

AEROMONAS SALMONICIDA : AGENT CAUSAL DE LA FURONCULOSE DES SALMONIDÉS

IDENTIFICATION ET EXPÉRIMENTATION THÉRAPEUTIQUE *IN VITRO*

M. TRUQUET (a), G. MICHEL (b)

RÉSUMÉ :

Une étude d'*Aeromonas salmonicida* a été réalisée dans le but d'étendre la gamme des traitements actuels et de vérifier leur efficacité.

Après identification d'un lot de 25 souches bactériennes, 23 d'entre elles ont répondu aux critères de l'espèce. La concordance des caractères biochimiques et leur pourcentage élevé de fiabilité sont en accord avec les travaux déjà réalisés dans ce domaine.

Sur le plan thérapeutique, l'inefficacité *in vitro* de traitements au chloramphénicol est démontrée sur ces souches. A l'inverse, la fluméquine, la nitrofurantoïne et l'ampicilline manifestent *in vitro* une activité antimicrobienne remarquable. Le cetrimide, la chlorhexidine, la polyvidone iodée, le merthiolate et l'AMMO 4 B (c) selon les degrés variables, sont des antiseptiques et désinfectants efficaces sur *Aeromonas salmonicida*.

SUMMARY

A study was carried out on *Aeromonas salmonicida* with the aim of extending the actual range of treatments and of checking their efficiency.

After identification on a series of 25 bacteria strains, 23 of these corresponded to the basic species. The specificity of the biochemical tests and their high percentage of reliability confirm the work already effected in this field.

At the therapeutical level, the lack of *in vitro* efficiency of chloramphenicol treatment is proved on these strains. On the other hand, flumequine, nitrofurantoïne and ampicillin exhibit a noticeable bacteriostatic *in vitro* activity. Cetrimide, chlorhexidine, iodized polyvidone, merthiolate and AMMO 4 B, in varying degrees, are efficient antiseptics and disinfectants on *Aeromonas salmonicida*.

INTRODUCTION

Aeromonas salmonicida, agent causal de la Furunculose des Salmonidés, est à l'origine d'enzooties récurrentes (d) en pisciculture intensive. Par ailleurs, certains chercheurs ont montré que cette bactériose atteint d'autres familles de poissons (1) (2). Pour toutes ces raisons, cette maladie présente un intérêt scientifique et économique indéniable.

Sur le plan clinique, l'affection se traduit par l'apparition de furoncles sur le corps du poisson. Cependant, les symptômes ne sont pas toujours aussi typiques. Ainsi, l'identification microbiologique de l'agent pathogène est une étape indispensable. Dans le cadre des recherches effectuées, une gamme de tests précis a été élaborée, à partir de travaux d'auteurs (1) (6) (3) (5) (4) dans le but d'identifier ce germe. Les résultats expérimentaux permettent, en outre, de discuter l'efficacité *in vitro* de traitements nouveaux et traditionnels.

(a) Docteur en pharmacie - Diplômé 1982 - Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse.

(b) Professeur Georges MICHEL - Directeur du Laboratoire de Virologie et Microbiologie Industrielle - Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse.

(c) AMMO 4 B : Bromure de diméthyl lauryl benzylammonium.

(d) Maladie contagieuse localisée qui peut récidiver.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A - Souches bactériennes

L'échantillonnage, volontairement diversifié, est composé comme suit :

- deux souches issues d'un centre de collection tchécoslovaque, (e)
- vingt souches isolées au Laboratoire d'Ichtyopathologie de l'INRA, (f)
- enfin, trois souches issues d'un gardon et d'une truite (GF. 28, TR. 24 et TR. 24 Ed). Ces deux dernières ayant été isolées directement (TR. 24) ou après incubation de préculture (TR. 24 Ed) sur bouillon TSA (g) à 22° C.

Le prélèvement microbiologique réalisé à partir des poissons congelés a été effectué le 21/9/82, soit 2 à 6 mois après leur capture.

Sur le plan pratique, toutes les souches sont cultivées sur gélose TSA à température ambiante (22° C). La maintenance est obtenue par repiquage hebdomadaire sur bouillon TSA.

B - Méthodes d'identification

Elles font appel à des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques (1) (4) (5) (6). Parmi les premiers tests, citons la forme bactérienne et la recherche de la mobilité. L'étude physiologique s'oriente vers l'analyse de la croissance et la production de pigments. Ces deux dernières réactions donnant lieu à des essais simultanés, pour chaque souche, à deux températures différentes (22° C et 37° C), l'une étant léthale pour notre bactérie (h). Dans la gamme des tests biochimiques, hormis la gélose PBG (3), quinze réactions ont été choisies parmi les plus représentatives de l'espèce *Aeromonas salmonicida*.

C - Antibactériens : choix et expérimentation pratique

Après sélection, selon les critères d'efficacité et de prix de revient, les antibiotiques suivants ont été testés : ampicilline, chloramphénicol, cotrimoxazole, nitrofurantoïne, fluméquine. Pour ce qui est des antiseptiques et des désinfectants le choix est limité à l'AMMO 4 B, à la polyvidone iodée, au cetrimide, à la chlorhexidine et au merthiolate.

Pour l'ensemble de ces produits, une gamme de dilutions est réalisée afin de cerner leur zone d'action, exprimée par leur concentration minimale inhibitrice (CMI) (i). Celle-ci étant établie à partir de la dose thérapeutique moyenne préconisée (1) (10) (11). Cependant, en ce qui concerne les antibiotiques, il se produit des phénomènes complexes d'absorption et de répartition dans les divers secteurs de l'organisme qui déborde le cadre de cette étude bactériologique. Il nous faut donc supposer, *a priori*, que l'antibiotique distribué dans la nourriture est absorbé à 100 % dans le tractus digestif, qu'il se répartit de manière uniforme dans tout l'organisme, et enfin, que le volume développé par un poisson est globalement en rapport avec son poids. Selon cette hypothèse, la dose prescrite d'antibiotiques devrait dans tous les cas être au moins égale à la CMI pour avoir une valeur thérapeutique.

Les boîtes de Pétri, contenant les antimicrobiens dilués dans la gélose TSA, sont préparées extemporanément. Avant dépôt, on uniformise la concentration des cultures bactériennes de 48 heures à l'aide d'un photomètre. Un taux de 10⁵ bactéries par microlitre est obtenu en diluant correctement la culture en bouillon TSB (j) jusqu'à DO 85 (k). Les 23 souches, ainsi standardisées, sont alors déposées à la surface de la gélose au moyen d'un appareil " Multipoint " inoculateur.

-
- (e) Czechoslovak Collection of Microorganisms - J.E. Purkyne University - 662.43 Brno, Czechoslovakia.
 - (f) Institut National de la Recherche Agronomique - Laboratoire d'Ichtyopathologie - Route de Thiverval - 78850 Thiverval Grignon.
 - (g) TSA. Trypto caséine de Soja - Bio Mérieux
 - (h) *Pseudomonas* est susceptible de produire des pigments aussi bien à 22° qu'à 37° (HAMILTON - MILLER 75). Cette réaction constitue donc un test différentiel appréciable.
 - (i) La concentration minimum inhibitrice de chaque substance correspond à la plus faible dose pour laquelle la croissance, par rapport à l'inoculum initial, est nulle dans les 48 heures.
 - (j) TSB. Trypticase Soja Broth (bouillon)
 - (k) DO. Densité Optique lue sur le photomètre.

RÉSULTATS

Ces derniers, présentés dans les tableaux 1 et 2 se décomposent de la manière suivante :

SOUCHES	TESTS																						
	Forme	Mobilité	Croissance à 22°	Croissance à 37°	Pigment à 22°	Pigment à 37°	Gram	Cyt. Oxydase	I ⁺ XC	ADH	ODC	Indole	H ₂ S production	Réd. Nitrates	Ferment. Glucose	ONPG	Rhamnose	Mannitol	Saccharose	Sorbitol	Inositol	Uréase	Gélose PDG
CCM 1307	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	2	-	+	-	-	-	-	+
CCM 1318	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
45.75	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
84.74	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
44.75	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
36.75	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
91.80	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	2	-	+	-	-	-	-	+
166.74	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	2	-	+	-	-	-	-	+
88.68	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
62.68	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
01.76	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
A 141.72	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
120.75	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
72.78	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	2	-	+	-	-	-	-	+
65.80	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	2	-	+	-	-	-	-	+
122.77	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	2	+	2	-	+	-	-	-	-	+
20.78	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
67.79	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	2	-	+	-	-	-	-	+
46.79	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
59.77	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
51.79	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	2	-	+	-	-	-	-	+
05.74	C	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
TR.24	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
TR.24 Ed	B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	2	-	+	-	-	-	-	+
GF.28	C	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Sens de la réaction		-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
% de souches d'Aeromonas s. répondant au test		100 %	100 %	100 %	95,6	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	86,9	100 %	82,6	100 %	100 %	93,6	100 %	100 %	100 %	100 %

Tableau 1 : Recherche et identification des souches d'Aeromonas salmonicida.

B : Bacille
 C : Coque
 ~ : Réaction peu caractéristique

	Merthiolate mg/l MERSEPTIL 0,1 %	Polyvidone iodée g/l DETADINE 8,5 %	Chloroxidine mg/l HIBITANE: 5 %	Ammonium IV ml/ml AIBID 4 B	Cetrimide mg/l CETAVLON 20 %	Fluméquine mg/l FLUMIX 50 %	Nitrofurantoina mg/l FURADOINE	Chloramphénicol mg/l MYCOLICINE	Cotrimoxazole mg/l BACTRIM 120 mg/cp	Ampicilline mg/l TOTAPEN I.V.
N°1 CCM 1307	0,5	2,12	500	1/6666	28,5	0,2	1,25	20	50	0,83
N°2 CCM 1318	0,5	2,12	500	1/6666	28,5	0,2	1,25	20	50	0,41
N°3 45.75	0,37	2,12	50	1/20000	28,5	0,1	12,5	7,5	50	<0,25
N°4 84.74	0,37	2,12	100	1/10000	28,5	0,1	12,5	>500	50	<0,25
N°5 44.75	0,5	2,12	76,9	1/10000	28,5	0,1	12,5	7,5	5	0,35
N°6 36.75	0,75	2,12	25	<1/50000	5	0,04	8,33	500	50	<0,25
N°7 91.80	0,75	2,12	50	1/20000	28,5	0,2	12,5	>500	50	0,31
N°8 166.74	0,75	2,12	500	1/10000	28,5	0,1	12,5	5	5	0,41
N°9 88.68	0,3	2,12	500	1/5000	40	0,1	12,5	7,5	50	0,35
N°10 62.68	0,5	2,12	100	1/10000	28,5	0,06	25	>500	50	0,5
N°11 01.76	0,3	2,12	50	1/35000	10	0,1	12,5	500	50	0,31
N°12 A141.72	0,75	2,12	500	1/6666	28,5	0,2	12,5	>500	50	0,83
N°13 120.75	0,5	2,12	500	1/6666	28,5	0,2	12,5	20	50	0,62
N°14 72.78	0,5	1,41	500	1/10000	28,5	0,2	12,5	20	5	0,62
N°15 65.80	0,5	1,41	500	1/6666	28,5	0,2	12,5	20	50	0,62
N°16 122.77	0,5	1,41	500	1/5000	40	0,2	8,33	500	50	0,62
N°17 20.78	0,5	2,12	500	1/5000	28,5	0,2	6,25	20	50	0,83
N°18 67.79	0,37	1,41	500	1/6666	28,5	0,1	8,33	20	50	0,83
N°19 46.79	0,5	1,41	500	1/5000	40	0,2	1,25	>500	50	0,83
N°20 59.77	0,5	1,41	500	1/6666	28,5	0,4	8,33	20	50	1,25
N°21 51.79	0,37	1,41	50	<1/50000	5	0,04	6,25	3,75	5	0,31
N°22 TR.24	0,5	1,41	100	1/6666	28,5	0,1	8,33	>500	50	0,41
N°23 TR.24Ed	0,5	1,41	100	1/6666	28,5	0,1	8,33	>500	50	0,41
DE 100*	0,75	2,12	500	1/5000	40	0,4	25	>500	50	1,25

Tableau 2 : Détermination de la CMI des antibiotiques et antiseptiques.

* Dose efficace qui détermine 100 % d'inhibition

A - Identification - Tableau 1

La lecture comparative des réactions d'identification a permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

- les souches 05.74 et GF.28 ne sont pas des *Aeromonas salmonicida* et sont rejetées dans la suite du travail,
- tous les autres échantillons répondent de manière non équivoque à la gamme de tests choisis. Seules de petites variations peuvent être observées.

B - Sensibilité du germe - Tableau 2

La détermination de la CMI des antibiotiques et antiseptiques est exprimée en mg/l sauf pour l'AMMO 4 B (ml/ml) et la BÉTADINE (g/l).

L'ensemble des valeurs trouvées peut se résumer par la dose efficace déterminant 100 % d'inhibition (D.E. 100). Ainsi, les antibiotiques peuvent être classés par ordre décroissant d'activité : fluméquine, ampicilline, nitrofurantoïne, bactrim et chloramphénicol (de 0,4 mg/l pour le plus actif, à plus de 500 mg/l pour le plus faible).

Les antiseptiques ordonnés selon le même motif sont : le merthiolate, les ammoniums quaternaires, la chlorhexidine et la polyvidone iodée.

DISCUSSION

A - Interprétation des réactions d'identification

Le cumul des résultats, abstraction faite des souches 05.74 et GF.28, met en évidence l'homogénéité du groupe *Aeromonas salmonicida* et la valeur des tests utilisés. Ainsi, sur un total de 23 réactions, 19 d'entre elles affirment une concordance maximale. En comparant ces observations aux résultats obtenus par POPOFF en 1971 (1), on constate très peu de différences pour la mise en évidence de l'arginine dihydrolase, de la nitratase, de la β galactosidase et dans l'utilisation du saccharose. Le test de la lysine décarboxylase se révèle cependant négatif, ceci contrairement aux travaux de POPOFF (1). Le résultat ici mentionné est d'ailleurs confirmé dans la 8^e édition du BERGEY'S MANUAL (6).

B - Efficacité des antibactériens testés

La fluméquine s'est révélée totalement active pour une dose mille fois plus faible que le traitement envisagé par MICHEL *et al.* (10). De même, ampicilline et nitrofurantoïne, du fait de leur efficacité, ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques. Notamment, la relation dose/efficacité permet de grouper ampicilline et fluméquine dans la catégorie des traitements décisifs.

Les phénomènes de potentialisation sont aussi intéressants car l'association sulfamide-triméthoprim (5) permet de diminuer la dose d'utilisation du seul sulfamide (1) (7) (9). Dans le cadre de notre postulat de départ, le cotrimoxazole se révèle dans tous les cas efficace substantiellement sur les souches testées à raison de 50 mg/kg de poisson par jour. Dans la réalité, il n'en est pas de même et cette dose thérapeutique devrait se révéler *in vivo* insuffisante.

A l'inverse, le chloramphénicol peut faciliter l'émergence de résistances, même pour une dose dix fois supérieure à la dose usuelle (voir tableau 2). Avec les traitements préconisés pour cet antibiotique (1) (7) (8) (5), il s'avère impossible de traiter une épidémie de furonculose dans 43,5 % des cas. Pour une dose dix fois supérieure, ce taux d'échec toujours élevé, se situe aux alentours de 30,5 %. Il faut toutefois admettre que les souches qui ont été sélectionnées peuvent précisément constituer des cas rebelles aux thérapeutiques usuelles.

Sur le plan aseptie, le merthiolate tient une bonne place. Ainsi, à raison de 0,75 ml de Merseptyl par litre d'eau, le traitement entraîne *in vitro* l'inhibition totale des 23 souches bactériennes. Les ammoniums quaternaires sont aussi de bons désinfectants. L'efficacité du cetrimide peut être comparée à celle de l'AMMO 4 B. En effet, la dilution à 1/5000 d'une solution à 20 % de Cetrimide correspond à une dose de 40 mg/l de Cetavlon.

L'essai thérapeutique de la chlorhexidine a permis de démontrer que la dose efficace 100 équivaut à 10 ml d'Hibitane à 5 % par litre d'eau. De même, la polyvidone iodée contenue dans la Bétadine, à raison de 25 ml par litre d'eau, est un excellent antiseptique.

CONCLUSION

En résumé, au cours des travaux préliminaires, la mise en culture de vingt-cinq souches bactériennes a été réalisée. Après identification, 23 d'entre elles se sont révélées être *Aeromonas salmonicida*.

Sur le plan biochimique, toutes les souches manifestent une grande homogénéité, conformément à ce qui a pu être observé par d'autres chercheurs.

Certaines conclusions peuvent être tirées à propos de l'utilisation des antimicrobiens éprouvés. La plupart des traitements choisis se révèlent efficaces pour lutter contre l'agent de la furunculose. Exception faite toutefois pour le chloramphénicol ; l'usage inconsidéré et immodéré de ce produit s'est soldé par l'apparition de nombreuses résistances. Ceci illustre, encore une fois, le manque d'information de certains utilisateurs à propos des effets secondaires des antibiotiques.

Enfin, cette étude ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques dans la mesure où l'on déterminera la toxicité éventuelle des substances en cause et leur posologie chez le poisson.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - POPOFF M., 1971. Etude sur les *Aeromonas salmonicida*. I. Caractères biochimiques et antigéniques. *Ann. Rech. Vét.*, 3, 49-57.
- 2 - EVELYN T.P.T., 1971. An aberrant strain of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* isolated from a marine host, the sablefish (*Anoploma fimbria*), and from two species of cultured Pacific salmon. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 28, 1629-1634.
- 3 - McCOY R.H. et PILCHER K.S., 1974. Peptone beef extract glycogen agar, a selective and differential *Aeromonas medium*. *J. Fish Res. Bd. Canada*, 31, 1553-1555.
- 4 - GRIFFIN P.J., SNIESZKO S.F. et FRIDDLE S.B., 1952. A more comprehensive description of bacterium *Salmonicida*. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 82, 129-138.
- 5 - McCARTHY D.H., 1975. Fish furunculosis. *J. Inst. Fish. Mgmt.*, 6 (1), 13-18.
- 6 - BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 1974. 8^e édition - Williams et Wilkins. Ed.
- 7 - HERMAN R.L., 1968. Fish furunculosis, 1952-1966. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 97 (3), 221-230.
- 8 - BELLET R., 1962. La Furonculose de la truite ou " septicémie hémorragique ". *Bull. Fr. Piscic.*, 207, 46-66.
- 9 - SNIESZKO S.F., 1953. Therapy of bacterial fish diseases. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 83, 313-330.
- 10 - MICHEL C., GÉRARD J.P., FOURBET B., COLLAS R. et CHEVALIER R., 1980. Emploi de la fluméquine contre la furunculose des salmonidés : essais thérapeutiques et perspectives pratiques. *Bull. Fr. Piscic.*, 277, 154-162.
- 11 - SNIESZKO S.F. et FRIDDLE, 1952. Further studies on factors determining tissue levels of sulfamerazine in trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 81, 101-110.
- 12 - HAMILTON-MILLER J.M.T. et OGUNNARIWO J., 1975. An improvement in the technique for the presumptive identification of *Aeromonas salmonicida*. *Br. Vet. J.*, 131, 663-665.