

Activité *in vitro* de la Teichomycine, de la Vancomycine et de la N-Formimidoyl-Thienamycine sur *Staphylococcus aureus* *

par A. THABAUT ** et M. MEYRAN **

RESUME

Les activités *in vitro* de la Teichomycine, de la Vancomycine, et de la N-formimidoyl-thienamycine ont été comparées sur 101 souches de *Staphylococcus aureus* producteurs de pénicillinase, dont 61 Méthicilline - résistantes. Les activités bactériostatiques de la Teichomycine et de la Vancomycine, pour les souches Méthicilline - sensibles ou Méthicilline - résistantes sont voisines : moyennes géométriques des C.M.I. \approx 1 mg/l. Les C.M.I. de la N-F-Thienamycine sont plus élevées pour les souches Méthicilline - résistantes (0,25 mg/l) que pour les souches Méthicilline - sensibles (0,02 mg/l). L'activité bactéricide (0,01 % de survivants) des 3 antibiotiques est faible. L'effet inoculum sur les C.M.I. des 3 antibiotiques est peu important entre 10^4 et 10^6 C.F.U./ml, marqué entre 10^6 et 10^7 . Le développement de la résistance *in vitro* par la méthode des transferts successifs, montre que les C.M.I. de la Teichomycine et de la Vancomycine sont peu ou pas modifiées après 14 passages. Les C.M.I. de la N-F-Thienamycine atteignent 32 mg/l ou plus (128 mg/l) pour les souches Méthicilline - résistantes, en 3 à 8 passages. Les associations Teichomycine/Vancomycine et Rifampicine, Teichomycine/Vancomycine et Pristinamycine sont le plus souvent indifférentes ou additives, rarement synergiques ou antagonistes.

Mots-clef :

Staphylococcus aureus - Antibiotiques - Teichomycine - Vancomycine - N-F-Thienamycine.

Staphylococcus aureus occupe une place importante, variable suivant les régions géographiques et même suivant les hôpitaux, à l'intérieur d'une même région, mais stable au cours du temps, dans l'étiologie des infections nosocomiales. Cependant, ces dernières années, l'augmentation de la fréquence des souches multirésistantes a été signalée dans différents pays. Ces souches résistent aux pénicillines du groupe M (Méthicilline, Oxacilline), aux aminoglycosides majeurs (Gentamicine, Tobramycine), aux macrolides. La thérapeutique des infections qu'elles déterminent est donc difficile et l'étude de l'activité d'antibiotiques éventuellement efficaces sur ces souches, d'un grand intérêt.

La Teichomycine est un nouvel antibiotique produit par *Actinoplanes teichomyceticus* qui appartient au groupe des antibiotiques glycopeptidiques (6) comme la Vancomycine. La N-

formimidoyl-Thienamycine est le dérivé stable *in vivo* de la Thienamycine, antibiotique de la famille des betalactamines, possédant un noyau carbapenem. L'objet de cette étude est de comparer l'activité *in vitro* de ces trois antibiotiques sur les souches de *Staphylococcus aureus* Méthicilline - sensibles ou Méthicilline - résistantes.

MATERIEL ET METHODES

Souches bactériennes

101 souches de *Staphylococcus aureus* toutes productrices de pénicillinase, récemment isolées de produits pathologiques divers (sang, pus, lésions cutanées...) 40 sont Méthicilline - sensibles, 61 sont Méthicilline - résistantes.

Antibiotiques

Les poudres titrées de chacun des antibiotiques ont été fournies par les fabricants : Teichomycine : Laboratoires Lepetit ; Vancomycine : La-

* Reçu le 21.12.1982. Acceptation définitive le 28.1.1983.

** Laboratoire de Biologie médicale, Hôpital militaire Bégin, 69 avenue de Paris, 94160 Saint-Mandé.

boratoires Eli-Lilly et N-F-Thienamycine : Laboratoires Merck-Sharp and Dohme.

Détermination de la Concentration Minima Inhibitrice (C.M.I.)

La C.M.I. de chacun des 3 antibiotiques a été déterminée par la méthode de dilution en gélose telle qu'elle est préconisée par le I.C.S. (3). On prépare des gammes de concentrations croissantes de raison 2, en gélose de Mueller-Hinton, de chacun des antibiotiques et on les répartit en boîtes de Pétri :

— Vancomycine et Teichomycine : Concentrations finales de 0,015 à 32 mg/l.

— N-F-Thienamycine, de 0,003 à 4 mg/l.

L'inoculum bactérien est dilué, à partir d'une culture de 4 h au bain-marie agité, de façon à ce que les pointes d'un multiinoculateur dérivé de l'appareil de Steers dépose 10^4 bactéries viables par point d'inoculation. Après 18 h d'incubation, la C.M.I. est la concentration d'antibiotique la plus faible pour laquelle le nombre de colonies au niveau du point d'inoculation correspondant est inférieur à 3.

Détermination de la Concentration Minima Bactéricide (C.M.B.)

Les gammes de dilution croissante de raison 2 de chacun des 3 antibiotiques sont réparties en tubes sous un volume de 1 ml, en bouillon de Mueller-Hinton. Après addition de 1 ml de l'inoculum bactérien, les gammes de Teichomycine et de Vancomycine titrent en finale de 0,06 à 64 mg/l, les gammes de N-F-Thienamycine, de 0,015 à 64 mg/l. L'inoculum bactérien est dilué pour titrer en finale de 10^5 à 10^6 bactéries viables par ml. Il est numéré de façon précise par dilutions successives. Après lecture de la C.M.I., on ensemence 0,1 ml du contenu de chacun des tubes demeurés « clairs » sur une boîte de Pétri. Après 18 h d'incubation, la numération des colonies sur chacune des boîtes permet de déterminer la C.M.B. par comparaison avec l'inoculum initial : concentration d'antibiotique bactéricide pour 99,99 % de la population bactérienne, soit ne laissant que 0,01 % de survivants.

Effet inoculum

Les C.M.I. et les C.M.B. des 3 antibiotiques sont déterminées par la méthode de dilution en milieu liquide utilisant des inoculums bactériens titrant 10^4 , 10^5 , 10^6 , et 10^7 bactéries viables par ml.

Développement de la résistance in vitro

L'évolution de la C.M.I. de chacun des 3 antibiotiques est étudiée par passages successifs en milieu liquide : on prélève le tube le plus proche de la C.M.I. dans lequel la densité de la croissance bactérienne est encore identique au témoin sans antibiotique. La culture contenue dans ce tube est utilisée comme inoculum pour nouvelle détermination de la C.M.I., après ajustement photométrique à 10^6 bactéries viables par ml, titre final. Cette opération est répétée quotidiennement 14 jours ou bien jusqu'à ce que la C.M.I. obtenue soit supérieure à 128 mg/l.

Associations d'antibiotiques

L'activité bactériostatique et bactéricide des associations Teichomycine/Vancomycine et Rifampicine (Laboratoire Lepetit) Teichomycine/Vancomycine et Pristinamycine (Laboratoires Spécia) a été déterminée par méthode de microdilution en milieu liquide suivant le « schéma carré ». L'inoculum bactérien titre en finale 10^5 bactéries viables par ml. Après 18 h d'incubation on calcule pour chaque association et chaque souche bactérienne le coefficient de synergie pour la cupule dépourvue de culture bactérienne visible et contenant la plus faible concentration du premier antibiotique associée à la plus faible concentration du deuxième :

$$\text{Coefficient de synergie} = \frac{a1}{a0} + \frac{b1}{b0}$$

a0 = C.M.I. de l'antibiotique A utilisé seul.

a1 = Concentration de l'antibiotique A dans l'association.

b0 = C.M.I. de l'antibiotique B utilisé seul

b1 = Concentration de l'antibiotique B dans l'association

Après ensemencement d'une aliquote du contenu de chaque cupule sur gélose de Mueller-Hinton, et 18 h d'incubation, on calculera le coefficient de synergie en bactéricidie, suivant le même principe et la même formule. L'effet des associations est interprété de la façon suivante :

Coefficient de synergie $\leq 0,5$: synergie

$0,5 < \text{coefficient de synergie} \leq 1$: addition

$1 < \text{coefficient de synergie} \leq 2$: indifférence

Coefficient de synergie > 2 : antagonisme.

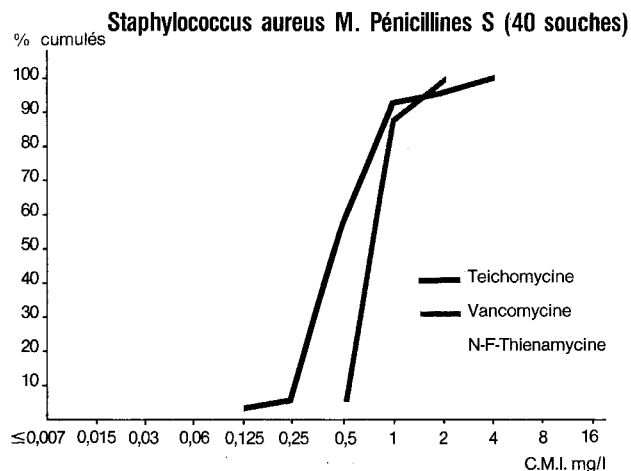
RESULTATS

ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE

Souches Méthicilline - sensibles

La N-F-Thienamycine a la plus grande activité. La répartition des C.M.I. s'étend de 0,007 à 0,25 mg/l et la moyenne géométrique de ces C.M.I. est de 0,02 mg/l (Figure 1). La répartition des C.M.I. de la Vancomycine 0,5 - 2 mg/l est moins étendue que la répartition des C.M.I. de la Teichomycine 0,125 - 4 mg/l. Les moyennes géométriques des C.M.I. de ces 2 antibiotiques sont voisines : Vancomycine 1,04 mg/l, Teichomycine 0,72 mg/l.

Figure 1



Souches Méthicilline - résistantes

La N-F-Thienamycine a également la meilleure activité pour ces souches : Répartition des C.M.I. de 0,03 à 4 mg/l, moyenne géométrique 0,25 mg/l. L'activité est cependant moins grande que pour les souches Méthicillines sensibles. (Figure 2). L'activité de la Vancomycine : Répartition des C.M.I. 0,5 à 2 mg/l, moyenne géométrique 1,04 mg/l, et de la Teichomycine 0,125 - 8 mg/l et 1,19 mg/l ne diffèrent pas significativement de l'activité sur les souches Méthicilline sensibles.

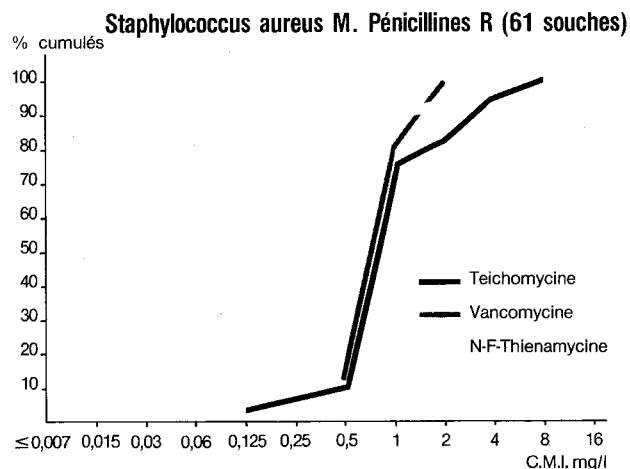
ACTIVITE BACTERICIDE

L'étude de cette activité a été réalisée sur 10 souches de *Staphylococcus aureus* dont 5 Méthicilline - sensibles et 5 Méthicilline - résistantes :

Vancomycine

Pour 8 souches la C.M.B. est supérieure à plus de 64 fois la C.M.I., pour 1 souche 32 fois, pour 1 souche 16 fois.

Figure 2



Teichomycine

Pour 8 souches, la C.M.B. est supérieure à plus de 64 fois la C.M.I. pour 2 souches, 16 fois.

N-F-Thienamycine

Pour toutes les souches, la C.M.B. est supérieure à plus de 64 fois la C.M.I. Suivant les critères de définition retenus par la C.M.B., soit bactéricidie pour 99,99 % de la population bactérienne, aucun des 3 antibiotiques ne présente d'activité bactéricide notable sur les *Staphylococcus aureus* Méthicilline - sensibles ou Méthicilline - résistants.

EFFETS DES VARIATIONS DE L'INOCULUM BACTERIEN.

Ils ont été évalués sur 4 souches de *Staphylococcus aureus*, 2 Méthicilline - sensibles, 2 Méthicilline - résistantes. Les variations de la C.M.I. (Tableau I) sont nulles ou faibles pour la Vancomycine (1 à 2 dilutions de raison 2) entre 10^4 et 10^6 bactéries viables par ml. Elles sont plus marquées (4 à 8 dilutions) pour la Teichomycine. Entre 10^6 et 10^7 bactéries/ml, pour les 2 antibiotiques, la C.M.I. augmente de 4 à 16 fois.

DEVELOPPEMENT DE LA RESISTANCE IN VITRO

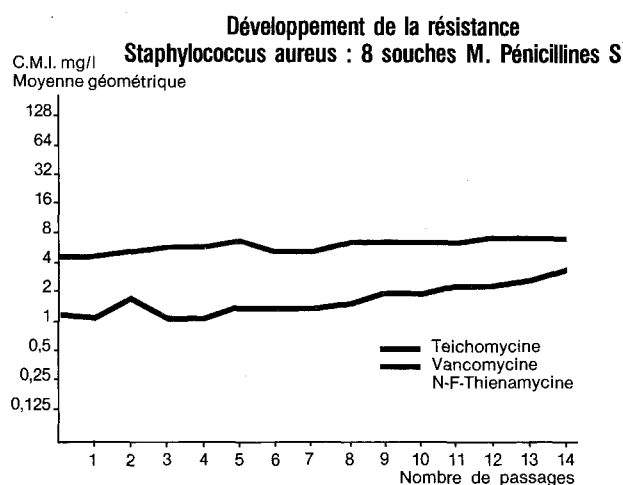
L'étude a été réalisée pour les 3 antibiotiques sur 8 souches Méthicilline - sensibles et 8 souches Méthicilline - résistantes. On a exprimé les résultats en moyennes géométriques des C.M.I. obtenues pour les différentes souches à l'issue des différents passages, ces résultats variant peu

TABLEAU I : *Staphylococcus aureus* (4 souches) - Effets des variations de l'inoculum C.M.I. (mg/l)

		Inoculum (C.F.U./ml)			
		10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
Souche n° 1 (Methi - S)	Teichomycine	0,125	0,25	1	8
	Vancomycine	2	2	2	8
Souche n° 2 (Methi - S)	Teichomycine	0,25	1	1	4
	Vancomycine	1	1	2	4
Souche n° 3 (Methi - R)	Teichomycine	0,5	0,5	1	8
	Vancomycine	1	2	2	8
Souche n° 4 (Methi - R)	Teichomycine	0,25	0,5	8	64
	Vancomycine	1	1	4	64

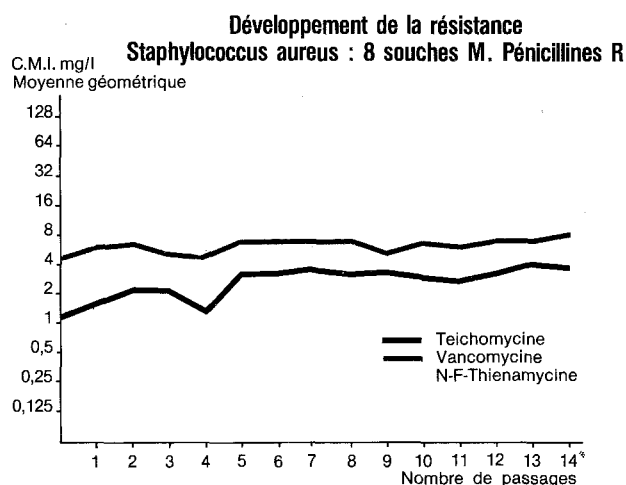
d'une souche à l'autre. Les C.M.I. de la Teichomycine et de la Vancomycine pour les souches Méthicilline - sensibles (figure 3) et pour les souches Méthicilline résistantes (figure 4) varient peu au cours et à l'issue des 14 passages : 0 - 1 ou 2 dilutions de raison 2. On n'a pas sélectionné de variants résistants.

Figure 3



Avec la N-F-Thienamycine, par contre, pour les souches Méthicilline - sensibles (Figure 3), la C.M.I. augmente par paliers successifs au cours des différents passages, jusqu'à 7 dilutions de raison 2 en moyenne, à l'issue des 14 passages. L'augmentation est plus rapide pour les souches Méthicilline - résistantes, (figure 4) et l'on obtient assez rapidement des variants résistants à haut niveau (C.M.I. > 64 mg/l).

Figure 4



EFFET DES ASSOCIATIONS

— **Les associations Teichomycine - Rifampicine et Vancomycine - Rifampicine** ont été étudiées sur 20 souches de *Staphylococcus aureus*, (Tableau II). Ces associations ont des effets voisins : Addition ou indifférence pour 70 à 85 % des souches en bactériostase comme en bactéricidie, synergie pour 10 à 25 % des souches, antagonisme pour 5 à 10 % des souches.

— **Les associations Teichomycine - Pristinamycine et Vancomycine - Pristinamycine** (Tableau III), étudiées sur les mêmes souches, ont un effet additif ou indifférent pour 85 à 95 % des souches en bactériostase comme en bactéricidie, rarement synergique ou antagoniste.

TABLEAU II : Effet des associations de la vancomycine ou de la teichomycine avec la rifampicine (20 staphylococcus aureus)

	Synergie C.S. $\leq 0,5$		Addition $0,5 < \text{C.S.} \leq 1$		Indifférence $1 < \text{C.S.} \leq 2$		Antagonisme C.S. > 2	
	Va - Ri	Te - Ri	Va - Ri	Te - Ri	Va - Ri	Te - Ri	Va - Ri	Te - Ri
Bactériostase	5	2	8	15	6	2	1	1
Bactéricidie	4	4	7	7	7	8	2	1

Va : Vancomycine - Te : Teichomycine - Ri : Rifampicine

TABLEAU III : Effet des associations de la vancomycine ou de la teichomycine avec la pristinaamycine (20 staphylococcus aureus)

	Synergie C.S. $\leq 0,5$		Addition $0,5 < \text{C.S.} \leq 1$		Indifférence $1 < \text{C.S.} \leq 2$		Antagonisme C.S. > 2	
	Va - Pr	Te - Pr	Va - Pr	Te - Pr	Va - Pr	Te - Pr	Va - Pr	Te - Pr
Bactériostase	0	1	8	4	12	15	0	0
Bactéricidie	2	0	8	5	9	12	1	3

Va : Vancomycine - Te : Teichomycine - Pr : Pristinaamycine

DISCUSSION

Le mode d'action antibactérien de la Teichomycine n'est pas encore parfaitement élucidé. Cependant, étant donné sa parenté structurale avec la Vancomycine, il est vraisemblable que comme cet antibiotique, il intervient au niveau de la 2^e phase de la synthèse de la paroi bactérienne. Comme la plupart des auteurs (1 - 2 - 10) nous trouvons une activité bactériostatique des deux antibiotiques voisine sur les *Staphylococcus aureus* Méthicilline - sensibles ou Méthicilline - résistants, avec cependant un léger avantage pour la Teichomycine. L'activité de la N-F-Thienamycine est sur la base pondérale supérieure à celle de ces 2 antibiotiques. Contrairement aux betalactamines jusqu'ici connues, elle conserve une activité élevée sur les souches Méthicilline - résistantes, inférieure cependant à son activité sur les souches Méthicilline - sensibles. Cet antibiotique est donc, dans une certaine mesure, sensible aux mécanismes de résistance intrinsèque aux betalactamines.

Une activité bactéricide notable de la Teichomycine et de la Vancomycine a été mise en évidence par Fietta (4), Varaldo (10) : pour ces auteurs, la C.M.B. est 2 à 3 fois supérieure à la C.M.I. Nous ne retrouvons pas cette activité, mais nos critères de définition de la bactéricidie et notre méthodologie sont différents : macrométhode en tubes, et 0,01 % de survivants seulement au lieu de 0,1 % pour les auteurs cités. Les méthodes de détermination des C.M.B. et les critères d'interprétation ne sont malheureusement pas parfaite-

ment standardisés. Or les résultats obtenus dépendent assez étroitement de ces facteurs. Nous-même, comparant les C.M.B. de la Teichomycine et de la Vancomycine obtenues par micro-méthode de dilution en plaques et méthode de dilution en tubes, avons trouvé des résultats fort différents : C.M.B. proche de la C.M.I. en microdilution, fort éloignée en macrodilution. Si l'on considère la méthode de dilution en tubes et le critère de 0,01 % de survivants comme méthode et interprétation de référence, Teichomycine et Vancomycine ne peuvent être considérés comme des antibiotiques bactéricides. Comme Griffith (5) pour la Vancomycine, nous n'avons pas mis en évidence de variation notable de la C.M.I. par la méthode des passages successifs et nous n'avons pas isolé de variants résistants. Nous avons obtenu les mêmes résultats pour la Teichomycine. Par contre, par la même méthodologie, on obtient rapidement des variants résistants à la N-F-Thienamycine et le niveau de résistance est particulièrement élevé pour les souches Méthicilline - résistantes. Il est vraisemblable que comme cela a été démontré pour les Céfalosporines (7 - 8), la population des souches de *Staphylococcus aureus* Méthicilline - résistantes est hétérogène quant à son niveau de sensibilité à la N-F-Thienamycine. Ceci devra être mis en évidence par la méthodologie des analyses de population. Quoi qu'il en soit, l'utilisation de cet antibiotique dans le traitement des affections déterminées par des souches de *Staphylococcus aureus* possédant un mécanisme de résistance intrinsèque, devra être envisagé avec prudence et circonspection.

L'effet des associations de la Teichomycine avec la Rifampicine ou la Pristinamycine est similaire à l'effet des associations de la Vancomycine. Comme Tuazon (9) nous mettons en évidence des effets le plus souvent additifs ou indifférents, plus rarement synergiques, rarement antagonistes. Watanakunakorn par contre (11) de même que Zimmer (12) ont récemment mis en évidence un effet antagoniste presque constant de l'association Vancomycine - Rifampicine. Cependant, les résultats des associations d'antibiotiques sont étroitement tributaires de la méthodologie : Watanakunakorn observe l'antagonisme avec la méthodologie des courbes de bactéricidie

en fonction du temps, Zimmer à partir d'un inoculum titrant au moins 10^6 bactéries viables/ml.

Jusqu'à ce jour, il n'a pas été isolé de souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la Vancomycine. La parenté structurelle de la Teichomycine et les résultats similaires des études in vitro peuvent également laisser espérer l'absence ou la rareté de la résistance acquise à cet antibiotique. Les résultats expérimentaux in vivo déjà encourageants, ainsi que les études pharmacocinétiques (1) incitent à mettre en œuvre les études cliniques destinées à attribuer à cet antibiotique une place dans la thérapeutique des infections dues aux *Staphylococcus aureus* multirésistants.

SUMMARY

We compared the antibacterial activities of teichomycin, vancomycin and N-f-thienamycin against 101 penicillinase-producing *Staphylococcus aureus* of which 61 were also methicillin - resistant. For all strains, teichomycin and vancomycin had similar bacteriostatic activity : MIC geometrics means ≤ 1 mg/l. MIC values of N-f-thienamycin were higher for methicillin - resistant strains (0,25 mg/l) than for methicillin - susceptible strains (0,02 mg/ml). The bactericidal activity (0,01 % survivors) were low for the three antibiotics : MBC/MIC ratio ≥ 64 for most of the strains. The inoculum effects on MIC values of the three antibiotics were significant between 10^6 and 10^7 cfu/ml, but negligible between 10^4 and 10^6 cfu/ml. The induction of resistance was studied in 16 strains using daily serial transfers. MIC values of teichomycin and vancomycin were not or only slightly modified upon 14 transfers ; MIC of N-f-thienamycin usually reached 32 mg/l or higher in 3 to 8 transfers. The teichomycin - rifampicin, vancomycin - rifampicin, teichomycin - pristinamycin, vancomycin - pristinamycin combinations, most often showed additivity or indifference, seldom synergy or antagonism.

Key-words :

Staphylococcus aureus - Antibiotics - Teichomycine - Vancomycine - N-F-Thienamycine.

BIBLIOGRAPHIE

- BERTI M. — In vitro and in vivo evaluation of Teichomycin : A new antibiotic active on gram - positive pathogens. 5th International Symposium on Future Trends in Chemotherapy, 1982.
- CYNAMON M.H., GRANATO P.A. — Comparison of the in vitro activities of Teichomycin A2 and Vancomycin against *Staphylococci* and *Enterococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1982, 21, 504-505.
- ERICKSSON H.M., SHERRIS J.C. — Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. (B) Suppl.* 217, 1971, 1-90.
- FIETTA A., MANGIAROTTI P. — In vitro activity of Teichomycin A2 against clinical isolates of gram positive bacteria. 1982. 5th International Symposium on Future Trends in Chemotherapy, 1982, Pise, Italie.
- GRIFFITH R.S. — Introduction to Vancomycin. *Rev. Infect. Dis.*, 1981, 3 Suppl., 200-204.
- PARENTI F., BERETTA G., BERTI M., ARIOLI V. — Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes Teichomyces*. *Nov. sp. J. Antibiot.*, 1978, 31, 276-283.
- SIROT D., SIROT J., CLUZEL R., JOLY B. — Etude comparée de l'action de 7 céphalosporines sur *Staphylococcus aureus* par la méthode d'analyse de populations. *Path. Biol.*, 1977, 25, 9, 605-610.
- THABAUT A., DUROSOIR J.L., SALIOU P. — Activité in vitro de la céfamandole comparée à l'activité de la céfalo-tine, de la céfoxitine et de la céfuroxime sur les entérobactéries et les *Staphylococcus aureus* isolés en milieu hospitalier. *Path. Biol.*, 1979, 27, n° 10, 649-654.
- TUAZON C.A., LIU M., SCHEAGREN J.M. — In vitro action of Rifampicin alone and in combination with Nafcillin and Vancomycin against pathogenic strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1978, 13, 759-761.
- VARALDO P.E., SCHITO G.C. — In vitro antibacterial activity against *Streptococci* and *Staphylococci* and comparison with Vancomycin. 5th International Symposium on Future Trends in Chemotherapy, 1982, Pise, Italie.
- WATANAKUNAKORN C., GUERRIERO J.C. — Interaction between Vancomycin and Rifampicin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1981, 19, 1089-1092.
- ZIMMER S.H., LAGAST H., KLASTERSKY J. — Antistaphylococcal activity of Rifampicin with other antibiotics. *J. Infect. Dis.*, 1981, 144, 4, 365-371.