

PROTOCOLE D'EVALUATION DES REACTIFS POUR LA DETECTION DE L'ANTIGENE DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

1. Objectif :

Cette évaluation a pour objectif de tester un réactif de détection de l'antigène de *Chlamydia trachomatis* sur un panel d'échantillons validé par l'Afssaps. Trois panels sont disponibles selon le type de trousse testée (IF, EIA, BM) et les indications de celles ci (Endocol, Urétral, Urine...) :

- Panel Souche
- Panel Endocol
- Panel Urine

2. Panels :

La souche de référence utilisée: *Chlamydia trachomatis* sérotype D (ATCC VR 885), titrée à 10^7 CEI/ml (titrage des bactéries réalisée par culture cellulaire et dénombrement dans la suspension du nombre de CEI). Une dilution au 1/10 en MEM (10^6 CEI/ml) a permis de fabriquer les différents panels.

Le mode de préparation des panels est détaillé dans l'article scientifique suivant, paragraphe, Matériel et Méthodes (voir annexe II):

[Etude comparative de la sensibilité de 29 trousse de diagnostic direct des infections *Chlamydia trachomatis* dans le cadre d'une réévaluation pour l'Agence du médicament, RFL, octobre 1998, N° 306.](#)

- 2.2.1 Préparation de la suspension mère de souche de *Chlamydia trachomatis*
- 2.2.2 Titrage de l'inoculum infectieux

2.1 Panel souche : Souche EIA BM

- Il s'agit d'un panel à préparer destiné aux essais de trousse EIA et de BM.
- Tubes de 250 μ l à 10^6 CEI /ml
- Dilution par le centre évaluateur de la suspension de *C. trachomatis* dans le tampon d'extraction propre à chaque trousse des techniques EIA ou de BM (voir annexe au protocole)
- Conservation à -80°C

2.2 Panel endocol : E

- Il s'agit d'un panel prêt à l'emploi destiné aux essais de trousse d'IF.
- Etabli dans des sécrétions d'endocol dans lesquelles ont été réalisées des dilutions de la souche.
- Tubes de 500 μ l de témoins négatifs : EC et ED
- Tubes de dilutions (n=9) (dilutions dans sécrétions cervicales) : EE à ET

Dilutions	Témoins Négatif Tube 1	10 10 ⁻¹	9 10 ⁻²	8 10 ⁻³	7 5.10 ⁻⁴	6 10 ⁻⁴	5 10 ⁻⁵	4 10 ⁻⁶	3 10 ⁻⁷	2 10 ⁻⁸
E	C	E	G	I	K	M	O	Q	S	U
E	D	F	H	J	L	N	P	R	T	V

- Conservation à -80°C

2.3 Panel Urine : U

- Il s'agit d'un panel prêt à l'emploi destiné aux essais des trousse revendant cette indication : **à noter** :seules les trousse de *BM* étaient considérées comme suffisamment sensible en 1997

- Etabli dans un pool de premier jet d'urines masculines

- Tubes de 2 ml de témoins négatifs : U3 et U4

- Tubes de dilutions (n=9) : U5 à U20 préparées à partir de la dilution au 1/10 en MEM de la solution mère souche (10⁶ CEI /ml) (cf préparation dans rapport d'évaluation 1997)

Dilutions	Témoins Négatif Tube 1	10 10 ⁻¹	9 10 ⁻²	8 10 ⁻³	7 5.10 ⁻⁴	6 10 ⁻⁴	5 10 ⁻⁵	4 10 ⁻⁶	3 10 ⁻⁷	2 10 ⁻⁸
U	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21
U	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22

- Conservation à -80°C

3. Modalités d'expertise

Un lot de réactif est évalué en simple dans un laboratoire sur la totalité du panel.
Le protocole de la notice doit être respecté.

Dans le cadre d'analyses à l'extérieur de l'Afssaps, les résultats codés sont envoyés à l'Afssaps par mail selon un format défini. Ils sont exprimés sous forme qualitative et/ou quantitative assortis de l'interprétation conformément à la notice d'utilisation.

Après l'analyse des résultats et à l'appréciation de l'évaluateur en charge de la technique, toute discordance entre les résultats obtenus et ceux attendus entraînera un contrôle.

Concernant les techniques EIA et les tests rapides, l'évaluation est réalisée à partir du panel souche. Un point important ici concerne les modalités d'extraction qui peuvent être de 2 natures :

a) la chaleur (80°C à 100°C)

b) «chimique» (exemple: HCl puis NaOH).

Les dilutions préconisées sont réalisées soit dans le liquide d'extraction, soit dans du milieu de transport (ex MEM). Ces modalités sont dépendantes du procédé d'extraction. Lors des extractions par plusieurs réactifs, il n'est pas possible de réaliser des dilutions sériées. Dans ce cas il est impératif de partir de la souche mère au 1/10 (10⁶CEI /ml), de réaliser des dilutions intermédiaires dans du PBS ou dans de l'eau distillée puis de pratiquer la dernière dilution par rapport au volume final de liquide d'extraction .

4. Critères d'évaluation

Le seuil de sensibilité est déterminé comme la dernière dilution de l'échantillon pré titré donnant une réaction positive.

4.1 Concernant les prélèvements endo-cervicaux et urétraux :

- Compte tenu de l'expérience de l'évaluation de 1997 qui a montré que le calcul en nombre de CEI par test était parfois difficile et laborieux et source de discussion

- Compte tenu des conclusions de l'évaluation de 1997 qui montrent que l'ensemble des trousse qui permettent la détection jusqu'à au moins la dilution de **100 CEI /ml** (tube 6) ou **500 CEI /ml** (tube 7) sont des trousse qui permettent la détection **de moins de 50 CEI** dans la prise d'essai. (voir Tableaux II et III Annexe II)⁽¹⁾

- Compte tenu du cas particulier des **tests rapides** (tests sur membrane) dont le plus performant avait un seuil de détection évalué entre **500** (tube 7) et **1000** (tube 8) **CEI /ml**. (voir Tableaux II Annexe II)⁽¹⁾

Les critères du contrôle du marché sont

- Pour les **EIA**: Détection du tube contenant **500 CEI /ml**
 - Pour les **tests rapides**: **1000 CEI /ml**.
- Ce seuil de détection est équivalent à celui du test Clearview, seul test rapide retenu en 1997.

4.2 Concernant les urines :

- Compte tenu des résultats de 1997 où seules les techniques de biologie moléculaire par amplification génique avaient été retenues comme méthode de diagnostic utilisable sur les prélèvements urinaires avec un seuil de 1 à 10 CEI /ml d'urine (tubes 4 et 5)⁽¹⁾
- Compte tenu des recommandations de l'HAS (ANAES) de février 2003⁽³⁾
- Compte tenu de la nomenclature des actes de biologie médicale qui permet le remboursement des diagnostics réalisés sur prélèvement urinaire par les méthodes d'amplifications géniques (B100 versus B30)⁽⁴⁾

Les critères du contrôle du marché sont

- Pour les **tests de biologie moléculaire**: Détection du tube contenant **10 CEI /ml d'urine**
- Pour les **autres techniques** (EIA, TDR...), compte tenu de la décision prise par les experts en 1997 de ne retenir que les techniques d'amplification génique pour ce type de prélèvement, **aucun critère n'est établi à ce jour.**

A Noter : Avec le marquage CE l'indication prélèvements urinaires est réapparue au niveau des DMDIV (TDR,...). Toute nouvelle méthode sera donc évaluée si l'indication est revendiquée dans la notice et les résultats obtenus seront comparés aux résultats de 1997.

Bibliographie

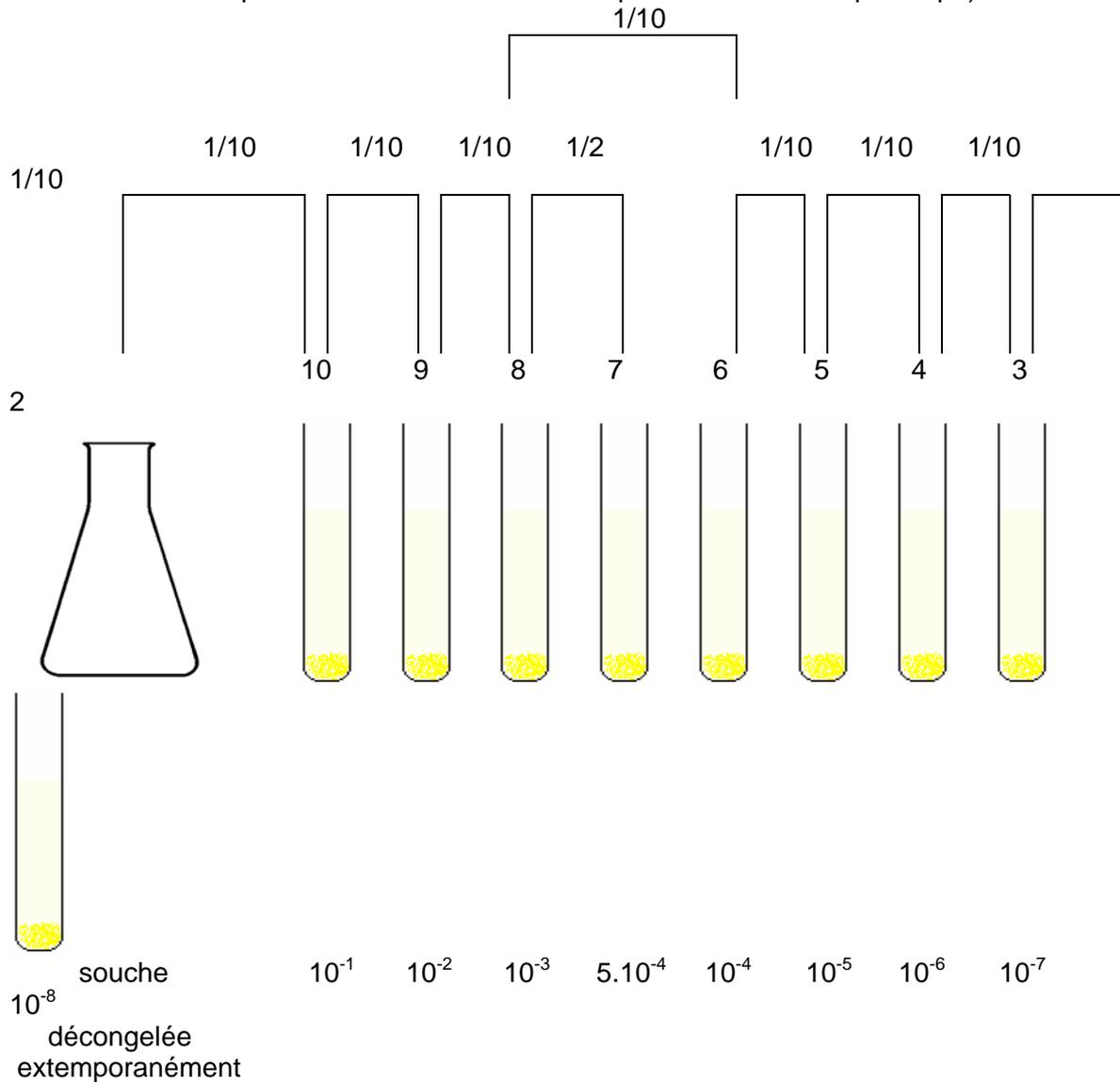
- 1- (Annexe II) Anne Bianchi et col, Etude comparative de la sensibilité de 29 trousse de diagnostic direct des infections *Chlamydia trachomatis* dans le cadre d'une réévaluation pour l'Agence du médicament, RFL, octobre 1998, N° 306, p 47-52.
- 2- Recommandation de l'HAS (ANAES/ Service Evaluation des technologies): Place des techniques de Biologie Moléculaire dans l'identification des infections uro-génitales basses à *Chlamydia trachomatis* Tome 1, Février 2003.
- 3- Recommandation de l'HAS (ANAES/ Service Evaluation des technologies): Evaluation du dépistage des infections uro-génitales basses à *Chlamydia trachomatis* en France Tome 2, Février 2003
- 4- Nomenclature des Actes de Biologie Médicale 2004

Fiche de Paillasse
Correspondances entre les dilutions et le nombre de CEI testés

Tirage de la souche « mère » réalisé à
L'Institut A. Fournier et l'Hôpital Saint-Louis :
 10^7 CEI /ml
utilisation diluée au $1/10^{\text{ème}}$: 10^6 CEI/ml

Cette souche est diluée dans le tampon d'extraction propre à chaque méthode ou bien dans les sécrétions d'endocol ou dans l'urine de la façon suivante :

Etablir les dilutions de la souche en utilisant de »s cônes cotonnés comme suit (changer de cône entre chaque tube. Vortexer 15 sec. chaque tube avant chaque étape) :



Tube 1 : contrôle négatif sans *Chlamydiae*

	Tube 10	Tube 9	Tube 8	Tube 7	Tube 6	Tube 5	Tube 4	Tube 3	Tube 2	Tube 1
Nombre de CEI/ml	10^5	10^4	10^3	$5 \cdot 10^2$	10^2	10	1	0.1	10^{-2}	0
Nombre de CEI/100 μ l	10^4	10^3	10^2	50	10	1	0.1	10^{-2}	10^{-3}	0
Nombre de CEI/10 μ l	10^3	10^2	10	5	1	0.1	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	0
Nombre de CEI/1 μ l	100	10	1	0.5	0.1	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	0

