

Sensibilité, résistance et profil de bactéricidie de la bacitracine vis-à-vis de souches de *Clostridium perfringens* isolées lors de cas cliniques d'Entéropathie Epizootique du Lapin.

P. RICHEZ¹, A. RICHARD¹, B. CORNEZ¹

¹TransPharm, St Geniès des Mourgues, F-34160, France

²Alpharma, Verrière le Buisson, F-91374, France

³Alpharma, Anvers, B-2610, Belgique

Résumé. La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de la bacitracine a été déterminée vis-à-vis de souches de *Clostridium perfringens* isolées lors de cas cliniques d'Entéropathie Epizootique du Lapin, conduisant à une valeur moyenne de 0.93 µg/ml pour la CMI90. Aucune souche n'était résistante et des passages en série en présence de concentrations sub-inhibitrices n'ont pas conduit à l'induction de souches résistantes. Le profil antibiotique a pu être décrit comme de type bactéricide concentration-indépendant, l'activité bactéricide étant obtenue dès le double de la valeur de CMI et n'augmentant ensuite pas en fonction de la concentration. Ce profil conduit à proposer une thérapeutique continue par l'eau de boisson.

Abstract. Susceptibility, resistance and bactericidal profile of bacitracin against *Clostridium perfringens* strains isolated during outbreaks of Rabbit Epizootic Enteropathy. Bacitracin Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against *Clostridium perfringens* strains isolated during outbreaks of Epizootic Rabbit Enteropathy was determined as an MIC90 of 0.93 µg/ml. No strains were resistant to bacitracin and serial passages in the presence of sub-inhibitory concentrations failed to induce the development of resistant strains. Bacitracin could be described as a concentration-independent bactericidal antibiotic. Bactericidal activity was obtained at a concentration corresponding to twice the MIC and did not further increase at higher levels. This profile is in favour of continuous administration, e.g. in drinking water.

Introduction

Le médicament vétérinaire BACIVET®-S a été enregistré récemment en France. Cette forme hydro soluble contient comme principe actif la bacitracine zinc (4200 UI/g) et est indiquée chez les lapins en croissance pour réduire les signes cliniques et la mortalité dus à l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) pour laquelle des souches de *Clostridium perfringens* sensibles à la bacitracine sont isolées. Le traitement doit être instauré en cas d'antécédents historiques dans l'élevage et dès les premières morts confirmées. La dose recommandée est de 420 UI de bacitracine par kg de poids vif et par jour, par voie orale via l'eau de boisson, pendant 14 à 21 jours. La bacitracine est un antibiotique polypeptidique constitué par un mélange de plusieurs polypeptides étroitement liés. Elle s'oppose à la biosynthèse au niveau de la paroi cellulaire en inhibant la pyrophosphatase impliquée dans le transport transmembranaire des précurseurs des peptidoglycane (EMA, 2001 ; Chambers, 2001). Le sel de zinc assure la stabilité de la substance active pendant sa conservation. La bacitracine possède des propriétés bactéricides vis-à-vis des coques et bacilles à Gram positif, en particulier certaines espèces de clostridies (Jawatz, 1995). Le but de cette étude était de déterminer in vitro le profil pharmacodynamique de la bacitracine vis-à-vis de souches cliniques de *Clostridium perfringens* isolées chez des lapins lors d'épisodes d'Entéropathie Epizootique du Lapin

(EEL), cette recherche incluant (i) la détermination des valeurs de Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI), (ii) la capacité éventuelle de la bacitracine à induire des résistances et (iii) le profil de bactéricidie suivi par la bacitracine.

1. Matériel et méthodes

1.1. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

Les CMI de la bacitracine ont été déterminées dans des conditions strictes d'anaérobiose en respectant les normes de mise en culture recommandées par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS, M11-A6, 2004). Cinquante et une souches ont été collectées dans des élevages de lapins atteints d'EEL en Belgique ; 34 autres souches ont été isolées en France. Ces souches ont été prélevées directement du caecum lors d'autopsie d'animaux présentant des lésions univoques. Les souches étaient indépendantes entre elles, chacune étant isolée lors d'un épisode distinct. Les souches ont été congelées à -80°C et maintenues à cette température jusqu'au jour des analyses. Après décongélation, chaque souche a fait l'objet d'un contrôle de pureté et d'une nouvelle identification (galerie API). Les cultures ont ensuite été conduites en double, avec d'une part un milieu Wilkins Chalgren pur (Oxoid, CM643) et de l'autre un Wilkins Chalgren additionné de 1.5% de gélose bacto (BD24101).

Une solution mère de bacitracine zinc à 5120 µg/ml a été préparée. Cette solution a ensuite été diluée dans le milieu de Wilkins Chalgren de façon à établir une gamme de concentrations finales entre 0.25 et 32 µg/ml. Chaque souche a été mise en culture en gélose Colombia avec 5% de sang de mouton (BioMérieux 43041) et gélose Perfringens et incubée en anaérobiose sous jarre et azote à 37±1°C pendant 18 à 22 heures avant de vérifier la pureté de la souche. Une colonie par plaque a été placée dans le bouillon Wilkins Chalgren et laissée en incubation en anaérobiose à 37±1°C pendant 18 à 22 heures. Le lendemain, la culture obtenue a été diluée dans du bouillon Wilkins Chalgren frais de façon à obtenir une densité bactérienne de 10⁷ UFC/ml (densité optique de 0,1–0,15). Une quantité de gélose Wilkins Chalgren autoclavée (18 ml) avec 2 ml de chaque dilution de bacitracine zinc a ensuite été déposée dans des boîtes de Petri. 10 µl de la suspension bactérienne (soit 10⁵ cellules) ont ensuite été ajoutés à chaque milieu, deux boîtes témoins étant laissées sans antibiotique pour chaque souche. Chaque souche a ainsi été testée en double en anaérobiose stricte (en jarre et sous azote) à 8 niveaux de concentration (0.25 à 32 µg/ml) en progression géométrique d'ordre 2, deux témoins négatifs permettant de vérifier la culture spontanée et l'absence d'interférence.

La concentration minimale inhibitrice correspondait à la plus faible concentration inhibant la croissance bactérienne. Les concentrations ont été exprimées en µg de bacitracine zinc par ml, sur la base d'une activité de 63 UI/mg pour le lot utilisé. Le pourcentage d'inhibition cumulé a été calculé pour chaque concentration. Les résultats pour chaque pays, puis les résultats cumulés, ont été traités par ajustement à une courbe de type sigmoïde. Le logiciel utilisé était WinNonlin 4.02 (Pharsight, USA). La relation entre la concentration en bacitracine zinc et le pourcentage d'inhibition cumulée était représentative d'une loi d'action de masse conduisant à l'équation : $E = [(E_{max} \times C^{\gamma}) / (C^{\gamma} + EC50^{\gamma})]$

Où E = effet (pourcentage d'inhibition), E_{max} = effet maximum théorique (100% en théorie), gamma = pente de la réponse, EC50 = concentration correspondant à la réponse moyenne (50%) et C = concentration en bacitracine zinc (µg/ml).

Cette équation a permis ensuite le calcul de la CMI₉₀ (valeur statistique correspondant à 90% d'inhibition cumulée) par interpolation.

1.2. Induction de résistances

Une des souches isolées dans l'essai décrit ci-dessus (CMI = 2 µg/ml) a ensuite été mise en culture dans un milieu identique, mais avec une concentration subinhibitrice en bacitracine zinc (1 µg/ml, soit 50% de la CMI). Les colonies issues de cette culture ont à nouveau été transférées dans un milieu contenant 50% de la CMI initiale. Sept passages en série ont ainsi été mis en œuvre. La CMI a été déterminée à l'issue de chaque passage comme indiqué au chapitre précédent.

1.3 Profil de bactéricidie

Cinq souches isolées lors de l'étude de détermination de la CMI ont été mises en culture à une densité fixe de 10⁷ UFC/ml en anaérobiose en présence de concentrations croissantes de bacitracine zinc, de 0.5 à 8 fois la valeur de CMI. Des isollements bactériens ont été prélevés à T0, puis après 2, 4, 6 et 24 heures de façon à déterminer la taille de l'inoculum résiduel. La technique de comptage présentait une limite de quantification de 100 (10²) UFC/ml. En accord avec les conventions internationales, une activité bactéricide correspondait à une diminution de la taille de l'inoculum de départ par un facteur 1000.

2. Résultats

Toutes les souches isolées ont été inhibées par la bacitracine zinc *in vitro*. Les concentrations inhibitrices étaient comprises entre 0.5 et 2 µg/ml, aucune souche ne répondant à 0.255 µg/ml et 100% d'entre elles étant inhibées à 2 µg/ml. Les résultats des mesures de CMI figurent dans le tableau 1, les résultats des calculs des relations % inhibition = f (concentration) dans le modèle sigmoïde étant présentés dans le Tableau 2.

Tableau 1 : Pourcentages d'inhibition cumulée en fonction de la concentration en bacitracine zinc dans le milieu de culture

Bacitracine zinc (µg/ml)	France (n=34)	Belgique (n=51)	France + Belgique (n=85)
0.25	0%	0%	0%
0.50	47.1%	31.4%	37.6%
1.0	94.1%	90.2%	91.7%
2.0	100.0%	100.0%	100%

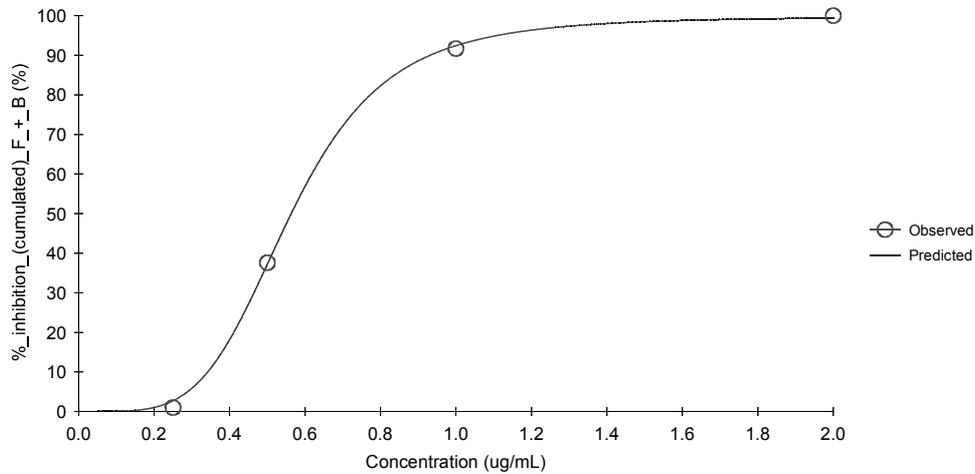
Tableau 2 : Paramètres de l'équation $E = [(E_{max} \times C^{\gamma}) / (C^{\gamma} + EC50^{\gamma})]$ obtenus pour chaque pays et pour le cumul des souches (n = 85).

Paramètre de l'équation en E _{max}	France	Belgique	France + Belgique
E _{max} (%)	100.3	98.9	99.8
EC50 (µg/ml)	0.60	0.51	0.56
Gamma	4.36	5.0	4.40
CMI ₉₀ (µg/ml)	0.80	0.99	0.93

Tableau 3 : Résultats des mesures de CMI après 7 passages en série en milieu sub-inhibiteur, montrant l'absence de modification notable de la CMI.

Transfert N°	CMI - µg/ml
0	2
1	3
2	3
3	3
4	4
5	3
6	2
7	2

Figure 1 : courbe décrivant le modèle sigmoïde pour l'ensemble des souches (France + Belgique, n = 85) et montrant la bonne adéquation entre points théoriques et points expérimentaux

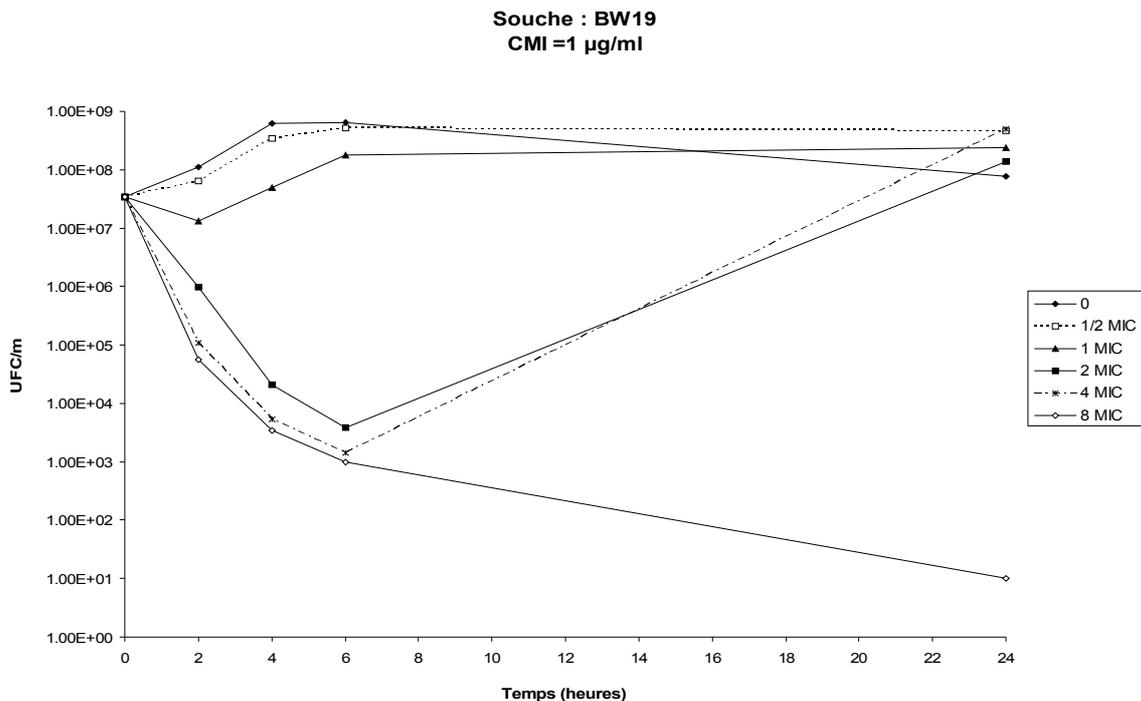


Les résultats ne différant pas entre la France et la Belgique, une analyse commune a été conduite, conduisant au profil décrit dans la Figure 1.

Ces résultats indiquent que la CMI90 de la bacitracine zinc est de l'ordre de 0.93 µg/ml vis-à-vis de souches de *Clostridium perfringens* de terrain isolées en conditions cliniques. Les recherches d'induction de résistances n'ont montré aucune tendance à l'augmentation des CMI après 7 passages en série en milieu sub-inhibiteur (Tableau 3). Les profils de bactéricidie ont été semblables pour les 5 souches testées. Un exemple typique est donné pour une des

souches (BW 19, CMI = 1 µg/ml) dans la Figure 2. Le profil obtenu montre un effet bactéricide, caractérisé par une diminution de la taille de l'inoculum de départ par un facteur 10^3 (diminuant donc ici de $10^{7.5}$ UFC/ml à $10^{4.5}$ UFC/ml), sensible dès la concentration en bacitracine correspondant à 2 fois la CMI (2 µg/ml ici). Les concentrations supérieures ne permettaient pas de diminuer de façon sensible la diminution de la densité bactérienne, sauf à la concentration la plus élevée au temps T+24 heures. Ce profil caractérise les antibiotiques bactéricides concentration-indépendants (temps-dépendants).

Figure 2 : Courbe typique décrivant la cinétique de bactéricide de la bacitracine vis-à-vis de *C. perfringens*.



Chaque point représente la densité bactérienne résiduelle en fonction du temps après exposition à des concentrations croissantes entre 0 et 8 fois la valeur de CMI, soit 0 à 8 µg/ml pour la souche testée.

Conclusion

La bacitracine zinc ressort de ces essais comme un antibiotique actif de façon remarquablement homogène vis-à-vis des souches cliniques de *Clostridium perfringens* isolées lors d'épisodes d'EEL. Les CMI étaient comprises entre 0.5 et 2.0 µg/ml, ce qui ne représente que trois degrés de dilution dans l'approche *in vitro* retenue. Aucune différence significative n'a été constatée entre la France et la Belgique, ce qui confirme la forte homogénéité de la sensibilité des souches de terrain. L'absence de résistance dans ces deux pays n'est pas surprenante ; les tentatives d'induction de résistance par passages réitérés en présence de concentrations subinhibitrices de bacitracine zinc (50% de la CMI), conditions habituellement favorables à leur émergence, plaide en faveur d'un risque faible lors de l'utilisation du Bacivet®-S en conditions cliniques. Ceci devra toutefois être éventuellement révisé à la lumière d'une longue utilisation. Les résultats obtenus *in vitro* ont par ailleurs démontré un mode d'action de type bactéricide concentration-indépendant (temps dépendant), l'effet bactéricide se manifestant dès les concentrations correspondant à 2 fois la valeur de CMI. Pour une valeur de CMI₉₀ de 0.9 µg/ml en France et en Belgique (valeur proche de celle mesurée pour la tiamuline par exemple, Bouvier *et al.*, 2005), il est donc possible de prédire une valeur de concentration bactéricide (CMB₉₀) de l'ordre de 1.8 µg/ml pour les souches visées. La concentration en bacitracine zinc disponible au site d'action (caecum chez le lapin) devra donc être maintenue à cette valeur pendant toute la durée du traitement, en accord avec le profil pharmacodynamique mis en évidence dans

ces essais. Une telle contrainte permet par ailleurs de limiter encore plus les risques, faibles, de création de résistances. Le calcul de la posologie optimale sur des bases pharmacocinétiques / pharmacodynamiques (PK/PD, Richez *et al.*, 2007) devra donc prendre en compte ce requis pharmacodynamique (McKellar *et al.*, 2004) à la lumière des résultats obtenus dans les présents travaux.

Références

- BOUVIER A.C., JACQUINET C., MANCO B. 2005. Etude récente sur la sensibilité de différentes souches de *Clostridium* prélevées sur des lapins avec signes d'EEL, vis-à-vis de la tiamuline. 11^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, Paris, 29-30 novembre 2005, 253-256.
- CHAMBERS H.F. 2001. Bacitracin, in *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics* 10th ed. J.G. Hardman & L.E. Limbird Eds., McGraw Hill, New York, USA, 1265-1266.
- JAWATZ E. 1995. Bacitracin, in *Basic and Clinical Pharmacology* 6th ed. Katzung B.G. Ed., Appleton & Lange, East Norwalk, USA, 739.
- McKELLAR Q.A., SANCHEZ BRUNI S.F., JONES D.G. 2004. Pharmacokinetic/ pharmacokinetic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 27 (6) 503-514.
- NCCLS/CLSI 2004. *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard*, 6th ed. M11-A6, 24 (2)
- RICHEZ P., RICHARD A., CORNEZ B. 2007. Pharmacocinétique digestive de la bacitracine chez le lapin après administration continue par l'eau de boisson d'une spécialité pharmaceutique hydrosoluble (Bacivet®-S): Mesure de la biodisponibilité systémique et des résidus tissulaires. 12^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, 27-28 novembre 2007.
- THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS (EMA) (2001) – Committee for Veterinary Medicinal Products - Bacitracin: summary report (2) – EMA/MRL/768/00-FINAL (January 2001).