

NOTE TECHNIQUE

ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE CINQ AMMONIUMS QUATÉRNAIRES SUR LES PRINCIPAUX VIRUS ET BACTÉRIES PATHOGÈNES POUR LES SALMONIDÉS

M. DORSON, C. MICHEL

“avec la collaboration technique de Corinne TORCHY, Bernadette FAIVRE et Brigitte KEROUAULT”

INRA, Laboratoire d'Ichtyopathologie, Route de Thiverval,
78850 THIVERVAL-GRIGNON, France

Reçu le 7 janvier 1987
Accepté le 20 Février 1987

Received 7 January, 1987
Accepted 20 February, 1987

RÉSUMÉ

Cinq ammoniums quaternaires disponibles sur le marché français ont été testés pour déterminer leur activité sur deux virus et cinq espèces bactériennes. Une concentration de 125 mg/l est suffisante pour détruire en 5 minutes le virus de la Septicémie Hémorragique Virale, mais 12500 mg/l est une concentration insuffisante pour obtenir le même résultat avec le virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse. Une concentration de 100 mg/l inactive totalement les espèces bactériennes utilisées en 2 minutes, ce résultat n'étant pas toujours obtenu avec 10 mg/l. Les Myxobactéries se révèlent les plus sensibles, une certaine inactivation étant encore notée à 1 mg/l pendant 10 min. en eau distillée. Les limites de l'utilisation de ces composés en salmoniculture sont discutées.

AN EVALUATION OF THE ACTIVITY OF FIVE QUATERNARY AMMONIUM COMPOUNDS ON MAIN VIRUSES AND BACTERIA PATHOGENIC FOR SALMONIDS

SUMMARY

Five quaternary ammonium compounds available in France have been tested for determining their activity against two viruses and five bacteria. A concentration of 125 mg/l is sufficient to inactivate Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus within 5 minutes, but 12500 mg/l is not sufficient for obtaining the same result with Infectious Pancreatic Necrosis Virus. The bacteria are totally inactivated within 2 minutes by a concentration of 100 mg/l, but this result is not always achieved at 10 mg/l. The Myxobacteria prove the most susceptible, some inactivation being observed with 1 mg/l during 10 min in distilled water. The limits of quaternary ammonium compounds in trout farming are discussed.

INTRODUCTION

Les sels d'ammoniums quaternaires, plus couramment dénommés ammoniums quaternaires, sont des désinfectants très utilisés, tant en médecine humaine qu'en santé animale. Leur succès est fondé sur les qualités suivantes : excellente conservation, absence d'odeur et de dégagement gazeux nocif, pouvoir corrosif pratiquement nul pour le matériel comme pour l'épiderme des personnes amenées à les manipuler, excellent pouvoir mouillant lié à d'intéressantes capacités bactéricides.

En pisciculture les ammoniums quaternaires préconisés dès 1948 par RUCKER sont utilisés suivant deux modalités (DE KINKELIN, GERARD et MICHEL 1981 ; DE KINKELIN, MICHEL et GHITTINO 1985) :

— comme désinfectants du matériel, des locaux et des bacs, des bottes et des mains, à des doses conseillées de l'ordre de 1 g/l en produit actif.

— comme traitement préventif et curatif des bactérioses branchiales et cutanées, causées essentiellement par des Myxobactéries. Les poissons sont alors baignés dans des solutions à 2 mg/l pendant 20 min.

Plusieurs préparations correspondant à des molécules différentes conditionnées seules ou en association sont disponibles sur le marché. Comme c'est souvent le cas pour des substances d'usage classique en pisciculture, l'efficacité des ammoniums quaternaires employés tant comme désinfectants qu'à titre thérapeutique n'a fait l'objet que de rares publications (RUCKER 1948 ; RUCKER, JOHNSON et ORDAL 1949). Il était donc intéressant pour la pratique piscicole d'évaluer l'efficacité de certaines préparations vis-à-vis des agents pathogènes viraux et bactériens les plus couramment rencontrés dans la salmoniculture européenne :

— le virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (NPI), qui appartient au groupe des Birnaviridae.

— le virus de la Septicémie Hémorragique Virale (SHV) de la famille des Rhabdoviridae.

— l'agent de la furonculose, *Aeromonas salmonicida* (Vibrionaceae), celui de l'Entérosepticémie hémorragique de la Truite, *Yersinia ruckeri*, (Enterobacteriaceae) ainsi que des représentants des espèces bactériennes les plus couramment impliquées dans les infections consécutives à des stress et traumatismes divers et qualifiées d'"opportunistes" : *Aeromonas hydrophila*, (Vibrionaceae), *Pseudomonas fluorescens*, (Pseudomonadaceae), *Flexibacter* sp. (Myxobacteriaceae).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Préparations d'ammoniums quaternaires

Trois des ammoniums quaternaires utilisés (dénominations commerciales : Agroseptil, Ammonium 80 %, Ammofish) ont été obtenus par le circuit commercial normal ; les deux derniers (Antigerm's et Desogerme 3A) ont été fournis par le fabricant pour essai. Leur composition et leurs caractéristiques sont les suivantes :

Agroseptil (Romeil) : la préparation contient :

- 25 % de chlorure de N-alkyl-diméthyl-benzyl ammonium.
- 25 % de chlorure de N-alkyl-diméthyl-éthylbenzyl ammonium. (Prescrit pour usage thérapeutique).

Ammofish (Jarlaud-Lefèvre) dont la composition est sensiblement identique au précédent (pourcentages de 40) (Prescrit à la fois pour la désinfection et l'usage thérapeutique).

Ammonium quaternaire 80 % (Romeil). Solution à 80 % de bromure de lauryl-diméthyl-benzyl ammonium. (Prescrit pour la désinfection).

Antigerm's (Eurochimie) : chlorure de di-isobutyl phenoxy-ethoxyethyl-diméthyl-benzyl-ammonium. Solution à 125 g/l.

Desogerme 3A (Laboratoires A.C.I.) composition confidentielle associant un ammonium et divers aldéhydes.

Pour tous les tests impliquant les virus, les dilutions ont été effectuées dans l'eau de la ville (pH 7,45 ; calcium 95 mg/l ; ion chlorure 18 mg/l). Pour la plupart des essais bactériologiques l'eau distillée a été préférée.

2. Techniques virologiques

La production et le titrage des virus de la NPI et de la SHV ont été réalisés suivant les techniques de routine déjà décrites (DE KINKELIN et SCHERRER 1970). Les suspensions virales concentrées reprises dans l'eau étaient mélangées volume à volume avec une préparation d'ammonium de façon à obtenir les concentrations en produit actif indiquées (tableau 1). Après 5 min. à la température de 20°C, le mélange réactionnel était dilué de 10 en 10 dans le milieu de culture (Milieu de Eagle tamponné au Tris additionné de 2 % de sérum d'embryon bovin). Des prises de 0,1 ml de chaque tube de dilution étaient aussitôt inoculées à des monocouches de cellules en culture RTG2 dans des boîtes de Pétri de 35 mm pour titrage du virus par la technique des plages sous agarose. Le pourcentage d'inactivation était exprimé par rapport à une suspension virale mélangée à un volume d'eau pure et incubée dans les mêmes conditions.

Préparation	Concentration en produit actif (mg/l)	Nature et titre du virus (ufp/ml)	Pourcentage d'inactivation
Agroseptil	125	SHV 10^8	100
	12,5	"	96
	1,25	"	0
	12 500	NPI 10^6	97
	1 250	"	95
	125	"	91
Ammonium 80 %	125	SHV 10^8	100
	12,5	"	96
	1,25	"	0
	12 500	NPI 10^6	96
	1 250	"	88
	125	"	62
Ammofish	12 500	NPI $1,5 \times 10^7$	83
	1 250	"	76
	125	"	16
Antigerme's	12,5	SHV 10^7	100
	1,25	"	0
	1 250	NPI 7×10^6	97
	125	"	96
	12,5	"	86
Desogerme 3A	500	NPI 10^7	100
	50	"	90

Tableau 1 : Pourcentages d'inactivation des virus de la NPI et de la SHV incubés 5 min. à 20 °C avec les préparations d'ammoniums quaternaires aux concentrations indiquées.

Table 1 : Inactivation percentage of IPN and VHS viruses incubated 5 min. at 20 °C with quaternary ammonium compounds at the indicated concentrations.

3. Techniques bactériologiques

Les souches bactériennes, cultivées en bouillon trypticase soja agité à 22 °C, étaient récoltées après 24 heures. La mesure de densité optique à 525 nm et la référence à des courbes standard permettaient d'ajuster les suspensions bactériennes à la dose approximative de 10 bactéries/ml. Un contrôle de pureté était réalisé sur milieu gélosé pour chaque suspension.

Les ammoniums quaternaires, d'abord ajustés à 11,1 % de produit actif pour obtenir une solution-mère, étaient dilués de 10 en 10 dans des tubes contenant 9 ml d'eau. L'apport d'1 ml d'inoculum bactérien rétablissait des dilutions finales de 10^{-1} à 10^{-6} tout en ajustant le titre infectieux à 10^6 bactéries/ml. Après contact à température ambiante des échantillons étaient prélevés à temps fixes : 2 min., 5 min., 10 min. (le Desogerme 3A faisant également l'objet de contrôles à 24 et 48 heures).

Des gouttes de chaque échantillon étaient déposées et adsorbées sur gélose nutritive, ou inoculées dans des tubes de bouillon. Après 48 h d'incubation à 22 °C la présence de culture était recherchée dans les tubes et sur les boîtes, où la densité pouvait en être grossièrement évaluée.

RÉSULTATS

1. Désinfection antivirale

Seulement 3 des préparations concernées par cette étude ont été testées contre le virus de la SHV. Des préparations virales de titre élevé (10^7 à 10^8 ufp/ml) sont totalement inactivées en 5 min.

en présence de 125 mg/l de produit actif. Quelques unités formant plages (ufp) subsistent à la concentration de 12,5 mg/l dans le cas de l'Agroseptil et de l'Ammonium 80 %, l'Antigerm's ne pouvant d'ailleurs être considéré comme supérieur compte tenu du titre viral initial plus faible (tableau 1). Par contre, pour le virus de la NPI, qui est considéré comme plus résistant à l'inactivation par divers agents physico-chimiques, des concentrations en produit actif de 12500 mg/l laissent subsister un nombre non négligeable d'ufp (exception faite du Desogerme 3A qui inactive totalement le virus à la concentration de 500 mg/l).

2. Désinfection antibactérienne

Les résultats obtenus sont représentés de façon simplifiée dans la figure 1, où ne sont considérées que les concentrations de produit pur inactivant totalement les bactéries (pouvoir bactéricide) ou n'en laissant subsister qu'un très faible nombre, indétectables sur milieu solide mais capables de reprendre leur croissance en bouillon nutritif (pouvoir bactériostatique). Lorsque les essais ont été réalisés à deux reprises (Antigerm's, Ammofish, Ammonium 80 %), les résultats ne sont pas exactement superposables.

A. salmonicida et les Myxobactéries (*Flexibacter* sp.) sont les plus sensibles tandis que les *Pseudomonas*, et surtout *Y. ruckeri* sont les plus résistants.

La comparaison des pouvoirs bactéricides et bactériostatiques respectifs en eau de ville et en eau distillée n'a été faite que pour le Desogerme 3A : des concentrations 10 fois supérieures ont été nécessaires en eau de ville pour obtenir le même résultat qu'en eau distillée.

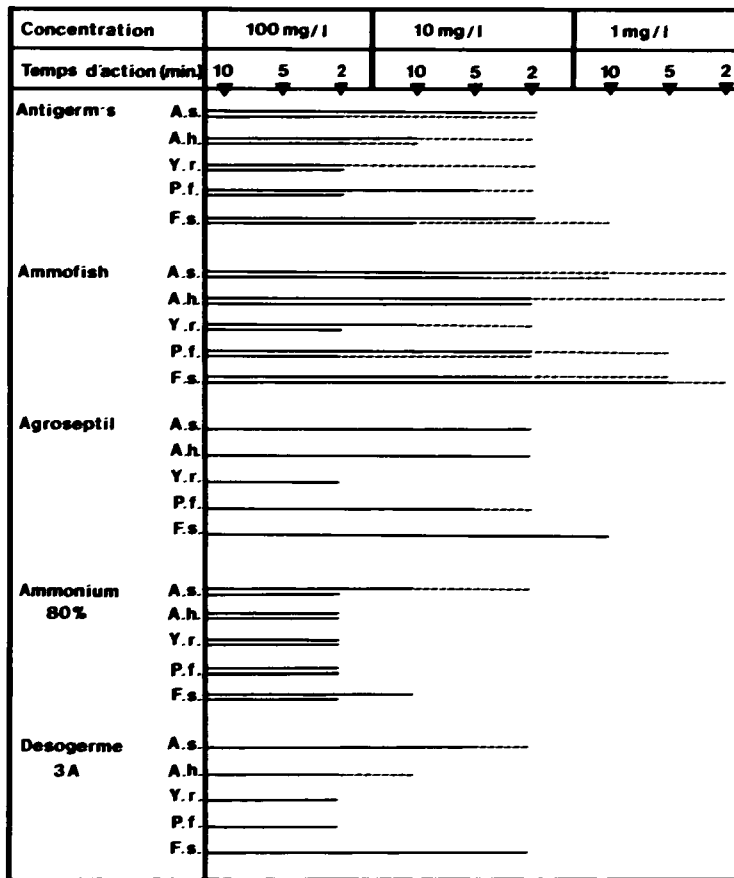


Figure 1 : Efficacité bactéricide (traits pleins : aucune bactérie ne subsiste) et bactériostatique (traits discontinus : un faible nombre de bactéries subsiste) de divers sels d'ammoniums quaternaires dilués en eau distillée aux concentrations et temps indiqués vis-à-vis de bactéries pathogènes de poissons : *Aeromonas salmonicida* (A.s.) ; *Aeromonas hydrophila* (A.h.) ; *Yersinia ruckeri* (Y.r.) ; *Pseudomonas fluorescens* (P.f.) ; *Flexibacter* sp. (F.s.). Un ou deux tests suivant les préparations.

Figure 1 : Bactericidal (Full lines : no bacterium survives) and bacteriostatic (dotted line : a few bacteria survive) activities of 5 different quaternary ammonium compounds diluted in distilled water against 5 pathogenic bacteria.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le pouvoir virucide des ammoniums a été testé sur des temps de contact de 5 min., durée qui a été choisie pour permettre le traitement en série des prélèvements et assurer une bonne reproductibilité des résultats. Ce temps peut paraître long comparé à des situations pratiques de "désinfection éclair" (mains par exemple). Les concentrations virales initiales élevées étaient elles aussi dictées par des raisons expérimentales (nécessité de diluer suffisamment l'ammonium toxique pour les cellules avant d'inoculer celles-ci tout en gardant un nombre de plages significatif) mais elles ne dépassaient guère ce qu'on peut attendre dans un bac où sévit une maladie virale (un alevin peut excréter jusqu'à 10^5 ufp du virus de la NPI par heure). Le choix de l'eau de ville visait à se rapprocher des conditions de la pratique, l'efficacité des ammoniums étant maximum dans l'eau distillée. Dans ces conditions une concentration de 125 mg/l des trois produits testés (Agroseptil, Ammonium 80 %, Antigerm's) est suffisante pour inactiver totalement le virus de la SHV (et même 12,5 mg/l pour le dernier). Il est probable que cette concentration vaudrait aussi pour les deux autres formules. De toute façon on peut conclure qu'une désinfection rapide à la dose préconisée (1000 mg/l) est efficace contre ce virus. On pouvait s'attendre à ce que le virus de la NPI soit plus résistant, d'après les études réalisées avec divers antiseptiques — à l'exclusion des ammoniums — par DESAUTELS et MACKELVIE 1975, ELLIOT et AMEND 1978, DORSON 1985 : la destruction totale nécessite au moins 5000 mg/l de formol pendant une nuit, 16 à 35 mg/l d'iode actif pendant 5 min. et 25 à 40 mg/l de chlore disponible pendant 5 min. Effectivement, une concentration de 500 mg/l est nécessaire pour le produit le plus actif (Desogerme 3A), l'inactivation totale n'étant pas atteinte à 12500 mg/l pour les quatre autres.

Le pouvoir bactéricide des cinq ammoniums est conforme à leur réputation, et la dose désinfectante usuelle de 1 g/l est suffisante, même si l'on considère que la réalisation des tests en eau distillée constitue une situation idéale, la présence de sels minéraux, et *a fortiori* de matières organiques, pouvant diminuer l'efficacité des produits. Les variations relevées d'un essai à l'autre, suggèrent que l'état de la culture bactérienne soumise au test en est responsable, mais doivent rendre prudent pour la comparaison de l'efficacité des molécules. Ceci posé, l'Ammofish et l'Agroseptil apparaissent les plus actifs, l'Ammonium 80 % se révélant le moins efficace. La sensibilité relative des espèces microbiennes est en revanche clairement détectable. *A. salmonicida* et les Myxobactéries s'avèrent constamment les plus sensibles tandis que les *Pseudomonas*, et surtout *Y. ruckeri* sont plus difficiles à détruire.

Ceci amène à considérer la question de l'emploi thérapeutique des ammoniums quaternaires, dont les Myxobactéries constituent justement la cible la plus fréquente. A première vue un effet de type bactériostatique peut être escompté avec certains produits à la dose de 1 mg/l, mais il faudra répéter les traitements, ce qui ne va pas sans inconvénients dans la mesure où le seuil de tolérance des poissons n'est guère plus élevé. Plus inquiétants s'avèrent les essais menés en diluant conjointement le Desogerme 3A dans l'eau distillée et l'eau du robinet. Alors que 10 mg/l exerçaient un effet nettement bactéricide pour *A. salmonicida* et *Flexibacter* sp. en eau distillée, il a fallu des concentrations 10 fois plus élevées pour obtenir la même chose en eau brute, même lorsque le temps de contact était prolongé de 24 à 48 heures. Ces différences sont probablement attribuables à la richesse de l'eau du robinet en composés minéraux, et lorsqu'on sait que les substances organiques, abondantes à la surface du poisson, ont en outre un effet inhibiteur marqué, on ne peut que mettre en doute l'efficacité thérapeutique des ammoniums quaternaires chez les Salmonidés.

La dose létale 50 % (mortalité enregistrée 96 h après un bain d'une heure) a été déterminée en eau de ville, vis-à-vis d'alevins de 0,5 g comme de truitelles de 20 g (résultats non détaillés ici) et se situe entre 5 et 10 mg/l pour les différentes préparations, ce qui est proche des concentrations efficaces.

Ces observations rejoignent celles de RUCKER, JOHNSON et ORDAL (1949) qui avaient montré que l'allongement de la chaîne alkyl (de C₈ à C₁₈) d'un chlorure d'alkyl-diméthyl-benzyl-ammonium ("Roccal") entraînait une croissance de l'efficacité, mais surtout une croissance plus rapide de la toxicité, la concentration toxique pouvant être inférieure à la concentration efficace pour les chaînes en C₁₆ et C₁₈, rendant ces composés inutilisables par bain. Cette étroitesse de la marge d'utilisation a été de nouveau soulignée récemment par HOSKINS et DALZIEL (1984) qui ont observé des mortalités à partir de 2 mg/l en eau peu minéralisée.

En conclusion, les ammoniums quaternaires ne pourront être utilisés comme désinfectants que tant que le virus de la NPI n'est pas concerné. Dans le cas contraire il faudra leur préférer les iodophores (déjà recommandés pour la désinfection des œufs). L'utilisation thérapeutique devra être faite avec prudence (un essai préalable sur un petit lot de poissons est conseillé) et il serait souhaitable de disposer de tests de maladie expérimentale avec les Myxobactéries afin d'évaluer plus précisément l'efficacité des diverses préparations disponibles, et la comparer avec celle d'autres molécules disponibles sur le marché (chloramine T en particulier).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la Société Eurochimie pour la fourniture du produit nécessaire aux essais, et les laboratoires A.C.I. pour le financement des essais concernant le Desogerme 3A, ainsi que Marie-Claire LE COHENNEC pour la frappe du manuscrit.

RÉFÉRENCES

- DESAUTELS D., MACKELVIE R.M., 1975. Practical aspects of survival and destruction of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 32 (4), 523-531.
- DORSON M., 1985. La nécrose pancréatique infectieuse des Salmonidés : étude de la maladie, du virus et de la réaction de la Truite. Thèse présentée à l'Université Paris VII, 92 p.
- ELLIOT D.G., AMEND D.F., 1978. Efficacy of certain desinfectants against infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Biol.*, 12, 277-286.
- HOSKINS G.E., DALZIEL F.C., 1984. Survival of Chinook fry (*Oncorhynchus tshawytscha*) following exposure to Benzalkonium chloride in soft water. *Prog. Fish. Cult.*, 46 (2), 98-101.
- DE KINKELIN P., GERARD J.P., MICHEL C., 1981. Notes techniques : traitements en pisciculture. *Bull. Fr. Pisc.*, extrait des n° 254, 263 et 280.
- DE KINKELIN P., MICHEL C., GHITTINO P., 1985. Précis de Pathologie des Poissons. *INRA/OIE*, Paris, 348 p.
- DE KINKELIN P., SCHERRER R., 1970. Le virus d'Egtved I. Développement, stabilité et structure de la souche danoise F1. *Ann. of Veter. Res.*, 1, 17-30.
- RUCKER R.R., 1948. New compounds for the control of bacterial gill disease. *Prog. Fish. Cult.*, 10, 19-22.
- RUCKER R.R., JOHNSON H.E., ORDAL E.J., 1949. An investigation of the bactericidal action and fish toxicity of two homologous series of quaternary ammonium compounds. *J. Bacteriol.*, 57 (2), 225-234.