



# **Injection d'enrofloxacin in ovo : étude des effets sur la croissance et sur la protection vis-à-vis d'une infection expérimentale par *Mycoplasma gallisepticum***

Isabelle KEMPF<sup>(1)</sup>, Fabienne DUFOR-GESBERT<sup>(1)</sup>,  
Mireille GICQUEL<sup>(2)</sup> et Jaqueline MANCEAU<sup>(2)</sup>

Avec la collaboration technique de Yannick MORIN<sup>(1)</sup>

(1) Agence française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA)- Ploufragan, Unité de Mycoplasmodologie - Bactériologie, Zoopole, BP 53, 22440 Ploufragan

(2) AFSSA Fougères, Laboratoire des Médicaments Vétérinaires, BP 90203, 35302 Fougères

## **RESUME**

Des embryons de poule sont injectés à 19 jours d'incubation, par voie intra-vitelline, à l'aide d'enrofloxacin. A quatre jours d'âge, les poussins issus de ces œufs ou d'œufs non injectés sont inoculés à l'aide d'une culture de *Mycoplasma gallisepticum* (MG). La croissance des poussins, les symptômes, lésions et réisolement de MG sont étudiés et l'enrofloxacin et son métabolite la ciprofloxacine sont dosés dans le plasma et les tissus le jour de l'éclosion et lors de l'inoculation. Les résultats montrent que l'injection d'enrofloxacin *in ovo* provoque un ralentissement de la croissance du poussin et, dans les conditions expérimentales utilisées, ne semble pas protéger vis-à-vis de l'infection mycoplasmaïque sans doute en raison des faibles niveaux d'enrofloxacin dans les tissus.

## **SUMMARY**

### ***Effect of in ovo injection with enrofloxacin***

*Chicken embryos were injected with enrofloxacin on the 19th day of incubation. On the fourth day of life, chicks from these eggs or from non injected ones were inoculated with a Mycoplasma gallisepticum (MG) culture. Growth of chicks, symptoms, lesions and MG isolation were studied and enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin were measured in plasma and tissues at hatch and on the challenge day. Results showed that the in ovo injection of enrofloxacin retarded chick growth, and in our experimental conditions, did not protect birds against mycoplasma infection, probably because of low enrofloxacin concentration in tissues.*

## Introduction

L'enrofloxacin est une fluoroquinolone utilisée pour le contrôle des infections mycoplasmaïques aviaires. Du fait de la transmission verticale de ces germes (Stipkovits and Kempf, 1996), ainsi que d'autres bactéries sensibles aux fluoroquinolones (salmonelles...), certains couvoirs effectuent des injections *in ovo* de cet antibiotique. Nous avons souhaité mieux évaluer les conséquences de cette pratique, pour laquelle il n'existe pas d'autorisation de mise sur le marché (A.M.M.). En effet, des travaux antérieurs ont montré que ce procédé ne permet pas d'éviter l'éclosion de poussins porteurs de *Mycoplasma gallisepticum* et ont permis de souligner la fréquence d'apparition de souches de *M. gallisepticum* de sensibilité diminuée vis-à-vis de l'enrofloxacin (Kempf et al., 1999). Dans la présente étude, les conséquences de l'injection d'enrofloxacin *in ovo* vis-à-vis de la croissance des poussins et la protection contre une infection expérimentale précoce par *Mycoplasma gallisepticum* sont évaluées. De plus, la concentration d'enrofloxacin et de son métabolite, la ciprofloxacine est recherchée dans le plasma et le vitellus des poussins à l'éclosion et le jour de l'inoculation.

## 1. Matériel et méthodes

**Injection in ovo d'enrofloxacin :** Cent-six œufs embryonnés exempts d'organismes pathogènes spécifiés, fournis par l'Unité Expérimentale d'Aviculture de l'AFSSA-Ploufragan, sont disposés dans un incubateur à contrôle d'aération et d'hygrométrie et à retournement automatique et répartis en deux groupes de soixante et onze ou trente-six œufs de poids moyen similaires. Ils sont utilisés après dix neuf jours d'incubation. Après mirage et désinfection de la coquille, trente-six de ces œufs sont injectés par voie intra-vitelline, à l'aide de 0,2 ml d'une solution d'enrofloxacin (Bayer, France) diluée dans de l'eau physiologique à raison de 0,6 mg/ml (lot traité). Trente-cinq autres œufs sont injectés

à l'aide de 0,2 ml d'eau physiologique (lot témoin). L'incubation est poursuivie jusqu'à éclosion. Les poussins éclos sont comptabilisés pour chacun des lots et bagués. Ils sont ensuite transférés et élevés ensemble en animalerie protégée.

**Infection expérimentale :** A quatre jours d'âge (J4), les oiseaux des lots témoin et traité sont inoculés par voie intra-trachéale à l'aide de 0,2 ml d'une culture de la souche 41-91 de *Mycoplasma gallisepticum* préparée en milieu FM4 (Frey et al, 1968). La culture utilisée pour l'inoculation des oiseaux titre  $10^4$  unités changeant couleur par ml. La souche MG 41-91 est sensible à l'enrofloxacin (Kempf, non publié).

**Croissance :** les poussins sont pesés le jour de l'éclosion (J0) et à quatre jours d'âge, avant l'inoculation. Le gain de poids de chaque lot pour la période J0-J4 est calculé.

**Observation des symptômes et lésions :** Après inoculation, les poussins sont observés quotidiennement. Trois sujets de chacun des lots sont sacrifiés et autopsiés à J7 et J11 et les lésions d'aérosacculite sont recherchées. De même à J14, tous les oiseaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

**Réisolement de mycoplasmes :** Une recherche de mycoplasmes est effectuée à partir de la trachée et des sacs aériens de tous les oiseaux sacrifiés à J7 et J11. Les prélèvements sont ensemencés dans un tube contenant 1 ml de milieu FM4 et trois dilutions décimales de ce tube sont préparées en milieu FM4. Chacune des dilutions est ensemencée sur une gélose FM4. Pour chacun des tubes ensemencés, après huit jours d'incubation ou lorsque le milieu a viré, un passage sur milieu gélosé est réalisé. Les colonies d'aspect mycoplasmaïque sont recherchées puis identifiées selon des procédures précédemment décrites par Nougayrede et al, 1985.

**Sérologie :** La recherche d'anticorps anti- *Mycoplasma gallisepticum* est effectuée sur les sérums des oiseaux sacrifiés à J14 à l'aide de la méthode d'agglutination rapide sur lame (Kempf I., 1998).

**Dosage d'antibiotique :** Des prélèvements de sang et de vitellus sont effectués sur les embryons vivants non éclos après 21 jours d'incuba-

tion afin de doser l'enrofloxacin et son éventuel métabolite, la ciprofloxacine. De même, à J4, cinq poussins de chacun des lots sont sacrifiés et des prélèvements de sang et de vitellus sont pratiqués. Les sangs prélevés sur tubes héparinés sont centrifugés 15 minutes à 3 000 tours par minute et les plasmas sont congelés jusqu'à l'analyse. Les échantillons de vitellus sont conservés à 4°C jusqu'à analyse. Le dosage de l'enrofloxacin et de la ciprofloxacine est réalisé par une méthode de chromatographie haute performance avec une double détection par UV et fluorimétrie.

**Analyses statistiques :** L'analyse statistique des résultats (éclosion, mortalité, lésions, réisolement, sérologie) est effectuée à l'aide de tests exacts de Fisher. Les gains de poids des lots sont comparés à l'aide d'un test t.

## 2. Résultats

**Eclosabilité :** Vingt-huit et vingt-neuf poussins sont éclos à partir des 35 et 36 œufs injectés avec de l'eau physiologique et de l'enrofloxacin respectivement. L'analyse statistique montre que l'injection d'enrofloxacin ne modifie pas le taux d'éclosabilité (80 %) comparé à celui observé chez les œufs traités à l'aide d'eau physiologique (80,5 %).

**Croissance :** Les poids enregistrés à J0 et J4 indiquent que le gain de poids moyen des oiseaux issus des œufs injectés à l'aide d'enrofloxacin est de 13,5 g alors que celui des oiseaux issus des œufs injectés à l'aide d'eau physiologique est de 19,8 g. Les gains de poids sont significativement différents (test t,  $p = 0,027$ ).

**Symptômes et lésions :** Un poussin issu du lot injecté par l'enrofloxacin est trouvé mort à J4, sans lésion apparente. Après l'inoculation de *M. gallisepticum*, très peu de symptômes sont observés chez les poussins. Les autopsies effectuées à J7, J11 ou J14 montrent que, pour chacun des lots, cinq des 23 sujets sont porteurs de lésions d'aérosacculite. Il n'y a donc pas de différence significative en ce qui concerne les lésions des sacs aériens.

**Réisolement de *Mycoplasma gallisepticum* :** Les résultats des réisolements de *M. gallisepticum* sont donnés dans le tableau 1.

L'analyse statistique des nombres de trachées ou de sacs aériens ou d'oiseaux positifs en culture pour chacun des lots ne met pas en évidence de différence significative entre les lots (test exact de Fisher,  $p > 0,05$ ).

**Sérologie :** Les analyses sérologiques effectuées sur les oiseaux sacrifiés à J14, soit onze jours après inoculation, sont négatives.

**Dosage d'antibiotique :** Les chromatogrammes de vitellus des œufs non traités ont permis de calculer une limite de détection de 5 ng/g et une limite de quantification de 11 ng/g dans le vitellus de poussins ( $n = 10$ ). A J0, soit trois jours après l'injection *in ovo* d'enrofloxacin, les concentrations moyennes d'enrofloxacin et de ciprofloxacine dans le vitellus sont respectivement de  $1976,5 \pm 720,3$  et de  $179,3 \pm 238,9$  ng / gramme de vitellus ce qui correspond à 91,7 % d'enrofloxacin et 8,3 % de ciprofloxacine. A J4, c'est à dire le jour de l'inoculation de MG, soit sept jours après l'injection d'enrofloxacin, les concentrations d'enrofloxacin dans le vitellus sont très hétérogènes. Sur dix échantillons de vitellus analysés, les concentrations d'enrofloxacin sont inférieures à la limite de détection pour cinq d'entre eux, inférieure à la limite de quantification pour un échantillon et pour les quatre échantillons quantifiables, les concentrations sont de  $44,2 \pm 28,3$  ng / g de , ce qui correspond à des traces d'enrofloxacin. Dans le plasma, les concentrations sont généralement inférieures à la limite de détection.

### 3. Discussion - Conclusion

Dans cette expérimentation, l'injection d'enrofloxacin est effectuée dans des conditions proches - pour ce qui concerne la posologie et la voie d'injection - de celles utilisées par certains couvoirs. Les analyses pharmacologiques montrent que les concentrations d'antibiotiques diminuent rapidement et, le jour de l'inoculation, l'enrofloxacin et son métabolite la ciprofloxacine ne sont plus détectés dans le vitellus ou le plasma.

Si l'injection ne modifie pas le taux d'éclosabilité, il semble que la croissance des sujets soit retardée dans les premiers jours de vie, comme le montre le gain de poids des oiseaux de J0 à J4. Cet effet défavorable des fluoroquinolones sur la croissance peut être rapproché des observations rapportées par Altreuther (1987) chez l'embryon de rat et par Stahlman et Lode (1998) chez le raton. Ces derniers auteurs soulignent le fait que les quinolones, utilisées chez l'animal jeune, provoquent des altérations irréversibles des cartilages chez le rat et chez le chien. Pour cette raison, les quinolones sont contre-indiquées chez l'enfant et l'adolescent. Dans le cas de notre étude, malheureusement l'absence d'analyses histologiques ne permet pas de révéler la présence éventuelle de lésions articulaires.

L'inoculation de *Mycoplasma gallisepticum* souche 41-91 par voie intra-trachéale à quatre jours d'âge

entraîne très peu de symptômes et lésions, sans doute en raison du faible titre de la culture utilisée et de l'absence de facteurs aggravants tels qu'une infection virale ou des conditions environnementales défavorables (Kempf et al, 1987) De même, seulement 9/23 (39 %) ou 11/23 (48 %) animaux des lots témoin et traité respectivement, paraissent positifs en culture. Enfin, aucun poulet ne développe de réponse sérologique, probablement du fait d'un délai trop court entre l'inoculation et la recherche des anticorps.

Dans ces conditions, la relative inefficacité du modèle expérimental d'infection rend difficile la mise en évidence d'un effet protecteur éventuel de l'injection *in ovo* ; de plus, il est peu probable que les concentrations sériques ou tissulaires d'enrofloxacin aient été suffisantes pour espérer une protection vis-à-vis d'une épreuve réalisée sur des poussins de quatre jours d'âge après une injection effectuée à 19 jours d'incubation.

En conclusion, si cette expérimentation n'a pas permis de mettre en évidence un effet protecteur vis-à-vis d'une infection précoce à *Mycoplasma gallisepticum*, l'effet néfaste de l'injection *in ovo* d'enrofloxacin sur la croissance du poussin, ainsi que les risques élevés de sélection de souches mycoplasmaïques - ou autres espèces bactériennes - de sensibilité diminuée voire résistantes aux fluoroquinolones doivent inciter à éviter ce procédé.

Tableau 1 : Réisolement de *M. gallisepticum*.

| Lot            | Trachée | Sacs aériens | Oiseaux |
|----------------|---------|--------------|---------|
| Lot témoin (1) | 8/23*   | 8/23         | 9/23    |
| Lot traité (2) | 9/23    | 5/23         | 11/23   |

(1) poussins issus des œufs injectés à l'aide d'eau physiologique

(2) poussins issus des œufs injectés à l'aide d'enrofloxacin

\* : nombre de positifs/ nombre testé

### Références bibliographiques

ALTREUTHER P. (1987) - Data on chemistry and toxicology of Baytril. Vet. Med. Rev., 2, 87-89  
 FREY M.L., HANSON R.P. & ANDERSON D.P. (1968) - A medium for isolation of avian Mycoplasmas. Am. J. Vet. Res., 29, 2163-2171.  
 KEMPF I. (1998) - Recherche des anticorps contre les principales mycoplasmoses aviaires par la technique d'agglutination rapide sur lame, Technique IS 281/01 du Programme 109 du COFRAC  
 KEMPF I., CACOU P.M., GUITTET M., BENNEJEAN G. & OLLIVIER C. (1987) - L'ammoniac, facteur prédisposant de la mycoplasmosse aviaire à *Mycoplasma gallisepticum*. L'aviculteur, 475, 104-105

KEMPF I., GESBERT F., LABBÉ M., GAUTIER-BOUCHARDON A. V. & KOBISCH, M. (1999) - Injection d'enrofloxacin sur des œufs de poules expérimentalement infectés par *Mycoplasma gallisepticum*. In Troisièmes journées de la recherche avicole, pp. 269-272. St Malo, France.  
 NOUGAYREDE P., GAILLARD-PERRIN G. & ANDRAL B. (1985) - Apport du laboratoire pour le diagnostic des mycoplasmoses majeures de la dinde. Le Point Vétérinaire, 17, 127-140

STAHLMAN R. & LODE H. (1998) - Safety overview - Toxicity, adverse effects, and drug interactions. In: V.T. Andriole (Ed), Quinolones, 2nd Edition, Academic Press Inc, 525 B Street/Suite 1900/San Diego/CA 92101-4495, pp. 369-415.  
 STIPKOVITS L. & KEMPF I. (1996) - Mycoplasmoses in poultry: an overview. Revue scientifique et technique de l'OIE Vol 15, 1495-1525.