



LIGNE DIRECTRICE À L'INTENTION DE L'INDUSTRIE

ÉTUDES SUR L'ÉVALUATION DES
RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS
VÉTÉRINAIRES DANS LES ALIMENTS DE
CONSOMMATION HUMAINE :

**MÉTHODE GÉNÉRALE D'ÉTABLISSEMENT D'UNE
DOSE JOURNALIÈRE ADMISSIBLE (DJA)
MICROBIOLOGIQUE**

VICH LD 36



Date d'adoption par la DMV	1 ^{er} octobre 2004
Date d'entrée en vigueur	1 ^{er} octobre 2004

Secrétariat de coordination VICH Canada

AVANT-PROPOS

La présente ligne directrice, élaborée par des groupes d'experts, a été approuvée par le Comité directeur du VICH. Les organismes de réglementation de l'Union européenne, du Japon et des États-Unis l'ont déjà adoptée.

En l'adoptant aussi, le gouvernement du Canada retient les principes et les pratiques qui y sont décrits. Son utilisation doit toutefois se faire parallèlement aux sections pertinentes des autres lignes directrices qui s'appliquent.

Les lignes directrices ont pour objectif d'aider l'industrie et les professionnels de la santé à se conformer aux politiques, aux lois et aux règlements du gouvernement du Canada. Elles servent également de guide, en matière d'examen et de conformité, aux employés du gouvernement du Canada en vue d'assurer une application équitable, uniforme et efficace des politiques et des lignes directrices.

Les lignes directrices constituent des outils administratifs qui n'ont pas force de loi et, de ce fait, elles autorisent une certaine souplesse quant aux approches à suivre. Des approches différentes, qui s'écartent des principes et des pratiques que proposent ces lignes directrices, peuvent être acceptées, si elles sont appuyées par une justification scientifique adéquate. Ces autres approches devraient être discutées au préalable pour éviter la possibilité qu'on détermine, lors des évaluations, que les exigences des lois et des règlements n'ont pas été rencontrées.

Il est important de souligner que le gouvernement du Canada se réserve le droit de demander des renseignements ou du matériel supplémentaire ou d'énoncer des conditions, qui ne se trouvent pas dans la présente ligne directrice, afin de permettre aux évaluateurs de déterminer correctement l'innocuité, l'efficacité ou la qualité des médicaments vétérinaires. Le gouvernement du Canada s'est assuré que de telles demandes soient justifiées et que ses décisions soient clairement documentées.

APPROCHE GÉNÉRALE POUR L'ÉTABLISSEMENT D'UNE DJA MICROBIOLOGIQUE

1. INTRODUCTION

1.1. Objectifs de la ligne directrice

Diverses évaluations toxicologiques sont effectuées pour établir l'innocuité des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments de consommation humaine. Une question qui reste à déterminer, toutefois, est l'innocuité des résidus de médicaments vétérinaires antimicrobiens sur la flore intestinale humaine. Les objectifs de la présente ligne directrice sont donc 1) de décrire les étapes de la détermination du besoin d'établir une dose journalière admissible (DJA) microbiologique, 2) de recommander des systèmes d'essais et des méthodes de détermination des concentrations sans effet nocif observable (CSENO) et des doses sans effet nocif observable (DSENO) pour les critères préoccupants pour la santé, et 3), de recommander une procédure de calcul d'une DJA microbiologique. Il est reconnu que différents essais pourraient être utiles. L'expérience acquise en utilisant les essais recommandés permettra éventuellement d'apporter des modifications futures à la présente ligne directrice et aux recommandations qu'elle contient.

1.2. Contexte

La flore intestinale joue un rôle important en maintenant et en protégeant la santé des personnes. Cette flore remplit des fonctions essentielles pour l'hôte telles que 1) la transformation par métabolisme de composés endogènes et exogènes et des composants alimentaires; 2) la production de composés qui sont absorbés plus tard et 3) la protection contre l'invasion et la colonisation de microorganismes pathogènes.

Lorsqu'ils sont ingérés, les médicaments antimicrobiens peuvent potentiellement modifier l'écologie de la flore intestinale. Ils peuvent atteindre le colon en raison d'une absorption incomplète ou être absorbés, entraînés dans la circulation, puis excrétés dans la bile ou sécrétés à travers la muqueuse intestinale.

Les critères microbiologiques qui sont préoccupants en santé publique et qui doivent être examinés lors de l'établissement d'une dose journalière admissible microbiologique sont les suivants :

Rupture de la barrière de colonisation : La barrière de colonisation est une fonction de la flore intestinale normale qui limite la colonisation du colon par des microorganismes exogènes, ainsi que la surpopulation de microorganismes indigènes potentiellement pathogènes. Le pouvoir de certains médicaments antimicrobiens de perturber cette barrière est bien établi et connu pour avoir des répercussions sur la santé humaine.

Augmentation des populations de bactéries résistantes : Aux fins de la présente ligne directrice, la résistance est définie comme l'augmentation dans le tractus intestinal de populations de bactéries insensibles aux médicaments à expérimenter ou à d'autres médicaments antimicrobiens. Cela peut être dû à l'acquisition d'une résistance chez des organismes auparavant sensibles ou à la croissance relative d'une fraction de population d'organismes à l'origine moins sensibles aux médicaments.

Un examen exhaustif de la littérature scientifique ne révèle aucun signalement d'effets sur la santé humaine (p.ex., thérapie antimicrobienne prolongée, hospitalisation prolongée, prédisposition à l'infection ou échec d'un traitement) causés par des modifications du pourcentage de bactéries résistantes aux agents antimicrobiens dans la flore intestinale normale des humains. Toutefois, de tels effets ne peuvent pas être exclus d'après ce que l'on sait de l'écologie microbienne.

Bien qu'on se préoccupe depuis plusieurs années des effets que peuvent avoir des résidus de médicaments antimicrobiens dans les aliments sur la flore intestinale humaine, il n'a jamais été établi de méthode harmonisée pour déterminer la dose seuil à laquelle la flore est perturbée. Les organismes de réglementation internationaux ont adopté une approche qui s'appuie sur des formules de détermination d'une DJA microbiologique de médicaments antimicrobiens. Ces formules utilisent des données pertinentes, telles que des données de concentrations minimales inhibitrices (CMI) des bactéries intestinales humaines. Des facteurs d'incertitude, en raison de la complexité de la flore intestinale, sont traditionnellement inclus dans les formules. Cependant, l'utilisation de ces facteurs d'incertitude donne lieu à des estimations prudentes, il a été jugé nécessaire d'élaborer de meilleurs systèmes d'essais, plus à même de fournir des calculs réalistes de DJA microbiologiques, sans devoir appliquer ces facteurs.

L'objectif de la présente ligne directrice est de résoudre la complexité de la flore intestinale humaine et de diminuer les incertitudes qui se rattachent à l'établissement de DJA microbiologiques. Elle fournit une description du processus de détermination du besoin d'établir une DJA microbiologique et une discussion de systèmes d'essais qui prennent en compte la complexité de la flore intestinale humaine. Ces systèmes d'essais pourraient servir à traiter des effets des résidus de médicaments antimicrobiens sur la flore intestinale humaine à des fins réglementaires.

Comme d'autres recherches sont nécessaires pour confirmer la fiabilité et la validité de tous les systèmes d'essais discutés dans la présente ligne directrice (voir l'Annexe A), aucun des systèmes n'est ici recommandé pour appuyer le processus de prise de décisions réglementaires. Cette ligne directrice recommande cependant une approche harmonisée d'établissement d'une DJA microbiologique et propose des choix d'essais plutôt que de spécifier un régime d'essais donné.

1.3. Portée de la ligne directrice

Le présent document fournit une orientation pour l'évaluation de l'innocuité des résidus de médicaments vétérinaires antimicrobiens dans les aliments de consommation humaine du point de vue de leurs effets sur la flore intestinale humaine, sans toutefois restreindre le choix d'études à mener en vue d'établir cette innocuité. Cette ligne directrice n'exclut pas non plus la possibilité d'adopter d'autres approches qui permettent de déterminer avec une même certitude l'innocuité des résidus ou d'appuyer la décision de ne pas imposer d'essai microbiologique sur la base de justifications scientifiques solides.

2. LIGNE DIRECTRICE

Si un médicament destiné à des animaux producteurs d'aliments a une activité antimicrobienne, l'innocuité de ses résidus doit être déterminée en fonction de la flore intestinale humaine. Le calcul d'une DJA microbiologique n'est vraiment nécessaire que si les résidus atteignent le colon humain et conservent leur activité antimicrobienne.

2.1. Étapes de la détermination du besoin d'établir une DJA microbiologique

Les étapes suivantes sont recommandées pour la détermination du besoin d'établir une DJA microbiologique. Les données peuvent être obtenues dans le cadre d'expériences ou d'autres sources appropriées telles que des documents scientifiques.

Étape 1. Les résidus du médicament et ses métabolites sont-ils actifs au plan microbiologique contre des organismes de la flore intestinale humaine?

- Données recommandées :
 - Données de CMI collectées selon des méthodes d'essais normalisées sur les genres pertinents de bactéries intestinales (*E. coli*, et espèces de *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Eubacterium* (*Collinsella*), *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus/Peptococcus*).
 - Il est admis que la compréhension de l'importance relative de ces microorganismes est incomplète et que leur taxonomie peut changer. La sélection des organismes doit être fondée sur les connaissances scientifiques courantes.
- S'il n'existe pas de données, prendre pour acquis que le composé et ses métabolites sont actifs au plan microbiologique.

Étape 2. Les résidus atteignent-ils le colon humain?

- Données recommandées :
 - Données sur l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'excrétion (ADME), la biodisponibilité ou des données similaires permettant d'établir le pourcentage de résidu ingéré qui atteint le colon.

- S'il n'existe pas de données pour les humains, utiliser des données portant sur des animaux qui conviennent. En l'absence de données ou de renseignements, prendre pour hypothèse que tout (100 %) le résidu ingéré atteint le colon.

Étape 3. Est-ce que les résidus dans le colon humain demeurent actifs au plan microbiologique?

- Données recommandées:
 - Données indiquant une perte de l'activité microbiologique obtenues dans le cadre d'études d'inactivation *in vitro* du médicament en l'incubant avec des fèces ou données d'évaluation *in vivo* de l'activité microbiologique du médicament dans les fèces ou dans le contenu du colon d'animaux.

Si la réponse aux étapes 1, 2 ou 3 est « non », la DJA n'est pas établie sur la base des résultats microbiologiques et il n'est pas nécessaire de passer aux étapes suivantes.

Étape 4. Déterminer s'il existe une justification scientifique pour écarter le besoin d'effectuer l'un des essais ou les deux pour collecter les données nécessaires. Prendre en compte les renseignements disponibles sur la rupture de la barrière de colonisation et l'émergence de la résistance au médicament. Si une décision ne peut pas être prise sur la base des renseignements disponibles, les deux critères devront être étudiés.

Étape 5. Établir les CSENO et les DSENO pour les critères établis à l'étape 4. La CSENO et la DSENO les plus appropriées sont utilisés pour calculer la DJA microbiologique.

2.2. Recommandations concernant la détermination des CSENO et des DSENO sur les critères à l'étude.

2.2.1. Rupture de la barrière de colonisation

2.2.1.1 Détection de la rupture de la barrière de colonisation

Les changements observés parmi les populations de bactéries sont des indicateurs directs de la rupture possible de la barrière de colonisation. Ils sont détectables à l'aide de diverses techniques de comptage de plusieurs systèmes d'essais. Un indicateur plus direct encore de la rupture de la barrière est la colonisation ou la surpopulation par un agent pathogène de l'écosystème intestinal. Les systèmes d'essais *in vivo* ou les systèmes d'essais complexes *in vitro* (p. ex., systèmes de culture continue, semi-continue ou alimentée en discontinu (culture en *fed-batch*)) permettent d'évaluer la rupture de la barrière de colonisation d'après la colonisation d'un organisme d'épreuve ajouté au système d'essai.

Les organismes d'épreuve (p. ex., *Salmonella*, *Clostridium*) doivent être insensibles au médicament à expérimenter. Les schémas d'inoculation de ces organismes doivent tenir compte du moment de l'épreuve du traitement à l'aide du médicament, du nombre d'organismes dans la dose d'épreuve et du nombre de fois où le système d'essai est provoqué.

2.2.1.2. Systèmes d'essais et plan d'étude

2.2.1.2.1. Essais *in vitro*

L'utilisation des CMI pour évaluer la capacité d'un médicament de rompre la barrière de colonisation ne tient pas compte de la complexité de la flore intestinale humaine. Par conséquent, la CMI₅₀ du genre ou des genres les plus pertinents sur lesquels agit le médicament (voir la section 2.1.) entraîne une estimation prudente des CSENO pour la rupture de la barrière de colonisation. L'estimation des CSENO est prudente parce qu'entre autres raisons, la densité de l'inoculum est en ordres de grandeur inférieure à la population de bactéries dans le tractus intestinal¹. Par conséquent, il peut être envisagé comme une option pour établir une DJA. Les isolats devraient être obtenus à partir de plusieurs individus sains et inclure un minimum de 10 isolats pour chacun des genres énumérés à la section 2.1.

Chaque essai de CMI d'une culture pure d'un isolat pertinent permet de produire des données sur une souche unique d'une espèce. D'autres systèmes d'essais *in vitro* fournissent des données sur des centaines d'espèces de bactéries (>10⁸ cellules bactériennes/g) pour chaque inoculum fécal. Chaque inoculum peut être testé en parallèle pour déterminer les effets du traitement. Compte tenu de tout ce qui précède, les systèmes *in vitro* qui utilisent des cultures fécales discontinues sont essentiellement plus solides et plus pertinents que les systèmes d'essai de CMI.

D'autres systèmes d'essais décrits ci-dessous, qui modélisent la flore intestinale, pourraient permettre d'établir une CSENO plus appropriée et une DJA probablement plus élevée.

Les lisiers fécaux constituent un système d'essais simple pour le calcul de CSENO pour ce qui est de la rupture de la barrière de colonisation après une exposition à court terme au médicament et pourraient même servir à des études de titrage de dose. Ces lisiers peuvent être analysés du point de vue des changements dans les populations de bactéries et de la production d'acides gras à chaînes courtes. Ces deux variables de réponses, si elles sont déterminées ensemble, peuvent servir d'indicateurs indirects de la rupture de la barrière de colonisation, bien que les CSENO dérivées de ce système d'essai pourraient être des estimations prudentes de cette rupture.

Les cultures semi-continues, continues et alimentées en discontinu (cultures en *fed-batch*) d'inoculats fécaux seraient appropriées pour évaluer la rupture de la barrière de colonisation après une exposition prolongée au médicament. Toutefois, des travaux préliminaires sur des cultures continues et semi-continues ont donné diverses CSENO pour la rupture de la barrière à cause de différences dans les protocoles. En conséquence, il faudrait que les plans d'étude prennent en compte les questions soulevées à l'Annexe A.

Dans le cas des lisiers fécaux et des cultures d'inoculats fécaux semi-continues, continues et alimentées en discontinu (cultures en *fed-batch*), des questions restent à examiner, notamment l'impact des inoculats fécaux (variations individuelles et par genre), le taux de dilution, la durée de l'exposition au médicament et la reproductibilité des essais.

2.2.1.2.2. Essais in vivo

Les systèmes d'essais *in vivo* qui utilisent des animaux de laboratoire conventionnels et à la flore intestinale approchant la flore humaine peuvent convenir à l'évaluation de la rupture de la barrière de colonisation. Par comparaison aux animaux de laboratoire conventionnels, les animaux à la flore intestinale approchant la flore humaine montrent une plus grande similarité avec les humains, à la fois en ce qui a trait à la gamme de populations de bactéries et à l'activité métabolique. Toutefois, la flore intestinale dérivée des humains peut ne pas être stable chez ces animaux. L'importance relative de la stabilité de la flore implantée et sa composition spécifique ne sont pas connues. Pour des raisons techniques, les animaux de laboratoire conventionnels peuvent être testés en plus grands nombres, ce qui permet de réaliser des analyses statistiques avec des résultats plus solides.

Le plan d'étude doit prendre en compte des facteurs tels que l'espèce animale, le genre, la variabilité de l'inoculum entre donneurs, le nombre d'animaux par groupe, l'alimentation, l'aléation des groupes de traitement, la minimisation et l'élimination de la coprophagie, les cellules d'isolement des animaux, la contamination croisée dans ces cellules et la voie d'administration du médicament (p. ex., gavage, dans l'eau de boisson). Les animaux axéniques doivent être inoculés en séquence, d'abord par une souche de *Bacteroides fragilis*, suivie d'une inoculation fécale.

2.2.2. Augmentation des populations de bactéries résistantes dans le colon humain (suivant la définition donnée à la section 1.2.)

Les points à prendre en considération dans la détermination de cet élément d'essai sont décrits ci-dessous.

2.2.2.1. Détection des changements dans les populations de bactéries résistantes

Les études visant à évaluer l'émergence de la résistance doivent tenir compte des organismes à étudier dans le tractus intestinal et des mécanismes documentés de la résistance à la classe de médicament utilisé. Des renseignements préliminaires sur la prévalence de la résistance dans la flore intestinale humaine, tels que la variation quotidienne chez les sujets et la variation entre les sujets, peuvent être utiles à l'élaboration des critères d'évaluation de l'émergence de la résistance. Les distributions de CMI d'organismes sensibles ou connus comme résistants, à étudier, peuvent servir de base à la détermination de la concentration de médicament à utiliser dans les milieux sélectifs à base de gélose pour dénombrer les organismes résistants dans les échantillons fécaux. Comme l'activité d'un médicament contre un organisme peut varier selon les conditions de l'essai, la CMI de l'organisme cultivé dans un milieu sélectif doit être comparée à la CMI calculée selon des méthodes normalisées (p.ex., celles du National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS]^{2,3}). Les changements en nombre exhibés par les organismes durant les périodes de prétraitement, de traitement et de post-traitement

peuvent être évalués à l'aide de techniques de dénombrement sur gélose, avec et sans médicament antimicrobien, en appliquant des méthodologies phénotypiques et moléculaires.

La modification de la résistance antimicrobienne peut être influencée par des facteurs autres que l'exposition à un médicament (p. ex., le stress de l'animal), qui doivent être pris en compte dans les systèmes d'essais sur des animaux.

2.2.2.2. Systèmes d'essais et plan d'étude

2.2.2.2.1. Essais in vitro

La durée de l'exposition requise pour que la résistance se développe dans une population de bactéries peut dépendre du médicament, de la nature des mécanismes de résistance et de la façon dont elle évolue dans la nature (p. ex., par transfert génétique entre cellules, par mutations génétiques). Pour cela, des études aiguës sur des cultures pures ne sont pas jugées appropriées pour la détermination de cet élément. Par conséquent, les essais de CMI ne peuvent pas être utilisés pour établir une CSENO applicable aux populations résistantes.

Des cultures définies peuvent fournir des renseignements utiles pour déterminer le potentiel d'une population résistante d'émerger à cause d'une mutation dans un isolat ou d'un transfert génétique entre isolats. Toutefois, ces systèmes d'essais ne sont pas conçus pour évaluer les changements dans les populations résistantes et ne sont pas recommandés.

Les systèmes d'essais à courte exposition de lisiers fécaux à un médicament ne sont pas non plus recommandés dans les études de l'émergence de la résistance, parce que la durée de l'essai est insuffisante pour évaluer les changements dans les populations résistantes.

Les cultures continues, semi-continues et alimentées en discontinu (cultures en *fed-batch*) d'inoculats fécaux sont de bons moyens d'évaluation de l'exposition à long terme de bactéries à un médicament. Voir à l'Annexe A: Questions à examiner au cours de l'élaboration de systèmes d'essais et de l'interprétation des données.

2.2.2.2.2. Essais in vivo

Les changements dans les populations résistantes peuvent être étudiés sur des rongeurs à la flore intestinale s'approchant de celles des humains. Le plan d'étude général et le protocole correspondant doivent s'appuyer sur les recommandations énoncées dans la section 2.2.1.2.2. Le système d'essais convient à une flore complexe et constitue une source de déterminants génétiques de la résistance. Le système permet plus de répétitions que les systèmes de cultures continues ou semi-continues, mais moins que les cultures alimentées en discontinu (cultures en *fed-batch*). La variabilité de l'essai sur des rongeurs à la flore intestinale s'approchant de celles des humains n'a pas été évaluée, mais il est utile dans la détermination des différences entre les

Ligne Directrice à l'intention
De l'industrie

Études sur l'évaluation des résidus de médicaments
vétérinaires dans les aliments de consommation humaine:
Méthode générale d'établissement d'une dose journalière
admissible (DJA) microbiologique

genres. Il y a aussi des avantages à mener des essais sur des animaux de laboratoire conventionnels.

L'utilisation de rongeurs à la flore intestinale s'approchant de celles des humains et d'animaux conventionnels permet d'évaluer le potentiel d'émergence de la résistance sur une exposition à long terme de bactéries à un médicament. Voir à l'Annexe A: Questions à examiner au cours de l'élaboration de systèmes d'essais et de l'interprétation des données.

2.3. Recommandations générales

- Les échantillons fécaux ou les isolats de bactéries de donneurs humains doivent être prélevés sur des sujets sains, qui n'ont pas été exposés à des agents antimicrobiens au cours des trois derniers mois au moins.
- Dans les cas des essais *in vivo*, l'espèce choisie doit permettre 1) d'effectuer un maximum de répétitions indépendantes; 2) de collecter une quantité suffisante de fèces aux fins des analyses; et 3) de tenir la coprophagie au minimum. L'évaluation doit porter sur deux genres, à moins qu'il ne soit démontré qu'un seul suffit.
- Les questions d'ordre statistique doivent être abordées dans la conception des études sur les résidus antimicrobiens (voir l'Annexe B).
- Le processus de pré-validation et de validation, tel que développé par l'OCDE depuis 1996⁴, doit être utilisé dans la validation subséquente des systèmes d'essais servant à déterminer les effets des médicaments antimicrobiens sur la flore intestinale humaine. Le processus est adapté et modifié selon le système d'essai à valider.
- Les plans d'étude doivent prendre en compte les questions non résolues des effets des conditions d'entreposage et d'incubation sur les inoculats fécaux.

2.4 Calcul d'une DJA microbiologique

Quand plusieurs valeurs d'une DJA microbiologique peuvent être déterminées en suivant les méthodes décrites ci-dessous, la valeur la plus appropriée (pertinente pour les humains) doit être utilisée.

2.4.1. Rupture de la barrière de colonisation

2.4.1.1. Calcul d'une DJA à partir de données d'essai *in vitro*

Si le critère à l'étude est la rupture de la barrière de colonisation, la DJA doit être calculée à partir des données de CMI obtenues à partir des systèmes d'essais sur des cultures de lisiers fécaux et en culture semi-continue, continue et alimentée en discontinu (*fed-batch*).

DJA calculée à partir des données de CMI :

$$DJA = \frac{CMI_{calc} \times \text{Masse du contenu du colon (220 g/jour)}}{\text{Masse du contenu du colon (220 g/jour)}}$$

Fraction de dose orale x 60 kg (personne)
disponible pour les microorganismes

CMI_{calc} : La CMI_{calc} est dérivée de la limite de confiance inférieure à 90 % pour la CMI_{50} moyenne des genres pertinents sur lesquels le médicament est actif, comme il est décrit à l'Annexe C.

DJA dérivée d'autres systèmes d'essais *in vitro* :

$$DJA = \frac{CSENO}{\text{Fraction de dose orale x 60 kg (personne) disponible pour les microorganismes}} \times \text{Masse du contenu du colon (220 g/jour)}$$

CSENO : La CSENO dérivée de la limite de confiance inférieure à 90 % de la CSENO moyenne établie par systèmes *in vitro* doit être utilisée pour tenir compte de la variabilité des données. Il n'est donc pas nécessaire, en général, d'inclure dans la formule les facteurs d'incertitude pour établir une DJA microbiologique.

Masse du contenu du colon : La valeur de 220 g est établie à partir du contenu du colon mesuré sur des victimes d'accidents.

Fraction de dose orale disponible pour les microorganismes : La fraction de dose orale disponible pour les microorganismes du colon doit être établie sur la base de mesures *in vivo* du médicament administré oralement. Si les données disponibles sont suffisantes, la fraction de dose disponible pour les microorganismes peut être aussi calculée en soustrayant de 1 la fraction (de dose orale) excrétée dans l'urine. Des données sur des humains sont préférables, mais en leur absence, des données sur des animaux non-ruminants sont acceptables. En l'absence de données contraires, on peut supposer que les métabolites qui ont une activité antimicrobienne sont équivalents au composé parent. La fraction peut être réduite si le requérant fournit des données quantitatives *in vitro* ou *in vivo* démontrant que le médicament est inactivé lors du transit intestinal.

2.4.1.2. Calcul d'une DJA à partir de données d'essai *in vivo*

La DJA microbiologique est égale à la DSENO divisée par le facteur d'incertitude. Les facteurs d'incertitude des études *in vivo* doivent être appliqués, au besoin, en fonction de la classe du médicament, du protocole, du nombre de donneurs et de la sensibilité des variables mesurées.

2.4.2. Augmentation des populations de bactéries résistantes

2.4.2.1. Calcul d'une DJA à partir de données d'essai *in vitro*

Si le critère à l'étude est une augmentation des populations de bactéries résistantes, les DSENO établies à partir de systèmes d'essais sur cultures continues, semi-continues et alimentées en discontinu (cultures en *fed-batch*) peuvent être utilisés pour établir une DJA microbiologique.

$$\text{DJA} = \frac{\text{DSENO} \times \text{Masse du contenu du colon (220 g/jour)}}{\text{Fraction de dose orale} \times 60 \text{ kg (personne) disponible pour les microorganismes}}$$

DSENO: La DSENO dérivée de la limite de confiance inférieure à 90 % de la DSENO moyenne établie par des systèmes *in vitro* doit être utilisée pour tenir compte de la variabilité des données. Il n'est donc pas nécessaire, en général, d'inclure dans la formule les facteurs d'incertitude pour établir une DJA microbiologique. Toutefois, dans les cas où la qualité et le volume de données *in vitro* utilisées dans le calcul de la DSENO comportent des insuffisances, il pourrait être nécessaire d'introduire un facteur d'incertitude.

2.4.2.2. Calcul d'une DJA à partir de données d'essai *in vivo*

La DJA microbiologique est égale à la DSENO divisée par le facteur d'incertitude.

Les facteurs d'incertitude des études *in vivo* doivent être appliqués, au besoin, en fonction de la classe du médicament, du protocole, du nombre de donneurs et de la sensibilité des variables mesurées.

3. GLOSSAIRE

Le glossaire regroupe les termes trouvés dans les annexes et dans le corps du texte.

Système d'essais:	Méthode utilisée pour déterminer les effets des résidus antimicrobiens sur la flore intestinale humaine.
Acide gras à chaîne courte:	Acide gras volatile produit par la flore intestinale. Les principaux acides gras sont l'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique.
Activité antimicrobienne:	Effet d'un agent antimicrobien sur une population de bactéries. Agent antimicrobien: Substance pharmaceutique dérivée ou produite par procédé biologique ou chimique ayant pour principal effet une activité antimicrobienne.
Animal de laboratoire conventionnel:	Animal de laboratoire dont la flore intestinale est indigène et naturelle.
Animaux à flore intestinale approchant celles des humains:	Animal hôte axénique inoculé par de la flore fécale humaine.
Barrière de colonisation:	Fonction de la flore intestinale normale qui limite la colonisation du colon par des microorganismes exogènes et empêche la surpopulation de microorganismes indigènes potentiellement pathogènes.
CMI ₅₀ :	Concentration d'un composé antimicrobien à laquelle 50 % des isolats testés d'un genre donné sont inhibés.
Colonisation:	Établissement de microorganismes dans le tractus intestinal
Concentration minimale inhibitrice (CMI):	Concentration la plus basse d'un composé antimicrobien qui inhibe la croissance d'un microorganisme d'épreuve telle que déterminée par des procédures d'essais normalisées.
Concentration sans effet nocif observable (CSENO):	Concentration la plus élevée ne causant aucun effet nocif observable dans une étude particulière.
Coprophagie:	Ingestion de fèces
Culture alimentée en discontinu (culture en <i>fed-batch</i>):	Culture alimentée par un écoulement discontinu, continu ou en semi-continu avec un milieu nutritif. Des parties de la culture peuvent être enlevées à des intervalles prédéterminés. Le volume de culture n'est pas constant.

Culture continue:	Culture maintenant continuellement la croissance de microorganismes par l'apport de nutriments et l'enlèvement simultanés du milieu épuisé et en maintenant une charge microbienne constante dans un volume fixe d'incubation.
Culture définie:	Culture microbienne dans laquelle toutes les espèces sont connues.
Culture discontinue:	Culture dans laquelle ni le substrat ni les déchets ne sont enlevés jusqu'à la fin de l'incubation, normalement incubée sur de courtes périodes, en général allant jusqu'à 24 heures.
Culture semi-continue:	Culture dans laquelle un substrat ou des déchets sont ajoutés ou enlevés de manière semi-continue pour maintenir un volume d'incubation fixe.
DJA microbiologique:	DJA établie à partir de données microbiologiques.
Dose journalière admissible (DJA):	Quantité estimative d'une substance, exprimée par rapport au poids du sujet, qui peut être ingérée chaque jour sur la durée d'une vie sans risque appréciable pour la santé humaine.
Dose sans effet nocif observable (DSENO):	Dose la plus élevée administrée ne causant aucun effet nocif observable dans une étude particulière.
Effet d'interaction:	Effets du traitement modifiés par d'autres facteurs présents. Par exemple, l'effet du traitement peut être plus grand ou plus petit chez l'homme que chez la femme ou peut changer avec le temps.
Facteur d'incertitude:	Facteur de correction qui prend en compte les caractéristiques des données d'essais comme il est décrit aux paragraphes 2.4.1.2., 2.4.2.1. et 2.4.2.2.
Facteur de groupage:	Facteur expérimental dont les valeurs ou niveaux définissent des groupes d'unités expérimentales similaires ou qui réagissent de façon similaire. La variation systématique dans les groupes peut être ignorée dans l'estimation de l'erreur au cours de l'analyse statistique, ce qui donne une plus grande précision. Un exemple serait une cage contenant plusieurs animaux, formant chacun une unité expérimentale, ou une cellule d'isolement à plusieurs cages.
Flore intestinale:	Flore microbienne normale du colon

Inoculat (fécal) de donneur:	Flore fécale, prélevée sur des volontaires humains, utilisée pour inoculer les systèmes d'essais. La flore fécale est considérée équivalente à la flore intestinale.
Lisier fécal:	Fèces humaines ou solides fécaux dilués au minimum dans un milieu tampon anaérobie.
Organisme d'épreuve:	Organisme ajouté expérimentalement à un système d'essais pour évaluer la rupture de la barrière de colonisation.
Phase solide:	Matière sous forme de particules utilisée dans un système d'essais <i>in vitro</i> .
Plan complet:	Un plan statistique est complet si toutes les combinaisons de facteurs ou de groupes sont observées au moins une fois. Un plan est incomplet si quelques combinaisons de facteurs ne sont pas observées.
Plan équilibré:	Un plan statistique est équilibré si chaque combinaison de valeurs ou de niveaux de tous les facteurs pris en compte (facteurs liés au traitement, facteurs à examiner tels que le genre ou facteurs de groupage) portent sur le même nombre d'unités expérimentales ou de répétitions. Un plan partiellement équilibré n'est pas équilibré, mais les combinaisons de facteurs de traitements et d'autres facteurs sont régulièrement présentes de sorte que l'analyse statistique demeure relativement simple.
Plan factoriel:	Plan expérimental comprenant plusieurs combinaisons d'un certain nombre de facteurs, incluant un facteur de traitement, ayant chacun deux valeurs ou niveaux et plus. D'autres facteurs seraient la stratification (p. ex. par genre) ou le groupage (p. ex. une cage). Typiquement, la variable est mesurée sur un nombre donné d'unités expérimentales pour chaque combinaison de niveaux des divers facteurs. L'analyse statistique des données comprend une analyse multifactorielle de la variance.
Résidu de médicament:	Le médicament lui-même et tous ses dérivés, métabolites et produits de dégradation qui persistent dans ou sur les aliments.
Taux de dilution (écoulement):	Taux d'approvisionnement et d'appauvrissement du milieu d'un système de cultures en continu. Le taux de dilution contrôle le taux de croissance microbienne dans un système de cultures en continu.
Unité expérimentale:	Sujet type à qui un traitement est administré et sur qui des mesures

	sont effectuées. Il peut s'agir d'un animal entier ou d'un organe ou tissu donné, d'une cage contenant plusieurs animaux ou une culture de cellules.
Variable mesurée:	Paramètre spécifique mesuré dans une expérience. Des variables spécifiques sont définies dans le protocole d'essai et sont les mesures effectuées au cours d'une étude.
Variation systématique:	Facteurs qui affectent les variables à mesurer. La variation est systématique dans le sens où elle représente un effet toujours présent. La variation systématique est distincte de la variation aléatoire, car cette dernière n'est pas prédictible. Elle peut être causée par des facteurs présentant un intérêt tels que le genre ou par d'autres facteurs tels qu'une cellule d'isolement donnée, qui ne sont pas au centre des préoccupations poursuivies au cours des études.

4. RÉFÉRENCES

1. Cerniglia, C.E., et Kotarski, S., 1999. Evaluation of Veterinary Drug Residues in Food for Their Potential to Affect Human Intestinal Microflora. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Pages 29, 238-261.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2004. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Anaerobically; Approved Standard - Sixth Edition. NCCLS document M11-A6. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA, USA.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition. NCCLS document M7-A6. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA, USA.
4. OCDE. 2001. Séries d'essais et d'évaluation No 34, Publications sur l'environnement, la santé et l'innocuité. Ébauche du document d'orientation sur l'élaboration, la validation et l'acceptation réglementaire de méthodes d'épreuves nouvelles et mises à jour acceptables au plan international et l'évaluation des risques. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris, France.

Ligne Directrice à l'intention
De l'industrie

Études sur l'évaluation des résidus de médicaments
vétérinaires dans les aliments de consommation humaine:
Méthode générale d'établissement d'une dose journalière
admissible (DJA) microbiologique

ANNEXE A

Questions à examiner au cours de l'élaboration de systèmes d'essais et de l'interprétation des données

1. Conditions expérimentales

Les données produites en vue d'études sur cultures en écoulement continu, semi-continu et alimentées en discontinu (culture en *fed-batch*) varient selon les conditions de croissance (p. ex., le milieu de culture, le pH et le taux de dilution). Différentes espèces de bactéries peuvent avoir différents taux de croissance dans les conditions expérimentales du système d'essai. Si le taux de dilution de la culture dépasse le taux de croissance de l'espèce bactérienne, celle-ci finira par être éliminée de la culture d'essai. Le système d'essai doit donc être conçu pour maximiser la rétention de bactéries différentes et maintenir la complexité de l'inoculum initial.

Les agents antimicrobiens peuvent influencer sur les taux de croissance de divers groupes de bactéries. Cela peut entraîner la perte de composantes de la culture mixte par une baisse du taux de croissance en deçà du taux de dilution utilisé dans le système d'essais et certaines composantes de la flore risquent aussi d'être évacuées de la culture. Tout cela peut être minimisé en établissant des conditions d'essai à des taux de dilution plus petits.

La susceptibilité aux antimicrobiens est influencée par la condition physique des organismes exposés, qui à leur tour sont affectés par les conditions de croissance du système d'essais. D'autres travaux doivent être réalisés afin de déterminer l'impact de différentes conditions de croissance sur les CSENO calculées pour la rupture de la barrière de colonisation et l'augmentation de la population de bactéries résistantes.

Un certain nombre de facteurs doivent être pris en considération dans les protocoles des systèmes d'essais *in vivo*. Par exemple, la contamination croisée est un facteur important des études menées sur des animaux dans une cellule d'isolement sans germes. Les protocoles doivent donc être conçus pour minimiser ce type de contamination.

2. Inoculum

La composition de la flore intestinale peut varier d'un sujet à l'autre en ce qui a trait aux groupes de bactéries et aux organismes résistants. Les populations de bactéries sont relativement stables chez un individu, mais ce n'est pas nécessairement le cas des groupes de bactéries résistantes.

Plusieurs donneurs doivent être utilisés pour tenir compte des différences entre les flores des sujets. Les inoculats groupés ne rendent pas compte des différences entre les flores des sujets. Par conséquent, les systèmes d'essais qui utilisent des inoculats fécaux obtenus de donneurs séparés sont préférables aux autres pour déterminer l'effet des résidus antimicrobiens sur la flore intestinale. De plus, la composition de l'inoculum du donneur doit être prise en compte au cours de l'interprétation des résultats d'essais.

Ligne Directrice à l'intention
De l'industrie

Études sur l'évaluation des résidus de médicaments
vétérinaires dans les aliments de consommation humaine:
Méthode générale d'établissement d'une dose journalière
admissible (DJA) microbiologique

3. Durée des études

Il est important d'établir le temps d'incubation optimal de cultures fécales discontinues pour déterminer les changements dans les populations de bactéries. Dans le cas de systèmes d'essais complexes à long terme *in vitro* ou *in vivo*, il est aussi nécessaire d'établir la période durant laquelle l'intégrité et la complexité de la flore intestinale demeurent stables et représentatives de la flore en question.

ANNEXE B

Questions statistiques à prendre en considération au cours de la conception d'études sur les résidus antimicrobiens

Deux éléments de portée générale qui soulèvent des préoccupations en santé publique ont été décrits : la rupture de la barrière de colonisation et l'augmentation des populations de bactéries résistantes. Le plan expérimental doit être conçu selon l'élément à étudier et tenir compte de variables particulières. Un paradigme de conception de ces systèmes d'essais comprend le choix du système d'essais, les traitements et le suivi du système dans le temps. Le choix du système dépend des caractéristiques du tractus intestinal humain qui doit être représenté par le système d'essais. Comme les essais de CMI sont simples à concevoir, plusieurs des questions discutées ci-dessous ne s'appliquent pas à cette méthode.

L'unité expérimentale est une composante cruciale du plan d'étude. Pour un système d'essai *in vivo*, par exemple, l'unité peut être un animal ou une cage entière. Si les cages sont groupées dans des cellules d'isolement, il est possible d'administrer certains traitements ou tous les traitements portant sur différentes cages dans chaque cellule. Dans ce cas, la cellule d'isolement devient un facteur de groupage puisque les cages placées dans la même cellule sont censées réagir de la même façon. Ce facteur de groupage est un moyen important pour réduire les variations systématiques. Une autre question qui se pose est de savoir s'il existe d'autres facteurs systématiques, tels que le genre, devant être pris en considération, ou en d'autres mots, s'il faut utiliser un plan factoriel. S'il existe de multiples facteurs, le plan retenu doit faire appel à une combinaison de choix de facteurs à inclure. Il est alors important que cela se fasse de manière à établir un plan équilibré. Dans un plan équilibré et complet, toutes les combinaisons sont représentées et s'expriment un même nombre de fois. Il est aussi possible de concevoir des plans incomplets et de différents types d'équilibre partiel. Dans ces derniers cas, l'analyse de la variance est nécessaire, mais de tels plans peuvent être utiles, par exemple lorsque les ressources expérimentales sont restreintes. Un exemple de plan incomplet serait le schéma expérimental en chassé-croisé à deux périodes normalisé.

Il faut également décider de la façon dont les traitements doivent être appliqués aux unités expérimentales. Dans certains cas, un traitement à deux volets, comportant un traitement par médicament et une épreuve bactérienne, peut être nécessaire. Trois groupes au moins de traitement antimicrobien doivent être constitués, en plus des groupes témoins appropriés. Le choix des niveaux de traitement dépend de la gamme désirée de doses, sans oublier non plus les niveaux d'effets et sans effets. La durée et la méthode d'administration du médicament sont adaptées au système d'essais. Un aspect important de certaines études est l'évolution des effets dans le temps, d'où la nécessité d'effectuer des mesures répétées des variables. Les problèmes courants sont le choix du moment, l'intervalle entre les mesures et les erreurs dues à l'absence de données.

Le contrôle de la variation aléatoire due à la variabilité biologique et aux erreurs de mesure dépend du nombre d'unités expérimentales et d'échantillons. Ces nombres sont déterminés en

fonction de la connaissance antérieure du système d'essais et des variables à mesurer, que ce soit grâce à l'expérience acquise ou en calculant la taille d'un échantillon, qui doivent être utilisées quand c'est possible. Des répétitions suffisantes permettent d'effectuer des mesures précises des effets des traitements et d'interaction appropriés, par exemple, des effets de traitement qui changent dans le temps. Dans certaines études, il peut être important d'examiner de tels effets d'interaction dans le cadre d'une analyse statistique. Un autre type de répétition est le groupement d'échantillons fécaux d'animaux dans une seule cage ou de différents donneurs. Dans les deux cas, le calcul des moyennes offre des avantages, mais pas la possibilité d'estimer la variabilité entre les répétitions. Le groupement peut obscurcir les effets individuels (du traitement et de l'inoculum) et son utilisation doit se faire par rapport aux objectifs des études.

ANNEXE C Calcul de CMI_{calc}

La CMI_{calc} est dérivée de la limite de confiance inférieure à 90 % pour la CMI_{50} moyenne du genre le plus approprié sur lequel le médicament est actif. La limite de confiance inférieure à 90 % est calculée à l'aide des données de transformation logarithmique. L'écart type expérimental de la moyenne et l'écart type sont dérivés à partir des valeurs transformées par logarithme de CMI_{50} . Cela implique aussi que la limite de confiance inférieure à 90 % doit être transformée vers l'arrière pour obtenir la valeur correcte. La formule de calcul de la limite de confiance est la suivante :

$$LC \text{ inférieure à } 90 \% = CMI_{50} \text{ moyenne} - \frac{\text{ÉcartType}}{\text{racine carrée de } n} \times t_{0.10, dl}$$

Où : CMI_{50} **moyenne** est la moyenne des valeurs normalisées de CMI_{50} , **ÉcartType** est l'écart type des valeurs normalisées de CMI_{50} , n est le nombre de valeurs de CMI_{50} utilisées dans le calcul, $t_{0.10, dl}$ est le 90^{ième} percentile d'une distribution de t-centrale de degrés de liberté (dl), $dl = n - 1$.

Examiner la CMI_{50} du genre approprié (voir la section 2.1). La CMI_{calc} est basée sur une valeur sommaire des genres qui ne sont pas intrinsèquement résistants au médicament. Par conséquent, la CMI_{calc} est basée sur la CMI_{50} des genres sur lesquels le médicament est actif. Veiller à ce que toutes les valeurs de CMI_{50} ne soient pas caractérisées comme étant « </= », de sorte qu'elles puissent être utilisées dans le calcul de la CMI_{calc} .

Exemple de calcul

Toutes les bases de transformation logarithmique des valeurs de CMI_{50} peuvent être utilisées. Cependant, une transformation logarithmique de base 2 fournira des valeurs entières pratiques pour le calcul, si des dilutions doubles de médicament sont employées dans la procédure d'essai de CMI. Dans l'exemple de calcul donné plus bas, les valeurs de CMI_{50} ont été transformées selon la formule suivante :

$$\text{Log}_2(CMI_{50}) - \text{Log}_2(\text{minimum}(CMI_{50})/2)$$

Exemple de calcul CMI_{calc}								
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Bactéroïdes</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Peptococcus/ Peptostreptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
CMI₅₀								
0.03125	0.25	0.25	8.0	32	2.0	>128	0.25	1.0
Log₂(CMI₅₀) – Log₂(0.03125/2)								
1	4	4	9	11	7	R*	4	6
<p>Moyenne (Log₂(CMI₅₀) – Log₂(0.03125/2)) = 5.75</p> <p>Écart type (Log₂(CMI₅₀) – Log₂(0.03125/2)) = 3.196</p> <p>t_{0.10,7} = 1.415</p> <p>Limite de confiance inférieure à 90 % = 5.75 – 3.196/sqrt(8)*1.415 = 4.15</p> <p>Transformation arrière à l'échelle de CMI = 2^{(4.15 + log₂(0.03125/2))} = 0.277</p> <p style="text-align: right;">CMI_{calc} = 0.277</p>								
* Les valeurs de CMI ₅₀ des genres intrinsèquement résistants ne sont pas utilisées dans le calcul								