

# Isolements, cultures et antibiogrammes sur *Clostridium spiroforme* issus d'élevages de lapins

J. LE GUENNEC<sup>1</sup>, C. QUÉRÉ<sup>1</sup>, B. LE NORMAND<sup>2</sup>

<sup>1</sup> LABOFARM, 4, rue Théodore Botrel, 22600 Loudéac, France

<sup>2</sup> SCP FOUQUE-GOUNOT-LE NORMAND-LE PAGE, 47 Bd Leclerc, 35460 Saint Brice en Cogles, France

**Résumé.** L'entérotoxémie due à *C. spiroforme* intervient souvent dans les maladies digestives du lapin. En France l'isolement et l'antibiogramme ne sont pas pratiqués couramment dans les laboratoires de diagnostic. Des échantillons caecaux choisis subissent un pré-traitement ; l'isolement de la bactérie et un antibiogramme sont ensuite réalisés. Par cette méthode, les molécules efficaces sont la bacitracine, le ceftiofur et la doxycycline ; in vitro *C. spiroforme* n'est pas toujours sensible à la tiamuline. En élevage néanmoins, la tiamuline est un traitement efficace alors que les résultats sont mauvais avec la bacitracine. Une détermination de la CMI par une autre méthode d'antibiogramme, comme la méthode de dilutions successives en milieu gélosé, devrait mieux préciser la sensibilité « in vitro » des souches isolées en particulier pour la tiamuline et la doxycycline.

**Abstract. Isolations, cultures and antibiograms on *Clostridium spiroforme* originating from rabbit's farms.** Enterotoxemia due to *C. spiroforme* is frequently involved in digestive diseases of rabbit. In France isolation and antibiogram aren't used in diagnosis laboratories. Specific caecal samples were obtained and after a pre-treatment, isolation of the bacteria and antibiogram were carried out. By this method, bacitracin, ceftiofur and doxycycline were efficient. In vitro, *C. spiroforme* was not always sensitive to tiamulin. Nevertheless in farms tiamulin is an efficient treatment and the results are bad with bacitracin. CMI investigation by another method of antibiogram, like successive dilutions in agar medium, could better define the sensitivity of isolated strains in vitro, specially for tiamulin and doxycycline.

## Introduction

L'entérotoxémie du lapin est une maladie décrite digestive bien connue chez le lapin due à *Clostridium spiroforme*. Dans un contexte hivernal souvent fragile, au cours duquel les épisodes d'entéropathie épizootique du lapin sont plus nombreux, l'entérotoxémie peut compliquer le tableau clinique et perturber les réussites thérapeutiques.

En diagnostic courant, seule une bactérioscopie de contenu caecal valide la suspicion d'entérotoxémie. Il nous a paru intéressant d'obtenir des cultures et des antibiogrammes pour *Clostridium spiroforme* afin d'affiner le diagnostic et de mieux cibler les traitements.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Prélèvements

Les prélèvements retenus pour les cultures ont été effectués sur des lapins malades ou morts présentant un trouble digestif. Les élevages d'origine peuvent être de très bon niveau sanitaire (certains élevages utilisent de l'aliment sans supplémentation en maternité comme en engraissement).

L'âge des lapins s'étend de 5 semaines à 9 semaines et les symptômes sont classiques de l'entérotoxémie du lapin :

- animal fortement prostré et anorexique
- diarrhée profuse d'apparition brutale avec présence inconstante de sang, avec présence de glaires
- mortalité rapide

Les prélèvements ont lieu sur les caecums de lapins présentant les lésions suivantes :

- estomac non dilaté, bien moulé sur l'aliment
- légère entérite ou absence de lésions de l'intestin grêle
- typhlite légère à sévère, avec un contenu caecal liquide souvent noirâtre, peu abondant, présentant des éléments glaireux, avec une faible présence de gaz
- colite faible ou absente, côlon vide ou de contenu noirâtre
- absence de crottes formées dans le rectum

La confirmation de la présence de *Clostridium spiroforme* est faite individuellement par bactérioscopie et coloration sur lame. *Clostridium spiroforme* est un bacille gram positif qui présente une morphologie particulière facilement reconnaissable à l'observation microscopique à la coloration de gram ou à l'état frais. Les bactéries ont une forme incurvée ou semi-circulaire ou presque circulaire. On observe souvent à l'examen des amas de bactéries en « ressort » qui résultent de plusieurs cellules mises bout à bout ou alors des formes en « trèfle à quatre feuilles » (Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, 2007).

Les prélèvements transmis au laboratoire pour culture sont constitués par des tubes individuels de contenus caecaux.

### 1.2. Culture et antibiogramme

*Clostridium spiroforme* est une bactérie anaérobie stricte qui nécessite donc des conditions particulières pour son isolement.

L'isolement de la bactérie dans le contenu intestinal nécessite certaines précautions :

- un pré-traitement de l'échantillon
- un ensemencement sur gélose sélective

- 1.2.1. Pré-traitement de l'échantillon

Cette étape vise à éliminer de manière drastique une grande partie de la flore bactérienne tout en préservant la viabilité de *C. spiroforme*. On peut par exemple faire subir à l'échantillon un traitement thermique à 70 C° durant 10 mn. Une autre méthode consiste à traiter le prélèvement caecal par de l'alcool. Dans ce cas on mélange à part égale du contenu caecal et de l'éthanol pendant 30 mn. Cette dernière méthode a le mérite d'être simple et facile à mettre en œuvre. Cependant, il faut bien faire attention à ne pas dépasser les temps de traitement pour éviter de perdre de la sensibilité dans des prélèvements pauvres en *C. spiroforme*.

- 1.2.2. Isolement sur gélose sélective

Si on ne dispose pas de gélose sélective, l'isolement de *C. spiroforme* reste délicat. En routine une gélose TSA (Tryptic Soy Agar, AES) avec 5 % de sang de mouton, 12,5 µg/ml de rifampicine (Rifampicin, Sigma) permet d'obtenir des cultures relativement pures où les colonies bactériennes suspectes sont faciles à repiquer pour des examens ultérieurs (AGNOLETTI *et al.*, 2004).

- 1.2.3. Incubation et lecture

L'incubation est réalisée en anaérobiose (GENBOX anaer Biomerieux) à 37 C° pendant 48 heures. Les bactéries suspectes ont un diamètre de 1 à 3 mm selon

la densité de culture. Les colonies sont lisses, bombées, à bords réguliers et non hémolytiques. Un examen microscopique des colonies suspectes permet de les identifier comme *C. spiroforme*. Une subculture est réalisée ensuite pour réaliser un antibiogramme.

- 1.2.4. Antibiogramme

La méthode retenue est la méthode de diffusion de disques imprégnés d'antibiotiques et de mesure des diamètres d'inhibition obtenus.

Un inoculum de bactérie est réalisé à partir de la subculture obtenue. La densité de l'inoculum a une équivalence de 0.5 MacFarland. Une gélose Muller Hinton avec 5 % de sang de mouton est utilisée. L'ensemencement des géloses est réalisé à l'aide d'un écouvillon trempé dans l'inoculum. Les disques antibiotiques sont ensuite déposés sur la gélose et les boîtes sont incubées en anaérobiose pendant 24 heures.

## 2. Résultats

Selon les antibiotiques, de 9 à 31 souches ont été testées. Le tableau 1 exprime la sensibilité des souches de *C. spiroforme* vis à vis des antibiotiques testés en fonction de la mesure des diamètres observés par rapport aux diamètres critiques fournis par le fournisseur de disques antibiotiques.

**Tableau 1.** Résultats des antibiogrammes pour *C. spiroforme*

Antibiotique	Nombre de souches testées	Diamètres critiques en mm	résistant	intermédiaire	sensible
Tylosine	30	14-18	29		1
Tiamuline	31	15-18	2	11	18
Spiramycine	31	19-24	30		1
Bacitracine	31	15	1		30
Néomycine	31	15-17	31		
Apramycine	15	12-15	15		
Ttmp-sulfamides	15	10-16	15		
Oxytétracycline	31	17-19	28	1	2
Doxycycline	9	17-19			9
Ceftiofur	23	17-21			23

## 3. Discussion

La bactériologie confirme les observations cliniques et a permis l'élaboration d'antibiogrammes.

Les souches de *C. spiroforme* testées dans cette étude sont résistantes à la tylosine, à la spiramycine, au triméthoprime sulfa, à l'apramycine et à la néomycine.

Concernant la tiamuline, compte tenu de la charge du disque (100 g/disque) et en l'absence de recommandations pour établir une CMI calculée, il faut rester prudent dans l'interprétation. La répartition des souches montre que 41 % des souches testées sont intermédiaires ou résistantes alors que les traitements utilisant cette molécule ont donné d'excellents résultats in vivo.

La bacitracine est également active in vitro sur 100 % des souches testées. Or cette dernière molécule, très efficace dans les cas d'entéropathie épizootique, ne donnait pas de résultats satisfaisants sur les lots analysés alors qu'elle était employée à doses thérapeutiques classiques.

Ces résultats mériteraient d'être confrontés à une autre méthode d'antibiogramme comme la méthode de dilutions successives en milieu gélosé en particulier pour la tiamuline.

Le ceftiofur est efficace in vitro sur toutes les souches testées.

### Conclusion

---

L'isolement et l'antibiogramme sont possibles en routine pour *C.s* piroforme. Cependant, la méthode doit être complétée par des études type CMI.

La poursuite des isolements sur les lots atteints permettra peut-être à l'avenir de mieux comprendre la transmission, l'expression et l'efficacité thérapeutique des molécules de traitement.

### Références

---

- AGNOLETTI F., BANO L., DEOTTO S., COMIN D., PARENTI E., MARCATI M., BERTOLIN M. MAZZOLINI E. Selective culture medium to isolate *Clostridium spiroforme* from rabbit. Proceedings of the 8<sup>th</sup> World Rabbit Congress, 2004, <http://www.dcam.upv.es/8wrc>.
- Dictionnaire de bactériologie vétérinaire : <http://www.bacterio.cict.fr>

