souches par un tirage au hasard est représentatif de la situation française globale.

Ces résultats confirment aussi le fait déjà accepté que les prévalences de résistance chez *E. coli* reflètent assez bien l'utilisation cumulée de chaque famille d'antibiotiques (VAN DEN BOGAARD et al., 2000). Elles peuvent ainsi être interprétées comme des marqueurs de cette utilisation.

Les données recueillies dans cette étude sont le résultat d'une des étapes de la démarche de sécurité sanitaire française qui vise à développer une stratégie de réponse efficace tout en limitant le recours au principe de précaution, par la compréhension de la relation entre les usages et les niveaux de résistance aux antibiotiques. Elles permettront finalement de sensibiliser les professionnels et les vétérinaires et d'explorer les moyens de progresser dans un usage raisonnable.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été cofinancée par le Ministère de l'Agriculture (Direction Générale de l'Alimentation) dans le cadre du pro-

gramme « Aliments-Qualité-Sécurité ». Les résultats n'ont été que partiellement exposés dans cette communication et feront l'objet d'autres publications.

Les auteurs remercient vivement Elizabeth CHASLUS-DANCLA (INRA), Jean-François GUILLOU (Université de Tours) et Jacques POURQUIÉ (DGAL) pour leur participation active au comité de pilotage de cette étude, ainsi que les éleveurs, les groupements de producteurs et les organisations dont ils dépendent qui ont accepté de participer à cette étude : Agrial, Cavac, Coopagri Bretagne, Fipso, Les Fermiers de l'Argoat, Les Fermiers de l'Erve, Porc Fermier de Vendée, Porc Loire, Valporc.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BELLOC C, LAM D. N., PERON V., CARIOLET R., LAVAL A., 2003. Journées Recherche Porcine, 35, 415-418.
- BYWATER B. J., DELUYKER H., DEROOVER EDÉ JONG A., MARION H., McCONVILLE M., ROWAN T., SHUSTER D., THOMAS V., VALLEE M., WALTERS J., 2003. J. Vet. Pharmacol. Therap., 26 suppl. 1, 165.
- CHASLUS-DANCLA E., GERBAUD G., LAGORCE M., LAFONT J.P., COURVALIN P., 1987. Antimicrobial agents and chemotherapy, vol.31, N°5, 784-788.
- CHASLUS-DANCLA E., LAFONT P., MARTEL J.L., 2000. Acta vet. scand., suppl. 93, 53-61.
- CHIEW Y-F., YEO S.-F., HALL L. M. C., LIVERMORE D. M., 1998. J. Antimicrob. Chemother., 41, 247-251.
- DUNLOP R. H., McEVEN S. A., MEEK A. H., BLACK W. D., FRIENDSHIP R. M., CLARKE R. C., 1999. Epidemiol. Infect., 122, 485-496.
- HOUNDT T., OCHMAN H., 2000. Appl. Environ. Microbiol., 66(12), 5406-5409.
- HUNTER J.E., SHELLEY J.C., HART C. A., BENETT M., 1992. epidemiol. infect., 108, 271-278.
- JACKSON F. R., MATHEWA. G., 2000. J. Anim. Sci., 78, Suppl. 1, 105.
- LANGLOIS B. E., DAWSON K. A., CROMWEL G. L., STAHLY T. S., 1986. J. Anim. Sci., 62 (suppl.3), 18-32.
- MATHEW A. G., BECKMANN M. A., SAXTON A. M., 2001. J. Swine Health Prod., 9(3), 125-129.
- RUGRAFF Y., 2002. Techni Porc, 25(6), 11-13.
- SANDERS P., GICQUEL M., HUMBERT F., PERRIN-GUYOMARD A., SALVAT G., 2002. Bull. Acad. Vét. De France , 155, 267-277.
- SHRAG S., PERROT V., LEVIN B. R., 1997. Proc. R. Soc. Lond. B, 264, 1287-1291.
- SUNDE M., SORUM H., 2001. Microb. Drug Resist., 7(2), 191-196.
- VAN DEN BOGAARD A. E. J. M., LONDON N., STOBBERINGH E. E., 2000. J. Antimicrob. Chemother., 45, 663-671.

