

**EFFICACITE D'UNE NOUVELLE CEPHALOSPORINE (CEFTIOFUR) ASSOCIEE OU NON A UN ANTIINFLAMMATOIRE STEROIDIEN (SUCCINATE DE METHYL PREDNISOLONE) DANS UN MODELE EXPERIMENTAL DE PASTEURELLOSE RESPIRATOIRE DU VEAU A PASTURELLA HAEMOLYTICA BIO-SEROGROUPE A1**

ESPINASSE (J.)\*, BOST (F.)\*\*, MADELENAT (A.)\*, SCHELCHER (F.)\*, VALARCHER (J.-F.)\*

\* Département de Physiopathologie Animale, Ecole Nationale Vétérinaire, 23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex

\*\* Laboratoire Upjohn, Tour Franklin, 92042 Paris La Défense Cedex 11

## INTRODUCTION

*Pasteurella haemolytica* A1 (Pha1) est l'agent responsable de lésions de bronchopneumonie fibrineuse qui font la gravité médicale et économique des bronchopneumonies infectieuses enzootiques (BPIE), affections considérées comme inéfectables dans la filière viande bovine <sup>1</sup>. Malgré les nombreux travaux destinés à améliorer la sécurité et l'efficacité des vaccins antipasteurelliques, l'antibiothérapie représente encore le meilleur moyen de lutte contre ces affections <sup>2</sup>. Il importe, pour limiter les pertes, de disposer d'antibiotiques actifs sur les pasteurelles tenant compte de leur sensibilité actuelle et de protocoles thérapeutiques leur permettant d'exprimer pleinement leur potentiel.

Le Ceftiofur (CEF) est une nouvelle céphalosporine de troisième génération bactéricide, à large spectre (germes à gram positif et à gram négatif), insensible à la plupart des bêta lactamines, dont les concentrations minimales inhibitrices 90 (CMI 90) pour les pasteurelles sont très faibles (0,06 µg/ml pour Pha1), associée pour l'instant à un très faible niveau de résistance, à pic sérique rapide, à durée de demi-vie longue (9,5 h), ce qui lui confère un profil intéressant pour le traitement des maladies respiratoires bovines. Pour apprécier son efficacité dans les BPIE il était nécessaire de la confronter in vitro dans un essai de type explicatif à l'une de ses principales cibles Pha1 dans un modèle de pasteurellose respiratoire chez le veau. On sait en effet que les infections expérimentales sont après les épreuves in vitro une étape incontournable des études précliniques permettant de mieux ajuster les protocoles d'essais terrain <sup>3</sup>.

Etant donné la polémique suscitée par l'intérêt des corticoïdes dans les BPIE, en raison en particulier de leur action défavorable vis-à-vis des mécanismes de défense contre les microorganismes <sup>4</sup>, il nous a paru intéressant d'inclure dans le schéma expérimental une comparaison de l'efficacité de CEF utilisé seul à son association avec le succinate de méthyl prednisolone (SMP), corticoïde à action rapide (corticoïde flash).

## MATERIEL ET METHODES

Ils sont voisins de ceux déjà utilisés avec des objectifs comparables <sup>5</sup>.

### ANIMAUX

18 veaux de race Prim'Holstein, 9 mâles et 9 femelles, âgés de 1 à 2 semaines, d'un poids moyen compris entre 35 et 56 kg. Dès réception ils sont pesés et après randomisation en 3 lots sur le poids, ils sont installés dans 3 box.

### INOCULATIONS

Dans cet essai les caractères des inoculats étaient les suivants :

- pour la voie intranasale (IN), cultures agitées de 2 h titrant entre 1,4 et 6,6 10<sup>8</sup> ufc/ml,
- pour la voie intratrachéale (IT), cultures agitées de 5 h titrant entre 6,3 et 7,4 10<sup>9</sup> ufc/ml.

L'inoculation IN a eu lieu trois jours de suite (J1, J2, J3) le matin vers 11 h, dès le lendemain de l'arrivée des veaux (J0), sous un volume de 5 ml par narine, à l'aide d'une seringue sur laquelle a été montée un embout permettant de vaporiser l'inoculum en aérosol. La première IN a été suivie d'une injection IT de 1 ml d'une solution d'acide acétique à 8 % dans de l'eau physiologique stérile. L'inoculation IT a eu lieu l'après midi vers 14 h deux jours de suite seulement (J1 et J2) sous un volume de 10 ml (10 ml de bouillon de culture le premier jour, 5 ml de bouillon de culture + 5 ml de sérum physiologique le second jour) après la mise en place d'un cathéter afin d'éviter les réactions inflammatoires au point d'injection et de faciliter l'administration.

## TRAITEMENTS

Ils ont été affectés par tirage au sort juste après la randomisation et l'installation dans les box.

**Traitement 1 :** CEF 1 mg/kg IM, dans les masses musculaires de la cuisse pendant 5 jours (J1 à J5) toutes les 24 h, dès la phase de détresse respiratoire de J1 (3 h après l'inoculation IT) + SMP 3 mg/kg, 2 jours de suite (J1 et J2) IV à J1, IM à J2 au même moment que l'injection de CEF.

**Traitement 2 :** CEF + placebo SMP dans les mêmes conditions que précédemment.

**Traitement 3 :** placebo CEF + placebo SMP dans les mêmes conditions que précédemment.

## CONTROLES CLINIQUES

Différents paramètres cliniques étaient enregistrés 2 fois par jour, avant chaque repas, à partir du jour de l'inoculation ; ils permettent à chaque contrôle et pour chaque veau de calculer une note moyenne générale de maladie (NMGM). Par ailleurs, les animaux ont été pesés avant l'essai, après leur mort ou à leur sacrifice.

## CONTROLES BIOLOGIQUES

Une fois par jour avant la buvée du matin ont été pratiquées une numération globulaire, une formule leucocytaire et une mesure du taux de fibrinogène plasmatique.

## CONTROLES NECROPSIQUES ET BACTERIOLOGIQUES

Les opérations ont été celles décrites en 5 : sacrifice, autopsie, scores pulmonaires (poids des poumons, note moyenne générale pulmonaire : NMGP).

## ANALYSES STATISTIQUES (programme Statview - Macintosh)

## RESULTATS

### CLINIQUES

En cours d'essai 5 veaux du lot placebo sont morts entre J1 et J4, 1 veau du lot CEF-SMP et 1 du lot CEF sont morts à J2, les autres ont été abattus, soit à J7, soit à J8.

La figure 1 montre l'évolution de la moyenne des NMGM par traitement en attribuant aux animaux morts la dernière NMGM obtenue. Il existe une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre les témoins et chacun des deux autres traitements (analyse de la variance), mais pas entre les deux lots traités.

A J2 au soir il existe une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre la moyenne des températures rectales des deux lots traités (analyse de la variance).

L'analyse de la variance de la moyenne des fréquences respiratoires fait ressortir une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre les deux lots traités tout au long de l'essai (Figure 2).

### BIOLOGIQUES

Les animaux de tous les lots montrent une hyperleucocytose dès la première inoculation dominée par une neutrophilie chez ceux recevant SMP (Figure 3). Le taux du fibrinogène plasmatique s'élève rapidement quel que soit le régime thérapeutique (Figure 4). Il n'existe pas de différence significative entre les lots pour tous ces paramètres.

### ZOOTECNIQUES

Bien qu'il n'existe pas de différence statistique significative entre les moyennes de gains moyens quotidiens (GMQ) des trois lots, ce sont les animaux traités qui font les meilleures performances, en particulier ceux recevant CEF+SMP (Figure 5)

Figure 1 : Evolution de la moyenne des notes moyennes générales de maladie par traitement

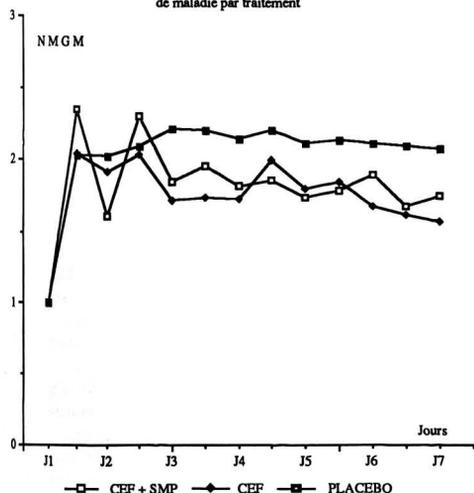


Figure 2 : Evolution de la moyenne des fréquences respiratoires

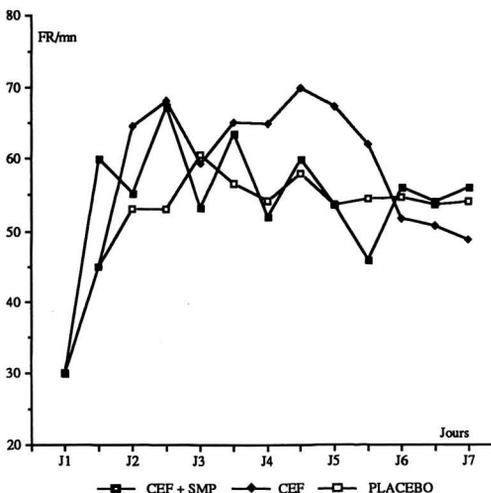


Figure 3 : Evolution de la moyenne du nombre de polynucléaires neutrophiles

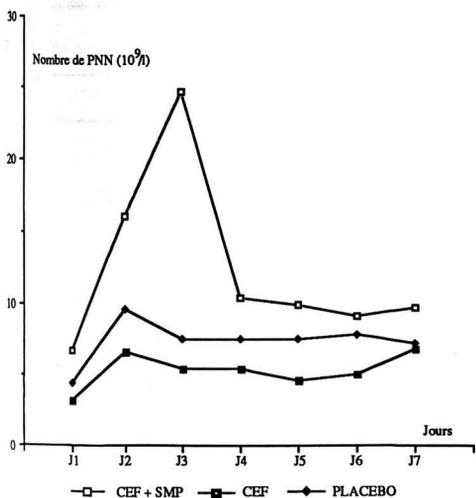


Figure 4 : Evolution des moyennes du taux de fibrinogène

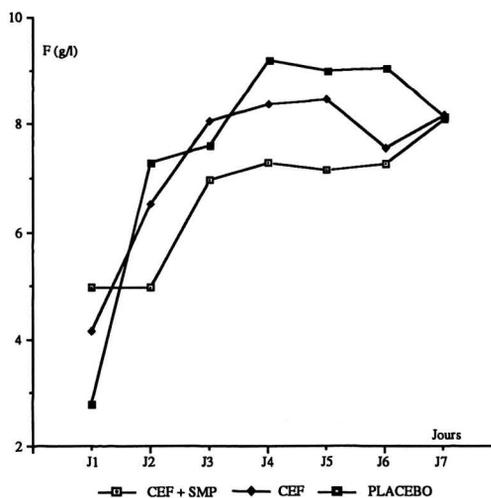
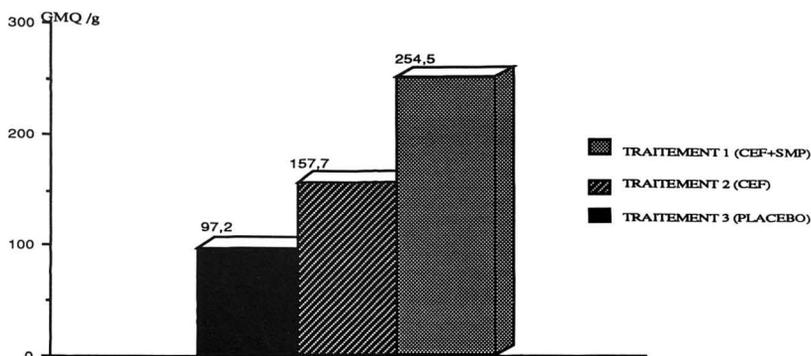


Figure 5 : Moyennes des gains moyens quotidiens



#### NECROSIQUES ET BACTERIOLOGIQUES (Tableau I)

Tableau I : Résultats des examens nécropsiques et bactériologiques

	TRAITEMENT 3 (Placebo)	TRAITEMENT 2 (CEF)	TRAITEMENT 1 (CEF + SMP)
Poids moyens des poumons (kg)	1,156 a	0,768 b	0,820 b
Moyenne des NMGP	2,500 a	0,875 b	1,375 b
Moyenne de [Pha1] ufc/g/poumon	1,34.10 <sup>9</sup> a	1,17.10 <sup>8</sup> b	5,02.10 <sup>6</sup> b

au sein d'une même ligne, 2 valeurs ne partageant pas la même lettre sont significativement différentes ( $p \leq 0,05$ )

#### DISCUSSION

L'utilisation d'un modèle expérimental pour l'évaluation des anti-infectieux offre de nombreux avantages par rapport aux seules études *in vitro*, surtout s'il est mis en œuvre dans l'espèce de destination. Alors que les épreuves *in vitro* n'explorent que la sensibilité des microorganismes vis-à-vis d'un agent chimique, les épreuves sur modèle renseignent de façon plus réaliste sur l'efficacité de celui-ci dans un contexte physiopathologique où interviennent les réactions biologiques de l'hôte (métaboliques et immunologiques) <sup>3</sup>. Pour reproduire un syndrome respiratoire comparable à celui des BPIE chez les bovins plusieurs types de modèles ont été proposés <sup>6</sup>. Le modèle utilisé dans nos essais paraît un des mieux adaptés; En effet l'association aérosol de virus parainfluenza 3-Pha1 est moins performante. Les associations faisant intervenir Pha1 précédée du virus de la rhinotrachéite infectieuse ou de *Mycoplasma bovis* ne correspondent pas aux situations épidémiologiques les plus courantes dans notre pays <sup>1</sup>. Par ailleurs, pour les modèles ne faisant intervenir que Pha1, l'inoculation par voie aérienne de cet agent semble plus légitime que l'injection par voie intra-thoracique. Enfin, le modèle mis au point <sup>5</sup> et destiné à évaluer l'efficacité de CEF dans les maladies respiratoires des bovins, possède les caractéristiques nécessaires et suffisantes pour satisfaire ces objectifs <sup>7-8</sup>. Les animaux utilisés dans cet essai sont des veaux conventionnels, âgés de 1 à 3 semaines au maximum. L'utilisation de veaux gnotobiotiques accélère les manifestations cliniques <sup>9</sup> mais ne nous paraît pas indispensable. Des veaux du même âge ont été utilisés par AMES et al <sup>10</sup> dans une épreuve d'évaluation de la dose efficace d'une association sulfadiméthoxine-orméthoprim, par contre pour comparer l'efficacité de l'oxytétracycline à l'association oxytétracycline-méglumine, SELLMAN et al. <sup>11</sup> ont fait appel à des veaux de 10 à 12 semaines. A notre avis, les veaux de 2 à 3 semaines ont plus de chances d'être indemnes de lésions préalablement acquises de l'appareil respiratoire. De plus, comme nous l'avons vérifié <sup>5</sup>, en

choisissant au hasard des animaux dans un centre de tri, ils ne sont pas porteurs de Pha1 et ne possèdent pas d'anticorps circulants pouvant modifier leur sensibilité à l'infection. L'administration par voie IT d'une solution d'acide acétique à 8 % quelques heures avant l'injection IT de la culture de Pha1 a été proposée par BREEZE et al. <sup>12</sup>. Cette intervention pourrait mieux assurer la multiplication et la colonisation de Pha1 dans le poumon profond. Dans la littérature relative à l'utilisation des modèles expérimentaux de maladie respiratoire pour l'évaluation de l'efficacité des anti-infectieux chez les bovins le temps écoulé entre l'inoculation de Pha1 et la première administration thérapeutique varie entre 1 à 2 h <sup>11-13</sup>. Le délai de 3 h correspondant dans cet essai avec l'installation de la détresse respiratoire est en bonne cohérence avec les précédents et ne paraît pas représenter un facteur de biais. La comparaison des résultats cliniques (taux de mortalité et moyenne des NMGGM), biologiques (hémogramme, taux de fibrinogène), nécropsiques (poids des poumons, score pulmonaire) et bactériologiques (concentration de Pha1/g de poumon) entre le lot placebo et les deux lots traités montre la sévérité de maladie (83 % du taux de mortalité chez les animaux traités avec un placebo versus 17 % chez les animaux traités avec CEF + SMP ou CEF, hyperleucocytose, hyperfibrinogémie) et la protection conférée par la thérapeutique (taux de mortalité significativement réduit, différence significative des moyennes de NMGGM, du poids des poumons, des NMGP, des concentrations de Pha1/g/poumon entre les animaux recevant un placebo et ceux traités avec CEF + SMP ou CEF). La comparaison des résultats obtenus avec les deux traitements CEF-SMP ou CEF fournit des données plus difficiles à interpréter :

- amélioration statistiquement significative des signes généraux à J2 au soir (température rectale) et des symptômes fonctionnels (tachypnée) pendant toute la durée de l'évolution,

- moyenne des fibrinogémies et des concentrations de Pha1 dans les poumons moins élevées, moyenne des GMQ plus importante pour les animaux traités avec CEF + SMP sans différence statistiquement significative avec celles des animaux traités avec CEF.

Les données issues de cette expérimentation n'autorisent cependant pas à recommander l'utilisation systématique pour le traitement des BPIE d'un anti-inflammatoire stéroïdien en association avec l'antibiothérapie. Elles ne concordent pas avec les résultats précédemment obtenus sur le terrain chez des taurillons traités avec une association acétate de prednisolone + oxytétracycline + chloramphénicol <sup>14</sup>. Une explication possible pourrait être la posologie élevée de corticoïde dans cet essai (3 mg/kg versus 0,5 mg/kg, soit x 6). En témoignerait l'intense neutrophilie post thérapeutique (Figure 3) peut-être à l'origine d'une aggravation des lésions pulmonaires (Tableau I). On sait en effet que celles-ci dépendent à la fois de mécanismes neutrophiles dépendants et de mécanismes neutrophiles indépendants <sup>9</sup>.

## SUMMARY

After randomization, 18 calves were inoculated with a Pha1 isolate as described in an earlier protocol. After the first inoculation 6 calves received Ceftiofur (CEF), 1 mg/kg by intramuscular route (IM) every day for 5 days together with methyl-prednisolone-succinate (MPS) 3 mg/kg IM on two consecutive days, 6 calves received CEF + an MPS placebo, and 6 calves a CEF placebo + an MPS placebo. Twice a day before the meal all calves were clinically examined to determine a mean disease score (MDS). After their death or sacrifice, 7 days at most after the first inoculation, all calves were autopsied. The lungs were weighed, the extent of the lesions quantified by a score (mean lung score = MLS) based on combined inspection and palpation and a quantitative bacteriological examination carried out on the damaged lung parenchyma. The validity of the model was confirmed by the percentage mortality observed in the control group (83 % versus 17 % in the other groups). A similar trend was apparent in the clinical results (significant difference  $p \leq 0,05$  between the mean MDS of the control group and that of the other group) in the necropsy results (significant difference  $p \leq 0,05$  between the control group and the other groups for mean lung weight and MLS) and in the microbiological results (significant difference  $p \leq 0,05$  between the mean number of cfu Pha1/g of lung in the control group and other groups). This demonstrate the efficacy of both therapeutic regimens (i.e. CEF and CEF + MPS) in our model. The advantage of the antibiotic + steroidal anti-inflammatory treatment is not clear.

## RESUME

Après randomisation, 18 veaux ont été inoculés avec un isolat de Pha1 selon un protocole déjà décrit. Dès la première inoculation 8 veaux ont reçu Ceftiofur (CEF) 1 mg/kg par voie intramusculaire (IM) tous les jours pendant 5 jours, et succinate de méthyl prednisolone (SMP) 3 mg/kg (IM) 2 jours de suite, 6 veaux CEF + un placebo SMP, 6 veaux un placebo CEF + un placebo SMP. Deux fois par jour, avant le repas, tous les veaux ont fait l'objet d'un examen clinique aboutissant à une note moyenne générale de maladie (NMGGM). Après leur mort ou sacrifice, au maximum 7 jours après la première inoculation, tous les veaux ont été autopsiés, les poumons ont été pesés, l'étendue des lésions objectivée par un score combinant l'inspection et la palpation (note moyenne générale pulmonaire = NMGP), un examen bactériologique quantitatif du parenchyme pulmonaire lésé a été effectué. La validité du modèle utilisé a été confirmée par le taux de mortalité observé dans le lot témoin (83 % versus 17 % dans les autres lots). Les

résultats cliniques (différence significative  $p \leq 0,05$  entre la moyenne des NMGM du lot témoin et celles des autres lots), nécropsiques (différences significatives  $p \leq 0,05$  entre le lot témoin et les autres lots pour la moyenne du poids des poumons et des NMGP) et microbiologiques (différence significative  $p \leq 0,05$  entre la moyenne des unités formant colonies de Pha1/g de poumon entre le lot témoin et les autres lots) vont dans le même sens et démontrent dans notre modèle l'efficacité des deux schémas thérapeutiques évalués (CEF et CEF + SMP). Par contre l'avantage de l'association antibiotique + antiinflammatoire stéroïdien n'apparaît pas clairement.

## RESUMEN

Después de separación por randomización 18 terneros fueron inoculados con una cepa de *Pasteurella haemolytica* A1 (Pha1) según un protocolo precedentemente descrito. Desde la primera inoculación 8 terneros reciben Ceftiofur (CEF) 1 mg/Kg per via intramuscular (IM) diariamente durante 5 días y succinato de metil prednisolona (SMP) 3 mg/Kg per via IM durante 2 días seguidos. 6 terneros reciben CEF + un placebo SMP, otros 6 terneros un placebo CEF + un placebo SMP. 2 veces por día antes de las comidas todos los terneros son examinados clinicamente para determinar su nota media general de enfermedad (NMGE). Después su muerte o sacrificio a un periodo máximo de 7 días después de la primoinoculación, todos los bovinos fueron autopsiados, los pulmones pesados, y la intensidad de las lesiones medida por una cifra que combina la inspección y la palpación (nota media general pulmonar = NMGP), un examen bacteriológico cuantitativo del parénquima pulmonar lesionado fue igualmente realizado. La validez del modelo empleado es confirmada por los porcentajes de mortalidad (83% en el lote testigo contra 17% en los otros). Los resultados clínico (diferencia significativa a  $p < 0,05$  entre la media de NMGE del lote testigo y la de los otros lotes); los resultados de las autopsias (diferencia significativa a  $p < 0,05$  entre el lote testigo y los otros si bien en lo que se refiere a los NMGP que al peso de los pulmones); y los resultados bacteriológicos (diferencia significativa  $p < 0,05$  entre las medias de unidades formando colonias de Pha1/gramo de pulmón entre el lote testigo y los otros) son concordantes y demuestran a través de nuestro modelo la eficacia de los esquemas terapéuticos examinados (CEF y CEF + SMP). Contrariamente, la ventaja de la asociación antibiótico + antiinflamatorio esteroideo no es evidente.

## REFERENCES

1. ESPINASSE, J., Maladies respiratoires des jeunes bovins. Où en est-on ? Où va-t-on ? Société Française de Buiatrie Ed., 231 p. 1988.2. CLARKE, C.R., BURROWS, G.E., AMES, T.R., Therapy of bovine bacterial pneumonia. *Vet. Clin. North America* : Food Anim. Pract. 7 (3) : 669-694. 1991.3. ZAK, O., O'REILLY, T., Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (8) : 1527-1531. 1991.4. LEKEUX, P., GUSTIN, P., DESMECHT, D., LINDEN, A., Therapeutique des pathologies respiratoires aiguës des bovins. *Ann. Med. Vet.* 135 : 175-184. 1991.5. ESPINASSE, J., LONGO, F., ROHART, S., CAMGUILHEM, R., SCHELCHER, F., GUELFI, J.F., CABANIE, F., Mise au point et première utilisation d'un modèle expérimental de pasteurellose respiratoire à *Pasteurella haemolytica* A1 chez le veau. *Rev. Méd. Vét.* 140 (8-9) : 673-680. 1989.6. SHOO, M.K., Experimental bovine pneumonic pasteurellosis : A review. *Vet. Rec.* 124 : 141-144. 1989.7. POWERS, T.E., VARMA, K.J., POWERS, T.D., Role of animal disease models in evaluating the efficacy of antimicrobial agents. 3 th. Congress European Ass. Vet. Comp. Pharmacology, Toxicology and Therapy : 401-406. 1985.8. POWERS, J.D., POWERS, T.E., Statistical method for evaluation of drug efficacy in animal models. 3 th. Congress European Ass. Vet. Comp. Pharmacology, Toxicology and Therapy : 427-435. 1985.9. WESTWEBER, J.G., KLERM, R.D., LEIPOLD, A.W., JOHNSON, D.E., Pneumonic pasteurellosis induced experimentally in gnotobiotic and conventional calves inoculated with *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* 51 (11) : 1799-1805. 1990. 10. AMES, T.R., CASAGRANDA, C.L., WERDIN, R.E., HANSON, L.J., Effect of Sulfadimethoxine-ormetoprim in the treatment of calves with induced *Pasteurella* pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 48 (1) : 17-20. 1987.11. SELLMAN, I.E., ALLAN, E.M., DALGLEISH, R.G., GIBBS, H.A., SHOO, M.K., Evaluation of the efficacy of flumixin meglumine using four different experimentally induced bovine respiratory disorders. *Int. Symp. on Non Steroidal Inflammatory Agents*, Orlando, Florida, 23 : 32. 1986.12. BREEZE, R.G., LAUERMAN, L.H., SCHMITZ, J.A., MAGONIGLE, R.A., Evaluation of long-acting oxytetracyclin for treatment of *Pasteurella* pneumonia in calves. *Bov. Pract.* 15 : 96-98. 1980.13. FARINGTON, D.O., JACKSON, J.A., BENTLEY, O.E., BARNES, H.J., Efficacy of sulbactam-ampicillin in an induced *Pasteurella haemolytica* pneumonia model in calves. *Am. J. Vet. Res.* 48 (12) : 1684-1685. 1987.14. ESPINASSE J., ALLAIRE, R., RAYNAUD, J.P., VAN GOOL, F., TIXIER, G., Corticothérapie associée à l'antibiothérapie dans les bronchopneumonies infectieuses enzootiques des jeunes bovins. Résultats cliniques. 4 th. World Congress on Diseases of Cattle, Dublin, 1 : 611-613. 1986.