

Rappel sur la résistance acquise de M.tuberculosis aux antibiotiques

- **de nature exclusivement chromosomique**
- **par mutation –sélection**
- **apparaît facilement car:**
 - **taux de mutation élevé (1 pour 10^5)**
 - **cavernes très riches en bacilles (jusqu'à 10^8)**
 - **antibiotiques fortement bactéricides (isoniazide, rifampicine,..)**

les différents tests utilisés pour mesurer la sensibilité aux antibiotiques de M.tuberculosis

- **la méthode des proportions**
- **l'antibiogramme en milieu liquide**
- **la détection moléculaire de la résistance**

la méthode des proportions (1): principe

- **mesure de la proportion de mutants résistants, sur milieu solide de L.Jensen**
- **souche résistante = souche dont la proportion de mutants est beaucoup plus élevée que celle des souches normales**
- **critères de résistance (concentration critique et proportion critique) adoptés après étude de nombreuses souches sauvages et résistantes isolées chez des malades en cours de traitement**

la méthode des proportions (2): concentration critique

- **choisie entre la CMI la plus haute des souches normales et la CMI la plus basse des souches résistantes**
- **en tenant compte du comportement de l'antibiotique dans le milieu**
ex: rifampicine : 40mg/l

la méthode des proportions(3): proportion critique

- **choisie très supérieure à la teneur moyenne des souches sauvages en mutants résistants**
- **1% ou 10% selon les antibiotiques, fonction de la teneur en mutants résistants des souches sauvages**
 - 1% pour INH, RMP, SM, EMB et PAS**
 - 10% pour PZA, kana mycine, éthionamide, cyclosérine, thiacetazone**
 - nouveaux antituberculeux?: AMK:10% (comme kana), fluoroquinolone :1%**

exemple résultat antibiogramme (méthode des proportions)

	témoin	témoin	INH0.2	SM4	RMP40	EMB2
-1	∞	∞	30	∞	0	0
-3	∞	∞	0	∞	0	0
-5	32	35	0	30	0	0
conclusion			0.01% S	100% R	<0.01% S	<0.01% S

la méthode des proportions (4): performances

- **résultats définitifs après 42 jours d'incubation mais nombreux résultats rendus après 28 jours**
- **possibilité d'antibiogramme direct (voir plus loin)**
- **utilisable pour les antibiotiques de réserve**
- **précision et reproductibilité dans la mesure de la proportion de mutants**
- **très bons résultats avec INH et RMP (SM et EMB)
difficultés avec PZA et certains antibiotiques de réserve (cyclosérine, éthionamide)**

le cas du pyrazinamide

- pyrazinamide actif à pH acide seulement → test sur milieu à pH 5.5 → difficultés +++ (croissance, maîtrise du pH)
- nombreux échecs pour absence de (ou trop forte!) croissance sur les témoins
- important: souches mono-résistantes au PZA extrêmement rares

l' antibiogramme direct

- **effectué directement à partir du prélèvement** (et non à partir de la culture =antibiogramme indirect)
- **possible seulement si le prélèvement est riche en bacilles(> 4 à 5 bacilles par champ) et en quantité suffisante (pour ensemercer tous les tubes)**
- **interprétation: id antibiogramme indirect**
- **résultats en même temps que la culture positive**

antibiogramme en milieu liquide(1): principe

- **principe: étude indirecte de la proportion de mutants résistants**
- **dans les systèmes Bactec 460, Bactec 960, Bact/Alert et les tubes MGIT**
- **souche résistante= souche qui se développe aussi rapidement dans le tube avec antibiotique que dans le tube témoin sans antibiotique** (inoculum du tube avec antibiotique =100fois inoculum du tube témoin : → > ou = 1% de mutants résistants)

antibiogramme en milieu liquide (2): performances

- **résultats en 5 à 10 jours**
- **pas de détermination précise du % de mutants résistants mais réponse seulement en termes de $<1\%$ ou $>1\%$**
- **pas bon pour antibiogramme direct (cocktail antibiotiques obligatoire pour la culture)**

antibiogramme en milieu liquide(3): performances

- **très bons résultats avec le système Bactec 460**
- **avec les autres systèmes: >90% de concordance avec la méthode de référence pour INH et RMP mais 80 à 90% seulement pour SM et EMB**
 - **contrôle des résistances par la méthode de référence**
- **pas de standardisation des concentrations critiques pour les antibiotiques de réserve**

tests de biologie moléculaire (1)

- = mise en évidence de mutations sur les gènes qui codent pour la cible de l'antibiotique
- amplification du gène et étude des mutations sur les amplifiats (Line probe assay ou séquençage)
- dépendant d'abord de l'état des connaissances sur les gènes de résistance

tests de biologie moléculaire (2)

- utilisés seulement

-pour la détection de la résistance à

rifampicine (Innolipa-Rif TB ou
séquençage *rpoB*)

pyrazinamide (séquençage *pncA*)

fluoroquinolones (séquençage de la QRDR de
gyrA)

-par des labos spécialisés

-dans le contexte d'une possible résistance

tests de biologie moléculaire (3)

- **une nouvelle bandelette: Genotype MTBDR**
 - >détection de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide
 - pour rifampicine: rpoB id Innolipa-RifTB
 - pour isoniazide: position 315 de katG
- premiers résultats encourageants:détection de 70% des souches R isoniazide

performances des tests de biologie moléculaire pour détection de la résistance

- pour rifampicine: excellentes
(sp,se,vpp et vpn*: >97%)
- pour fluoro-quinolones:
sp (97%) et vpn (99%) excellentes
se(83%) et vpp(67%) moins bonnes
- pour pyrazinamide et isoniazide:?

*se= sensibilité, sp= spécificité, vpp = valeur prédictive d'un résultat positif ,
vpn =valeur prédictive d'un résultat négatif