

La coloration vitale au diacétate de fluorescéine permet un diagnostic plus précoce de la tuberculose à germes résistants à la rifampicine

A. Van Deun,*† A. K. J. Maug,‡ A. Hossain,‡ M. Gumusboga,* B. C. de Jong*

*Unité de Mycobactériologie, Institut de Médecine Tropicale, Anvers, Belgique ; †Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires, Paris, France ; ‡Fondation Damien Bangladesh, Dhaka, Bangladesh

RÉSUMÉ

CONTEXTE : Projet de la Fondation Damien au Bangladesh.

OBJECTIF : Evaluer la coloration vitale au diacétate de fluorescéine (FDA) pour les frottis de crachats en matière de prédiction de l'échec défini par la culture et de prédiction de la résistance à la rifampicine (RMP).

SCHEMA : Etude opérationnelle rétrospective.

RÉSULTATS : On a pu évaluer 1633 épisodes de négativation tardive et d'échec définis par la coloration du frottis à l'auramine (respectivement 640 et 584 cas de premier traitement et 185 et 224 cas de retraitement). Une FDA négative a une valeur prédictive de 95% pour une culture négative chez les patients sous premier traitement, alors que sa valeur prédictive positive se situe autour de 95% en cas de retraitement. La valeur prédictive d'un résultat positif (à l'exclusion des très faiblement positifs) pour une résistance à la RMP ou la présence de mycobactéries non-tuberculeuses (MNT) est d'au moins 90%, sauf en cas de négativation tardive au cours du premier traitement ; un résultat négatif permet d'exclure plus de 95% des mêmes données, sauf en cas d'échec de retraitement. La FDA a identifié correctement entre 88% et 98% de l'ensemble des cas de résistance à la RMP.

CONCLUSION : La coloration FDA augmente la proportion de patients TB mis sous traitement de deuxième ligne, sans qu'un régime de retraitement standard de première ligne ait été mis en route. Dans notre contexte, où l'examen microscopique est excellent, la présentation des cas tardive et la prévalence des résistances faible, elle s'est avérée indispensable pour la référence rapide à une culture efficace et à l'identification des cas précocement suspects. Dans d'autres contextes où la prévalence des MNT est faible et l'accès difficile à des tests précis et rapides de sensibilité, on pourrait même prendre en considération la mise en route immédiate d'un traitement de deuxième ligne dans les échecs positifs à la FDA.

MOTS-CLÉS : microscopie ; multi-résistance ; viabilité ; culture ; tests de sensibilité aux médicaments

DANS LES CONTEXTES où le traitement antituberculeux est efficace et où les taux de tuberculose à germes multirésistants (TB-MDR) primaires sont faibles, un excellent examen microscopique à la recherche de bacilles acido-résistants (BAAR) peut conduire à de fréquents excès de diagnostic d'échec du primo-traitement en raison de la confusion avec l'excrétion tardive de bacilles morts.^{1,2} Les programmes nationaux de lutte contre la tuberculose (PNT) tentent fréquemment de dépister la TB-MDR à partir des négativations tardives des frottis à BAAR mais ceci est tout à fait inefficace.³ La culture et les tests de sensibilité aux médicaments (TS) échouent généralement alors que le TS avec les tests line-probe (LPA) peut donner des résultats ne permettant pas de conclusion en raison de la présence d'ADN dégradée.

Nous avons signalé antérieurement la valeur prédictive élevée de la coloration vitale au diacétate de

fluorescéine (FDA) pour le diagnostic des échecs véritables de traitement (démonstrés par la culture) et montré qu'une corrélation était supérieure à 95% avec la croissance en culture. En se basant sur cette étude menée dans un laboratoire de référence, nous avons recommandé la coloration FDA pour le dépistage de la TB-MDR.⁴ Depuis 2008, la technique au FDA a été utilisée au Bangladesh parallèlement avec le TS sur lames (TS lame)⁴ par quatre laboratoires régionaux, ce qui a permis un passage plus précoce au régime de deuxième ligne du Bangladesh comportant la gatifloxacine d'une efficacité élevée.⁵ Cette étude opérationnelle visait à évaluer de manière rétrospective l'utilité du dépistage par le FDA au moyen d'indications de référence comme ses valeurs prédictives avec les cultures mycobactériennes et le TS comme référence ainsi que sa contribution globale à la prise en charge de la TB-MDR.

Auteur pour correspondance : Armand Van Deun, Mycobacteriology Unit, Institute of Tropical Medicine, Nationalestraat 155, 2000 Antwerp, Belgium. Tel : (+32) 3 247 6548. Fax : (+32) 3 247 6333. e-mail : avdeun@itg.be

[Traduction de l'article : « Fluorescein diacetate vital staining allows earlier diagnosis of rifampicin-resistant tuberculosis » Int J Tuberc Lung Dis 2012; 16(9): 1174–1179. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.11.0166>]

Le Projet Bangladesh de la Fondation Damien (DF) met en œuvre la lutte contre la TB au nom du PNT dans une population d'environ 25 millions de personnes qui se présentent fréquemment à un stade avancé de maladie qui reste toutefois sensible aux médicaments.^{6,7} Les régimes comportant la rifampicine (RMP) d'un bout à l'autre sont utilisés pour les nouveaux cas (Catégorie I) et les cas de retraitement (Catégorie II). Le traitement est directement observé en utilisant tous les pourvoyeurs disponibles.⁸ En accord avec les directives du PNT, sont considérés comme échecs du traitement les cas positifs à partir du 5^{ème} mois de traitement, même en présence d'un seul BAAR. La même limite de positivité est utilisée pour la définition d'une rechute à frottis positif (au moins un BAAR dans un frottis de crachats à n'importe quel moment après la guérison ou l'achèvement du traitement).

MÉTHODES

Patients et échantillons

Initialement, tous les types de personnes suspectes de TB-MDR ont été éligibles pour un frottis FDA, c'est-à-dire les échecs de Catégories I et II ainsi que les rechutes de même que les négativations tardives (frottis positif après respectivement 3 et 4 mois d'une phase intensive prolongée) quel que soit le nombre de BAAR sur le frottis coloré au Ziehl-Neelsen (ZN) ou à l'auramine. Les frottis ont été généralement examinés à frais et le patient a été référé pour la coloration au FDA et le TS sur lame à un laboratoire régional où l'on a répété l'examen microscopique à l'auramine parallèlement à la coloration au FDA. Un autre échantillon a été conservé grâce un préservatif à base de chlorure de cétylpyridinium en vue d'une culture sur milieu de Löwenstein-Jensen (LJ) au laboratoire de référence du projet. Le TS sur LJ a été réalisée au laboratoire de référence supranational (SRL) à Anvers sur les isolats qui y ont été transférés systématiquement.

Procédé FDA

Nous avons introduit les modifications suivantes à notre technique antérieure :

- Coloration pendant 30 minutes de frottis non fixés avec une solution de travail au FDA, décoloration pendant 3 minutes à l'alcool acide à 0,5% et stérilisation pendant 10 min au phénol à 5% ;⁴
- Refroidissement (Quenching) au moyen de permanganate de potassium aqueux à 0,5% pendant 1 minute après décoloration ;
- Lecture d'une longueur de frottis avec agrandissement de 200× au moyen d'un microscope à fluorescence avec diode électroluminescente (LED ; plutôt qu'un agrandissement de 1.000× exigé par les systèmes à vapeur de mercure), en utilisant un module Easy FLUOLED® (Fraen Corporation Srl,

Settimo Milanese, Italy) avec une LED de 450 nm et des filtres pour auramine sur les microscopes Olympus CX21 ou CX31. (Olympus Corporation, Tokyo, Japon) ;

- Prévention de la précipitation et de l'évaporation grâce à une moindre concentration des stocks (échantillons de stock de 500 µl de FDA à 0,5% poids/volume dans l'acétone, au lieu de 100 µl à 5%) ;
- Adjonction d'un frottis de contrôle positif provenant d'un cas à frottis positif récemment diagnostiqué.

Tests au laboratoire de référence

La décontamination, la culture primaire et le TS sur LJ ont été exécutées selon les méthodes standard décrites antérieurement.⁶ Notre technique de TS sur lame a été légèrement modifiée depuis la description antérieure :⁴

- Homogénéisation des crachats au moyen du citrate de N-acétylcystéine pour un étalement régulier ;
- Remplacement de la décontamination acide par l'emploi d'antibiotiques sélectifs ;⁹
- Remplacement du milieu de Sula par celui de Middlebrook 7H9 avec 10% de sérum de chèvre ;
- Adjonction d'un flacon comportant 500 µg/ml d'acide para-nitrobenzoïque pour l'identification des mycobactéries non-tuberculeuses (MNT).¹⁰

L'identification des MNT a reposé sur la croissance en présence d'acide p-nitrobenzoïque et sur la morphologie des microcolonies sur le TS sur lame, à côté de l'analyse 16S r-ARN sur les isolats sur LJ référés au SRL.

Considérations éthiques

En raison de son caractère rétrospectif, cette étude n'a pas été soumise à un comité éthique.

RÉSULTATS

On trouve au Tableau 1 une vue globale de l'ensemble des 4.512 tests FDA exécutés par les quatre laboratoires au cours de ces 3 années et leur répartition en fonction de leurs indications. Les rechutes après Catégorie I sont sous-représentées car cette indication a été rapidement abandonnée vu leur grand nombre et le faible rendement en TB-MDR. Les frottis FDA ont été exécutés dans 1.477 négativations tardives de Catégorie I et 292 de Catégorie II ainsi que dans 748 échecs de Catégorie I et 317 de Catégorie II. Le pourcentage de résultats négatifs a varié de presque 80% dans les négativations tardives de Catégorie I à 21% pour les rechutes de Catégorie II. Les résultats très faiblement positifs (convertis en 1 à 9 bacilles par 100 champs à fort grossissement)¹¹ ont représenté 41% de tous les frottis FDA positifs dans les négativations tardives et moins dans les autres groupes.

Tableau 1 Nombre de frottis pratiqués avec coloration vitale au FDA, répartis en fonction des indications et des résultats

Indication	Résultats des frottis FDA				
	Positif* n	Très faiblement positif* n	Négatif n	Total n	Négatif %
Négativisation tardive de Catégorie I	177	123	1177	1477	79,7
Echec de Catégorie I	129	57	562	748	75,1
Négativisation tardive de Catégorie II	128	49	115	292	39,4
Echec de Catégorie II	180	52	85	317	26,8
Rechute de Catégorie I	126	39	82	247	33,2
Rechute de Catégorie II	333	144	125	602	20,8
Autre†	275	121	433	829	52,2
Total	1348	585	2579	4512	57,2

*Très faiblement positif, se rapporte à l'échelle de quantification pour les frottis acido-résistants de l'Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires/Organisation Mondiale de la Santé.

†Inclut les nouveaux cas, les retours après abandon, le suivi des traitements de deuxième ligne et des cas non spécifiés.

FDA = diacétate de fluorescéine.

On trouve au Tableau 2 les résultats des colorations FDA comparés avec les résultats des cultures sur milieu liquide et/ou solide (pour autant qu'ils aient été disponibles ; les contaminations ont été exclues) dans les 2.834 négativations tardives et ainsi que dans les échecs définis uniquement par les frottis. Un seul résultat a été pris en compte par patient/indication, le résultat le plus positif étant choisi en cas de discordance. La spécificité et la valeur prédictive négative (VPN) du FDA ont été élevées dans les négativations tardives de Catégorie I (respectivement $n = 640$, spécificité 91% et VPN 95%) et dans les échecs ($n = 584$, spécificité 95% et VPN 97%). La sensibilité et la valeur prédictive positive (VPP) ont été plus élevées chez les patients de Catégorie II (respectivement 93% et 94% dans les 185 négativations tardives, respectivement 94% et 97% dans les 224 échecs). Dans les échantillons de Catégorie I, la sensibilité n'a été que d'environ 80 à 85% et la VPP a été la plus basse (69% dans les négativations tardives et 83%

dans les échecs) ; dans la Catégorie II, la spécificité a été de 91% dans les échecs alors que la VPN restait modérée, à 83%, les valeurs étant quelque peu meilleures dans les négativations tardives (spécificité 93%, VPN 91%).

On trouve au Tableau 3, la TB résistante à la RMP (Rr) et les MNT réparties par indication et par résultat de la FDA ainsi que la VPP pour les deux réunis, uniquement dans les échantillons à culture positive. Environ 92% à 95% des isolats provenant d'échantillons de Catégorie II avec n'importe quel nombre de BAAR viables ainsi que provenant des échecs de Catégorie I avec une positivité d'au moins 1+ se sont avérés Rr ou MNT. Dans les échantillons de Catégorie I positifs à la FDA correspondant à des négativations tardives et à des échecs faiblement positifs, cette VPP a été de l'ordre de 80%, alors qu'elle n'atteignait qu'environ 44% dans les frottis très faiblement positifs à la FDA provenant de négativations tardives de Catégorie I. N'apparaissent pas au Tableau les échantillons négatifs à la FDA mais positifs au ZN ayant poussé à la culture : 58% de 26 FDA négatifs de Catégorie I et 57% des 7 FDA-négatifs de Catégorie II, tous positifs à la culture et provenant d'échantillons à négativisation tardive ont fourni des isolats Rr ou MNT, par comparaison avec 88% des 16 échecs de Catégorie I et 90% des 10 échecs de Catégorie II.

On trouve au Tableau 4 la précision du diagnostic sur l'ensemble des échantillons pour les BAAR viables, Rr et MNT. Un petit nombre de Rr ou de MNT ont été isolés dans les échantillons négatifs au FDA, ce qui démontre une prédiction correcte à 95–97% de la positivité BAAR sans importance clinique, à l'exception du groupe des échecs de Catégorie II (85%). Les MNT représentent environ la moitié des négativations tardives ayant échappé dans les deux régimes ; toutefois, les échecs ayant échappé sont habituellement Rr. Les frottis très faiblement positifs à la FDA ne sont que médiocrement prédictifs d'une Rr dans les négativations tardives de Catégorie I (16% de Rr et aucune MNT identifiés dans cette catégorie) ou dans les échecs (29% de Rr mais 45% en cas d'inclusion des MNT). Les frottis très faiblement positifs au

Tableau 2 Caractéristiques opérationnelles de la coloration vitale au FDA dans les négativations tardives des frottis acido-résistants et dans les échecs de traitement (échantillons dont seulement un résultat positif ou négatif de la culture est disponible ; un résultat par patient et par indication)

Indication	FDA-négatif		FDA-positif ou très faiblement positif		Sensibilité % (IC95%)	Spécificité % (IC95%)	VPP % (IC95%)	VPN % (IC95%)
	Culture- positive n	Culture- négative n	Culture- positive n	Culture- négative n				
Négativisation tardive Catégorie I ($n = 640$)	26	468	100	46	79 (71–86)	91 (88–93)	69 (60–76)	95 (92–96)
Echec Catégorie I ($n = 584$)	16	441	105	22	87 (79–92)	95 (93–97)	83 (75–86)	97 (94–98)
Négativisation tardive Catégorie II ($n = 185$)	7	74	98	6	93 (86–97)	93 (84–97)	94 (87–98)	91 (82–96)
Echec Catégorie II ($n = 224$)	10	49	160	5	94 (89–97)	91 (79–97)	97 (93–99)	83 (71–91)

FDA = diacétate de fluorescéine ; IC = intervalle de confiance ; VPP = valeur prédictive positive ; VPN = valeur prédictive négative.

Tableau 3 VPP de la coloration vitale au FDA pour la TB résistante à la RMP et pour les MNT dans les négativations tardives des frottis acido-résistants et dans les échecs de traitement avec frottis acido-résistants, en se limitant aux échantillons où des mycobactéries se développent dans des milieux solides et/ou liquides

Indication, résultat de FDA	TB sensible <i>n</i>	TB résistante à RMP <i>n</i>	MNT <i>n</i>	VPP pour TB résistante à RMP ou MNT % (IC95%)
Négativations tardives Catégorie I				
Très faiblement positif (<i>n</i> = 18)	10	8	0	44 (22–69)
Positif (<i>n</i> = 82)	18	64	0	78 (67–86)
Les deux (<i>n</i> = 100)	28	72	0	72 (62–80)
Echec Catégorie I				
Très faiblement positif (<i>n</i> = 21)	4	11	6	81 (57–94)
Positif (<i>n</i> = 84)	4	73	7	95 (88–98)
Les deux (<i>n</i> = 105)	8	84	13	92 (85–96)
Négativations tardives Catégorie II				
Très faiblement positif (<i>n</i> = 19)	1	11	7	95 (72–100)
Positif (<i>n</i> = 79)	5	70	4	94 (85–98)
Les deux (<i>n</i> = 98)	6	81	11	94 (87–97)
Echec Catégorie II				
Très faiblement positif (<i>n</i> = 34)	2	24	8	94 (79–99)
Positif (<i>n</i> = 126)	9	107	10	93 (86–96)
Les deux (<i>n</i> = 160)	11	131	18	93 (88–96)

VPP = valeur prédictive positive ; FDA = diacétate de fluorescéine ; TB = tuberculose ; RMP = rifampicine ; MNT = mycobactéries non-tuberculeuses ; IC = intervalle de confiance.

FDA ont une valeur prédictive plus importante au cours du traitement de Catégorie II, particulièrement si l'on envisage ensemble les Rr TB et les MNT (75–87%). Un frottis positif à la FDA a indiqué une TB Rr dans 67% des négativations tardives de Catégorie I (pas de MNT dans ce groupe) ; cette valeur a augmenté jusqu'à 82–88% dans les autres groupes

(ou jusqu'à 90–93% après adjonction des MNT). La précision globale des frottis FDA pour l'inclusion ou l'exclusion des TB Rr ou des MNT est d'environ 90% dans l'ensemble des groupes sauf dans les négativations tardives de Catégorie I (86% ; IC95% 83–89). Sur l'ensemble des Rr, 90%/88% étaient positifs ou très faiblement positifs à la coloration FDA dans les

Tableau 4 Précision de la coloration vitale au FDA pour exclure ou prédire une TB résistante à la RMP ou la présence de mycobactéries environnementales dans les cas de négativations tardives des frottis acido-résistants et dans les échecs de traitement

Parameter	Négativations tardives de Catégorie I <i>n</i> ou % (IC95%)	Echecs de Catégorie I <i>n</i> ou % (IC95%)	Négativations tardives de Catégorie II <i>n</i> ou % (IC95%)	Echecs de Catégorie II <i>n</i> ou % (IC95%)	Total <i>n</i> ou % (IC95%)
FDA négatifs					
Total	494	457	81	59	1091
TB résistante RMP	8	11	2	6	27
MNT	7	3	2	3	15
TB vraiment négative ou non-résistante à RMP	97 (95–98)	97 (95–98)	95 (87–98)	85 (73–92)	96 (95–97)
FDA très faiblement positifs					
Total	50	38	24	37	149
TB résistante RMP	8	11	11	24	54
MNT	0	6	7	8	21
TB réellement résistante à RMP	16 (8–30)	29 (16–46)	46 (26–67)	65 (47–79)	36 (29–45)
TB réellement résistante à RMP ou MNT	16 (8–30)	45 (29–62)	75 (53–89)	87 (70–95)	50 (42–59)
FDA positifs					
Total	96	89	80	128	393
TB résistante RMP	64	73	70	107	314
MNT	0	7	4	10	21
TB réellement résistante à RMP	67 (56–76)	82 (72–89)	88 (78–94)	84 (76–89)	80 (76–84)
TB réellement résistante à RMP ou MNT	67 (56–76)	90 (81–95)	93 (84–97)	91 (85–95)	85 (81–89)
N'importe quel résultat FDA					
Total	640	584	185	224	1633
Précision pour TB résistante à RMP ou MNT	86 (83–89)	92 (90–94)	91 (86–95)	89 (84–93)	89 (88–91)
TB avec résistance marquée à RMP	90 (81–95)	88 (80–94)	98 (91–100)	96 (90–98)	93 (90–95)
TB avec résistance marquée à RMP ou MNT	83 (73–90)	87 (79–93)	96 (89–99)	94 (89–97)	91 (88–93)

FDA = diacétate de fluorescéine ; TB = tuberculose ; RMP = rifampicine ; IC = intervalle de confiance ; MNT = mycobactéries non-tuberculeuses.

Tableau 5 Tendances des enrôlements pour traitement de la TB-MDR, Fondation Damien Bangladesh, 2005–2010

	2005 n (%)	2006 n (%)	2007 n (%)	2008 n (%)	2009 n (%)	2010 n (%)
Cas résistants à RMP diagnostiqués	101	106	167	127	129	121
Cas résistants à RMP enrôlés (% des diagnostiqués)	66 (65)	69 (65)	106 (64)	96 (76)	111 (86)	108 (89)
Cas résistants à RMP enrôlés avant Catégorie II (% des enrôlés)	3 (5)	2 (3)	15 (14)	16 (17)	38 (34)	50 (46)
Cas erronément considérés comme résistants à RMP (% des enrôlés)	5 (8)	4 (6)	6 (6)	12 (13)	11 (10)	8 (7)

TB-MDR = tuberculose à germes multirésistants ; RMP = rifampicine.

négativations tardives/échecs de Catégorie I respectivement et de 98%/96% dans les négativations tardives/échecs de Catégorie II. Au total, ceci représente 93% (IC95% 90–95). Ces proportions sont légèrement plus faibles (91% ; IC95% 88–93%) en cas d’inclusion des MNT.

On trouve au Tableau 5 tous les enregistrements pour traitement de la TB-MDR pendant la période 2005–2010. Le pourcentage de tous les patients diagnostiqués comme Rr et mis effectivement sous traitement est passé de 55% en 2005 à près de 90% en 2010. Particulièrement en 2009 (34%) et en 2010 (46%), une proportion plus importante de ceux-ci ont été diagnostiqués précocement grâce au FDA et à la TS sur lame avant l’administration d’un traitement de Catégorie II. Une proportion légèrement plus élevée n’a pas pu être confirmée comme Rr par la TS conventionnelle en 2008 (13%) et en 2009 (10%) mais en 2010, cette proportion est retombée au niveau antérieur (7%).

DISCUSSION

Nous avons signalé antérieurement les excellents résultats obtenus par la coloration vitale FDA sur des échantillons de crachats fraîchement examinés avec une VPP de 92% et une VPN de 97% pour une croissance en culture.⁴ Ces résultats avaient été obtenus dans un laboratoire de référence sur des échantillons frais provenant d’échecs de Catégorie I. Nous avons recommandé cette technique suivie d’une TS rapide sur lame pour le passage rapide à un traitement de deuxième ligne et pour limiter les références en vue de TS aux patients dont les échantillons de crachats étaient positifs à la coloration FDA. On n’a rapporté pratiquement aucun autre travail sur l’utilisation de la coloration FDA pour la TB et à notre meilleure connaissance, seul notre propre projet du Bangladesh utilise ces stratégies de dépistage et de passage précoces. Nous signalons ici notre expérience en matière d’utilisation en routine décentralisée de la coloration au FDA chez tous les suspects de TB-MDR identifiés au cours d’une période de 3 ans. Depuis lors, la technique a été améliorée : il s’est avéré que l’examen microscopique par fluorescence LED était meilleur que la microscopie conventionnelle par fluorescence puisqu’elle permet de se contenter d’un agrandissement de 200 fois quand on utilise la lampe standard d’excitation de l’auramine ainsi que le filtre d’émission.

La proportion de patients atteints d’une Rr confirmée qui sont passés à un traitement de deuxième ligne a augmenté de 60% à 83% des cas diagnostiqués. De plus, la proportion de patients atteints d’une Rr confirmée qui ont été identifiés et qui sont passés au traitement de deuxième ligne avant de recevoir un traitement de Catégorie II a triplé. Initialement, un nombre légèrement plus élevé de cas avaient été diagnostiqués erronément ; toutefois, ceci s’est réduit rapidement au faible niveau antérieur, considéré comme acceptable puisque le régime standard du Bangladesh est moins toxique et moins coûteux. De plus, nos résultats non publiés montrent que le régime du Bangladesh donne des résultats dans les TB-MDR non-confirmées (TB sensible à la RMP et/ou à l’INH) aussi bons que ceux signalés dans la TB-MDR.⁵

Nous avons limité ce rapport aux performances de la FDA sur les échantillons de crachats positifs pour les BAAR provenant des négativations tardives et des échecs au cours d’un traitement standard de première ligne, quoique nous ayons visé initialement d’autres groupes de retraitement comme les rechutes. Parmi celles-ci la VPP de la FDA a été la plus élevée mais la VPN a été relativement basse en matière de viabilité (données non fournies). De plus, alors que les rechutes de Catégorie I représentent rarement une TB-MDR, les rechutes de Catégorie II dans notre population ont comporté des proportions égales de TB sensible à tous les médicaments, de TB-MDR et de MNT. On a dès lors arrêté rapidement la coloration FDA dans les cas de rechute. Les rechutes de Catégorie I ont été mises au régime de Catégorie II en même temps que l’on pratiquait une TS lente ; toutefois, on a recouru à la TS rapide sur lame pour les rechutes de Catégorie II.

Notre analyse montre que le dépistage par FDA peut être également moins utile dans les échecs de Catégorie II où la VPN n’est pas satisfaisante en matière de croissance (83%, IC95% 71–91) et où 90% des colorations FDA faussement négatives correspondent à Rr ou MNT. Une TS rapide et une identification sans dépistage par FDA pourraient donc être recommandées dans les échecs de Catégorie II où dans de nombreuses populations, on a signalé qu’ils correspondent dans plus de 80% des cas à des TB-MDR.¹²

Le dépistage FDA s’est avéré le plus utile dans la Catégorie I en cas de négativations tardives et d’échec. Une VPN d’au moins 95% devrait nous permettre d’éviter de recourir à plus de 60% de tous les transferts pour TS dans notre population. Le faible

pourcentage de sujets à bacilles viables qui ont échappé pourraient être retestés à une occasion ultérieure s'ils sont toujours positifs. Un développement de bacilles sensibles à la RMP a été observé dans près de la moitié des négativations tardives de Catégorie I négatives à la FDA et positives en culture. Un résultat très faiblement positif à la FDA peut être ignoré dans le cas des négativations tardives dans l'attente d'une évolution ultérieure, puisque dans la plupart des cas, il n'y aura pas de développement sur culture ou un développement de bacilles sensibles, la valeur prédictive pour Rr étant seulement de 16%.

La VPP de la FDA a été élevée dans les échecs de Catégorie I et dans les négativations tardives de Catégorie II, un résultat franchement positif (pas très faiblement positif) correspondant dans 90% des échantillons à Rr ou MNT. Dans les contextes sans MNT ou avec accès difficile à la TS, un résultat franchement positif de la FDA pourrait dès lors constituer une indication suffisante pour l'enrôlement d'un patient dans un traitement coût-efficace de la TB-MDR. Vu les complications logistiques de la TS, comme par exemple les cultures faussement négatives, les erreurs de TS et la mortalité bacillaire due à des transferts difficiles et tardifs, la FDA pourrait même être utile dans les contextes ayant accès à la TS. Une stratégie de passage au traitement de deuxième ligne basée sur des frottis positifs à la FDA dans les échecs et dans les négativations tardives sous retraitement, pourrait même être plus justifiée dans les contextes où la prévalence de la TB-MDR est plus élevée dans les nouveaux cas que ce n'est le cas dans notre population où elle n'est que de 0,5%. La raison principale des tests ultérieurs pourrait être la différenciation entre Rr et MNT dans les contextes où les MNT ne sont pas très rares dans les groupes de suspects de TB-MDR. Cette différenciation ne peut être assurée de façon fiable par l'examen microscopique¹³ et un faux diagnostic de MNT pourrait avoir des conséquences particulièrement sérieuses.

Les directives du PNT du Bangladesh ont rendu impossible une meilleure utilisation de nos résultats de la FDA. La grande majorité des échecs FDA-négatifs de Catégorie I peuvent n'avoir pas eu besoin d'un régime de retraitement de première ligne vers lequel ils sont automatiquement transférés, même lorsqu'on n'a trouvé qu'un seul BAAR. Les directives actuelles de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour les programmes de lutte contre la TB recommandent de démarrer un traitement empirique de deuxième ligne dans les échecs de première ligne dans l'attente des résultats d'une TS lente conventionnelle ou lorsque la TS n'est pas possible.¹⁴ Dans notre cas, ceci aurait signifié que plus de la moitié de nos régimes de traitement de deuxième ligne auraient été donnés à des patients guéris.

Notre étude connaît quelques limitations. Premièrement, en raison de l'absence de données, nous

n'avons pas pu calculer les valeurs prédictives pour la rechute, qui pourraient avoir été indiquées dans les négativations tardives (les échecs avaient déjà été transférés vers le régime de traitement plus élevé suivant en se basant sur le frottis BAAR). Il pourrait paraître probable que les patients positifs à la coloration FDA et à négativation tardive, porteurs de bacilles sensibles à la RMP encourent un risque plus élevé de rechute en cas de traitement standard. Nous avons démontré récemment que la prolongation de la phase intensive du traitement de Catégorie I ne prévient pas les échecs mais réduit de manière significative les rechutes chez les patients dont les frottis sont positifs à 2 mois dans un régime comportant la RMP d'un bout à l'autre. Toutefois, la valeur prédictive de frottis conventionnels BAAR pour la rechute n'est que d'environ 2%.¹⁵ Dans cette étude, la moitié des cas de Catégorie I positifs à la FDA au 3ème mois abritait des bacilles sensibles à la RMP et il est possible que ceux-ci seulement auraient bénéficié réellement d'une prolongation de la phase intensive.

En deuxième lieu, la référence en vue d'un développement à la culture et pour Rr a impliqué le TS sur lame, méthode qui n'est pas recommandée par l'OMS. Toutefois, notre étude antérieure avait obtenu des valeurs prédictives similaires pour le développement uniquement sur culture de Löwenstein-Jensen, et la plupart des échantillons repris ici ont subi au SRL une TS sur lame tout comme une TS sur LJ, avec une concordance de 90 à 95% pour Rr entre les différents laboratoires. Le fait de considérer n'importe quel Rr comme un résultat exact pourrait avoir entraîné un léger excès de diagnostic, ce qui signifie que la VPP de la FDA pour Rr pourrait avoir été légèrement surestimée, et sa VPN légèrement sous-estimée.

La technique FDA est simple, mais impose quelques exigences, quoique beaucoup moindres que celles de la culture. Au moyen de microscopes à fluorescence LED, l'instrument et la fourniture de courant ne posent plus de problèmes sérieux. Toutefois, la poudre FDA doit être conservée congelée à moins 20°C, comme c'est le cas aussi pour les solutions stock (ou conservées à 4°C pendant quelques mois), ce qui dans la plupart des contextes limite son utilisation décentralisée à des laboratoires de niveau intermédiaire. De plus, les crachats doivent être frais ou conservés au réfrigérateur.

CONCLUSION

A l'opposé des résultats positifs sur frottis conventionnels, des résultats positifs au FDA apparaissant tardivement au cours du traitement sont un facteur prédictif puissant de l'échec d'une négativation de la culture et d'une résistance à la RMP. L'utilisation décentralisée de cette technique a triplé la proportion de patients TB mis précocement sous traitement de deuxième ligne. La coloration vitale FDA peut dès

lors améliorer considérablement l'efficacité du dépistage et du diagnostic de la TB-MDR dans les cas de négativation tardive déterminée par les frottis et dans les échecs du traitement de première ligne dans les contextes à faible prévalence de résistance à la RMP, à présentation tardive des cas ou à examen microscopique hautement sensible pour les BAAR. En cas de probabilité élevée de TB-MDR avant le test, un test FDA positif pourrait même être considéré comme une évidence suffisante pour mettre en route un traitement de deuxième ligne particulièrement au moyen d'un régime bien toléré et en cas de faible prévalence de MNT.

Références

- 1 Rieder H L. Sputum smear conversion during directly observed treatment for tuberculosis. *Tubercle Lung Dis* 1996; 77: 124–129.
- 2 Al-Moamary M S, Black W, Bessuille E, Elwood R K, Vedal S. The significance of the persistent presence of acid-fast bacilli in sputum smears in pulmonary tuberculosis. *Chest* 1999; 116: 726–731.
- 3 Telzak E E, Fazal B A, Pollard C L, Turett G S, Justman J E, Blum S. Factors influencing time to sputum conversion among patients with smear-positive pulmonary tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 666–670.
- 4 Hamid Salim A, Aung K J M, Hossain M A, Van Deun A. Early and rapid microscopy-based diagnosis of true treatment failure and MDR-TB. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10: 1248–1254.
- 5 Van Deun A, Kya Jai Maug A, Halim M A, et al. Short, highly effective, and inexpensive standardized treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 684–692.
- 6 Van Deun A, Aung K J M, Chowdhury S, et al. Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* in a rural area of Bangladesh and its relevance to the national treatment regimens. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3: 143–148.
- 7 Van Deun A, Salim A H, Daru P, et al. Drug resistance monitoring: combined rates may be the best indicator of programme performance. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 23–30.
- 8 Hamid Salim M A, Uplekar M, Daru P, Aung M, Declercq E, Lönnroth K. Turning liabilities into resources: informal village doctors and tuberculosis control in Bangladesh. *Bull World Health Organ* 2006; 84: 479–484.
- 9 Mitchison D A, Allen B W, Carrol L, Dickinson J M, Aber V R. A selective oleic acid albumin agar medium for tubercle bacilli. *J Med Microbiol* 1972; 5: 165–175.
- 10 Giampaglia C M S, Martins M C, Chimara E, et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* from other mycobacteria with *p*-nitrobenzoic acid using MGIT960. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11: 803–807.
- 11 Rieder H L, Van Deun A, Kam K M, Kim S J, Chonde T M, Trébucq A, Urbanczik R. Priorities for tuberculosis bacteriology services in low-income countries. 2nd ed. Paris, France: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2007.
- 12 World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Emergency update 2008. WHO/HTM/TB/2008.402. Geneva, Switzerland: WHO, 2008.
- 13 Dawson D J, Blacklock Z M, Hayward A J, Walsh M J. Differential identification of mycobacteria in smears of sputum. *Tubercle* 1981; 62: 257–262.
- 14 World Health Organization. Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. 4th ed. WHO/HTM/TB/2009.420. Geneva, Switzerland: WHO, 2009: pp 1–147.
- 15 Aung K J M, Declercq E, Ali Md A, et al. Extension of the intensive phase reduces relapse but not failure in a regimen with rifampicin throughout. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16: 455–461.