

Antibiotiques et environnement
Séance publique du 21 novembre 2018

Aquaculture et Antibiorésistance (AMR)

Sandrine Baron

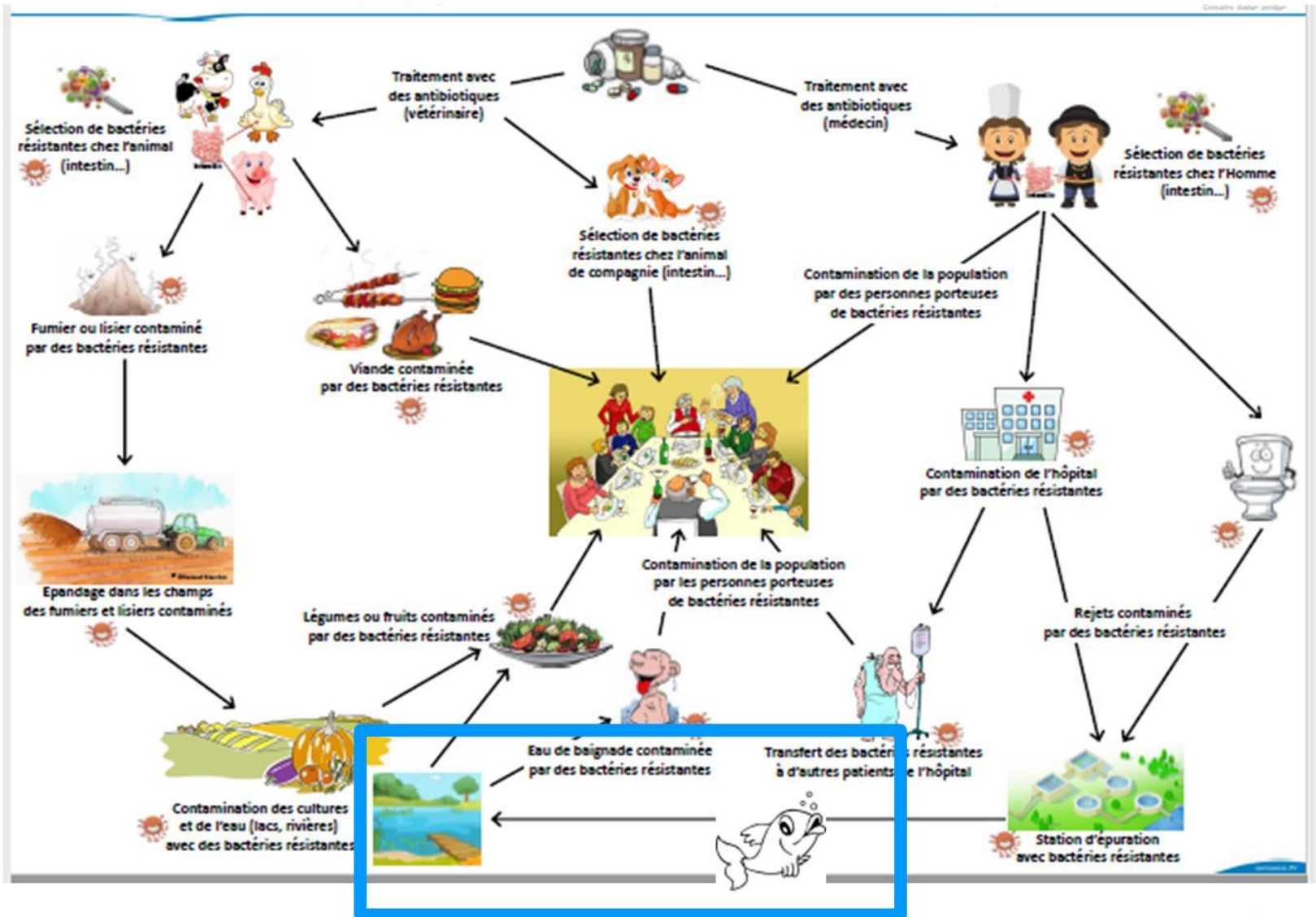
Anses – Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort

UMBA : Emeline Larvor, Eric Jouy, Héloïse Duprey, Isabelle Kempf

EPISABE : Claire Chauvin, Rodolphe Thomas, Sophie Le Bouquin

PVP : Thierry Morin

Milieu aquatique : récepteur et source d'exposition



Aquaculture

Elevage d'organismes aquatiques en zones continentales et côtières, impliquant une intervention dans le processus d'élevage en vue d'en améliorer la production, et la propriété individuelle ou juridique du stock en élevage.

FAO Fisheries Department (2003) World Fisheries and Aquaculture Atlas. CD-ROM. Rome, FAO. 2nd ed.; FAO, Fisheries Department (1997) Aquaculture development. FAO Tech. Guidelines for Responsible Fisheries (5):40p. Rome, FAO.

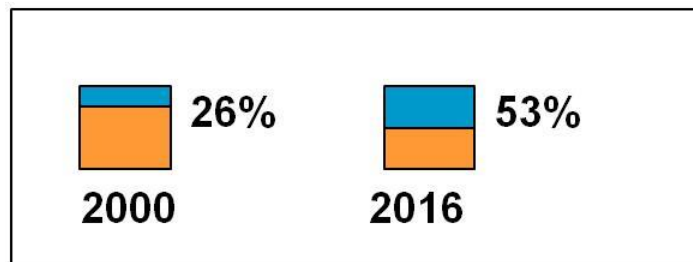
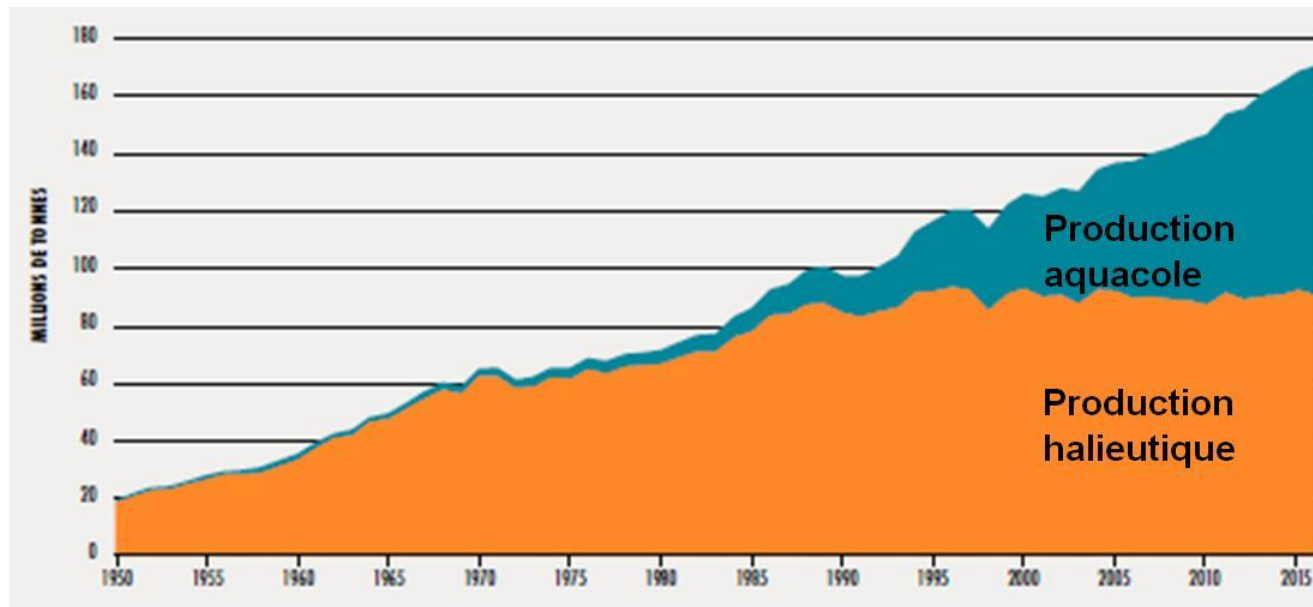
Pisciculture

Reproduction, élevage, conservation, etc. de poissons (sens étroit) par des moyens qui complètent ou remplacent ceux qui sont normalement présents dans la nature.

O'sullivan, D., Hilder, M. & Rough, K. (comp.) (1996) A dictionary of aquaculture. A guide to commonly used words and terms. Aquaculture Sourcebook, (6):64p. Launceston, Tasmania, Univ. Tasmania Key Centre for Aquaculture/ Turtle Press Pty Ltd., 2nd. Ed.;

Production aquacole et halieutique mondiale – données 2016

171MT: 53% Aquaculture (110,2 MT)



Usage des antibiotiques en pisciculture

- Pas d'antibiotique spécifique à l'aquaculture
- 3 méthodes :
 - Balnéation : les juvéniles et les larves (en écloserie)
 - Injection: seulement pour les « gros poissons », les reproducteurs...
 - Aliments pré médicamenteux
- Usage des antibiotiques dépend
 - du pathogène ciblé
 - du système d'élevage
 - de la législation/réglementation
- En Europe, Amérique du nord et au Japon : régulation stricte
 - Interdiction des usages prophylactiques (Directive 2001/82/EC)
 - Peu de molécules avec AMM en aquaculture :
tétracycline, quinolone 1^{ère} génération, florfenicol,
association sulfamide-triméthoprine, amoxicilline

Usage des antibiotiques en pisciculture

- Pas d'antibiotique spécifique à l'aquaculture
- 3 méthodes :



**90% DE LA PRODUCTION
MONDIALE
VIENT D'AILLEURS !**

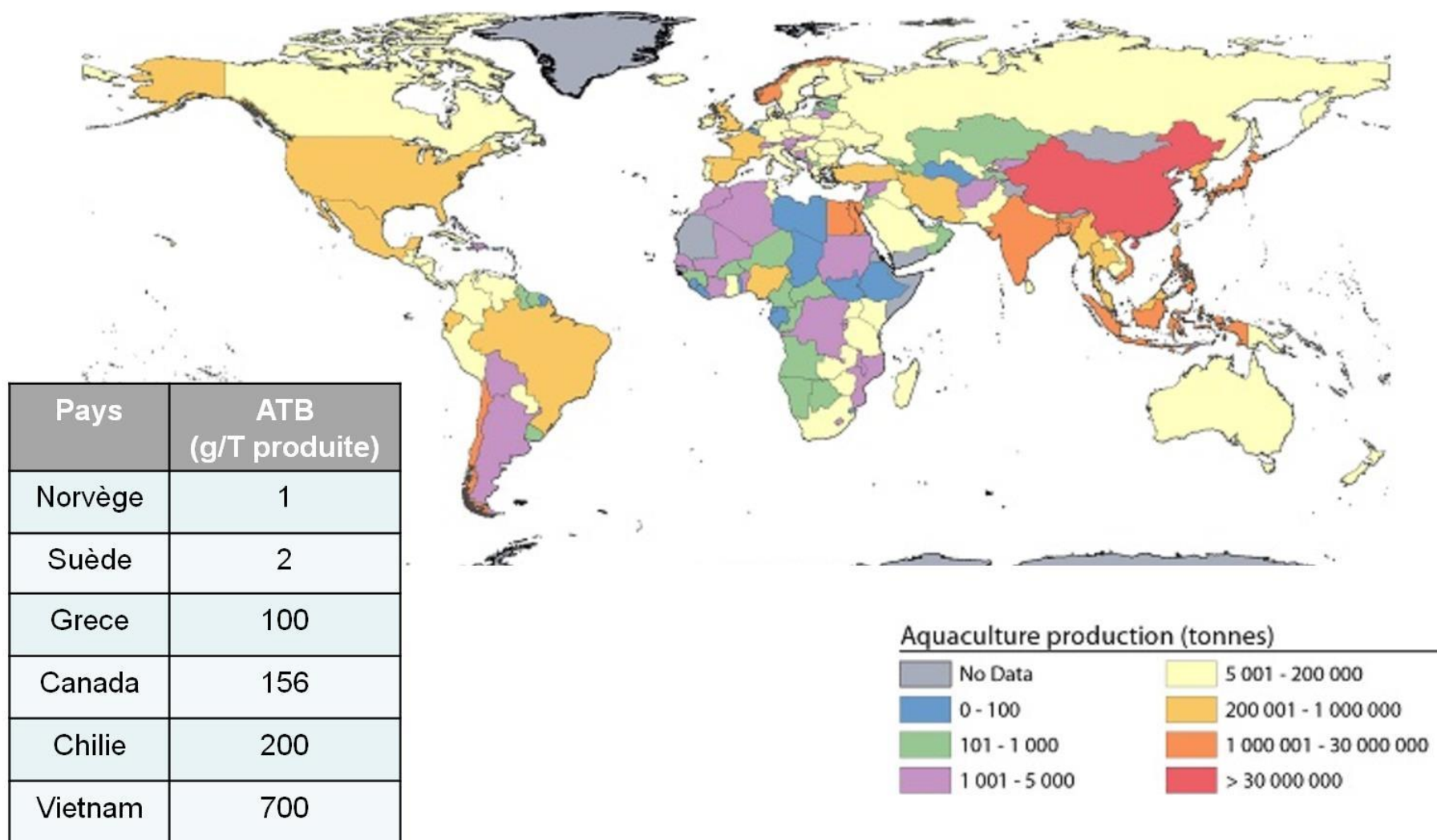
- interdiction en tant que facteur de croissance (Directive 2001/82/EC)
- Peu de molécules avec AMM en aquaculture :
tétracycline, quinolone 1^{ère} génération, florfenicol,
association sulfamide-triméthoprime, amoxicilline

Production aquacole* en 2015 : 106 millions de tonnes (MT)

- Animaux aquatiques : 76,6 MT Plantes aquatiques : 29,4 MT

www.fao.org/fishery/naso-maps/nationalaquacultureproduction1950-2015/fr

<http://www.fao.org/fishery/naso/search/fr>



P. Smith 2008

*Incluant les plantes aquatiques, les poissons, les mollusques, les crustacées et les autres animaux aquatiques

La pisciculture en France

- Activité ancestrale (Dès le moyen-age)

- 19^{ème} siècle :

reproduction artificielle de la truite (Rémy et Géhin)

111 piscicultures d'eau douce



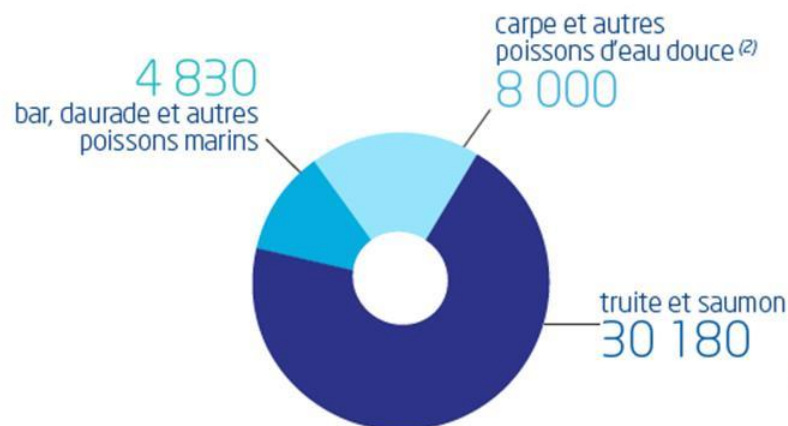
- Années 80 : cycle biologique complet du bar et de la dorade maîtrisé par des scientifiques français



- Années 90 : élevage des esturgeons (3^{ème} producteur mondial)



- En 2015 : 43 010 tonnes vendues



>>> Pêche et aquaculture
Chiffres-clés de FranceAgriMer

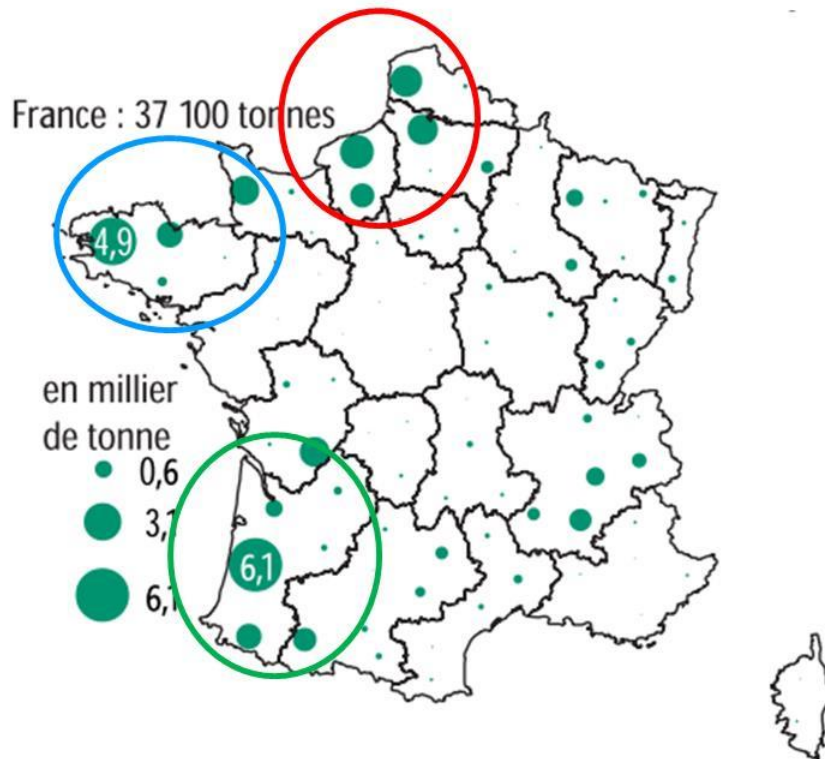


Pisciculture : 600 fermes

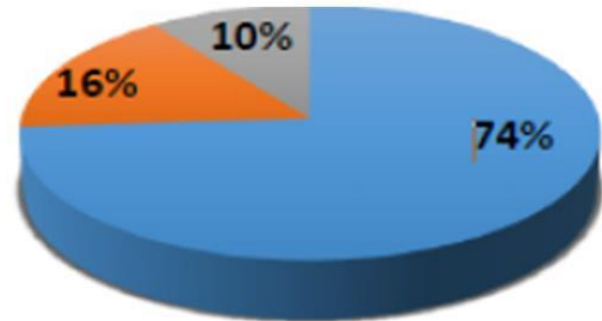
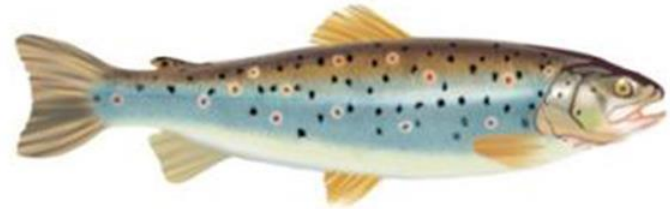
3 principales régions :

Aquitaine Bretagne

Nord/Picardie



Espèce principale



* Source CIPA

■ Salmonides élevés en eau douce

■ Poissons d'étangs

■ Poissons marins et nouveaux

Quels impacts sur la dissémination de l'AMR ?

↳ Quelles sont les données disponibles ?

- usages des antibiotiques
- présence de bactéries résistantes ou gènes de résistance dans:
 - le poisson d'élevage, poisson sauvage ?
 - l'environnement des piscicultures ?

↳ très peu d'études

Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms

L. Gordon, E. Giraud, J.-P. Ganière, F. Armand, A. Bouju-Albert, N. de la Cotte, C. Mangion and H. Le Bris

Effects of three dosages of oral oxolinic acid treatment on the selection of antibiotic-resistant *Aeromonas*:
Experimental approach in farmed trout

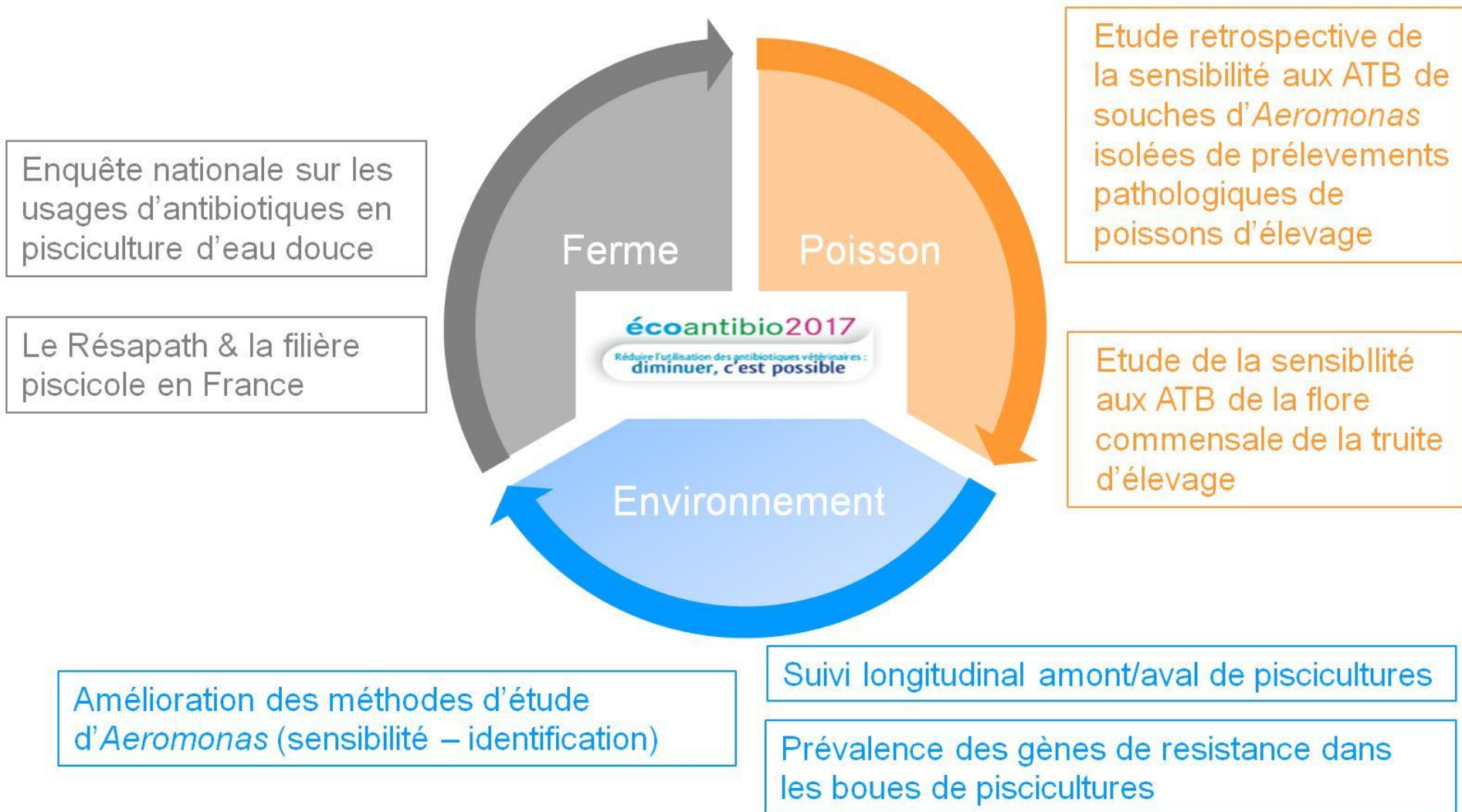
Magali Naviner^{*}, Etienne Giraud, Chantal Thorin, Hervé Le Bris¹,
Hervé Pouliquen, Jean-Pierre Ganière

Survey of antibiotic resistance in an integrated marine aquaculture system under oxolinic acid treatment

Etienne Giraud, Diane-Gaëlle Douet, Hervé Le Bris, Agnes Bouju-Albert, Claire Donnay-Moreno, Chantal Thorin & Hervé Pouliquen

Unité Mixte de Recherche INRA-ENVN Chimiothérapie Aquacole et Environnement, Ecole Nationale Vétérinaire, Atlanpôle, La Chantrerie, Nantes, France

Quels usages ?



Usage des antibiotiques en pisciculture en France

- Nombre limité de molécules
 - oxytétracycline,
 - florfenicol,
 - Mélange triméthoprim-sulfamide,
 - fluméquine,
 - Acide oxolinique
- Voie principale d'administration via l'alimentation
- Recours limité à la cascade
- Données disponibles : ANMV

Usage des antibiotiques en pisciculture en France

Données sur les produits vétérinaires contenant des antibiotiques en France 2017 (rapport annuel – nov 2018)

Tonnage par espèce

Tableau 2 : Répartition des ventes en 2017 entre les différentes espèces en tonnage de matière active et en quantité de matière active par kilogramme de poids vif

	Bovins	Porcs	Volailles	Lapins	Chats & Chiens	Ovins & Caprins	Chevaux	Poissons	Autres	Total
Tonnage vendu	131,01	181,27	94,62	31,68	16,08	34,06	8,45	1,30	0,27	498,74
Pourcentage	26,27%	36,35%	18,97%	6,35%	3,22%	6,83%	1,69%	0,26%	0,05%	100,00%
Ventes en mg/kg	14,07	64,33	43,37	356,52	98,10	62,75	30,73	28,19	7,64	32,25

Indicateur par espèce

Tableau 4 : Répartition des ventes 2017 entre les différentes espèces en tonnage de poids vif traité et en indicateur d'exposition ALEA

	Bovins	Porcs	Volailles	Lapins	Chats & Chiens	Ovins & Caprins	Chevaux	Poissons	Autres	Total
Poids vif traité (tonnes)	2 347 798	1 755 851	1 125 599	157 143	105 024	186 943	94 947	8 896	3 610	5 785 811
Pourcentage	40,58%	30,35%	19,45%	2,72%	1,82%	3,23%	1,64%	0,15%	0,06%	100,00%
ALEA	0,252	0,623	0,516	1,768	0,641	0,344	0,345	0,194	0,103	0,374

QUEL USAGE DES ANTIBIOTIQUES EN SALMONICULTURE CONTINENTALE EN FRANCE ?

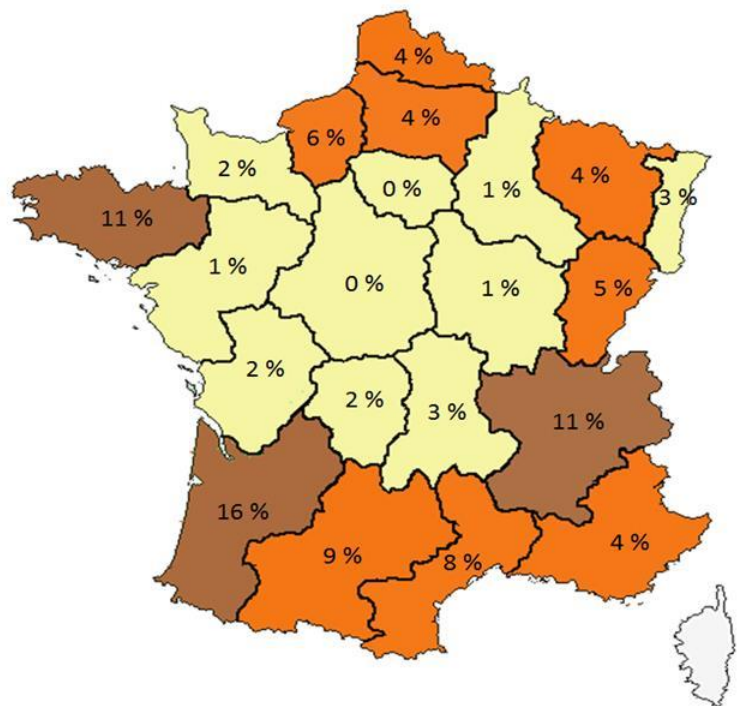
Le Bouquin S.¹, Baron S.², Thomas R.¹, Jamin M.³,
Hanne-Poujade S.¹, Chauvin C.¹

¹Unité EPISABE, ²Unité MBA, - Anses, Ploufragan-Plouzané-Niort

³ FILI@VET - Saint Martin des Champs

Conception de l'étude

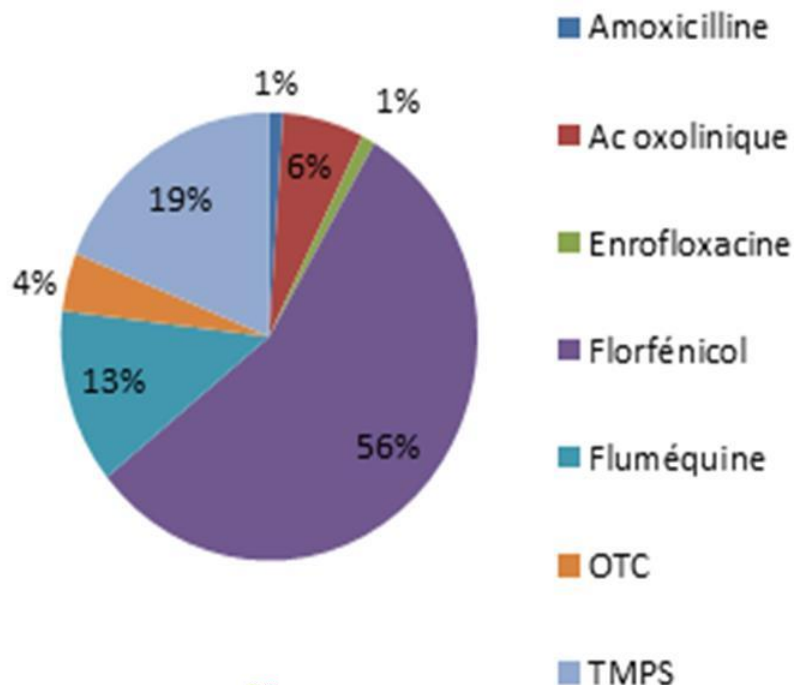
- Échantillonnage représentatif au niveau national
- critères d'inclusion
 - Pisciculture d'eau douce
 - Nombre de fermes / région (stratification)
 - Production > 2T/an
- Traitement anonymisé des données



- Juillet 2014 – avril 2015
- 67% de réponses
- 101 fermes sélectionnées
- 1 visite/ferme – 3 personnes
- Questionnaire épidémiologique (production, organisation, maladie ...)
- Info sur les ATB prescrits en 2013 (quantité, molécules,...)

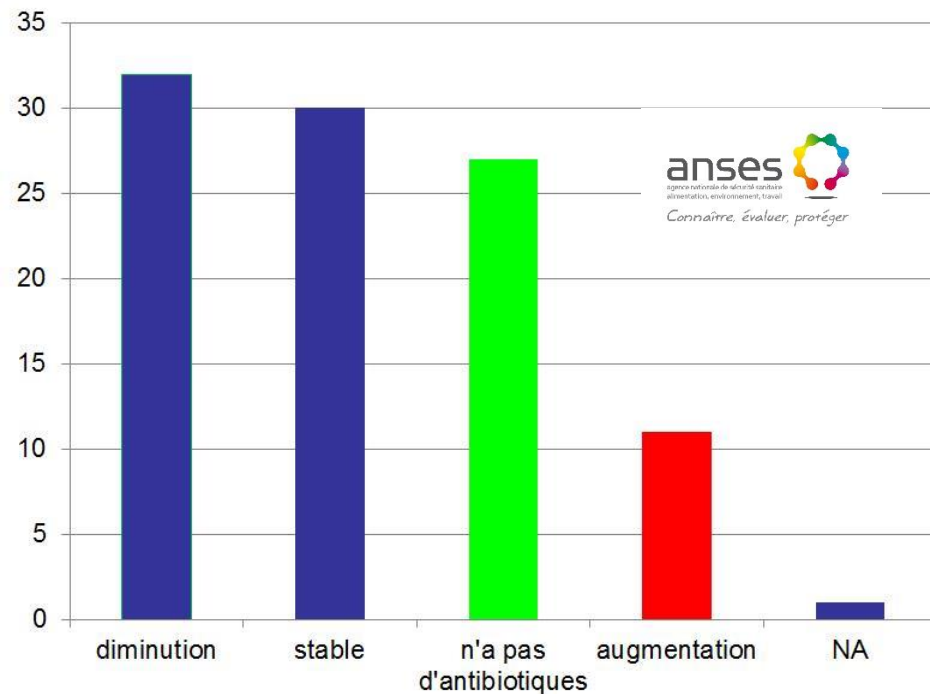
Usages antibiotiques (2013)

64% des éleveurs ont fait l'acquisition d'antibiotiques au cours de l'année 2013
(vs 60% en 97 et 52% en 2007) (Agreste 2011)



- Florfenicol le plus souvent utilisé (flavobactériose)
- Pas/peu d'utilisation d'antibiotiques critiques
- Développement de la vaccination (yersiniose) (55% des élevages vs 13% en 97 et 21% en 2007) (Agreste 2011)
- Faible/autres filières de PA

Usages antibiotiques (5 dernières années)



- 27% déclarent ne pas en avoir utilisé au cours des 5 dernières années
- Une minorité a augmenté pour raison sanitaire
- 62% stable ou en diminution (vaccination, meilleure gestion sanitaire, baisse de production...)

Tendance sur les 5 dernières années

- 65% considèrent que la réduction des usages est possible
- Motivation éthique, économique, vaccination
- 71 % considèrent leur couverture vaccinale « pas optimale »

Quels impacts sur la dissémination de l'AMR ?

↳ Quelles sont les données disponibles ?

- usages des antibiotiques
- présence de bactéries résistantes ou gènes de résistance dans:
 - le poisson d'élevage, poisson sauvage?
 - l'environnement des piscicultures ?

↳ très peu d'études

Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms

L. Gordon, E. Giraud, J.-P. Ganière, F. Armand, A. Bouju-Albert, N. de la Cotte, C. Mangion and H. Le Bris

Survey of antibiotic resistance in an integrated marine aquaculture system under oxolinic acid treatment

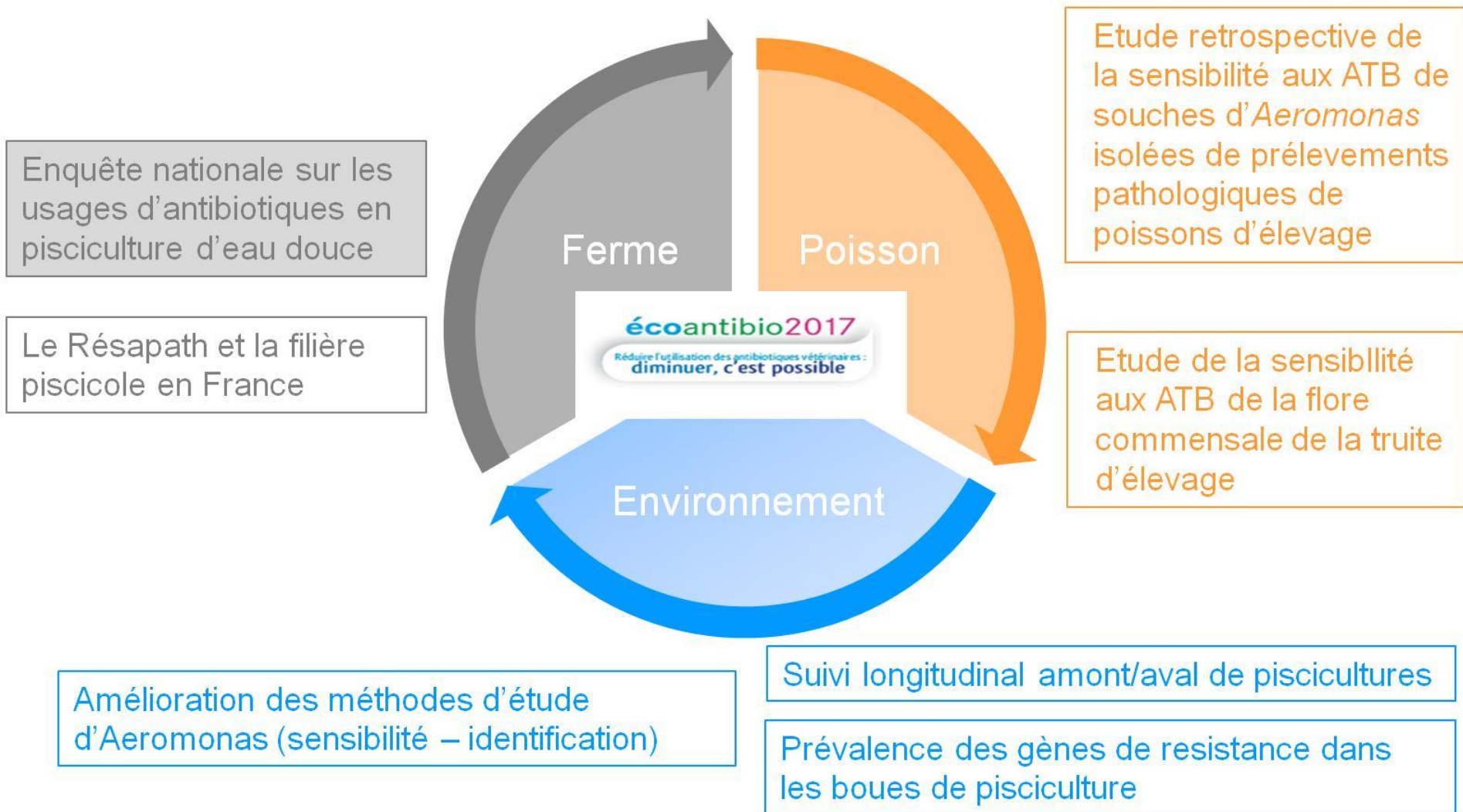
Etienne Giraud, Diane-Gaëlle Douet, Hervé Le Bris, Agnes Bouju-Albert, Claire Donnay-Moreno, Chantal Thorin & Hervé Pouliquen

Unité Mixte de Recherche INRA-ENVN Chimiothérapie Aquacole et Environnement, Ecole Nationale Vétérinaire, Atlanpôle, La Chantrerie, Nantes, France

Effects of three dosages of oral oxolinic acid treatment on the selection of antibiotic-resistant *Aeromonas*:
Experimental approach in farmed trout

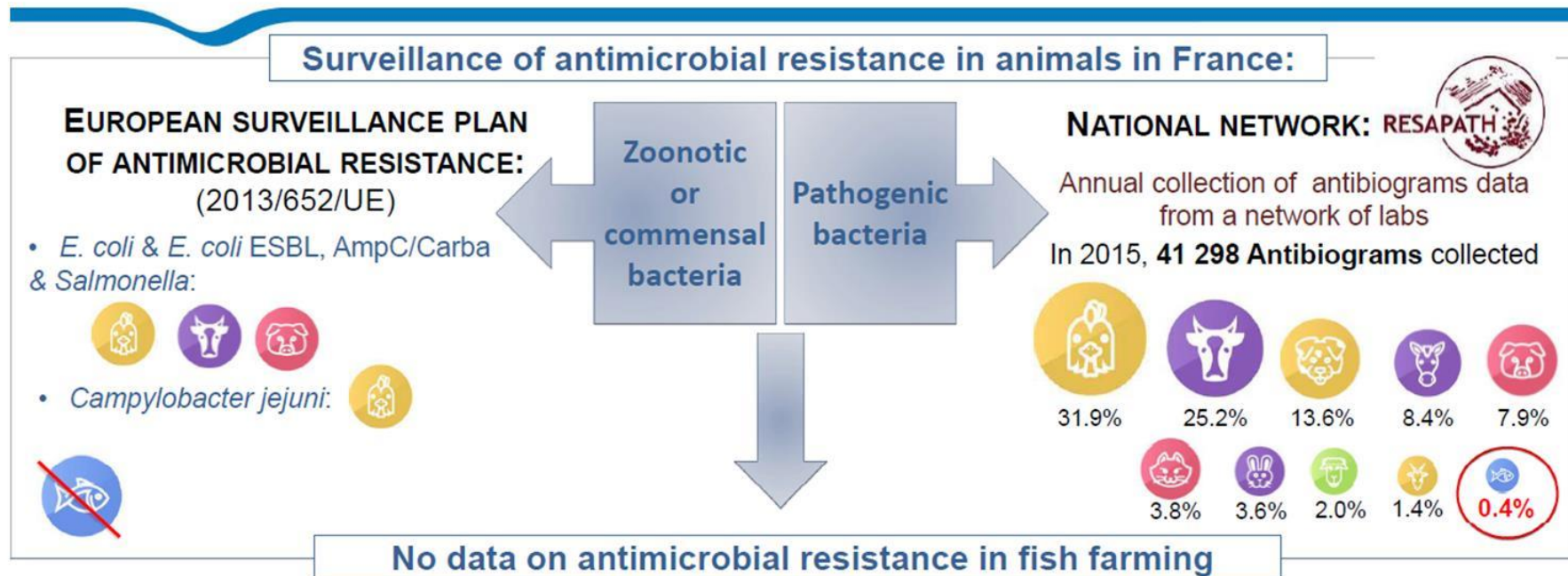
Magali Naviner *, Etienne Giraud, Chantal Thorin, Hervé Le Bris¹,
Hervé Pouliquen, Jean-Pierre Ganiere

présence de bactéries ou gènes de résistance dans le poisson d'élevage ?



Surveillance de la dissémination de l'AMR en filière piscicole en France

1 – Contexte : la surveillance de l'AMR en filière animale en France



2 – Enquête épidémiologique : Les antibiogrammes en filière piscicole

Exhaustive panel
8 vets + 3 labs



Interview in face to face
2 hours / unique investigator



Thèse vétérinaire
A. Nalovic (2016)

WHICH BACTERIAL SPECIES?

Aeromonas spp., *Yersinia ruckerii*
Vibrio spp., *Photobacterium damsela*,
Tenacibaculum maritimum, *Edwardsiella*
tarda, *Flavobacterium psychrophilum*

HOW ?

- Isolation step: swab or organ
- Antibiogram analysis:
≠ conditions of incubation,
≠ inoculum size,
≠ interpretative criteria.

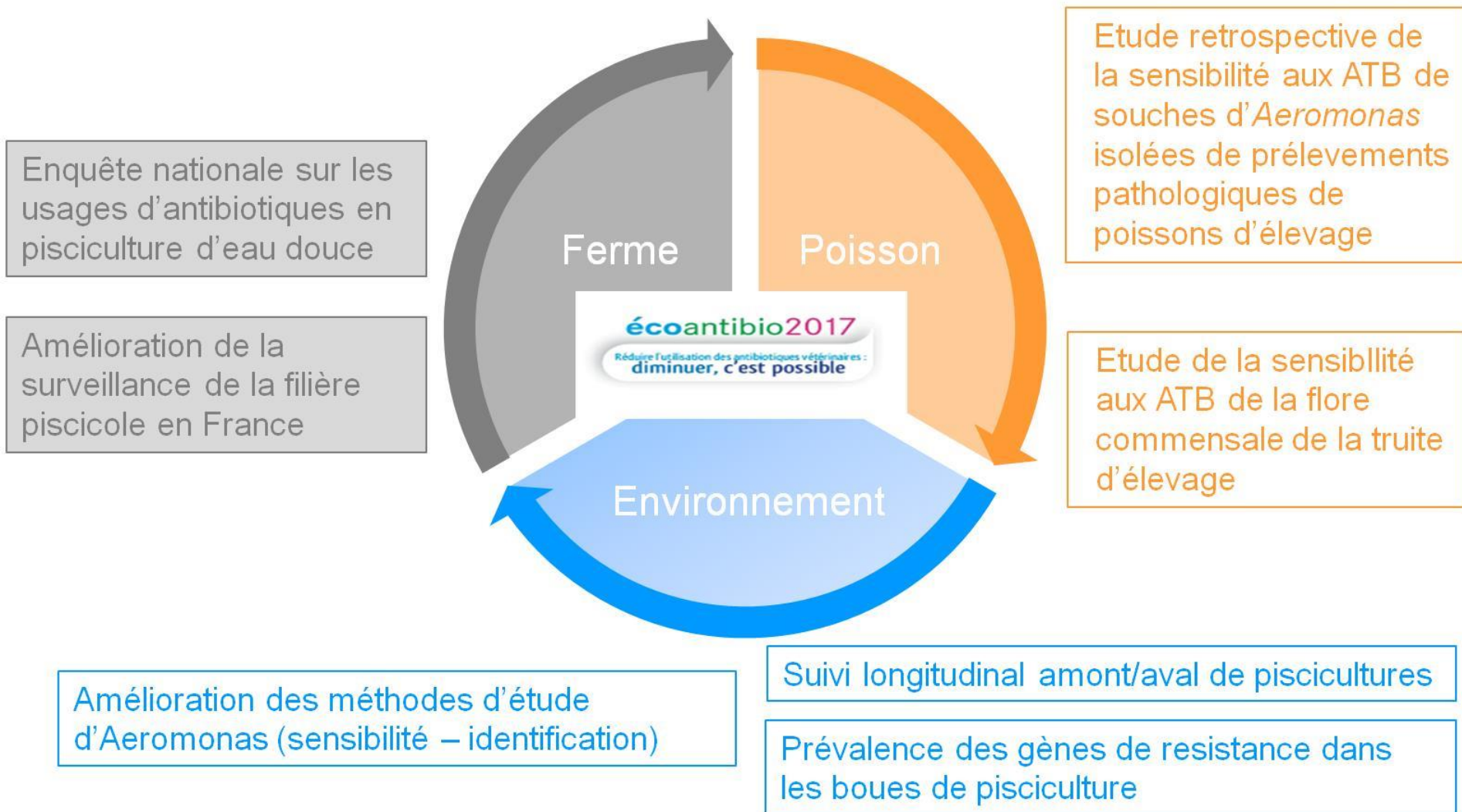
WHO DOES IT? HOW MANY ?



$n \approx 800/\text{year}$
50% vets - 50% labs

Need of standardized method

présence de bactéries ou gènes de résistance dans le poisson d'élevage ?



Modèle d'étude : *Aeromonas*

- 😊 Bactérie autochtone des milieux aquatiques
- 😊 Pathogène du poisson – pathogène opportuniste pour l'homme
- 😊 Plasticité génétique
- ☹️ Peu de critères d'interprétation de la sensibilité aux antibiotiques

	CBP			ECOFF	CO _{WT}
AO	0,12	2,5-0,5	1	0,25	0,03
FLU	-	-	-	-	0,125
CIP	-	-	-	-	0,125
FC	-	-	-	8	4
GEN	-	-	-	-	4
SXT	-	-	-	-	0,25
TET*	1	2-4	8	2	0,5



Seuil clinique (CBP) :

Seuil épidémiologique (ECOFF) :



Ecoff provisoire (CO_{WT}) :



European Association
of
Fish Pathologists



18th International
Conference on Diseases
of Fish and Shellfish

BELFAST, UK
4-8 SEPTEMBER 2017

Study of Antimicrobial Susceptibility of *Aeromonas* Isolates Collected from Diseased Fish since 1985

Baron S., Larvor E., Lepiouffle A., Thuillier B., Calvez S., Duprey H., Fournel C., Jouy E.,
Vanrobaeys Y., Delaunay A., Delannoy S., Fach P., Chauvin C., Morin T., & Kempf I.



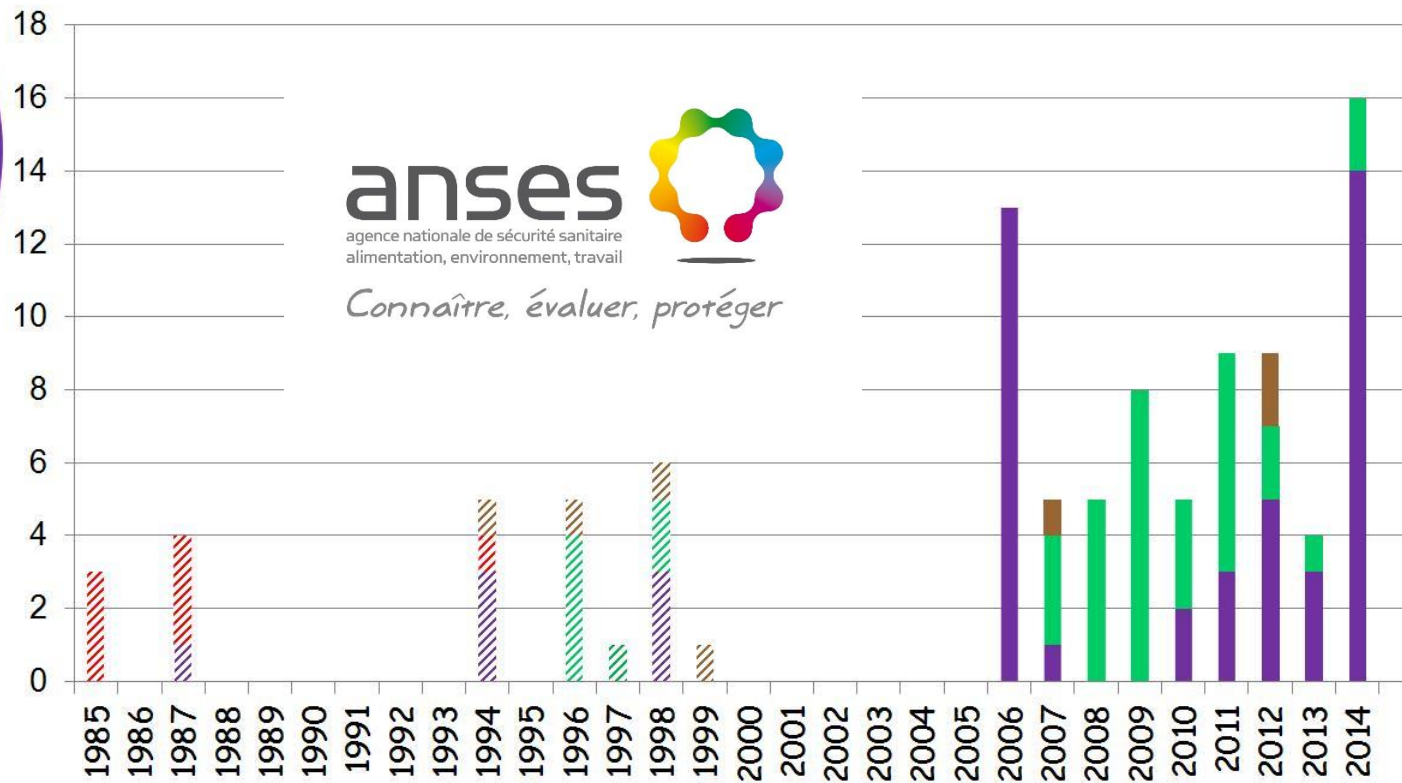
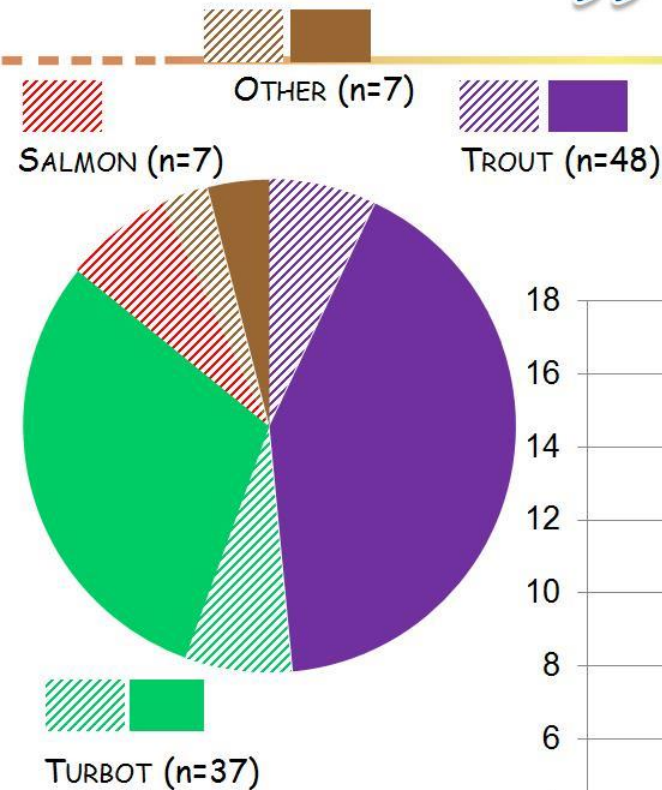
Laboratoire public
Conseil, Expertise et Analyse en Bretagne



Investigate, evaluate, protect



99 Isolates from Sick Fish



anses
 agence nationale de sécurité sanitaire
 alimentation, environnement, travail
Connaître, évaluer, protéger

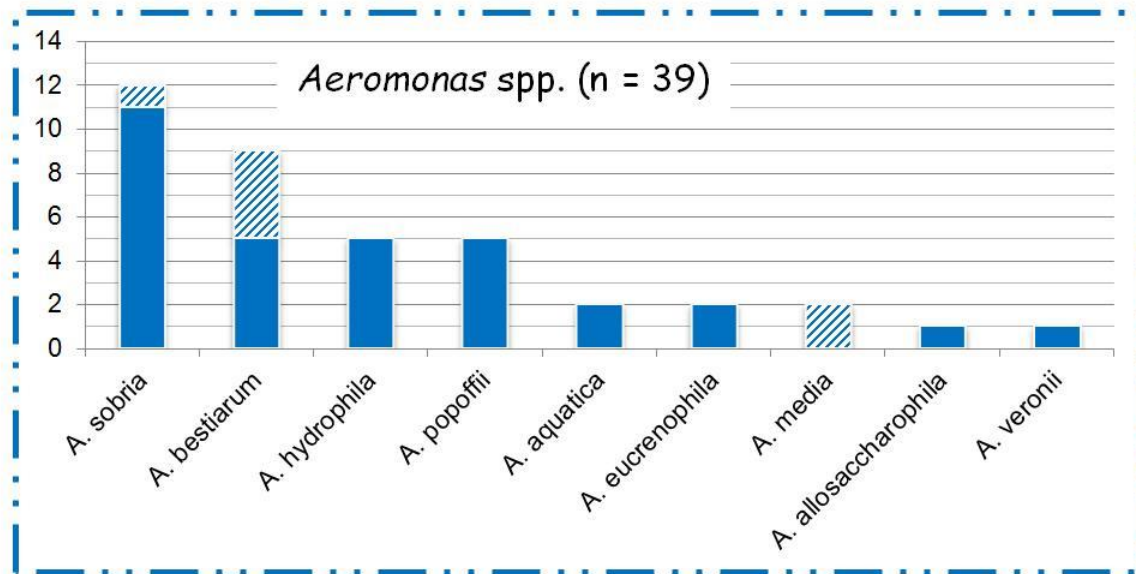
old collection

new collection

coming from 33 fishfarms: trout: 24, turbot: 10, salmon: 4 & other: 4

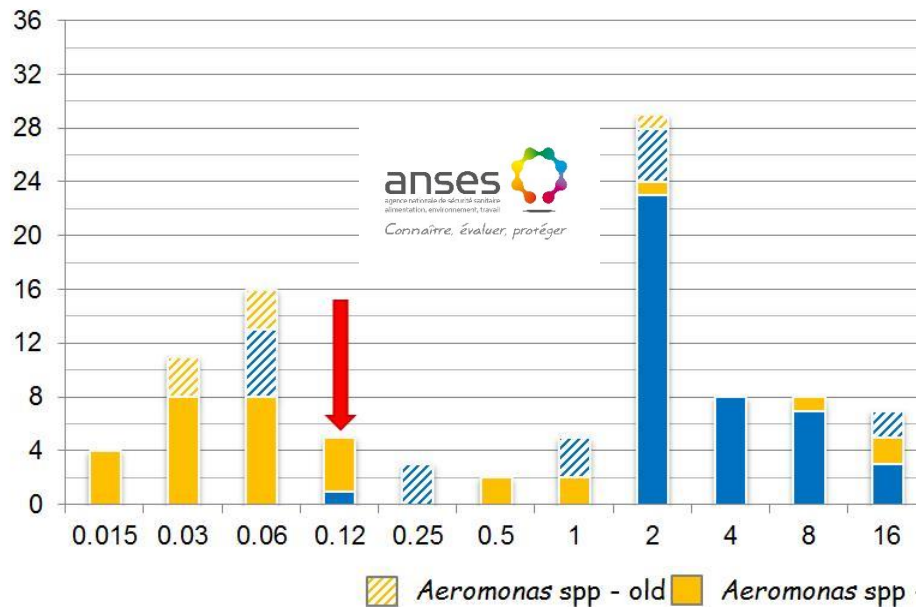
Collection of Isolates:

	Before 2000 « old isolates »	Since 2006 « new isolates »	total
<i>Aeromonas salmonicida</i>	18	42	60
<i>Aeromonas</i> spp.	7	32	39
total	25	74	99

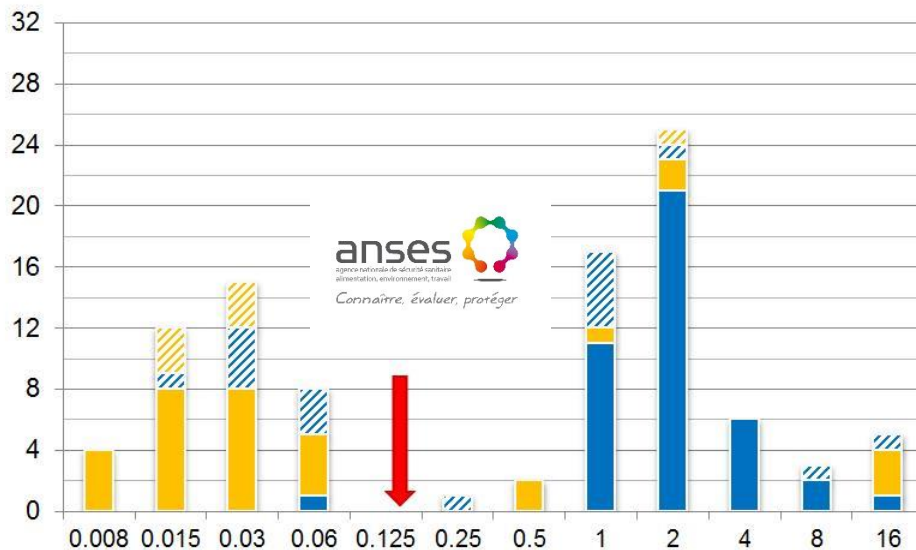


⇒ Antimicrobial susceptibility analysis was done separately for *Aeromonas* spp and *A. salmonicida*

Temporal Evolution of Antimicrobial Susceptibility

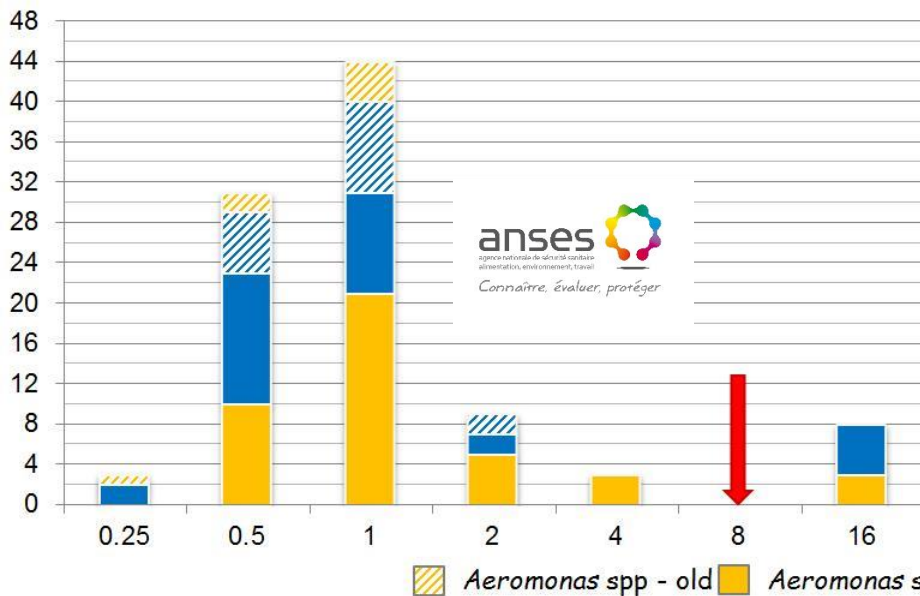


- 63% of resistant strains
- Significantly more resistance ($p < 0.01$) in new *A. salmonicida* than old ones.



- 62% resistant strains
- Significantly more resistance ($p < 0.001$) in new *A. salmonicida* than old ones.

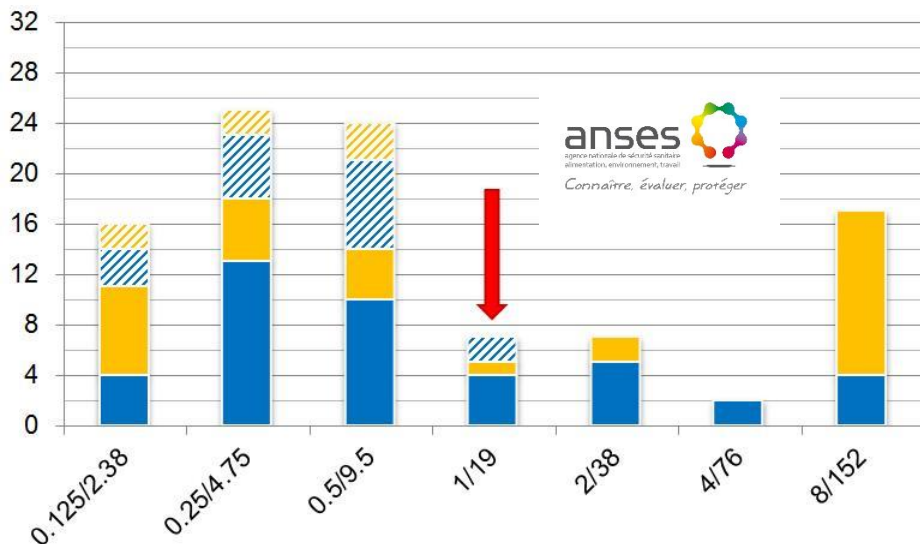
Temporal Evolution of Antimicrobial Susceptibility



FLORFENICOL

$E_{\text{coff}} \geq 8$ - CLSI Vet03/Vet04-S2

- 8% of resistant strains, only detected in new isolates

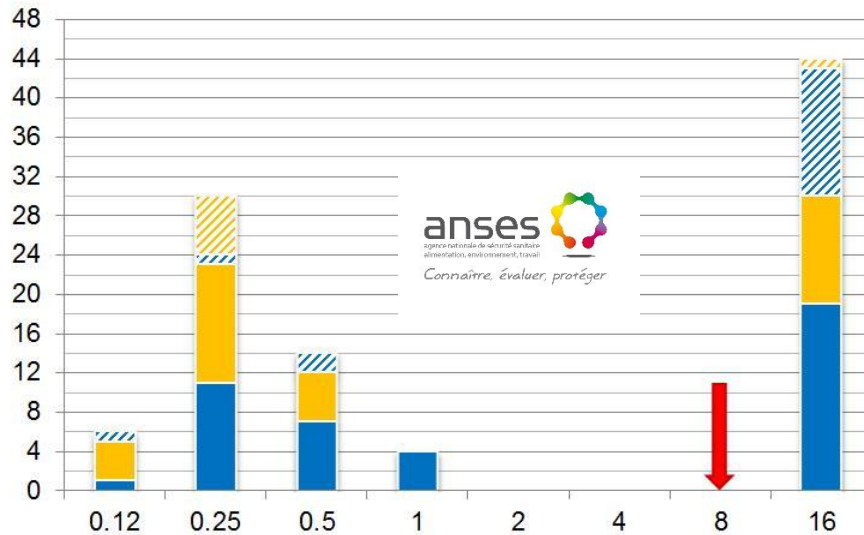


TRIMETHOPRIM-SULFADIAZINE

$E_{\text{coff}} \geq 1/19$ - CLSI Vet03/Vet04-S2

- 33% of resistant strains
- A. salmonicida* significantly ($p < 0.01$) less resistant than *A. spp*
- No significant effect of period detected.

Temporal Evolution of Antimicrobial Susceptibility



OXYTETRACYCLINE

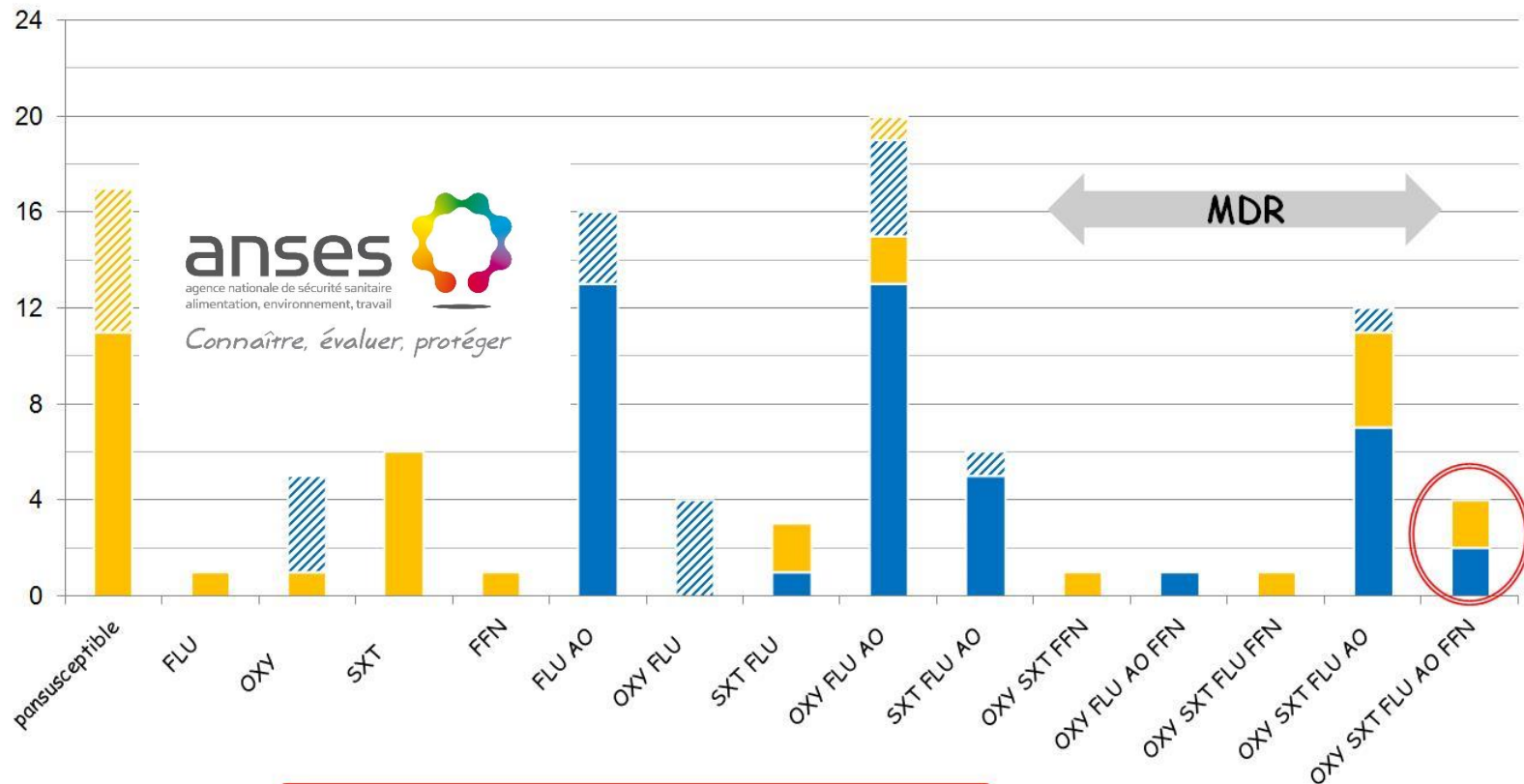
Ecoff/BP $\geq$ 8 - CLSI Vet03/Vet04-S2

- 45% of resistant strains
- Significantly ($p < 0.05$) less resistance in new *A. salmonicida* than in old ones.

Multidrug Resistant Isolates

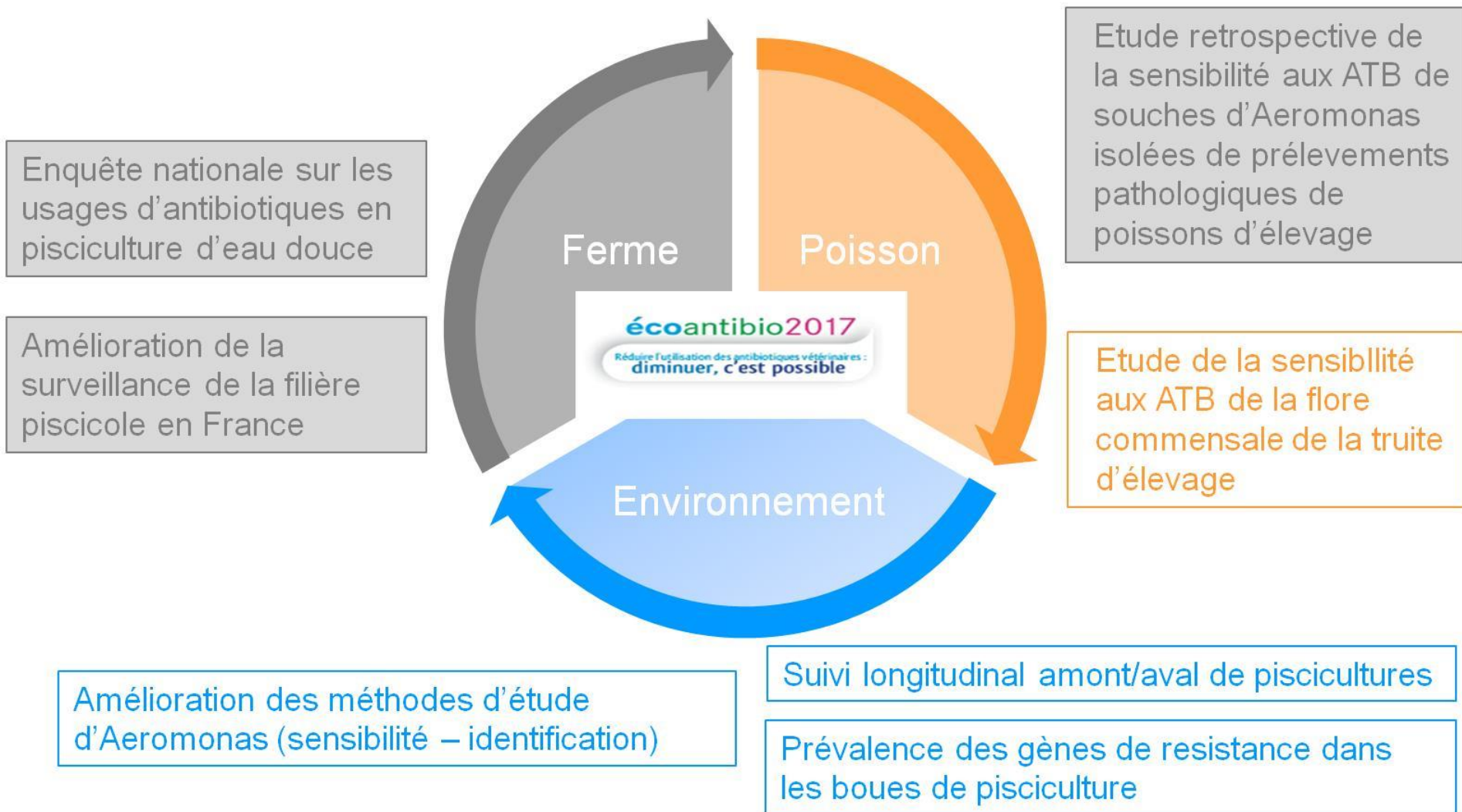
19 isolates were multidrug resistant (19%):

- 18 (24%) in new collection: 10 *A. salmonicida* (23%) & 8 *A. spp* (25%)
- 1 (4%) in old collection: *A. salmonicida*



2 *A. salmonicida* (2007 & 2014)
1 *A. bestiarum* (2014)
1 *A. sobria* (2014)

présence de bactéries ou gènes de résistance dans les piscicultures ?



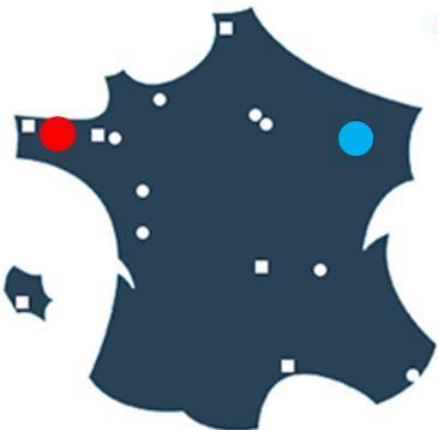
Sensibilité aux antibiotiques d'une collection de souches d'*Aeromonas* isolées des branchies et du contenu intestinal de truites d'élevage

*E. Larvor, M. Quentel, H. Duprey, E. Jouy, C. Chauvin, S. Lebouquin, R. Thomas,
I. Kempf, A. Wilhelm, B. Gassilloud & S. Baron*

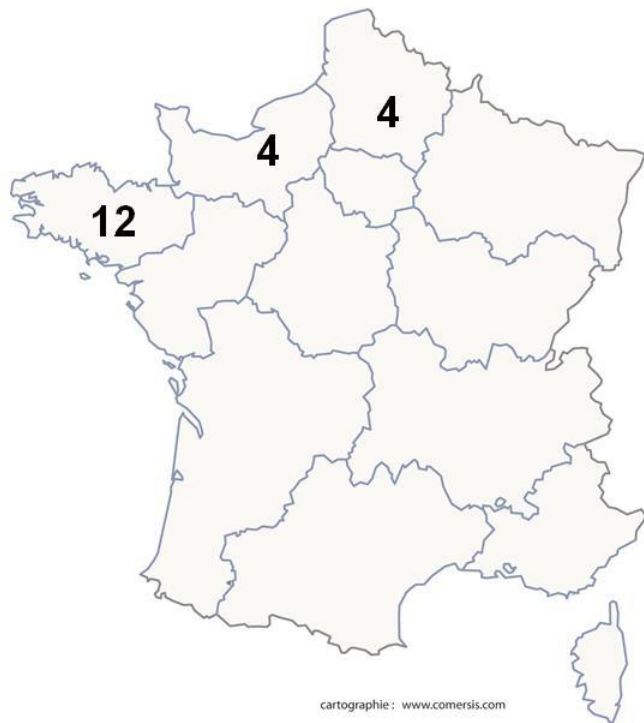
*ANSES Ploufragan-Plouzané: Unité Mycoplasmatologie-Bactériologie et
Antibiorésistance, Unité Epidémiologie et Bien-être*

Anses Nancy – Plateforme Maldi-Tof

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de
l'environnement et du travail



Plan d'échantillonnage – collecte des souches



20 piscicultures
(mai - aout 2014)

10 truites par pisciculture (n=200)

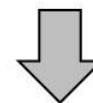


branchie

contenu intestinal

Incubation
48h à 22C

GSP agar



jusqu'à 10 colonies
caractéristiques/échantillon

Collection d'étude

195 *Aeromonas* spp. (102 truites):

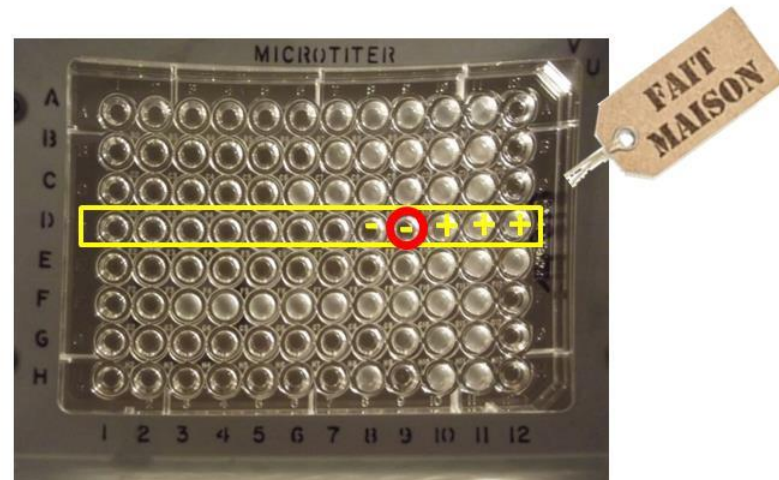
Identification au genre confirmée par PCR et Maldi-Tof

- 139 provenant de branchies (B)
- 56 provenant de contenus intestinaux (CI)

Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

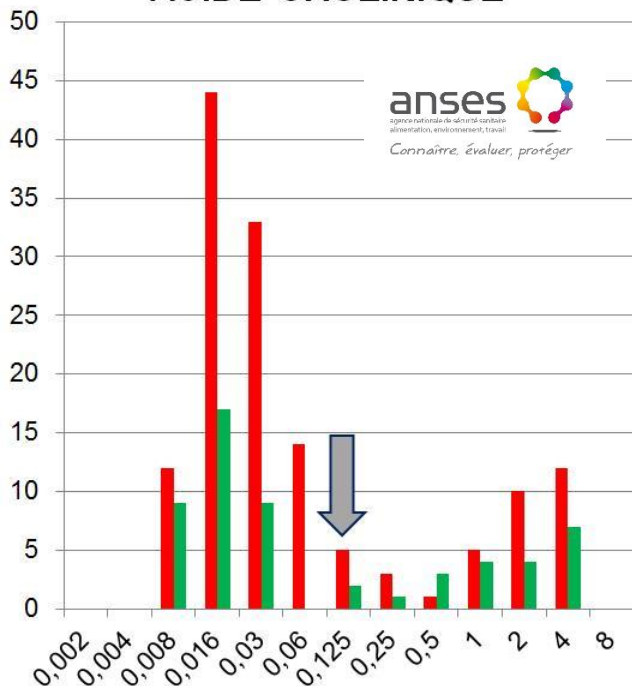
7 antibiotiques – 5 familles

Antibiotique	Concentration (mg/L)
Acide oxolinique (AO) 	0,002 - 2
Fluméquine (FLU) 	0,002 - 2
Ciprofloxacine (CIP)	0,002 - 4
Florfenicol (FC) 	0,008 - 16
Gentamicine (GEN)	0,016 - 32
Triméthoprim/ Sulfaméthoxazole (1/19) (SXT) 	0,008-16
Tetracycline (TET) 	0,016 - 32



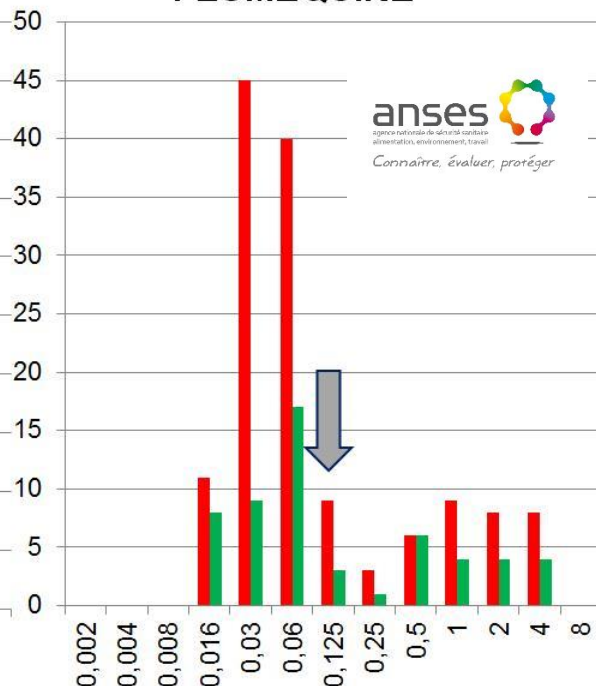
CMI pour les 195 isolats (branchies n=139, contenu intestinal n=56)

ACIDE OXOLINIQUE



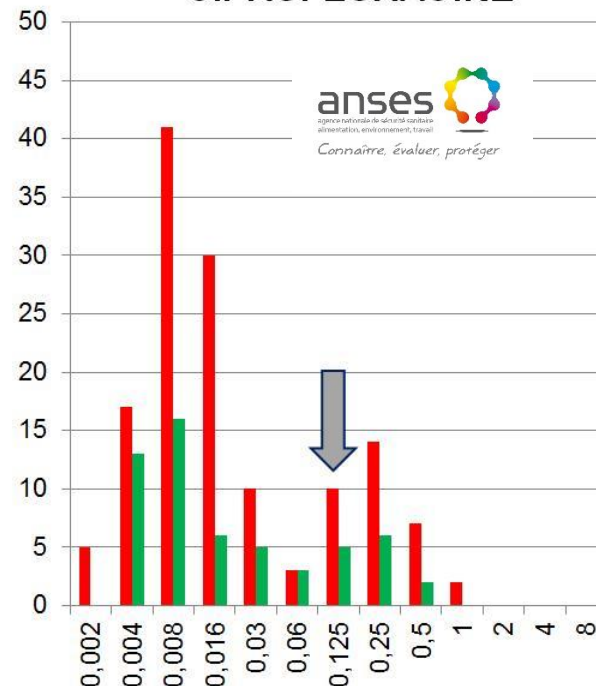
AOR^R = 42 (21,5%)
27 (19,4%) vs **15 (26,8%)**

FLUMÉQUINE



FLUR^R = 65 (33,3%)
43 (30,9%) vs **22 (39,3%)**

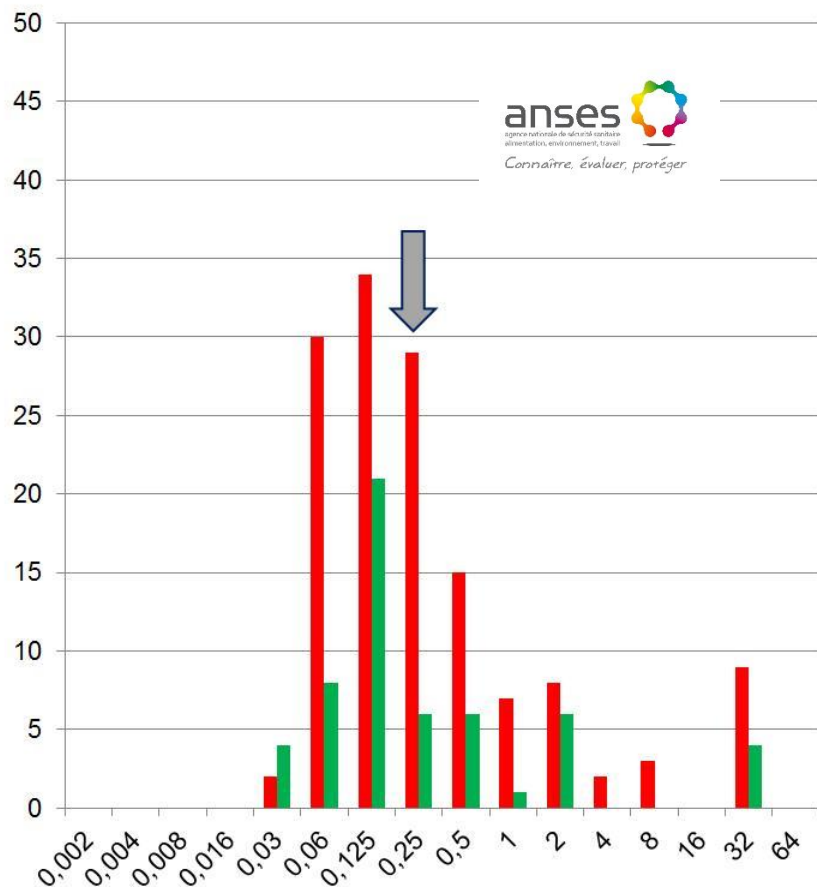
CIPROFLOXACINE



CIPR^R = 44 (22,5%)
31 (22,3%) vs **13 (23,2%)**

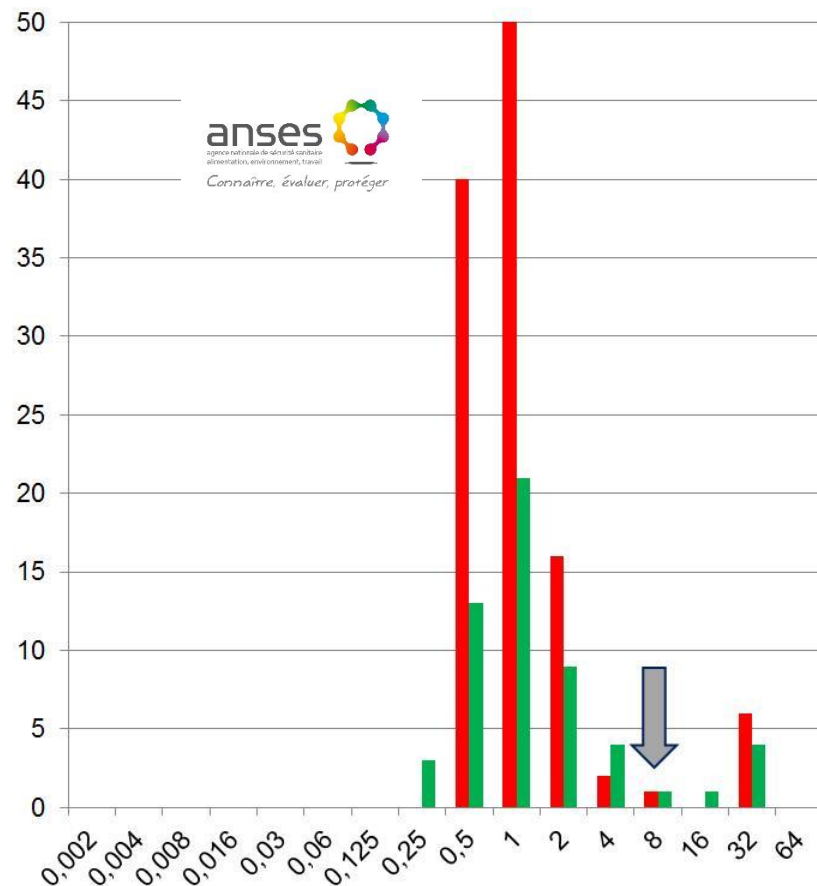
CMI pour les 195 isolats (branchies n=139, contenu intestinal n=56)

SXT



SXT^R = 96 (49,2%)
73 (52,5%) vs **23 (41,1%)**

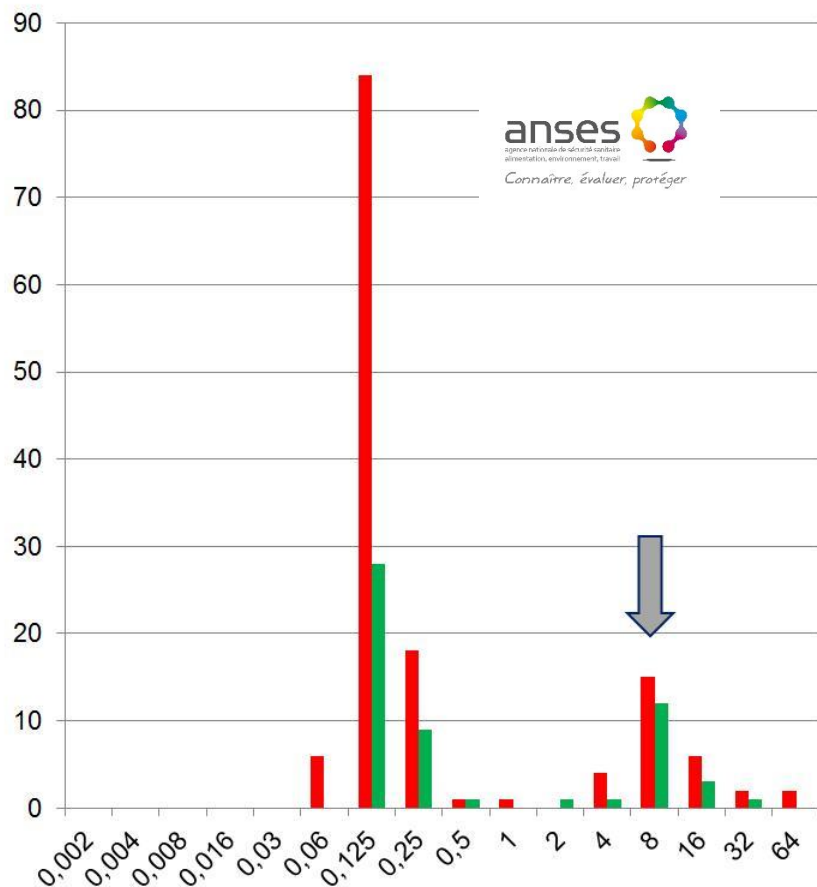
FLORFENICOL



FC^R = 13 (6,6%)
7 (5,0%) vs **6 (10,7%)**

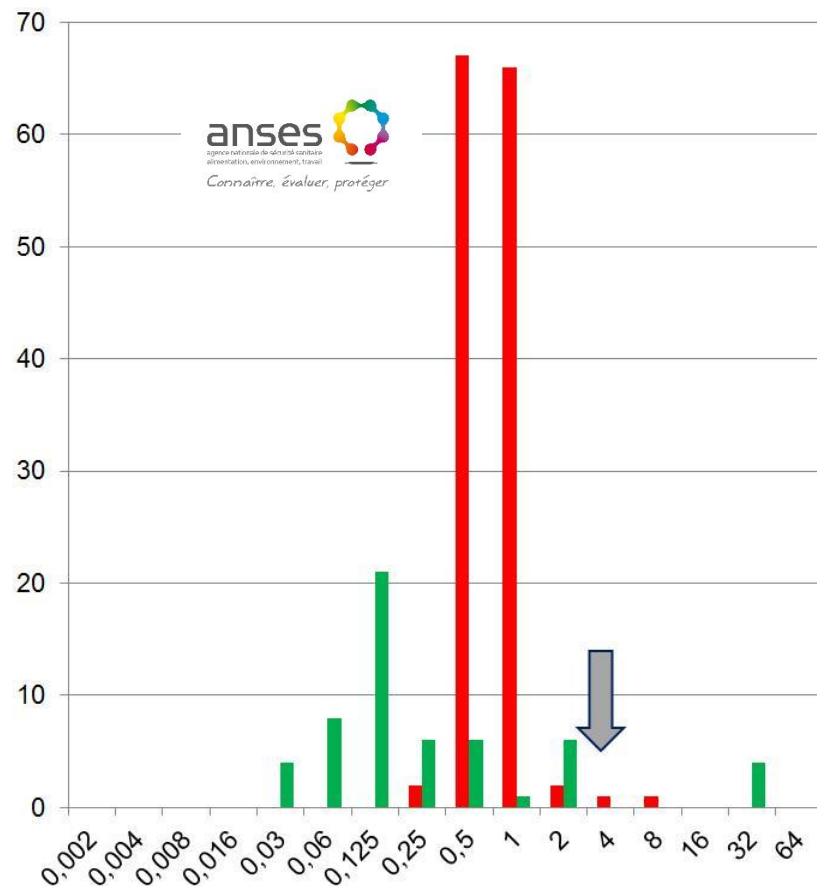
CMI pour les 195 isolats (branchies n=139, contenu intestinal n=56)

TETRACYCLINE



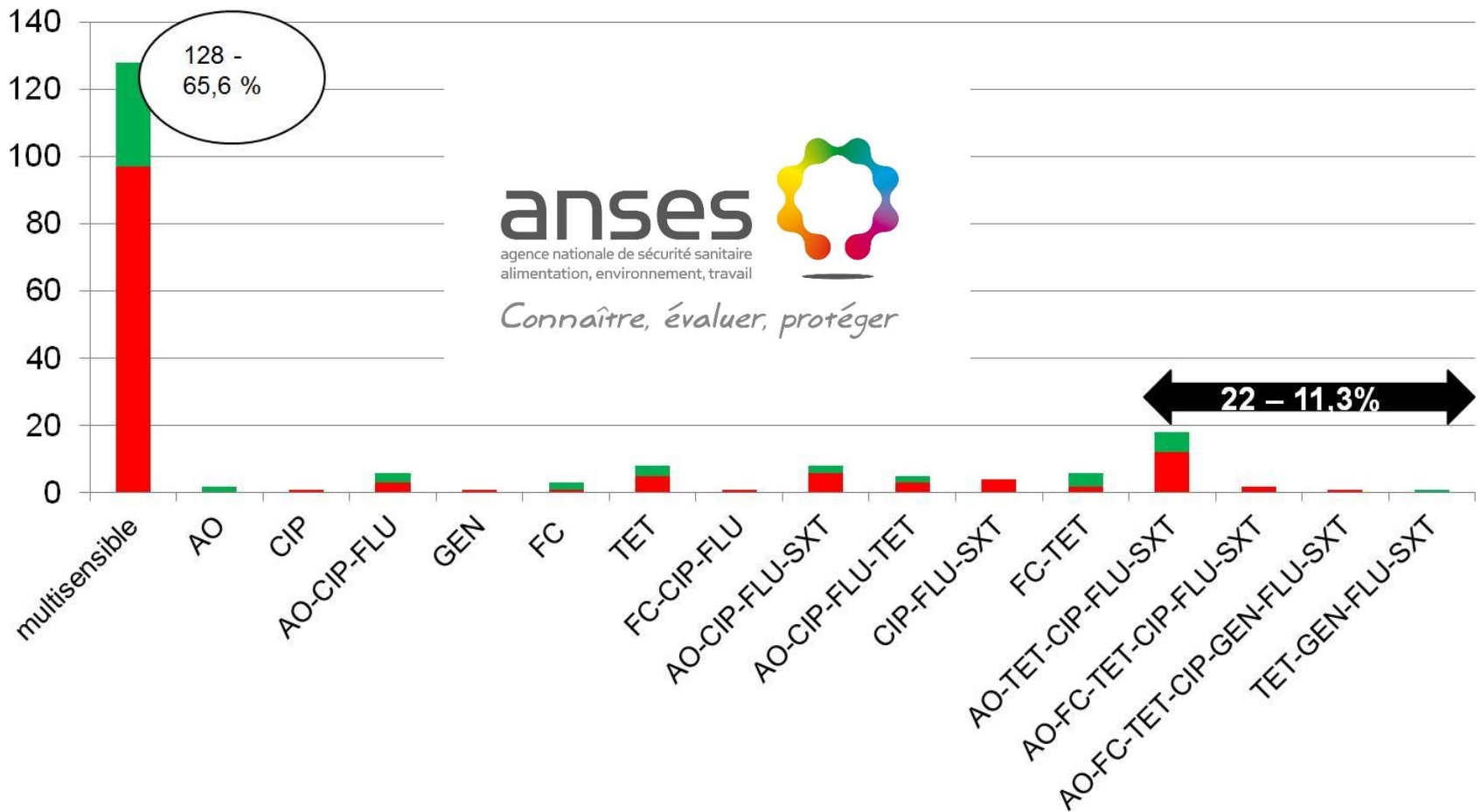
TET^R = 41 (21,0%)
25 (17,9%) vs **16 (28,6%)**

GENTAMICINE

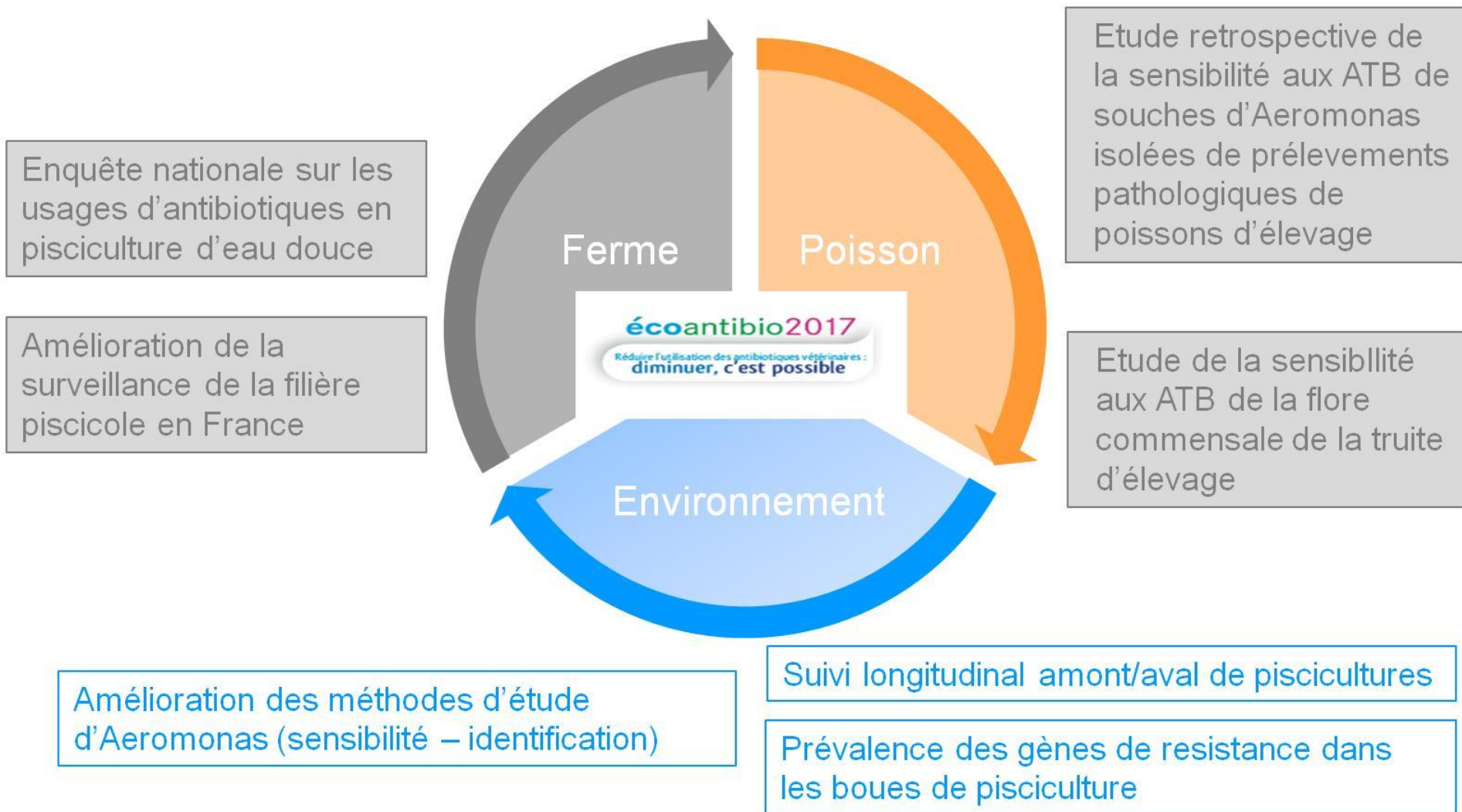


GEN^R = 3 (1,5%)
2 (1,4%) vs **1 (1,8%)**

Souches multirésistantes



présence de bactéries ou gènes de résistance dans l'environnement des piscicultures ?



Présence de bactéries ou gènes de résistance dans l'environnement des piscicultures ?

- Qualité des eaux : bactéries résistantes non incluses dans les critères
- Peu de publication en France :

Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms

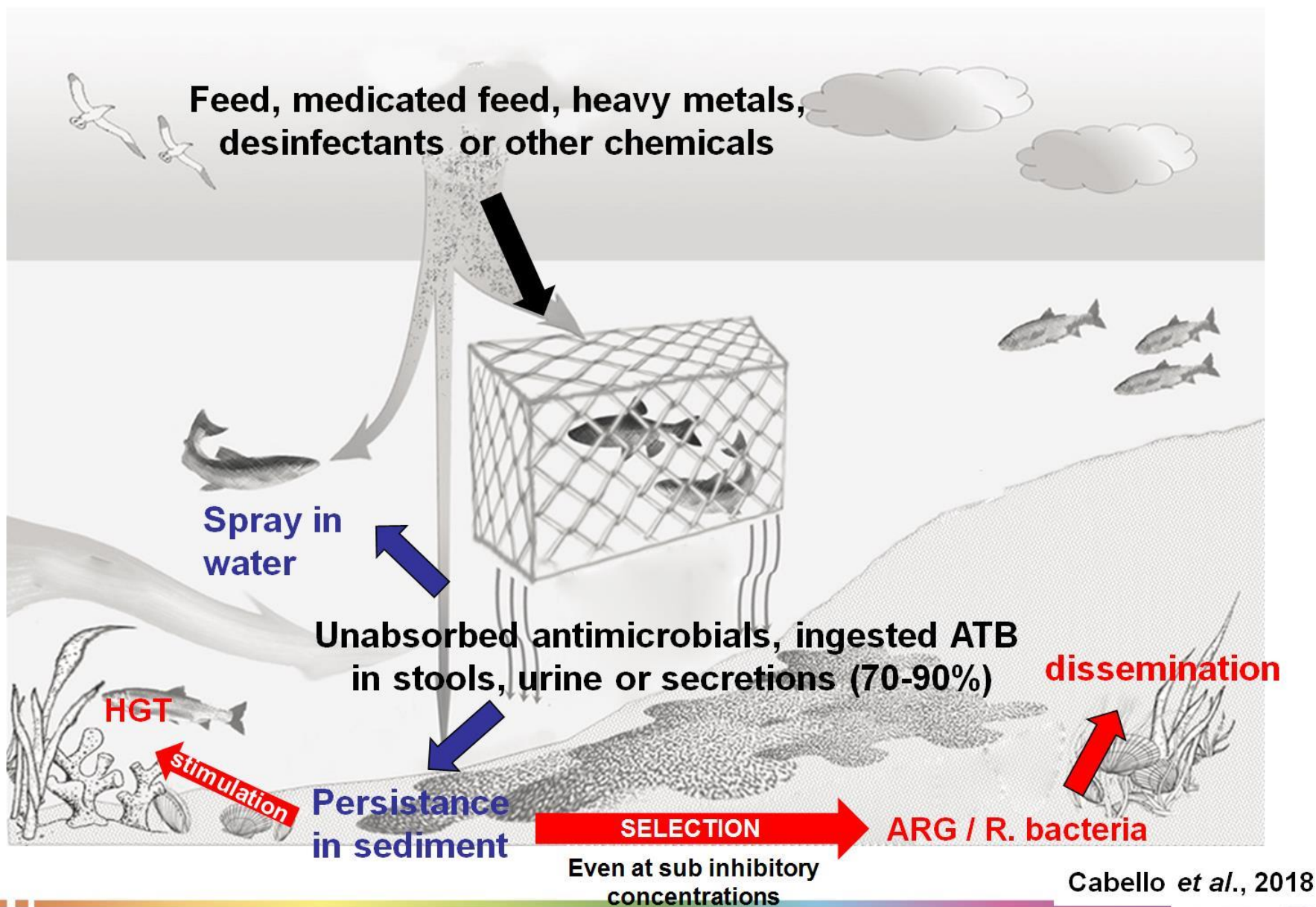
L. Gordon, E. Giraud, J.-P. Ganière, F. Armand, A. Bouju-Albert, N. de la Cotte, C. Mangion and H. Le Bris

Survey of antibiotic resistance in an integrated marine aquaculture system under oxolinic acid treatment

Etienne Giraud, Diane-Gaëlle Douet, Hervé Le Bris, Agnes Bouju-Albert, Claire Donnay-Moreno, Chantal Thorin & Hervé Pouliquen

Unité Mixte de Recherche INRA-ENVN Chimiothérapie Aquacole et Environnement, Ecole Nationale Vétérinaire, Atlanpôle, La Chartrerie, Nantes, France

- Nécessité d'une démarche Amont/Aval
- Prise en compte des sources de contamination (STEP, Ruissèlement...)
- Importance du compartiment sédiment/boue



Etude en cours ...
Suivi longitudinal de 18 mois
des bactéries résistantes et des gènes de résistance



Station d'épuration



Pisciculture



Prélèvement d'eau

Conclusion

- Une filière qui utilise peu d'antibiotique
- Pas antibiotique critique
- Recours à la vaccination en augmentation
- Peu de données disponibles sur l'AMR en filière piscicole
- Design des études très important
- Besoin de développement de méthodes standardisées pour l'étude des bactéries aquatiques
- Pas de plan de surveillance de l'AMR pour cette filière

Perspective

- Transposition des plans de surveillances des autres filières animales ?
 - Quel indicateur bactérien ?
 - Quel échantillon ?
 - Quelle méthode ?
 -
- Surveillance « phénotypique classique » ?
- Surveillance « génotypique » : NGS ?

Ploufragan - Plouzané - Niort



**Eleveurs &
Vétérinaires**
qui ont accepté de
participer à ces études



PATRICK



SABINE



AMANDINE

BENOIT



SOPHIE



Remerciements

BENOIT
ANTHONY



écoantibio2017

Réduire l'utilisation des antibiotiques vétérinaires :
diminuer, c'est possible



MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
ET DE
L'ALIMENTATION



MINISTÈRE
DE L'ÉCOLOGIE,
DU DÉVELOPPEMENT
DURABLE
ET DE L'ÉNERGIE