



JNI

14^{es} Journées
Nationales
d'Infectiologie

Clermont-Ferrand
et l'interrégion Rhône-Alpes Auvergne

Du mercredi 12 au
vendredi 14 juin 2013
Polydome, centre d'expositions
et des congrès



Modèles in vitro et tests antibiotiques

Julien Buyck, Dr Sc.

En collaboration avec Françoise Van Bambeke, Dr Sc. Pharm.,
Eugénie Basseres, Dr Sc., & Paul M. Tulkens, Dr Med.

Pharmacologie cellulaire et moléculaire

Louvain Drug Research Institute

Université catholique de Louvain,

Bruxelles, Belgique



Avec approbation de la plateforme belge d'éthique médicale - visa n° 13/V1/5773/052539



Les antibiotiques sauvent-ils toujours ?

Obituary

J.-M. Ghuysen



Cet homme a découvert le mode d'action des pénicillines

*Ann. Rev. Biochem. 1979. 48:73-101
Copyright © 1979 by Annual Reviews Inc. All rights reserved*

USE OF MODEL ENZYMES IN THE DETERMINATION OF THE MODE OF ACTION OF PENICILLINS AND Δ^3 -CEPHALOSPORINS¹

*Jean-Marie Ghuysen, Jean-Marie Frère, Mélina Leyh-Bouille,
Jacques Coyette, Jean Dusart, and Martine Nguyen-Distèche*

Service de Microbiologie, Faculté de Médecine, Institut de Botanique,
Université de Liège, 4000 Sart Tilman, Liège, Belgium

...et est décédé d'une infection pneumococcale invasive

Quelles sont les méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques ?

- L'activité des antibiotiques est établie sur base de méthodes *in vitro* pour des raisons évidentes de facilité et de possibilité de standardisation
- **A ce jour, trois grandes normes à considérer**
 - **EUCAST** (Europe – la SFM en fait partie officielle)
 - **CA-SFM** (France et plusieurs pays francophones)
 - **CLSI** (Etats-Unis et un grand nombre d'autres pays)
- **Objectifs:**
 - Standardiser les méthodologies
 - Etablir des concentrations critiques
 - S'accorder sur l'expression des concentrations critiques



<http://www.sfm-microbiologie.org>



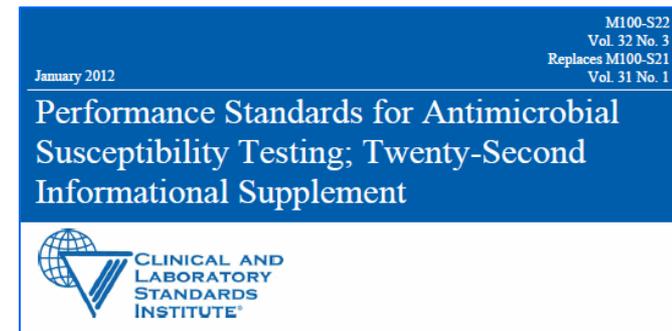
Antimicrobial susceptibility testing

Media preparation
 MIC determination
 Disk diffusion methodology
 Disk diffusion implementation
 Compliance of manufacturers
 Breakpoint tables
 QC Tables
 Calibration and validation
 Guidance documents
 Projects and data submission
 Previous versions of tables



<http://www.eucast.org>

<http://www.clsi.org/>



EUCAST



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Les objectifs de l'EUCAST ont été définis de la façon suivante :

- standardiser les méthodologies ;
- s'accorder sur l'expression des concentrations critiques : celle qui a toujours prévalu en France a été retenue, soit $S \leq x$ mg/L et $R > y$ mg/L ;
- établir des « cut-off values » séparant pour chaque couple espèce-antibiotique, la population des souches sauvages de celles porteuses d'un ou plusieurs mécanismes de résistance acquise ;

- établir des concentrations critiques pour la catégorisation clinique, d'une part, en rédigeant en accord avec l'EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) une procédure pour les nouveaux antibiotiques et, d'autre part, en tentant d'harmoniser les concentrations critiques nationales des antibiotiques existants sur de nouveaux arguments solides, notamment des points de vue pharmacocinétique et pharmacodynamique ainsi que clinique.

EUCAST

- Consensus Européen (UK, FR, NL, DE, SV, NO)
- Budget Européen (pas de liens commerciaux)
- "*Breakpoints*" communs au travers de l'Europe (!)



cefotaxime vs. <i>E. coli</i>		S_≤ / R
BSAC	United Kingdom	2 / ≥4
CA-SFM	France	4 / >32
CRG	The Netherlands	4 / >16
DIN	Germany	2 / ≥16
NWGA	Norway	1 / ≥32
SRGA	Sweden	0.5 / ≥2

- Méthodologie commune pour les méthodes par disque
- Tout est exprimé en termes de CMI (méthode ISO)

CLSI: attention !



- Since 2006, FDA has reasserted its legal rights to define official breakpoints
- CLSI may determine and publish breakpoints BUT no sooner than 24 months after FDA decision (and only if the company requests this [?])
- In the meantime, only FDA breakpoints will be legal in the US, and will be essentially geared to the protection of the **US** Public for drugs registered in the US.
- Non-US organizations have no direct possibility to impact on the FDA-decision process ...

communicated at the General meeting of EUCAST during the 17th ECCMID & 25th ICC (Munich, Germany) by the CLSI representative

Comparaison des normes pour la détermination des CMI et la réalisation de l'antibiogramme

Pseudomonas aeruginosa

	CA-SFM	EUCAST	CLSI
Souche référence	ATCC 27853		
Culture	o/n bouillon ou gélose		
Inoculum	0.5 McFarland		
Milieu	Mueller-Hinton (agar ou bouillon)		CA-MHB (ou MHA)
Temps incubation	18-24h 35-37°C	18 ± 2 h 35 ± 1°C	16-20 h 35 ± 2°C

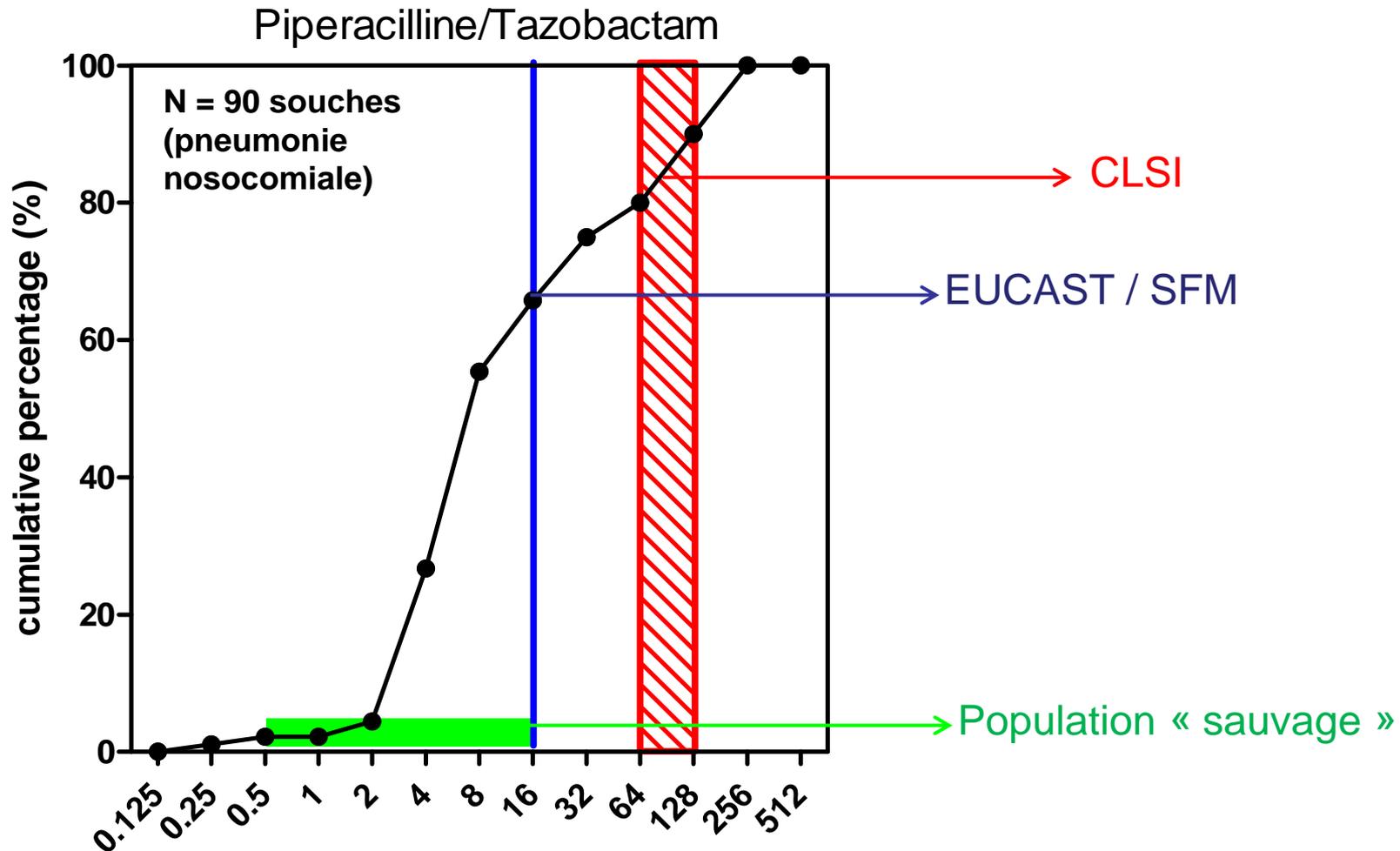
Comparaison des “breakpoints”

Pseudomonas aeruginosa

CMI (mg/L)	Ca-SFM		Eucast		CLSI	
	S	R	S	R	S	R
Tobramycin	≤ 4	> 4	≤ 4	> 4	< 4	> 16
Ciprofloxacin	≤ 0.5	> 1	≤ 0.5	> 1	< 1	> 4
Piperacillin/ Tazobactam	≤ 16	> 16	≤ 16	> 16	< 16	> 128
Colistin	≤ 2	> 4	≤ 4	> 4	< 2	> 8

Comparaison des “breakpoints”

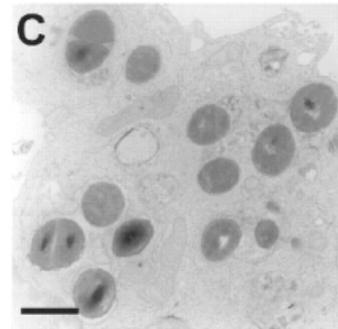
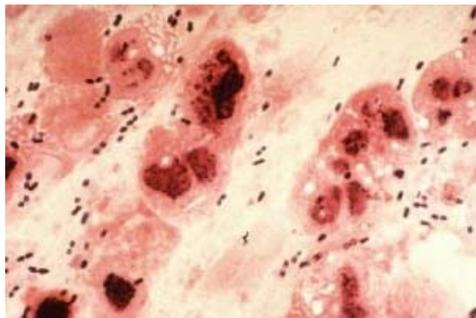
Pseudomonas aeruginosa



Riou *et al.*, Int J Antimicrob Agents. 2010; 36:513-22.

Devons nous améliorer les méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques ?

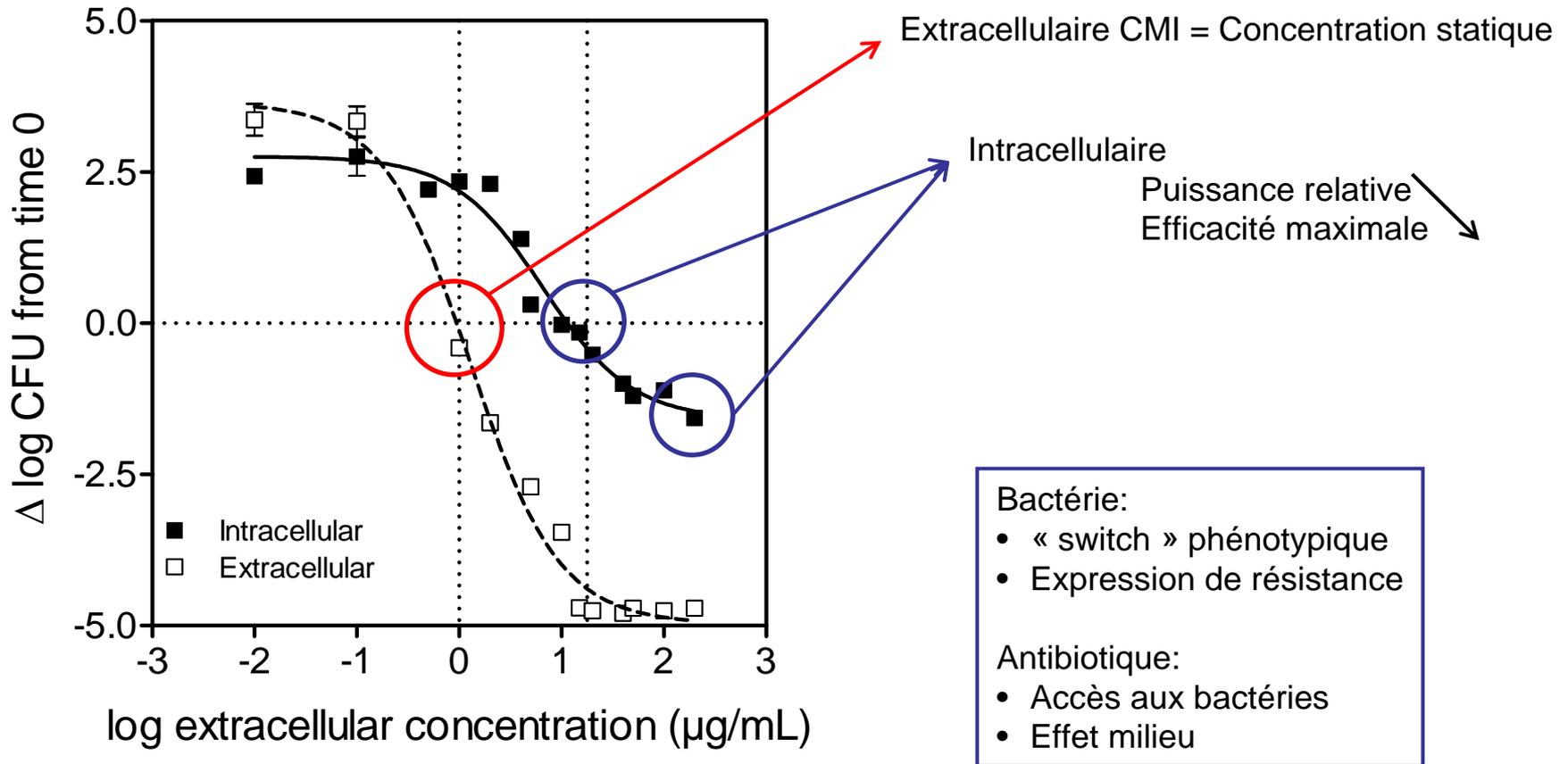
- Les méthodes sont définies par les normes établies pour les bactéries en bouillon ou sur gélose...
- Mais, ces méthodes sont-elles les bonnes pour des bactéries
 - dans un foyer infectieux (milieu, densité, SCV ...)
 - en "communauté structurée" (biofilm)
 - dans des niches "protégées" (intracellulaires, abcès, ...)



Activité intracellulaire des antibiotiques

- Infection intracellulaire

Gentamicin



Buyck et al., Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57:2310-8

Quelle est l'importance du milieu ?

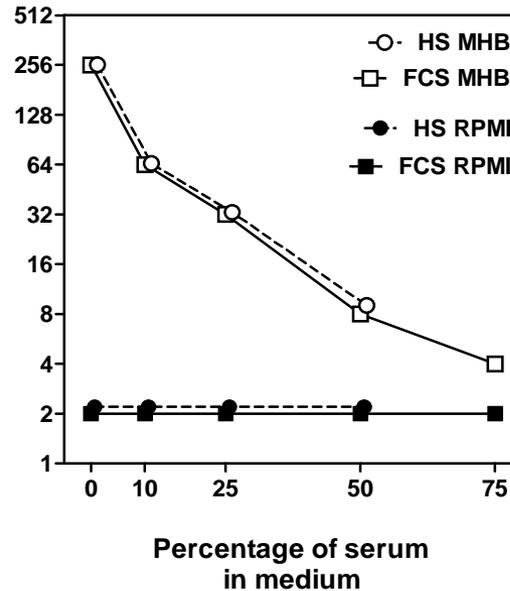
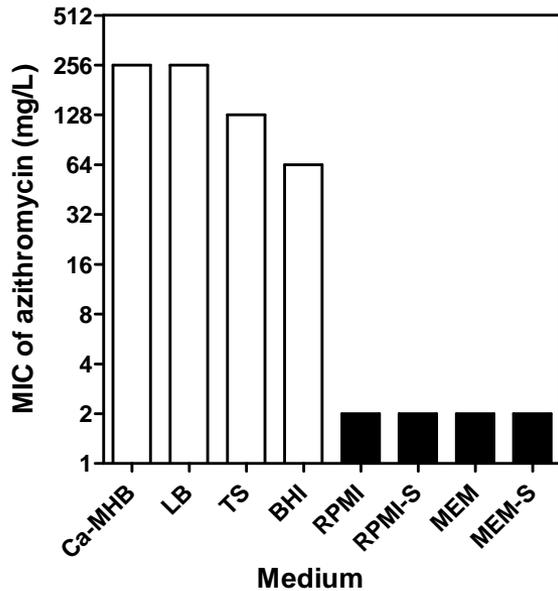
- Infection intracellulaire = antibiotiques en milieu pour cellules eucaryotes...

Antibiotic	MIC (mg/L)		
	CA-MHB		RPMI-1640
	pH 7.4	pH 5.5	
Aminoglycosides			
Gentamicin	2	8	4
Amikacin	4	64	4
Tobramycin	1	8	1
β-lactams			
Piperacillin/Tazobactam	16	16	16
Cefepime	4	8	4
Ceftazidime	2	4	2
Aztreonam	8	16	8
Meropenem	1	1	2
Fluoroquinolones			
Ciprofloxacin	0.125	0.25	0.125
Polymyxins			
Colistin	1	2	2
Azithromycine	128	>512	16

Buyck et al. Clin Infect Dis. 2012; 55:534-42

Quelle est l'importance du milieu ?

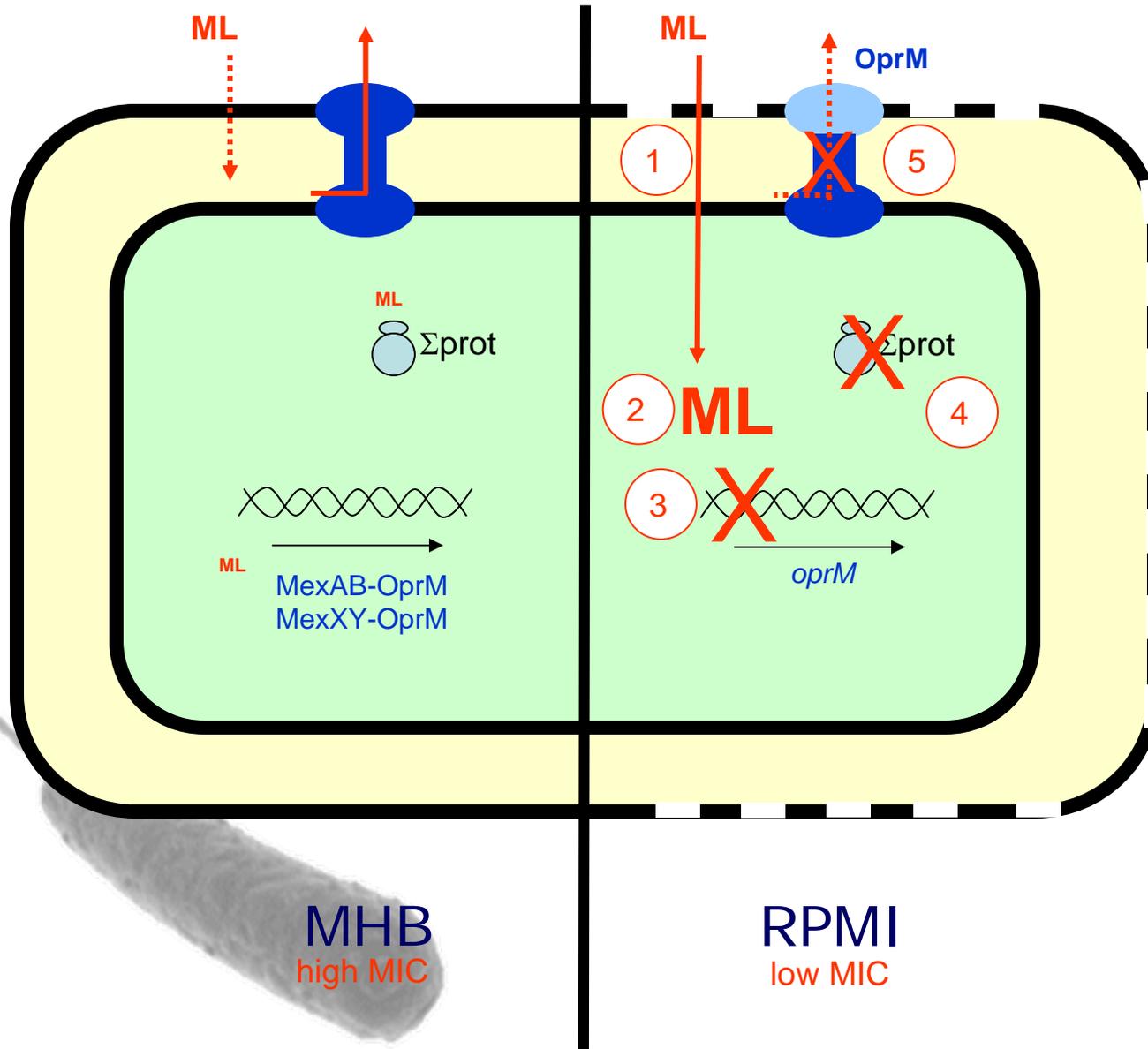
- Influence du milieu sur les CMI des macrolides



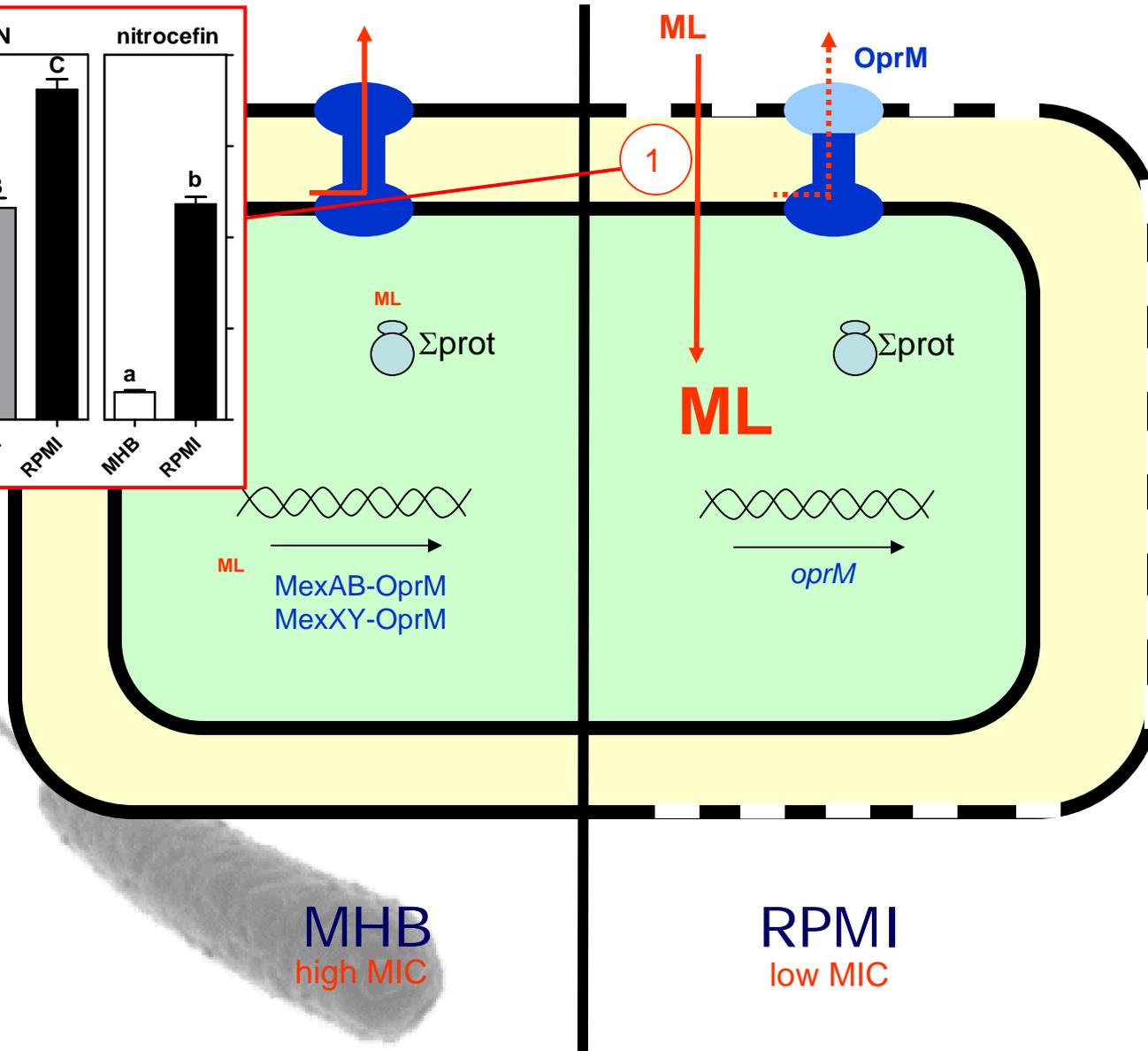
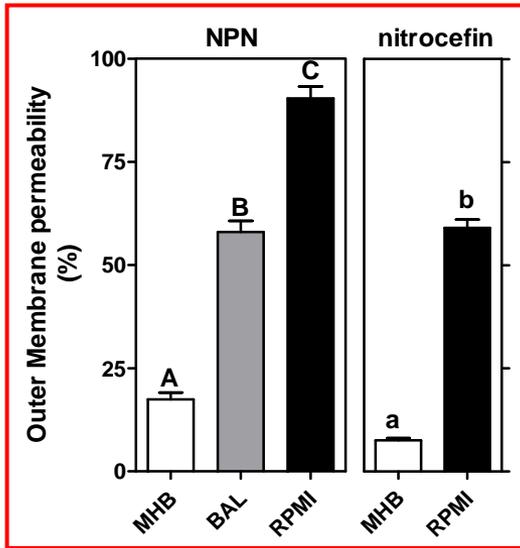
MICs in mice BAL = 16 mg/L

L'activité de l'AZM est meilleure dans les milieux « biologiques »

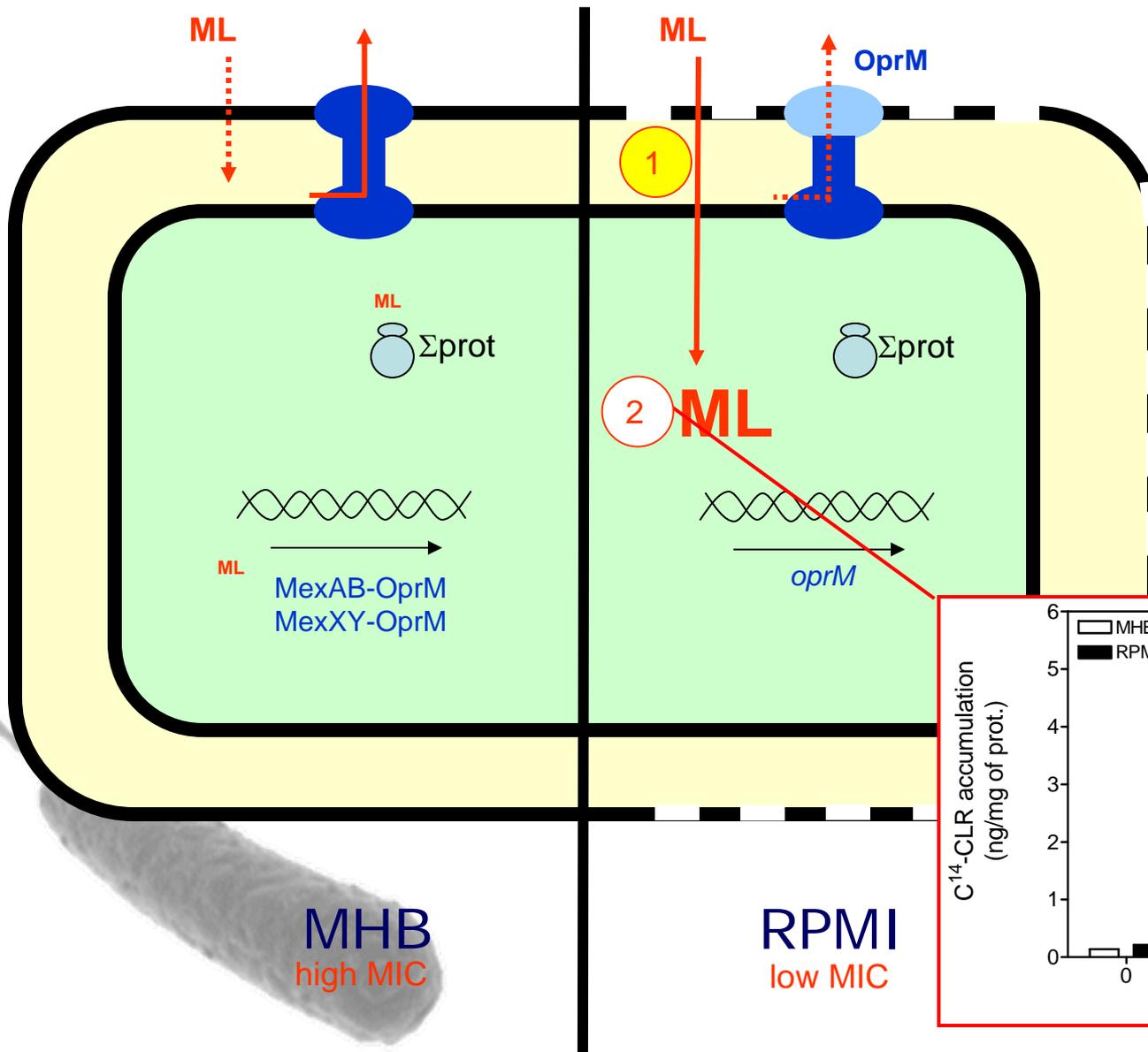
Quelle est l'importance du milieu ?



Quelle est l'importance du milieu ?

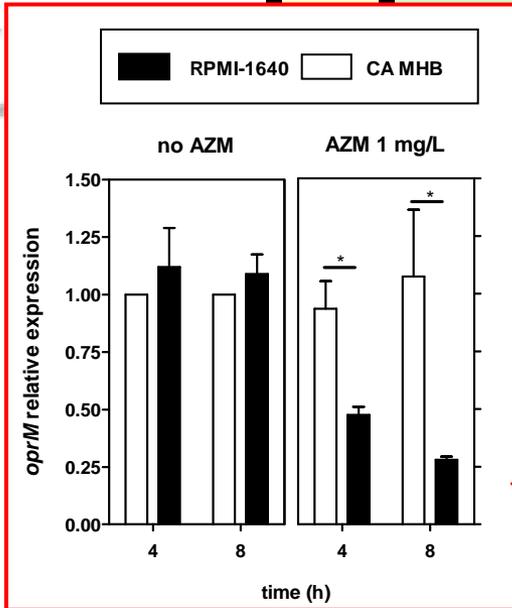
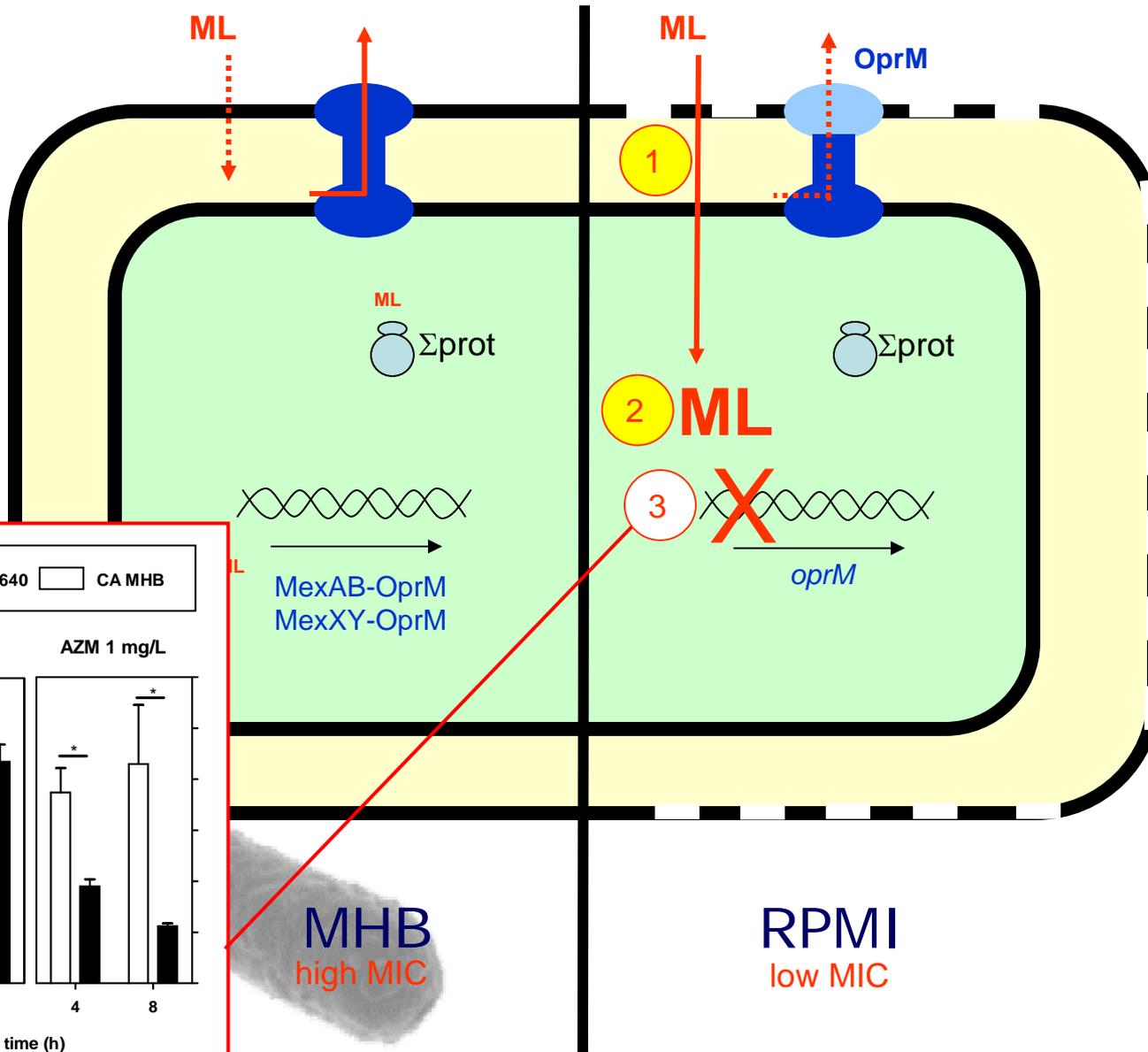


Quelle est l'importance du milieu ?

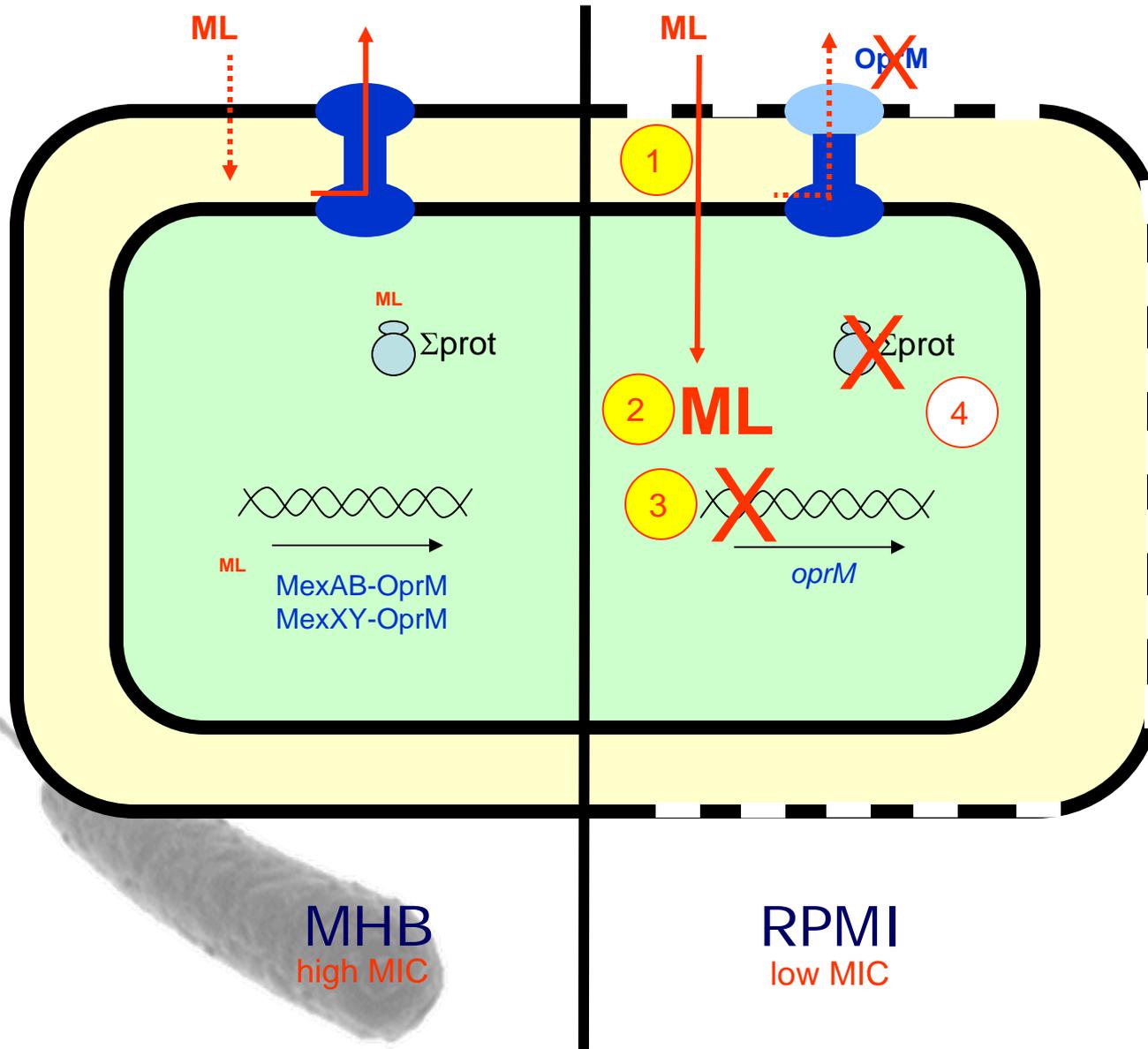


Buyck et al. Clin Infect Dis. 2012; 55:534-42

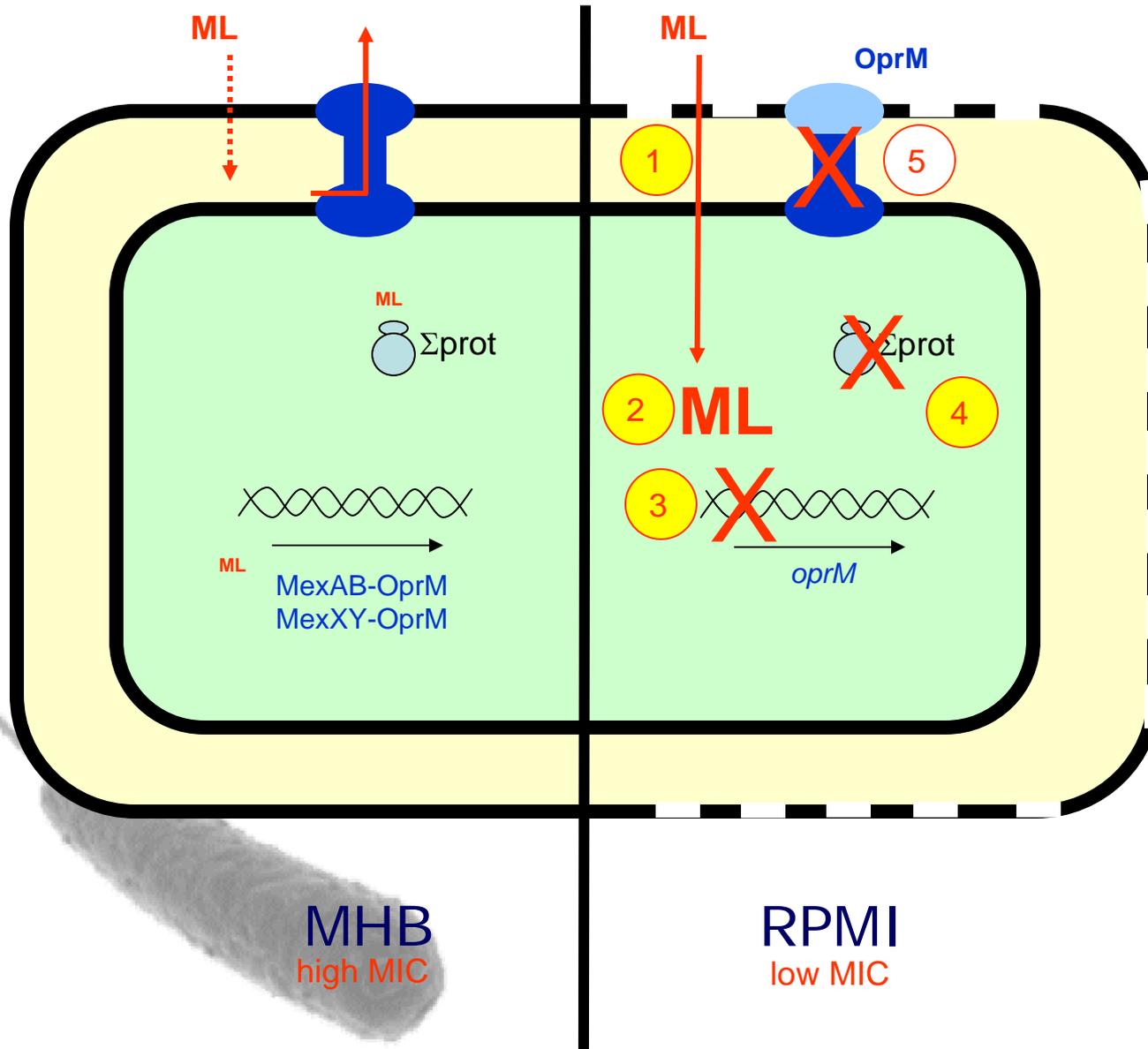
Quelle est l'importance du milieu ?



Quelle est l'importance du milieu ?



Quelle est l'importance du milieu ?



Et pour le biofilm ?

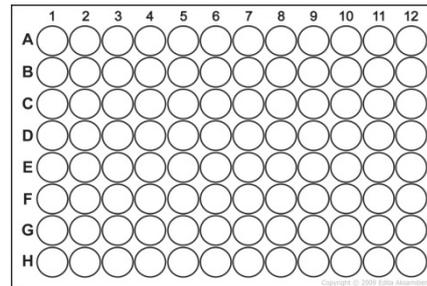
- Modèle de biofilm dans l'ASM (artificial sputum medium)

L'ASM mime l'environnement retrouvé dans les poumons des patients mucoviscidosiques :

- Croissance des bactéries plus lente
- Habilité à former des micro- et macro-colonies

P. aeruginosa + ASM
 Croissance 24h (biofilms jeunes) ou 12 jours
 (biofilms matures).

ASM: mucine
 ADN
 amino acids
 sels
 jaune d'oeuf
 chélateur de fer



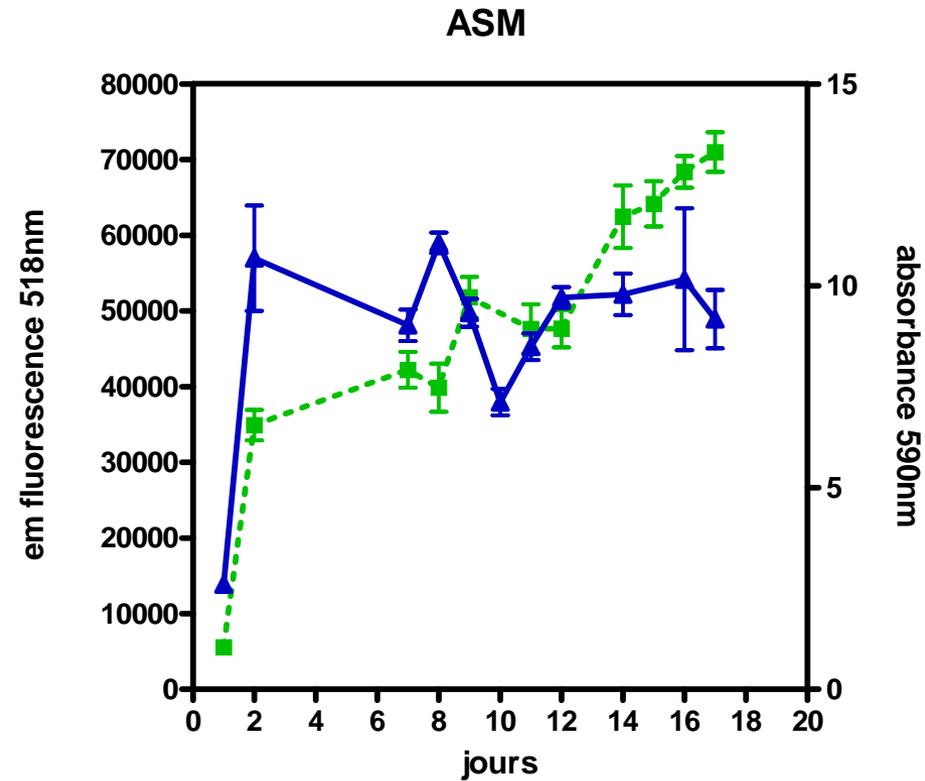
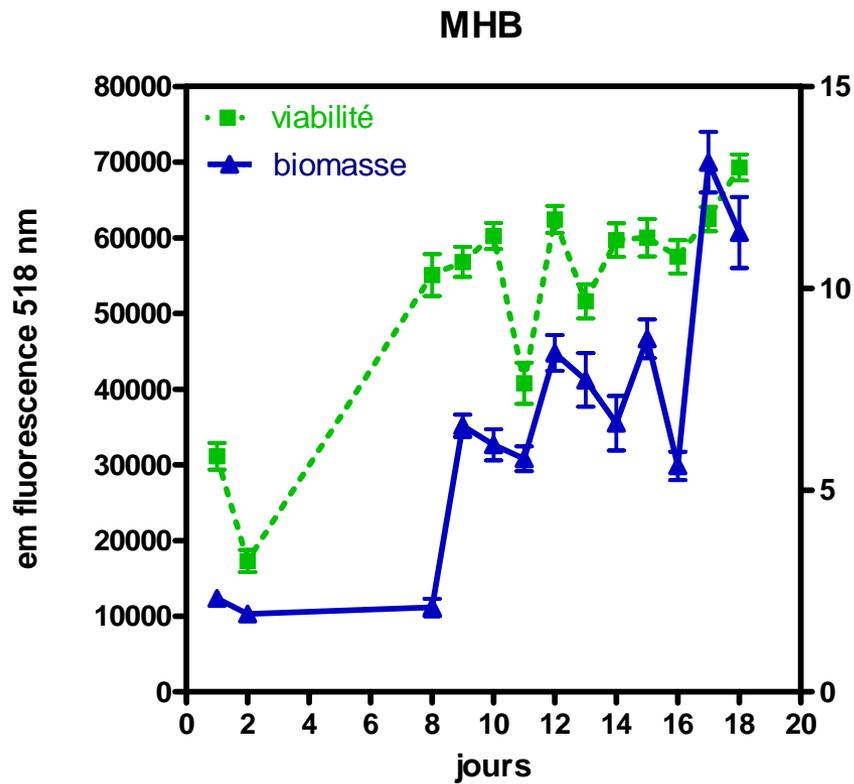
Crystal violet
 Liaison à la matrice
 ➤ **biomasse**

Fluorescein DiAcetate
 Molécule qui fluoresce
 quand elle est clivée par
 les estérases
 ➤ **viabilité**

(Sriramulu *et al.*, 2005)

Et pour le biofilm ?

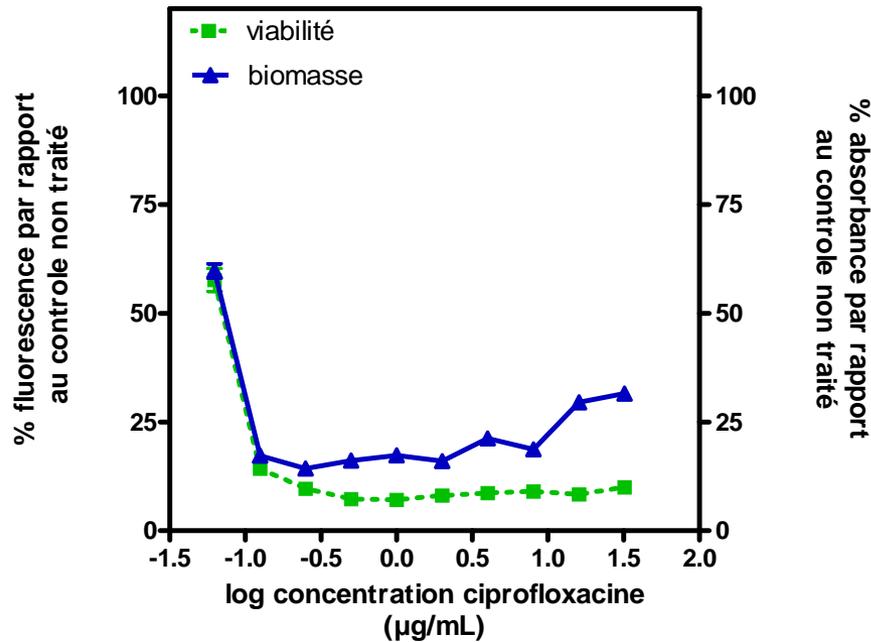
- Développement du biofilm



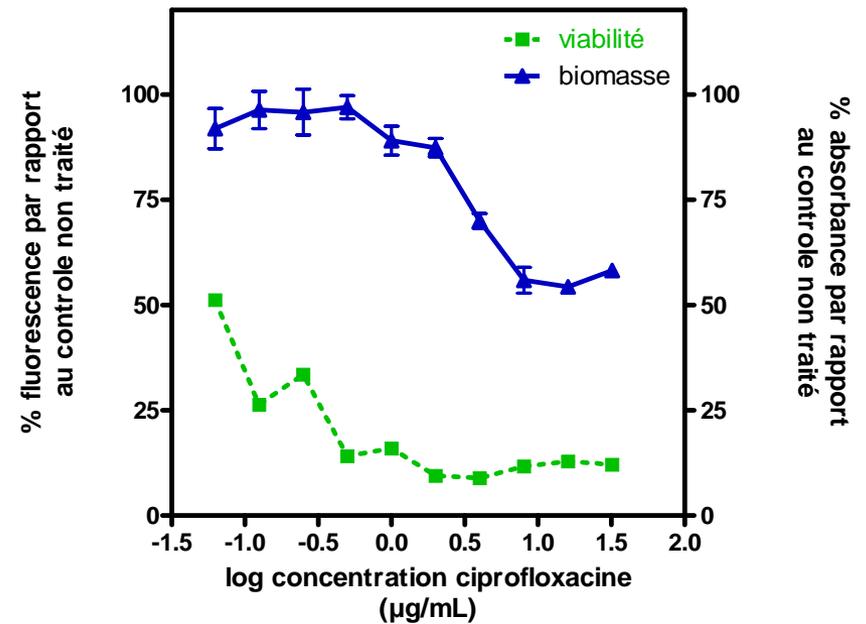
Et pour le biofilm ?

- Activité des antibiotiques sur les biofilms matures
 - Biofilms de 12 jours, traitement antibiotique de 24 h

MHB



ASM



Conclusions

- Les normes sont une chose pour le laboratoire (et sont utiles) ... mais la réalité pour l'infectiologue en est une autre
- Des efforts pourraient être faits pour définir des milieux utilisables *in vitro* qui soient plus pertinents de la situation clinique
- La situation prévalent *in vivo* devrait être mieux modélisée en termes de réponse aux antibiotiques
- L'impact du biofilm sur l'évaluation de la sensibilité est essentiel et devrait être inclus dans les méthodes standards

Déclaration de Transparence

- Le laboratoire a bénéficié de crédits de sources nationale belge (Politique Scientifique Fédérale), communautaire (Fonds de la Recherche Scientifique) et régionales (Région de Bruxelles-Capitale/*Brussels Hoofdstedelijke Gewest* et Région Wallonne)
- Les activités concernant l'étude des biofilms est soutenue par SMB-Galephar (Belgique) et Rib-X Pharmaceuticals (Etats-Unis)
- Cette présentation a été soutenue par BioFilm Control SAS.