



Agence française de sécurité sanitaire
des produits de santé

Direction de l'Évaluation des Dispositifs Médicaux
Département Surveillance du Marché
Unité Évaluation et Contrôle du Marché-DIV

Protocole de Contrôle du marché des réactifs utilisés pour la recherche des anticorps anti *Helicobacter pylori* de type IgG et Totaux sur sérum ou plasma (version Janvier 2008)

1. Objectifs :

- Contrôler la sensibilité et spécificité de l'ensemble des Dispositifs Médicaux de Diagnostic In Vitro (DMDIV) participants.
- Comparer les tests immunochromatographiques rapides (TDR) (nouvellement arrivés sur le marché) aux techniques ELISA (EIA) classiques.

Ont été exclus de l'étude : les tests sur sang total et un test de fixation du complément

2. Etude technique :

2.1 Echantillons

2.1.1 Le panel

L'évaluation portera sur un panel de **100** échantillons natifs de type sérique (recueillis sur tube sec sans gel) comprenant **50** sérums positifs et **50** sérums négatifs. Une étude complémentaire sur **10** sérums douteux sera réalisée pour information.

Ces échantillons seront codés.

2.1.2 Caractéristiques des échantillons:

[voir **Annexe I** au protocole : Recherche d'*Helicobacter pylori* par culture dans des biopsies gastriques]

Il s'agit de **sérums de patients** dont les résultats de la fibroscopie et de la clinique sont **documentés**. Différents sites cliniques d'origines géographiques différentes vont participer à la constitution du panel de sérums afin d'intégrer la diversité de représentation des souches d'*H. pylori*. Les critères d'intégrations des patients sont les suivants: patients âgés de 18 à 80 ans, n'ayant pas reçu de traitement antibiotique dans les 4 semaines précédant la biopsie, ni d'inhibiteurs de la pompe à protons dans les 15 jours précédents la biopsie et n'ayant jamais eu de tentatives d'éradication d'*Helicobacter pylori*. Ces patients venant consulter pour une fibroscopie à visée anatomopathologique et également à visée bactériologique (mise en culture d'*H. pylori*), pourront se voir proposer un test respiratoire à l'urée marquée. De même un test à l'uréase rapide pourra être pratiqué sur la biopsie.

Critères de référence pour le classement des patients:

Les patients seront classés en : patients infectés, patients non infectés ou infection douteuse, sur la base des règles suivantes :

Patients infectés : ⇔ Sérums positifs

- Un patient sera considéré comme **infecté** si:
 - ▶ la culture de la biopsie est positive à *H. pylori*

- ▶ en cas de résultat négatif de la culture si :
 - ▶ Histologie et Test rapide à l'uréase sont positifs
- ou
 - ▶ Histologie et Test respiratoire à l'urée sont positifs

Patients non infectés : ↔ Sérums négatifs

- Un patient sera considéré comme **non infecté** si:
 - ▶ tous les tests sont négatifs
 - et ▶ s'il y a absence de gastrite à l'examen histologique

Infection douteuse : ↔ Sérums « douteux »

- L'infection sera considérée comme **douteuse** si 1 seul test est positif :
 - ▶ histologie positive seule
 - ou ▶ test rapide à l'uréase positif seul
 - ou ▶ gastrite (histologique) sans aucun test positif (Giemsa modifié ...)

Les sérums seront conservés en sérothèque à - 80°C sous un volume de 500 µl.

2.2 Modalités de l'expertise

Le protocole de la notice du fabricant doit être respecté. Les résultats doivent être exprimés sous forme qualitative et/ou semi quantitative assortis de l'interprétation conformément à la notice d'utilisation.

Les résultats codés seront rendus selon un bordereau de rendu de résultats prédéfini.

Les **110** échantillons du panel seront testés en simple. Les techniques manuelles seront réalisées dans le laboratoire de l'Afssaps (pour les tests à lecture subjective, les échantillons seront évalués en simple mais lus par 2 lecteurs indépendants, en cas de lecture discordante il sera fait appel à un 3^{ème} lecteur). Les techniques automatisées seront réalisées dans des laboratoires externes après concertation des industriels concernés. En cas de résultats douteux, l'évaluateur se réserve la possibilité de retester le sérum posant problème.

2.3 Critères d'Evaluation

Les résultats obtenus sur les 50 sérums positifs et les 50 sérums négatifs seront étudiés au regard des performances réelles annoncées dans les notices. Ensuite, en fonction de l'ensemble des résultats obtenus, un état des lieux sera réalisé et soumis aux experts pour analyse.

Le panel constitué pour cette étude pourra au besoin faire l'objet de quelques réajustements sur le positionnement des échantillons en fonction des résultats obtenus par l'ensemble des trousse. Par exemple, un sérum non reconnu par 80 % des trousse pourra voir son inclusion reconsidérée.

3. Evaluations des notices

L'ensemble des notices sera évalué selon les exigences essentielles requises dans la directive 98/79 CE. En fonction des résultats de l'évaluation des notices et du contrôle analytique du marché, il est possible que des ajouts de mentions spécifiques soient demandés dans les notices d'utilisation des dispositifs.

4. Confidentialité.

L'évaluation doit obéir aux règles strictes de la confidentialité. Les résultats restent propriété du fabricant du dispositif et de l'Afssaps.

5. Liste des experts

Experts externes :

Pr. Francis MEGRAUD Groupe Hospitalier Pellegrin Bordeaux, Bactériologie-enfants
Pr. Jean-Charles DELCHIER Hôpital Henri Mondor Créteil, Service de Gastro-entérologie
Pr Jean Dominique de KORWIN Hôpital central Nancy, Service de médecine interne H
Pr. Jean-Louis FAUCHERE Hôpital de la Milétrie Poitiers, Microbiologie A
Dr. Josette RAYMOND Hôpital Cochin Paris, Bactériologie
Dr Anne COURILLON-MALLET Centre Hospitalier de Villeneuve St Georges, Service d'Hépatogastro-entérologie
Dr. Thoai Duong LY L.A.B.M. LCL, Ivry sur seine, Biologie

Représentant CNDMDIV (commission nationale des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro)
Pr Claude James Soussy, Hôpital Henri Mondor, Créteil, Bactériologie-Virologie-Hygiène

Afssaps

UECM-DIV (unité évaluation et contrôle du marché DIV)

- Dr Natacha CHARLIER-BRET
- Dr Muriel DURAN CORDOBES
- Mme Béatrice BOUCHER

UCNQ2 (unité Contrôle national de qualité 2)

- Dr Muriel FROMAGE

Annexe I au protocole *H. pylori*

Recherche d' *Helicobacter pylori* par culture dans des biopsies gastriques

(Ref : REMIC ; référentiel en bactériologie médicale ; 2ème édition ; SFM/2M2 ed. Paris 2004)

Les prélèvements biopsiques doivent être adressés au laboratoire de bactériologie dans les **3 heures** qui suivent en conservant les biopsies dans un tube stérile contenant 0,5 ml de bouillon thioglycolate ou d'eau physiologique stérile. Si le délai avant examen est compris entre 3 heures et 24 heures, il faut utiliser un milieu de transport « portagerm pylori » ®.

Si ce délai est supérieur à 24 heures, la biopsie doit être acheminée congelée dans un tube sec.

• Examen Direct

- Au laboratoire de bactériologie

Les biopsies sont broyées stérilement. Le produit est étalé sur une lame et coloré par la méthode de Gram. Les *H. pylori* apparaissent comme des germes spiralés à Gram négatif. Ils sont parfois rares ou groupés en "bans de poissons". La recherche à fort grossissement doit être suffisamment complète (observer 20 à 50 champs au moins).

- Au laboratoire d'anatomopathologie

Les coupes sont colorées par Giemsa modifié (méthode de Romanovsky)

• Culture

La biopsie broyée est ensemencée en milieu solide.

Le milieu est constitué d'une base gélosée (Wilkins-Chalgren ou Mueller-Hinton) additionnée de 10 % de sang humain, de cheval ou de mouton.

Ensemencer une boîte de milieu non sélectif et une boîte de milieu sélectif (milieu de Skirrow).

L'atmosphère d'incubation doit être appauvrie en oxygène par rapport à l'air. En pratique, une concentration de 5 % d'oxygène convient à la plupart des souches. Cette tension réduite en oxygène peut être obtenue dans des enceintes closes (jarres) avec des générateurs de CO₂ ou de CO₂ et d'azote. L'atmosphère doit être humidifiée par une compresse placée dans le fond de la jarre.

La température optimale de culture est de 37°C. En primo-culture, les colonies apparaissent en 3 à 12 jours sur gélose au sang. En subculture, la croissance est plus rapide (2 à 4 jours). Les primo-cultures doivent donc être incubées 12 jours et examinées toutes les 48h à partir du 3^e jour. Certaines cultures dégénèrent rapidement. Il convient donc de démarrer les subcultures dès que les colonies sont visibles. Dans le cas de cultures pauvres, une subculture peut être tentée sur une petite surface de gélose (culture "en spot"). On peut également "réétaler les colonies" dans une autre zone du même milieu (à condition qu'il ne contienne aucun contaminant). Ces procédés favorisent la culture des souches difficiles.

• Identification

- Les colonies de *H. pylori* sont petites (0,5 mm) ou en nappes, brillantes, non hémolytiques, oxydase et uréase positives. Elles poussent lentement en microaérophilie.

- A l'examen direct, les bactéries sont Gram négatif, spiralées ou arquées ou en forme de U ou de O. Dans les cultures âgées, des formes coccoïdes non subcultivables apparaissent.

- *H. pylori* possède une oxydase, une catalase et une uréase très actives. Cette dernière enzyme peut être recherchée en milieu urée-indole de Ferguson ; la mise en suspension d'une pointe de pipette de colonies dans quelques gouttes de milieu fait virer le milieu au rouge en quelques minutes.

- Aucun diagnostic différentiel n'est à envisager. *H. pylori* est la seule bactérie retrouvée dans l'estomac humain avec *H. heilmannii* qui ne pousse pas dans ces conditions. De façon exceptionnelle, le diagnostic différentiel peut se poser avec des *Campylobacter* mais ces derniers sont uréase négative (à l'exception de *C. lari* biovar UPTC).