Rôle du laboratoire dans le suivi du traitement antibiotique

Pr. H.ZIANE

Rappel sur les critères de prescription d'une antibiothérapie:

Avant la prescription d'un traitement antibiotique, le clinicien doit répondre à un certain nombre de questions:

1.Dois-je prescrire un antibiotique?

2.Si oui, quel antibiotique?

3.Comment?

4.Comment juger de l'efficacité?

Une prescription correcte et judicieuse doit répondre aux 4 critères énumérés ci-dessous:

1-Infection bactérienne:

Le clinicien s'aidera d'arguments cliniques et bactériologiques en se basant sur les résultats du laboratoire et notamment **l'identification du germe** responsable de l'infection.

La connaissance de l'épidémiologie des agents étiologiques des infections ainsi que de leur sensibilité aux ATB permettent de **guider vers un choix d'ATB adapté**.

2-Choix de l'ATB: doit tenir compte du :

- ✓ Bactérie en cause(spectre),
- ✓ Site infectieux (biodisponibilité),
- ✓ Terrain du patient (la présence d'une pathologie sous-jacente: immunodépression,diabète)

Le laboratoire intervient pour **identifier le germe**, **apprécier sa sensibilité aux ATB**, et **étudier l'efficacité d'une antibiothérapie.**

3-L'administration de l'ATB: nécessitent des connaissances sur:

- ✓ Terrain du patient,
- ✓ Pharmacocinétique,
- ✓ Type d'infection (locale/disséminée)

4.Le suivi du TRT ATB: il est nécessaire et permet de **juger de son efficacité** et de **sa toxicité**.

"Rôle du laboratoire à chacune des étapes"

Bactéricidie/Bactériostase: Interaction antibiotique / bactérie

1.Effet létal(mortel)de l'antibiotique= **bactéricidie** quantifiée par la concentration minimale bactéricide **« CMB ».**

2.Ralentissement de la croissance bactérienne: **bactériostase**; quantifiée par la concentration minimale Inhibitrice **« CMI ».**

I . Tests de sensibilité aux antibiotiques:

- Le test doit être pratiqué sur une souche **pure**.
- Culture bactérienne **jeune** de 18-24h
- Inoculum bactérien : 0.5MF
- Le milieu de culture utilisé : **Mueller Hinton** liquide ou solide, simple ou additionné de sang.
- Le choix de la technique se fera selon **une chronologie**: de la plus simple à la plus élaborée
- Conditions d'incubations variables selon la bactérie.

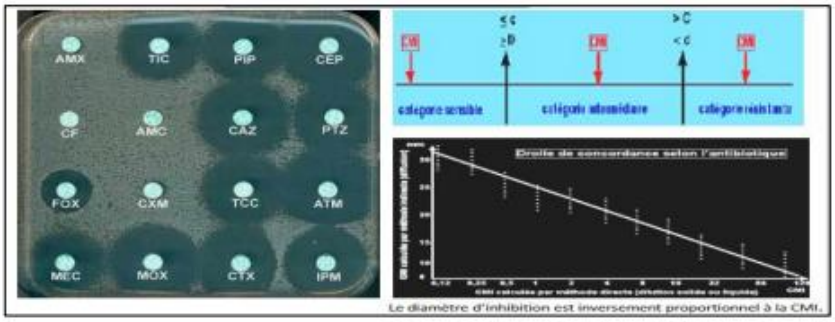
1. Antibiogramme:

- La méthode utilisée est la méthode de **diffusion en gélose** avec des disques.
- Le principe du test: consiste à utiliser **des disques** en **papier buvard** imprégnés d'une concentration fixe d'ATB.
- Ces disques sont déposés à la surface d'une gélose inoculée par une suspension bactérienne contenant une quantité **fixe** de bactéries (inoculum).
- Après une incubation à 35 degré pendant **18-24 heures**, il s'établit un gradient de concentration entre **la culture bactérienne** et **la diffusion du disque** et qui s'exprime par **un diamètre d'inhibition de la culture**.

La mesure de ce diamètre permet de classer la bactérie après comparaison des diamètres à une table de lecture dans 3 catégories :

- ✓ Sensible : les souches S sont celles pour lesquelles la probabilité de **succès** thérapeutique est **forte**, à condition de respecter les autres conditions pharmacodynamiques.
- ✓ Intermédiaire : les souches I sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est **imprévisible**. La valeur de la CMI pour ces souches n'est pas prédictive.
- ✓ Résistante: les souches R sont celles pour lesquelles il existe une **forte** probabilité d'**échec** thérapeutique. On ne peut s'attendre à un effet thérapeutique quel que soit le traitement.

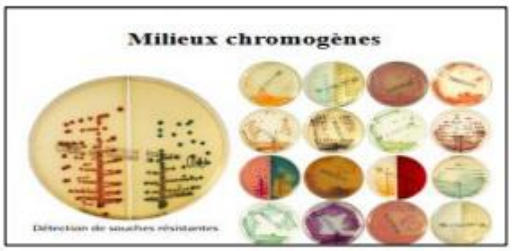
- **Avantages:** rapidité et reproductibilité.
- **Inconvénients:** étude de bactériostase, manque de précision, tient compte des doses mais pas du site infectieux.



2. Tests rapides:

2.1. Chromatographiques:

- Test **complémentaire** à l'antibiogramme
- Obligatoire pour certaines espèces bactériennes *(Haemophilus, Neisseria gonorrhoeae)*
- **Test à la nitrocéfine:** est une céphalosporine (ATB) chromogène qui scindée par **une ß-lactamase**, libère une substance **chromogène** (colorée).
- Principe: déposer une colonie sur un disque imprégné de **nitrocéfine**, lorsqu'il y a production de **β-lactamase** par la bactérie, il y a apparition d'une **coloration rouge** sur le disque.



2.2. Moléculaires:

Détection des gènes de résistance aux antibiotiques.

- Techniques utilisées : **hybridation avec des sondes nucléiques** ou **l'amplification par PCR** .

Exemples :

- ✓ Gène mecA: Résistance à **l'oxacilline** chez *Staphylococcus aureus*
- ✓ Gènes vanA, vanB et vanC: Résistance aux **glycopepetides** chez Enterococcus spp.

- **Avantages:**
  - Rapide, spécifiques et sensibles.
  - Complètent les méthodes phénotypiques
  - Intérêt pour les bactéries à croissance **lente** ou **difficilement cultivables**
  - Appliquées **directement** sur les produits pathologiques, réponse plus rapide, notamment en cas d'infection sévère.
- **Inconvénients:**
  - Détection des gènes non exprimés par la bactérie (c.a.d qu'on peut détecter **des gènes de résistance** alors que la bactéries a **un phynotype sensible**)
  - Ne permettent pas la détection de nouveaux mécanismes de résistance, à la différence de

l'antibiogramme « classique ».

3. Etude des concentrations minimales inhibitrices (CMI):

-C'est **la plus faible concentration d'antibiotique** qui **inhibe** une **culture visible à l'œil nu**. Elle définit la **bactériostase**. *CMI plus précise qu'avec les disques d'antibiotiques*.

- **Indications:**
  - Infections sévères,
  - étude de la sensibilité de *Streptococcus pneumoniae* aux **β-lactamines,**
  - étude de la sensibilité des *Staphylocoques* et *Entérocoques* aux **glycopeptides**,....etc.

- Méthode par dilution:

Principe :consiste à mettre un inoculum bactérien fixe (105 UFC/ml) dans une série de *dilution de l'antibiotique*.

-*Un tube **sans antibiotique** servira de témoin.*

-Elle se pratique en:

-Milieu liquide: (en **tubes** ou en **microplaques**)

-Milieu solide: l'antibiotique est incorporé dans **la gélose**; chaque boîte de Pétri correspond à une concentration donnée d'antibiotique. Il est possible de tester plusieurs souches déposées sous forme de spot sur la même série de boîtes.

-La CMI déterminée, permet de classer la bactérie en **S, I ou R**

- **Avantages :** technique précise,
  - Donne un résultat **quantitatif** en mg/l ou en µg/ml.
  - Utile dans les infections sévères ou quand les foyers infectieux sont peu accessibles.
- **Inconvénients:** technique longue, lourde et coûteuse**.**

-Détermination automatisée de la CMI:

- Certains **automates** utilisés pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques rendent des résultats de CMI.
- Des **galeries** contenant une gamme de concentration par antibiotique sont inoculées avec une suspension de la bactérie à étudier.
- Après incubation dans l'automate, des CMI seront déterminées.
- Trois automates : **le Phoenix (Becton Dickinson), le Vitek 2 (bioMérieux) et le Microscan (Siemens).**

-Méthode par diffusion:

- Pour alléger cette technique, **des bandelettes de plastique** imprégnées d'un gradient prédéfini de concentrations croissantes d'antibiotique sont utilisées.
- Les bandelettes **E-Tests® (bioMérieux)** et **MICE® Tests (Oxoid)** sont commercialisées.
- La technique d'ensemencement est identique à celle de l'antibiogramme.
- Après une incubation à 35° pendant **18-24 heures**, une ellipse d'inhibition symétrique centrée le long de la bandelette se forme.
- La lecture de la CMI est effectuée au **point d'intersection** de l'ellipse d'inhibition et de la bandelette.
  - **Avantages:** technique facile à réaliser,
  - **Inconvénient :** coût élevé

4. Etude de la concentration minimale bactéricide (CMB):

-C'est **la plus faible concentration** de **l'antibiotique** bactéricide c'est-à-dire qui **lyse les bactéries** (≤0,01% de survivants). Elle définit **la bactéricidie.**

-Principe :

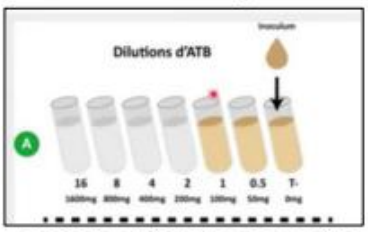
-dénombrer le nombre de bactéries survivantes à partir de **la dilution de l'ATB** correspondant à la CMI.

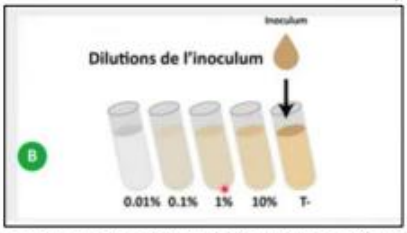
-Une gamme de concentration est réalisée comme pour la détermination de la CMI. Le même jour, une numération de l'inoculum de départ (tube témoin sans antibiotique) est effectuée en réalisant 4 dilutions de **10 en 10** qui seront chacune ensemencées **en strie** sur une gélose.

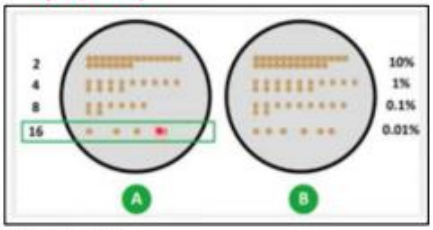
-Après incubation à 35°C pendant **18 h**, les colonies seront dénombrées et le nombre d'**UFC(unité formatrice de colonie)** à la dilution 1/10000 correspondra à 0,01% de l'inoculum de départ.

-Après **18 h** d'incubation à 35°C, tous les tubes qui ont une concentration d'antibiotique ≥ à la CMI seront repiqués sur gélose **en stries**. Après **18 h** d'incubation à 35°C, les colonies présentes sur chaque strie sont comptées et comparées à la numération de l'inoculum de départ.

-La CMB est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle le nombre de colonies bactériennes est ≤ au nombre de colonies présentes sur la dilution de l'inoculum de départ **(≤0,01%).**







Une vidéo très utile pour bien comprendre: https://youtu.be/1knLutVGwhU

-**Un antibiotique est bactéricide:** rapport **CMB/CMI <2** (la valeur de sa CMB est proche de celle de la CMI).

-**Antibiotique est bactériostatique : CMB/CMI < 32,**

-**Souche dite tolérante:** s'il s'agit d'un antibiotique bactéricide avec un rapport **CMB/CMI >32.**

Indication CMB: infection grave telle que l'endocardite infectieuse

Cinétique de bactéricidie : vitesse de bactéricidie, consiste en un dénombrement dynamique au cours du temps (2, 4, 6 heures) de bactéries survivantes à partir de bouillons contenant l'antibiotique à étudier.

- **Inconvénient :** méthode lourde, non réalisée en routine.

5. Etude des associations des antibiotiques:

Indications:

- Elargir le spectre
- Obtenir une synergie
- Augmenter l'effet bactéricide lors d'infections sévères (endocardites, bactériémies, arthrites, infections sur matériel…)
- Couvrir une infection polymicrobienne.
- Les infections à BMR, BHRe
- Eviter l'apparition de mutants résistants
- Diminuer la durée du traitement

J0 : Gamme étalon (100; 10; 1; 0.1; 0.01 %), ensemencement, incubation.

J0 : Incubation avec les ATB seuls et associés 2 à 2.

J1 : ensemencement des bouillons, incubation avec des repiquages sur milieu solide après 2H, 4H, 6H et 18H
J2 : comparaison avec les témoins

Pouvoir bactéricide des associations:

Une association est dite **bactéricide**; si le nombre de bactéries survivantes est **≤ à 0,01%** de l'inoculum de départ.

Elle est précoce si la bactéricidie est observée **à partir de 2H.**

Cinétique de la bactéricidie:

Association synergique : effet des deux antibiotiques est supérieur à celui de l'antibiotique utilisé seul.

Elle est antagoniste: son effet est inférieur à celui de l'antibiotique utilisé seul.

Elle est indifférente: son effet est égal à celui de l'antibiotique utilisé seul.

Intérêt : Permet de **suivre l'efficacité** de l'association d'antibiotique utilisée et **d'étudier l'association d'antibiotique la plus efficace** pour le traitement.

- **Avantages:**
  - Pertinence du test : moyennement reproductible.
  - Bonne corrélation avec l'efficacité des antibiotiques in vivo.
  - Appréciation de la bactéricidie quantitative et de la vitesse de bactéricidie.
- **Inconvénients**:
  - Surestime l'effet des antibiotiques sur les bactéries **fragiles.**
  - Contraintes techniques (souche du malade, rigueur et temps).
  - Absence de standardisation.

Contrôle de qualité:

- Le contrôle de qualité permet d'assurer la fiabilité des réactifs, la reproductibilité du test et de valider la technique utilisée.
- **Obligatoire**.
- Il est réalisé en utilisant des souches témoins dites : souches de référence, qui sont testées dans les mêmes conditions que la souche test.
- La pratique du contrôle de qualité doit être régulière (une fois par semaine au moins).

II. Tests de suivi:

Dosage des ATBs dans le sérum:

Intérêt :

- Apprécier le risque toxique d'un antibiotique ayant un index thérapeutique étroit: la dose efficace est proche de la dose toxique (The **therapeutic index** is a comparison of the amount of a **therapeutic** agent that causes the **therapeutic** effect to the amount that causes toxic effects), ex : **aminosides** et **glycopeptides**
- Surveiller et prédire l'efficacité d'une thérapeutique
- Dosage de la teicoplanine « à la vallée » (un antibiotique de la famille **des glycopeptides**)
- Adapter les posologies des antibiotiques toxiques
- Vérifier la compliance des patients
- Foyers où les antibiotiques ne diffusent pas ou peu : foyers enkystés, collection purulente, anaérobiose et acidité pour **les aminosides.**

Principe du test : on effectue deux prélèvements de sérum le 1er au pic de la plus forte concentration sérique (entre 1 et 2 h après injection) et le 2eme à la vallée au moment de l'élimination de l'antibiotique (avant une nouvelle injection).

-Méthodes très diverses (microbiologiques, immuno-enzymatiques...)
-Pour être **actif**, la concentration locale de l'antibiotique doit être **>CMI**

Le pouvoir bactériostatique /bactéricide d'un liquide biologique:

Le pouvoir bactériostatique:

-Indiqué pour apprécier l'efficacité d'un traitement d'infection sévère ou compliquée, et se pratique le plus souvent sur le sérum.

-Il est nécessaire d'avoir la souche responsable de l'infection.

Principe : consiste à mettre en contact différentes dilutions du sérum avec un inoculum de la bactérie pathogène responsable de l'infection. On note la dernière dilution où il n'y a pas de croissance bactérienne.

L'effet bactériostatique est valable si la plus grande dilution est ≥1/16ème ou 1/32ème

Le pouvoir bactéricide d'un liquide biologique:

-Consiste à dénombrer les bactéries survivantes à partir de la dernière dilution du pouvoir bactériostatique et permet de noter si le sérum est suffisamment bactéricide.

L'effet bactéricide est valable si la plus grande dilution est ≥1/8ème

M.tuberculosis: tests de sensibilité:

- Le principe de l'antibiogramme d'une souche de M.tuberculosis: évaluer la proportion de **bacilles résistants** qui existent dans le nombre total de bacilles ensemencés.
- Déterminer la proportion critique de **mutants résistants** dans la population totale au delà de laquelle la souche peut être considérée comme résistante.
- Pour chacun des antibiotiques majeurs entrant dans le traitement de la tuberculose, cette proportion critique est de **1%** de la population totale.
- Si la proportion de la population bacillaire résistante **dépasse 1%** de la population totale, **la souche est déclarée résistante.**
- Le milieu utilisé est le milieu de **Löwenstein-Jensen sans antibiotique** (milieu témoin) et **le milieu de Löwenstein-Jensen contenant une concentration bien déterminée d'un antibiotique donné**.
- Les milieux sont ensemencés avec **la même population bacillaire** afin de pouvoir comparer le nombre de bacilles poussant sur chaque tube contenant un antibiotique **(bacilles résistants à l'antibiotique)** au nombre de bacilles poussant sur le milieu témoin **(bacilles sensibles et bacilles résistants).**
- Les colonies de M.tuberculosis ne devenant visibles à l'œil nu qu'au bout de 21 à 28 jours d'incubation à 37°, la lecture du test de sensibilité est faite après 4 semaines (28e j) et 6 semaines (42e j) d'incubation.
- La lecture consiste à compter le nombre de colonies apparues dans les tubes témoins et celles ayant poussé éventuellement sur les tubes contenant l'antibiotique et d'en déduire la proportion de bacilles résistants existant dans population totale.

$$\% \text{ de } R = \frac{\text{Nombre de } R \times 100}{\text{Population totale } (S + R)}$$

Indications: échec thérapeutique, résistance primaire ou secondaire, tuberculose extrapulmonaire?

Conclusion:

-Importance de la communication et collaboration clinicien-microbiologiste pour la transmission des résultats et pour le choix des techniques.

-Aider et orienter la prise en charge thérapeutique.

-Amélioration des pronostics.