

ETUDE 03 465/013

Etude 03-465 / 013

DETERMINATION DES CMI ET QMI DES PRODUITS AIR PHARMA SUR DES SOUCHES BACTERIENNES MULTIRESISTANTES

I. IDENTIFICATION DU LABORATOIRE D'ESSAI

Laboratoire de Bactériologie, Virologie et Microbiologie Industrielle
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35, Chemin des Maraîchers
31062 Toulouse Cedex 4
FRANCE

Responsable du Laboratoire

Dr C. ROQUES

Responsable de la Recherche
et de la Manipulation

Dr V. G. de BILLERBECK

Responsable de la Qualité

Dr J. BACARIA

II. IDENTIFICATION DU CLIENT

AIR PHARMA
337, Avenue des Terres Noires
81370 SAINT-SULPICE
FRANCE

III. OBJECTIF

Evaluation de l'activité antibactérienne du produit AIR PHARMA 505 vis-à-vis de souches bactériennes multi-résistantes responsables de maladies nosocomiales. *Escherichia coli* est responsable d'infections nosocomiales dans 19 % des cas (infections localisées principalement dans l'urine et le sang), *Staphylococcus aureus*, dans 10 % des cas (au

niveau des plaies, de la peau et le sang) et *Pseudomonas aeruginosa* dans 9 % des cas (infections localisées dans l'urine, le sang, les plaies et l'appareil respiratoire).

IV. MATERIEL

1. Produit-essai

Produit 505

Il contient des huiles essentielles de *Cannelle*, *Thym rouge*, *Eucalyptus* et *Citronnelle* et un émulsifiant non ionique E 40. Le lot No. D-187/133-2 utilisé a été reçu en Septembre 2000, conditionné dans un bidon en aluminium fermé hermétiquement et conservé à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Il est utilisé par micronisation directe en atmosphère ou dans les réseaux de climatisation dans le domaine hospitalier (blocs opératoires des hôpitaux, cliniques et salles blanches) et en agro-alimentaire.

2. Souches bactériennes

2.1. *Staphylococcus aureus* (origine : souche hospitalière)

2.2. *Escherichia coli* (origine : souche hospitalière)

2.3. *Pseudomonas aeruginosa* (origine : souche hospitalière)

V. METHODES

1. Méthode en milieu gélosé

Différentes concentrations de produit (0,03 %; 0,06 %; 0,12 %; 0,25 %; 0,50 %) sont incorporées dans le milieu de culture (Trypcase-soja). Après solidification, l'inoculation des géloses est effectuée en surface, sous forme de dépôts de 1 µl, déposés à l'aide d'un inoculateur multipoint (DENLEY). Trois dépôts sont réalisés par bactérie, à partir de suspensions-tests correspondant à des concentrations de 10^5 , 10^4 et 10^3 bactéries/dépôt respectivement. Après incubation à 37°C pendant 24 h, la croissance est comparée à celle du témoin. La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) est définie comme la plus petite concentration de produit pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans produit. Les inoculums qui n'ont pas poussé sont repiqués avec un emporte-pièce sur du milieu Trypcase-soja neuf et placés en incubation à 37°C. Cette subculture est observée pendant 7 jours et permet de définir si l'action du produit est bactéricide (arrêt définitif de la croissance) ou bactériostatique (inhibition transitoire de la croissance). La

CMB (Concentration Minimale Bactéricide) est alors définie comme la plus petite concentration de produit pour laquelle aucune croissance n'est visible après 7 jours d'incubation en subculture.

2. Méthode en micro-atmosphère

Cette méthode en boîte de Petri constitue une première approche pour l'étude de l'activité antimicrobienne des vapeurs de produits volatils. Différentes quantités de produit (10, 20, 40, 80 et 160 µl) sont déposées sur un papier filtre placé au fond du couvercle de la boîte de Petri. L'inoculation des géloses (Trypcase-soja) est effectuée en surface, sous forme de dépôts de 1 µl, déposés à l'aide d'un inoculateur multipoint (DENLEY). Trois dépôts sont réalisés par bactérie, à partir de suspensions-tests correspondant à des concentrations de 10^5 , 10^4 et 10^3 bactéries/dépôt respectivement. Après incubation à 37°C pendant 24 h, la croissance est comparée à celle du témoin. La QMI (Quantité Minimale inhibitrice) est définie comme la plus petite quantité de produit pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans produit. Les inoculums qui n'ont pas poussé sont repiqués avec un emporte-pièce sur du milieu Trypcase-soja neuf et placés en incubation à 37°C. Cette subculture est observée pendant 7 jours et permet de définir si l'action du produit est bactéricide (arrêt définitif de la croissance) ou bactériostatique (inhibition transitoire de la croissance). La CMB (Concentration Minimale Bactéricide) est alors définie comme la plus petite concentration de produit pour laquelle aucune croissance n'est visible après 7 jours d'incubation en subculture.

3. Aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de cellulose imprégné d'huile essentielle ou de produit à base d'huiles essentielles. Une suspension de chaque germe est préparée en eau distillée stérile et ajustée à 10^8 , 10^7 et 10^6 bactéries/ml. Chaque suspension (100 µl) est étalée sur boîte de Petri de 90 mm de diamètre. La surface des boîtes est séchée sous hotte à flux laminaire avec le couvercle des boîtes légèrement ouvert. Des disques de papier buvard stériles de 5 mm de diamètre sont ensuite déposés sur les géloses ensemencées avec les différents micro-organismes. Ils sont imprégnés d'huile essentielle ou de produit à base d'huiles essentielles (20 µl par disque). Des dilutions du produit 505 en eau distillée stérile (1/2, 1/4, 1/8 et 1/10) sont également réalisées et déposées sur les disques (20 µl par disque). La

lecture des diamètres d'inhibition D se fait après 24-48 h d'incubation à l'étuve à 37 °C. Les résultats sont exprimés selon trois niveaux d'activité : résistant ($D < 6$ mm), intermédiaire ($13\text{mm} \geq D \geq 6$ mm) et sensible ($D > 13$ mm).

VI. RESULTATS

1. Méthode en milieu gélosé

BACTERIES INOCULUM	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
10 ⁵ bactéries/dépôt	0,5	0,5	0,5	0,5	0,12	0,25
10 ⁴ bactéries/dépôt	0,5	0,5	0,25	0,25	0,12	0,12
10 ³ bactéries/dépôt	0,5	0,5	0,25	0,25	0,12	0,12

Tableau 1. Activité inhibitrice de croissance du produit AIR PHARMA 505 incorporé dans le milieu Trypcase-soja gélosé après 24 h d'incubation à 37°C. La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) est exprimée en pourcentage (v/v) de produit dans le milieu.

TIC	PIP	TCC	CTX	TZP	FEP	CAZ	ATM	IPM	CS	PEF	CIP	AN	TM	GM	K
R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	I	R	I	R	R

Tableau 2. Antibiogramme réalisé sur la souche hospitalière de *P. aeruginosa*.

S : sensible (D > 13 mm), I : intermédiaire (6 mm < D < 13 mm), R : résistant (D < 6mm).

TIC : Ticarcilline, PIP : Piperacyline, TCC : Ticar-Ac.Clav. ; CTX : Cefotaxine, TZP : Piper+Tazo-Bactam, FEP : Cefepime, CAZ : Ceftazidine, ATM : Aztreonam, IPM : Imipenem, CS : Colistine, PEF : Pefloxacine, CIP : Ciprofloxacine, AN : Acide Nalixidique, TM : Tobramycine, GM : Gentamycine, K : Kanamycine.

VA	FOS	FA	RA	SXT	PEF	TEC	PB	L	PT	SP	E	FT	K	TM	GM
S	S	S	S	S	I	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S

Tableau 3. Antibiogramme réalisé sur la souche hospitalière de *S. aureus*. S : sensible (D > 13 mm), I : intermédiaire (6 mm < D < 13 mm), R : résistant (D < 6mm). VA : Vancomycine, FOS : Fosfomycine, FA : Acide Fusidique, RA : Rifampicine, SXT : Sefotaxi, PEF : Pefloxacine, TEC : Techoplanine, PB : Polymixine, L : Lincomycine, PT : Pristinamycine, SP : Spiramycine, E : Erytromycine, FT : Furanes, K : Kanamycine, TM : Tobramycine, GM : Gentamycine.

2. Méthode en micro-atmosphère

BACTERIES INOCULUM	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	QMI	QMB	QMI	QMB	QMI	QMB
10 ⁵ bactéries/dépôt	160	160	160	160	80	80
10 ⁴ bactéries/dépôt	80	80	160	160	40	40
10 ³ bactéries/dépôt	80	80	160	160	20	20

Tableau 4. Activité inhibitrice de croissance du produit AIR PHARMA 505 incorporé dans le milieu Trypcase-soja gélosé après 24 h d'incubation à 37°C. La QMI (Quantité Minimale Inhibitrice) est exprimée en microlitres de produit déposés sur le couvercle de la boîte de Petri.

3. Aromatogrammes

BACTERIES INOCULUM	Produit pur	Produit dilué 1/2	Produit dilué 1/4	Produit dilué 1/8	Produit dilué 1/10
10 ⁵ bactéries/dépôt	22	21	17	13	12
10 ⁴ bactéries/dépôt	32	23	20	19	16
10 ³ bactéries/dépôt	35	28	24	28	21

Tableau 5. Aromatogramme sur *P. aeruginosa* avec le produit AIR PHARMA 505 après 24 h d'incubation. Les résultats sont les valeurs des diamètres d'inhibition (en mm) autour du disque contenant le produit.

BACTERIES INOCULUM	Produit pur	Produit dilué 1/2	Produit dilué 1/4	Produit dilué 1/8	Produit dilué 1/10
10 ⁵ bactéries/dépôt	14	13	10	7	< 6
10 ⁴ bactéries/dépôt	15	11	9	7	11
10 ³ bactéries/dépôt	18	15	12	8	10

Tableau 6. Aromatogramme sur *E. coli* avec le produit AIR PHARMA 505 après 24 h d'incubation. Les résultats sont les valeurs des diamètres d'inhibition (en mm) autour du disque contenant le produit.

BACTERIES INOCULUM	Produit pur	Produit dilué 1/2	Produit dilué 1/4	Produit dilué 1/8	Produit dilué 1/10
10 ⁵ bactéries/dépôt	22	21	16	8	< 6
10 ⁴ bactéries/dépôt	36	35	26	16	16
10 ³ bactéries/dépôt	45	30	23	20	18

Tableau 7. Aromatogramme sur *S. aureus* avec le produit AIR PHARMA 505 après 24 h d'incubation. Les résultats sont les valeurs des diamètres d'inhibition (en mm) autour du disque contenant le produit.

VII. CONCLUSION

Les résultats obtenus en milieu gélosé sont présentés dans le tableau 1. **Le produit 505 apparaît plus actif sur *P. aeruginosa*** (souche multirésistante à la majorité des antibiotiques testés, voir tableau 2) que sur les deux autres souches testées, avec une **CMI égale à 0,12 % sur les trois inoculums testés**. Cette concentration est bactéricide sur 10³ et 10⁴ bactéries/dépôt, alors que sur 10⁵ bactéries/dépôt, la concentration bactéricide est égale à 0,25 %. **Sur *E. coli***, le produit 505 présente des **CMI et des CMB comprises entre 0,25 %** (10³ et 10⁴ bactéries/dépôt) **et 0,5 %** (10⁵ bactéries/dépôt). Par contre, **sur *S. aureus*** (souche multirésistante, voir tableau 3) **la CMI et la CMB sont égales à 0,5 % sur les trois inoculums testés**.

En micro-atmosphère (Tableau 4), **les composés volatils du produit 505 sont plus actifs sur *P. aeruginosa***, mais l'activité est variable selon l'inoculum testé (QMI=QMB comprise entre 20 µl et 80 µl). **Sur *E. coli***, la QMI et la QMB sont égales à 160 µl quelque soit l'inoculum testé et **sur *S. aureus***, la QMI et la QMB sont comprises entre 80 µl (10³ et 10⁴ bactéries/dépôt) **et 160 µl** (10⁵ bactéries/dépôt).

Les aromatogrammes ont également permis de comparer l'activité inhibitrice de croissance du produit 505 pur ou dilué (tableaux 5, 6 et 7). ***P. aeruginosa* (Tableau 5), est sensible (D > 13 mm) même lorsque le produit est dilué au 10^{ème}** (sauf sur 10⁵ bactéries/dépôt, l'activité est de niveau intermédiaire avec D = 12 mm). ***E. coli* (Tableau 6), est sensible lorsque le produit est testé pur et dilué au 1/2** et présente une sensibilité intermédiaire à partir de la dilution 1/4 (sauf avec la dilution 1/10 sur 10⁵ bactéries/dépôt, où l'activité est de niveau résistant avec D < 6 mm). ***S. aureus* (Tableau 7), est sensible pour les trois inoculums testés jusqu'à la dilution 1/4** et sur 10³ et 10⁴ bactéries/dépôt jusqu'à la dilution

au 10^{ème}. L'activité est de niveau intermédiaire avec la dilution 1/8 sur 10⁵ bactéries/dépôt et de niveau résistant avec la dilution 1/10 sur 10⁵ bactéries/dépôt.

Si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus sur des souches référencées (Etude 01-465/002), il apparaît que la souche de ***P. aeruginosa* multirésistante est plus sensible au produit 505** (CMI = 0,12 % et QMI = 80 µl) **que la souche de référence** (CMI > 0,5% et QMI > 160 µl). **D'où l'intérêt de réaliser l'aromatogramme en parallèle à l'antibiogramme** pour chercher des produits alternatifs aux antibiotiques.

A l'inverse, l'isolat clinique de ***S. aureus* (SARM : *S. aureus* Résistant à la Méthicilline) est moins sensible au produit 505** (CMI = 0,5 % et QMI = 160 µl) **que la souche de référence** (CMI = 0,12 % et QMI = 40 µl).

La souche de ***E. coli* se comporte à peu près de la même manière en présence du produit 505** (CMI = 0,5 % et QMI = 160 µl) **que la souche de référence** (CMI = 0,5 % et QMI = 80 µl). Cependant, il faut remarquer que les essais avec les souches de référence ont été réalisés à 35°C, alors que les essais avec les souches sauvages ont été réalisés à 37°C, ce qui peut expliquer cette légère différence d'activité en micro-atmosphère.

Enfin, il faut souligner que **l'intérêt de produits à base d'huiles essentielles réside dans le fait qu'il s'agit de biocides multisites**, comportant des molécules présentant des modes d'action différents **et par conséquent, le risque de développement de résistance apparaît plus faible** qu'avec les antibiotiques.

Fait à Toulouse, le 21 juillet 2003.

Dr V. G. de BILLERBECK