



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET
BIOLOGIQUES

THESE n° 15-2017

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
présentée et soutenue publiquement le 1^{er} septembre 2017 par

Mme GUILLERME Cécile

Née le 24/07/1990

A Lyon 3ème

**ACCREDITATION DES METHODES DE SEROLOGIE DE LA SYPHILIS A
L'INSTITUT DES AGENTS INFECTIEUX DE LYON**

JURY

M. LAURENT Frederic, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
M. LINA Gérard, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
Mme ROURE SOBAS Chantal, Praticien Hospitalier
Mme DOLEANS JORDHEIM Anne, Maître de Conférence des Universités-Praticien
Hospitalier
Mme PIETROPAOLI Carole, Praticien Hospitalier

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- | | |
|---|-----------------------|
| • Président de l'Université | M. Frédéric FLEURY |
| • Présidence du Conseil Académique | M. Hamda BEN HADID |
| • Vice-Président du Conseil d'Administration | M. Didier REVEL |
| • Vice-Président de la Commission Recherche | M. Fabrice VALLEE |
| • Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire | M. Philippe CHEVALIER |

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

- | | |
|---|--|
| • UFR de Médecine Lyon Est | Directeur : M. Gilles RODE |
| • UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux | Directeur : Mme Carole BURILLON |
| • Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques | Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA |
| • UFR d'Odontologie | Directeur : M. Denis BOURGEOIS |
| • Institut des Techniques de Réadaptation | Directeur : M. Yves MATILLON |
| • Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine | Directeur : Anne-Marie SCHOTT |

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- | | |
|--|----------------------------------|
| • Faculté des Sciences et Technologies | Directeur : M. Fabien DE MARCHI |
| • UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) | Directeur : M. Yannick VANPOULLE |
| • Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL) | Directeur : M. Pascal FOURNIER |
| • I.U.T. LYON 1 | Directeur : M. Christophe VITON |
| • Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) | Directeur : M. Nicolas LEBOISNE |
| • ESPE | Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE |

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

• **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Madame Anne DENUZIERE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)

• **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (AHU)

• **BIOPHYSIQUE**

Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH - HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

• **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

• **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)

Madame Carole SIANI (MCU – HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

• **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

• **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

• **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
 Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)
 Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)
 Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)
 Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
 Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH)
 Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
 Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
 Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
 Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
 Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
 Madame Christelle MARMINON (MCU)
 Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)
 Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
 Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
 Monsieur Thierry LOMBERGET (Pr)
 Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
 Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
 Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
 Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
 Madame Isabelle KERZAON (MCU)
 Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
 Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)
 Madame Catherine RIOUFOL (PU- PH)
 Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
 Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)
 Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)
 Madame Florence RANCHON (MCU-PH)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**
 Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
 Madame Léa PAYEN (PU-PH)
 Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
 Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)
- **PHYSIOLOGIE**
 Monsieur Christian BARRES (Pr)
 Madame Kiao Ling LIU (MCU)
 Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

- **PHARMACOLOGIE**
 - Monsieur Michel TOD (PU – PH)
 - Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
 - Monsieur Roger BESANCON (MCU)
 - Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
 - Madame Evelyne CHANUT (MCU)
 - Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
 - Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)
- **COMMUNICATION**
 - Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)
- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**
 - Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)
 - Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)
 - Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**
 - Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
 - Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
 - Madame Morgane GOSSEZ (AHU)
 - Monsieur Sébastien VIEL (AHU)
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
 - Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)
 - Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
 - Monsieur Yohann JOURDY (AHU)
- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIE INDUSTRIELLES**
 - Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
 - Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
 - Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)
 - Madame Florence MORFIN (PU – PH)
 - Monsieur Didier BLAHA (MCU)
 - Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
 - Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
 - Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
 - Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)
- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**
 - Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
 - Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
 - Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**

Monsieur Alexandre JANIN

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Monsieur Karim MILADI (85^{ème} section)
Monsieur Antoine ZILLER (87^{ème} section)

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

Remerciements

Professeur Frederic Laurent,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. Merci pour votre disponibilité et votre écoute lorsque je vous ai parlé de mes projets professionnels atypiques. Votre soutien a été déterminant dans leur réussite et je vous en suis énormément reconnaissante. J'ai également beaucoup appris à vos côtés en passant dans votre service.

Professeur Gérard Lina,

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail. Vous m'avez fait découvrir la bactériologie clinique, qui est aujourd'hui devenue une passion pour moi. Merci pour tous vos enseignements, théoriques et pratiques.

Docteur Chantal Roure Sobas,

Je vous remercie de m'avoir permis d'effectuer ce travail. Ce fut un plaisir de travailler avec vous. Votre disponibilité, votre écoute, et vos conseils m'ont beaucoup aidé. Merci pour tout le temps que vous avez consacré à m'encadrer pour ce travail. Merci aussi pour vos enseignements dans les domaines de la sérologie infectieuse bactérienne et de l'assurance qualité.

Docteur Anne Doleans Jordheim,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous suis très reconnaissante pour le temps que vous avez aussi consacré à sa relecture, vos conseils m'ont beaucoup apporté.

Docteur Carole Pietropaoli,

Merci d'avoir accepté de participer à ce jury. Je n'oublie pas le plaisir de ces six mois passés à travailler ensemble à la Croix Rousse. J'ai beaucoup appris sur l'infectiologie clinique à tes côtés. Merci pour ta bonne humeur, ta disponibilité et ton expertise !

A toutes les équipes des différents stages d'internat dans lesquels je suis passée, à Saint Etienne et à Lyon, biologistes, techniciens et internes, pour tous leurs enseignements.

Au bureau de Biologie Sans Frontières, merci de m'avoir ouvert les bras et fait participer à votre travail. Un remerciement particulier à Pierre Flori, qui m'a fait découvrir l'association et ouvert tant de portes ; à Jean Sémon, pour ce voyage ensemble au Cameroun ; à Odette Terry, pour ces sessions de réflexion autour de la bactériologie en Afrique qui m'ont tant apporté ; et à Yves Gilles, pour sa disponibilité et ses conseils.

A l'équipe d'IQLS, qui m'a récemment adoptée : Antoine, Laurence, Arnaud, Marie, Maimouna et Aazam. Merci pour tous ces nouveaux projets, ces voyages et ces belles rencontres. Une pensée pour Michel, qui m'a particulièrement soutenu lors de ces dernières semaines de travail de thèse.

A ma famille : mes parents, pour leur soutien et leurs encouragements pendant ces neuf longues années d'études ; mes grands-parents, toujours présents pour moi ; et Christophe, pour tous ces bons moments passés en grandissant à tes côtés.

A Nicolas, pour le bonheur que je vis avec toi, pour longtemps encore. Merci à toute la famille Perrillat-Collomb de m'avoir accueillie parmi vous.

Aux copains de pharmacie : Dudu, Chouf, Nanard, Tétaix, Raphaële, Juliette, Abdou, Mounier, Quentin, Jocelin, JC, Alexis et Paco. Pour notre belle amitié, déjà tant d'années passées à rire à vos côtés, merci pour ces soirées, ces réveillons, ces vacances passés ensembles, et tous les moments qui restent à venir.

Aux copains de Saint Etienne : Charlène, Pauline J, Issam, Ghita, Amine, Charlie, Anne-Sophie, Virginie, William, Alexis et bien sûr la fine équipe (qui m'a prévenue qu'elle me ferait la gueule en l'absence de remerciements appropriés, ce qui je dois le dire, m'a un peu mis la pression) : Eung Sun, grande complice et meilleure voisine au monde ; Pauline, la plus rive droite de toutes mes copines ; Léa, la plus girly et la plus photogénique de tous les rugbymans ; Eve, la reine incontestée de tous les défis ; Camille, toujours là pour filer un coup de main quand il s'agit de refaire la décoration d'un appart (ou d'un jardin, ou d'une voiture) ; Gabrielle, la plus sage d'entre nous, heureusement tu es là pour remonter un peu le niveau ; Stéphanie, grande voyageuse et gobeuse de flamby à ses heures perdues. Merci pour

tous ces bons moments, ces rires, et ces belles soirées. Les meilleurs souvenirs de mon internat sont auprès de vous.

A Clémence la cinéaste, pour notre passé d'imitatrices à la cour de récré, et pour toutes ces fois où tu m'as laissé copier tes DM de math'. Merci pour toutes ces années d'amitié.

A Martin le nouveau lao, kop chaï deeeu d'être toujours présent, d'être une oreille si attentive et d'avoir toujours des histoires incroyables à raconter.

A mes anciens co-internes (ou apparentés) pour tous ces bons moments à travailler à vos côtés : Marine, Josselin, Mélanie, Yara, Sophie, Remy, Carole, Camille, Zoé, Vincent, Yann, Pauline J, Laurent, Claire, Nicolas, Marc.

Et pour finir merci au Dr. Hervé Itri, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire il y a maintenant 11 ans (ce qui ne nous rajeunit pas) et qui a fait naître en moi l'envie de devenir biologiste médical. Je te dois tout mon parcours.

Table des matières

REMERCIEMENTS	9
TABLE DES MATIERES	13
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	17
ABBREVIATIONS	21
INTRODUCTION	23
I/ RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	25
A/ LA SYPHILIS	25
A) LE GENRE TREPONEMA	25
B) HISTOIRE DE LA SYPHILIS.....	25
C) EPIDEMIOLOGIE.....	27
D) PHYSIOPATHOLOGIE	32
E) SYMPTOMATOLOGIE.....	36
F) DEPISTAGE.....	41
G) TRAITEMENT	42
H) PREVENTION	44
B/ DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA SYPHILIS	44
A) ALGORITHME DE DIAGNOSTIC	44
B) DIAGNOSTIC DIRECT	48
C) DIAGNOSTIC INDIRECT	51
D) INTERPRETATION BIOLOGIQUE	65
C/ LE MANAGEMENT DE LA QUALITE AU LABORATOIRE.....	69
A) INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO)	69
B) LA NORME ISO 9001 : 2015	69
C) LA NORME ISO/CEI 17025.....	70
D) LA NORME NF EN ISO 15189 :2012.....	70
E) LE COMITE FRANÇAIS D'ACCREDITATION (COFRAC)	71
F) LES REFERENTIELS COFRAC.....	72

G) PORTEE D'ACCREDITATION.....	73
H) L'APPROCHE PROCESSUS	74
I) CONTROLES INTERNES DE QUALITE (CIQ) ET EVALUATION EXTERNES DE LA QUALITE (EEQ)...	76
J) MAITRISE DES RISQUES	79
D/ LE DOSSIER DE VERIFICATION/VALIDATION DE METHODE	80
A) INTRODUCTION	80
B) ETUDE DE LA REPETABILITE.....	82
C) ETUDE DE LA FIDELITE INTERMEDIAIRE (OU REPRODUCTIBILITE INTRA-LABORATOIRE)	82
D) VARIABILITE INTER-OPERATEUR	83
E) ETUDE DE LA JUSTESSE	83
F) EXACTITUDE DE MESURE.....	83
G) ETUDE DE L'INCERTITUDE DE MESURE	84
H) ETUDE DE L'ETENDUE DE MESURE.....	84
I) COMPARAISON DE METHODES.....	84
J) CONTAMINATION	85
K) ROBUSTESSE ET FIABILITE DES REACTIFS	85
<u>II/ TRAVAIL PERSONNEL</u>	<u>85</u>
A/ OBJECTIFS	85
B/ TESTS SEROLOGIQUES DE DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS	86
A) METHODES UTILISEES POUR LA SEROLOGIE SYPHILIS	86
B) STRATEGIE DIAGNOSTIQUE	92
C/ PROCESSUS DE REALISATION DE LA SEROLOGIE SYPHILIS.....	94
A) GESTION DES CONTROLES DE QUALITE INTERNES (CIQ) ET EXTERNES (EEQ)	95
B) MAITRISE DES RISQUES	95
D/ METHODES DE VERIFICATION/VALIDATION D'UN PROCESSUS ANALYTIQUE.....	98
A) ETUDE DE LA REPETABILITE	98
B) ETUDE DE LA FIDELITE INTERMEDIAIRE	98
C) ETUDE DE LA SENSIBILITE ET DE LA SPECIFICITE ANALYTIQUE.....	99

D) VARIABILITE INTER-OPERATEUR	99
E) ETUDE DE LA JUSTESSE	99
F) EXACTITUDE DE MESURE.....	99
G) ETUDE DE L'INCERTITUDE DE MESURE	100
H) ETUDE DE L'ETENDUE DE MESURE.....	101
I) COMPARAISON DE METHODES.....	101
J) ETUDE DES INTERFERENCES	102
K) ETUDE DE LA CONTAMINATION INTER-ESSAIS.....	102
L) ROBUSTESSE ET FIABILITE DES REACTIFS	102
M) INTERVALLE DE REFERENCE.....	102
<u>III/ RESULTATS</u>	103
A/ PHASE PRE-ANALYTIQUE	103
B/ PHASE ANALYTIQUE SYPHILIS TP SUR ARCHITECT i1000	107
A) RISQUES IDENTIFIES, CRITICITE ET MOYENS DE MAITRISE MIS EN PLACE	107
B) RESULTATS DES ESSAIS	109
C/ PHASE ANALYTIQUE RPR	114
A) MAITRISE DES RISQUES ET CHOIX DES POINTS A VERIFIER	114
B) RESULTATS DES ESSAIS	116
D/ PHASE ANALYTIQUE TPHA	121
A) MAITRISE DES RISQUES ET CHOIX DES POINTS A VERIFIER	121
B) RESULTATS DES ESSAIS	123
E/ PHASE ANALYTIQUE IGM SUR EVOLIS	127
A) MAITRISE DES RISQUES ET CHOIX DES POINTS A VERIFIER	127
B) RESULTATS DES ESSAIS	129
F/ PHASE ANALYTIQUE WESTERN BLOT	131
A) MAITRISE DES RISQUES ET CHOIX DES POINTS A VERIFIER	131
B) RESULTATS DES ESSAIS	132
G/ PHASE POST-ANALYTIQUE	133

<u>DISCUSSION</u>	<u>137</u>
<u>CONCLUSIONS</u>	<u>141</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>145</u>
ANNEXE 1 : FICHE TECHNIQUE DU TEST TREPONEMIQUE AUTOMATISE SYPHILIS TP SUR ARCHITECT	145
ANNEXE 2 : FICHE TECHNIQUE DU TEST TREPONEMIQUE TPHA	150
ANNEXE 3 : FICHE TECHNIQUE DU TEST NON TREPONEMIQUE RPR.....	152
ANNEXE 4 : FICHE TECHNIQUE DU TEST ELISA IGM	154
ANNEXE 5 : FICHE TECHNIQUE DU TEST WESTERN BLOT IGG	156
ANNEXE 6 : FICHE TECHNIQUE DU TEST WESTERN BLOT IGM.....	165
ANNEXE 7 : FICHE TECHNIQUE EUROBLLOT MASTER	174
ANNEXE 8 : LISTE DES CODES COMMENTAIRES SYSTEMATIQUES SUR LES COMPTES RENDUS DES RESULTATS	175
ANNEXE 9 : COMPARAISON DU TT CMIA (SYPIE) ET DU TPHA (1).....	176
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>179</u>

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Organisation des réseaux de surveillance nationale des IST (10) (ARS : Agence Régionale de santé, DGS : Direction Générale de la Santé, Inpes : Institut National de Prévention et d'Education pour la Santé, InVS : Institut de Veille Sanitaire, CNR : Centre National de Référence, LGV : Lymphogranulomatose Vénérienne).....	28
Figure 2 : Evolution des caractéristiques des patients diagnostiqués pour une syphilis récente (12).....	29
Figure 3 : Evolution du nombre de cas de syphilis récente chez les hétérosexuels et les HSH selon la région (12)	30
Figure 4 : Evolution du nombre de cas de syphilis récente selon l'orientation sexuelle (12) ..	30
Figure 5 : Distribution des cas de syphilis récente par classe d'âge selon l'orientation sexuelle (12).....	31
Figure 6 : Structure générale des spirochètes	33
Figure 7 : Différentes voies de transmission de la syphilis	35
Figure 8 : Histoire naturelle de la syphilis (19)	37
Figure 9 : Exemples de chancres syphilitiques (oral et génital)	38
Figure 10 : Algorithme simplifié selon les recommandations de la HAS (27).....	46
Figure 11 : Comparaison des sensibilités et spécificités des deux algorithmes de dépistage de la syphilis proposés par le CDC (27)	46
Figure 12 : Stratégie diagnostique de la syphilis selon le CDC d'Atlanta (34)	48
Figure 13 : Observation de tréponèmes en microscopie à fond noir	49
Figure 14 : Comparaison des sensibilités et spécificités des deux méthodes de PCR dans le diagnostic de la syphilis (39)	50
Figure 15 : Comparaison de la sensibilité et de la spécificité de la PCR tréponème dans différents types de prélèvements et dans différents stades de la maladie. Meta-analyse sur 69 études (40).....	51
Figure 16 : Sensibilités du TPHA et du TPPA en fonction des stades de la maladie (44)	53
Figure 17 : Réactifs sur le marché utilisant la technique TPHA/TPPA.....	53
Figure 18 : Réactifs disponibles en France utilisant la technique FTA	54
Figure 19 : Liste des TDR disponibles sur le marché français en 2015 (48).....	55
Figure 20 : Réactifs disponibles en France utilisant la technique PaGIA.....	56
Figure 21 : Principe du test PaGIA	56

Figure 22 : Principe de l'ELISA	57
Figure 23 : Comparaison des sensibilités et spécificités des techniques Bioplex 2200 Syphilis IgG, Architect Syphilis TP, et TPHA (56).....	58
Figure 24 : Différents tests tréponémiques automatisés disponibles sur le marché français...	59
Figure 25 : Comparaison de six tests tréponémiques automatisés (52)	61
Figure 26 : Sensibilités des TNT manuels en fonction du stade de la maladie (44).....	62
Figure 27 : Test non tréponémiques automatisés disponibles sur le marché	63
Figure 28 : Bandelettes de Western Blot et antigènes de la syphilis	64
Figure 29 : Western blot syphilis disponibles sur le marché	64
Figure 30 : Histoire naturelle de la syphilis et positivité des tests de diagnostic (19).....	68
Figure 31 : Formulaire SH FORM 06 décrivant la portée d'accréditation (84).....	74
Figure 32 : Représentation schématique des éléments d'un processus d'après la norme ISO 9001(85)	74
Figure 33 : Interaction des différents types de processus	76
Figure 34 : Différents types d'erreurs possibles pour une valeur donnée	77
Figure 35 : Schéma des principaux modules de l'Evolis	88
Figure 36 : Exemples de réactions RPR positives	89
Figure 37 : Exemples de TPHA positifs à plusieurs dilutions	90
Figure 38 : Liste des antigènes présents sur les bandelettes Anti-Treponema pallidum EUROLINE Western Blot IgG et IgM	90
Figure 39 : Interprétation des Anti-Treponema pallidum EUROLINE Western Blot IgG et IgM.....	91
Figure 40 : Algorithme de dépistage de la syphilis à l'IAI (TT= Test tréponémique, TNT= Test non tréponémique)	92
Figure 41 : Conduite à tenir en cas de dépistage syphilis positif à l'IAI.....	93
Figure 42 : Conduite à tenir en fonction des résultats obtenus pour les titrages du TPHA et du RPR	93
Figure 43 : Cartographie du processus de sérologie de la syphilis	94
Figure 44 : Les questions génériques de l'AMDEC (91)	96
Figure 45 : Critères d'estimation de l'occurrence d'un risque	96

Figure 46 : Critères d'estimation de la gravité d'un risque.....	97
Figure 47 : Critères d'estimation de la détectabilité d'un risque	97
Figure 48 : Méthodes des essais de répétabilité.....	98
Figure 49 : Méthodes des essais de fidélité intermédiaire	98

ABREVIATIONS

Ac :	Anticorps
AFNOR :	Association Française de Normalisation
AMDEC :	Analyse des Modes de Défaillance et de leur Criticité
ARS :	Agence Régionale de Santé
ARS :	Agences Régionales de Santé
CBPN :	Centre de biologie et de pathologie Nord
CBPN :	Centre de biologie et de pathologie Nord
CDC :	Center for Disease Control and prevention
CeGIDD :	Centres gratuits d'information, de dépistage et de diagnostic
CIA	Chemiluminescence Assay
CIQ :	Contrôles de qualité internes
CMIA :	Chemiluminescence Immunoassay
CNR :	Centres Nationaux de Référence
COFRAC :	Comité Français d'Accréditation
CQE :	Contrôle de Qualité Externe
CTCB :	Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie médicale
CV :	Coefficient de Variation
DGS :	Direction Générale de la Santé
ECDC :	European Center for Disease Control
EEQ :	Evaluation Externe de la Qualité (synonyme de CQE)
EIA :	Enzyme Immuno Assay
ELFA :	Enzyme-Linked Fluorescent Assay
ELISA :	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FTA :	Fluorescent Treponemal Assay
HAS :	Haute Autorité de Santé
HCL :	Hospices Civils de Lyon
HSH :	Hommes ayant des rapports Sexuels avec des Hommes
IAI :	Institut des Agents Infectieux
ICT :	Immunochromatographie
IgG :	Immunoglobuline G
IgM :	Immunoglobuline M
IM :	Intramusculaire
Inpes :	Institut National de prévention et d'éducation pour la santé
ISO :	International Organization for Standardization
IST :	Infections Sexuellement Transmissibles
IUSTI :	International Union Against Sexually Transmitted Infections
IV :	Intravasculaire
LBMMS :	Laboratoire de Biologie Médicale Multi Site
LCR :	Liquide Céphalo-Rachidien
LGV :	Lymphogranulomatose vénérienne
MFI :	Multiplex Flow Immunoassay
NABM :	Nomenclature des actes de biologie médicale
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
OP :	Ouvrier Professionnel

PaGIA :	Particle Gel ImmunoAssay
PaGIA :	Particle Gel ImmunoAssay
PBQ :	ProBioQual
PCR :	Polymerase Chain Reaction
RPR :	Rapid Plasma Reagin test
SA :	Semaines d'Aménorrhées
SIDA :	Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SIL :	Système d'Information de Laboratoire
SMQ :	Système de Management de la Qualité
TDR :	Test de Diagnostic Rapide
TNT :	Test Non Tréponémique
TPHA :	Treponema pallidum Haemagglutination Assay
TPPA :	Treponema Pallidum Particle Agglutination Assay
TT :	Test Tréponémique
VDRL :	Venereal Disease Research Laboratory
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WB :	Western Blot

INTRODUCTION

La syphilis est une infection sexuellement transmissible due à une bactérie, *Treponema pallidum*. Elle connaît une très forte recrudescence en France depuis les années 2000. Le plateau de sérologie infectieuse de l'Institut des Agents Infectieux (IAI) des Hospices Civils de Lyon réalise aujourd'hui plus d'une centaine de sérologies syphilis par jour, avec en moyenne 10 % de dépistages positifs nécessitant des examens complémentaires.

L'accréditation des laboratoires de biologie médicale est obligatoire en France depuis l'ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010. L'objectif est de garantir la mise en conformité des laboratoires avec les exigences techniques et managériales de la norme NF EN ISO 15189 : 2012 (Norme Française, European Norm, International Organization for Standardization). Le COFRAC (Comité français d'accréditation), seule instance nationale d'accréditation, a élaboré en complément un document de référence opposable appelé le SH REF 02. L'examen de biologie médicale est un « acte médical » comprenant les phases pré-analytique, analytique et post-analytique qui sont toutes sous la responsabilité du biologiste. Le dossier de validation de méthode, obligatoire pour accréditer un examen, est construit dans l'esprit de ces deux référentiels opposables : la norme ISO EN 15189 : 2012 et le SH REF 02. En 2020 les laboratoires devront être accrédités sur 100% des actes qu'ils réalisent. Au sein du Laboratoire de Biologie Médicale Multi-Sites des Hospices civils de Lyon (LBMMS), la Bactériologie participe à ce processus d'accréditation avec les examens de sérologie syphilitique.

Ce sérodiagnostic repose sur des méthodes très diverses : automatisées, semi-automatisées et manuelles. Le dépistage de la syphilis au LBMMS associe un test tréponémique automatisé (Architect Syphilis TP) et un test non tréponémique manuel (RPR). En cas de positivité, ces tests sont complétés par un titrage manuel du RPR et un test tréponémique manuel titré (TPHA). La recherche des IgM par ELISA et les techniques de confirmation en immunoempreinte IgG et IgM sont réalisées en seconde intention dans des contextes cliniques particuliers (femmes enceintes, infections néonatales, patients en attente de greffe, suspicion de neurosyphilis...).

Pour répondre aux exigences de l'accréditation, le laboratoire doit remplir des dossiers de validation de méthodes pour l'ensemble des techniques de ce processus complexe. L'objectif de ce travail de thèse a été de monter ces dossiers.

Dans une première partie de revue bibliographique, après un rappel sur la syphilis, son diagnostic et son traitement, l'ensemble des techniques de diagnostic et leurs performances ont été étudiés. Les différents documents réglementaires et non réglementaires du COFRAC ont été présentés, ainsi que les différents éléments à intégrer dans un dossier de vérification de méthode.

A la différence des examens biochimiques ou hématologiques dont la distribution suit une courbe de Gauss, les résultats sérologiques sont distribués de manière bimodale (résultat positif ou négatif) autour d'une valeur seuil. Aucun exemple d'accréditation de méthode de ce type n'est encore proposé dans les référentiels du COFRAC ou de la discipline (SH GTA 04, QUAMIC). Le principal objectif de ce travail a donc été d'effectuer l'analyse de risques, et d'en déduire les essais pertinents à mettre en place. Ce travail décrit l'analyse de risques réalisée sur les processus pré-analytique, analytique et post-analytique. La finalité est d'aboutir à l'élaboration d'un plan d'action ayant pour objectif de réduire la criticité des activités identifiées comme critiques sur les résultats des examens du sérodiagnostic de la syphilis. Ce travail fait suite à un précédent travail de thèse réalisé dans le laboratoire de bactériologie de la Croix Rousse, qui s'intéressait à l'accréditation des techniques manuelles (TPHA et du RPR) (1).

I/ Rappels bibliographiques

A/ La Syphilis

a) Le genre *Treponema*

La syphilis est une infection sexuellement transmissible (IST) chronique due à une bactérie, *Treponema pallidum*, autrement appelée tréponème pâle. Elle fait partie, avec les autres tréponèmes, de l'ordre des *Spirochaetales* et de la famille des *Spirochaetaceae*. Ce genre comprend actuellement plus de 30 espèces (2). Les bactéries du genre spirochètes sont très répandues. Certaines sont présentes de manière commensale au niveau des muqueuses buccales, digestives et génitales. La famille des spirochètes regroupe les bactéries des genres *Treponema* (responsable entre autres de la syphilis), *Borrelia* (maladie de Lyme), *Leptospira* (leptospirose). Quatre espèces du genre *Treponema* sont pathogènes pour l'homme :

- *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* : c'est l'agent de la syphilis vénérienne ;
- *Treponema pallidum* subsp. *pertenue* : c'est l'agent du Pian. Cette pathologie est responsable de lésions cutané-osseuses chroniques. La primo-infection a lieu chez les enfants de 2 à 15 ans, dans les régions tropicales humides et pauvres (3). La maladie est présente en Afrique, Asie, Amérique Latine, et dans les îles pacifiques. La transmission se fait par contact cutané direct non vénérien à partir de lésions récentes. Le rôle du surpeuplement, de la promiscuité et de la mauvaise hygiène est très important pour cette pathologie. En 2012, le Pian a fait l'objet d'une feuille de route proposée par l'OMS, ciblant son éradication d'ici 2020 ;
- *Treponema pallidum* subsp. *endemicum*, variété endémique : c'est l'agent du Bejel. Il s'agit d'une atteinte cutané-muqueuse qui touche les enfants et adultes. On la retrouve dans les régions arides d'Afrique et d'Asie (4) ;
- *Treponema carateum* : c'est l'agent de la Pinta, parfois appelée « Caraté ». Il s'agit d'une atteinte cutanée qui frappe les enfants et adolescents. Elle est strictement sud-américaine. La transmission est directe, non vénérienne (2).

b) Histoire de la syphilis

Les premières traces de la syphilis en Europe datent de la période post-colombienne. L'hypothèse la plus probable serait son introduction par les marins de Christophe Colomb (5). Depuis son apparition, la syphilis a toujours été une maladie stigmatisée et honteuse. Au

départ, chaque pays dont la population a été affectée par l'infection a accusé les pays voisins (et parfois ennemis) d'être à l'origine de l'épidémie (6) :

- les Italiens, Allemands, et Anglais ont nommé syphilis «le Mal français» ;
- les Français l'ont appelée «le Mal de Naples» ;
- les Russes ont choisi le nom de «Mal polonais» ;
- les Polonais l'appelaient «le Mal allemand» ;
- les Danois, les Portugais et les habitants de l'Afrique du Nord l'ont appelé «le Mal espagnol» ;
- les Turcs ont choisi le terme «Mal Chrétien» ;
- dans le nord de l'Inde, les musulmans ont accusé les Hindous d'avoir déclenché l'épidémie. Les Hindous ont accusé les musulmans et, finalement, tout le monde s'est mis d'accord pour accuser les Européens.

Au 16^e-17^e siècle, le seul traitement disponible est l'utilisation du mercure. Ce remède était initialement utilisé dans la médecine arabe comme traitement de maladies dermatologiques comme la lèpre (6). Plusieurs méthodes d'administration étaient alors disponibles. Le mercure pouvait être administré par voie topique dans un mélange avec un corps gras. La pilule de Barbarossa (nom d'un amiral turc affecté par la maladie et qui a donné ce remède à ses soldats), contenait un mélange de mercure, d'essence de parfum et d'arômes de fruits. Le chlorure de mercure (calomel, Hg₂Cl₂) était un sel blanc pouvant être administré par voie orale, topique ou par injection. La forme métallique était administrée par fumigation. Tous ces traitements avaient des effets secondaires très importants, causant des neuropathies, des insuffisances rénales, des ulcères sévères de la bouche ou des pertes de dents. De nombreux patients mouraient d'intoxication au mercure plutôt que de la syphilis en elle-même. Le traitement durait des années (6). Les sels de bismuth furent introduits en 1884 (6). Ils étaient moins toxiques que le mercure, tout en portant un effet bactéricide plus fort.

En 1905, Fritz Richard Schaudinn (zoologiste allemand), et Erich Hoffmann (dermatologue), découvrent *Spirochaeta pallida* comme étant l'organisme à l'origine de la syphilis. La bactérie était spiralée et blanche au microscope à fond noir. Elle est maintenant appelée *Treponema pallidum*. (7).

En 1906, August Paul Von Wassermann (un bactériologiste allemand) développe la première méthode de sérodiagnostic de la syphilis, en appliquant la réaction de fixation du complément

décrite par BORDET. Ces deux hommes donneront leur nom à cette technique, appelée réaction de Bordet-Wassermann (8). Aujourd'hui encore de nombreux médecins continuent à appeler le test non tréponémique « test de Bordet-Wassermann ».

Le scientifique allemand Paul Ehrlich reçut le prix Nobel de médecine en 1908 pour sa découverte de l'arsphénamine (Salvarsan), composée d'arsenic IV associé à des sels de bismuth. Le Salvarsan a également été dénommé "Composé 606", car il a été découvert après 606 expériences échouées. Il fut rapidement remplacé par le Neosalvarsan, considéré moins toxique et plus hydrosoluble (6).

Diverses méthodes d'induction de fièvre ont été expérimentées, basées sur l'observation suivante : la fièvre entraîne une amélioration symptomatique de la neurosyphilis. Des essais ont été effectués avec la térébenthine, la tuberculine, le mercure et même *Salmonella typhi*. En 1917, le médecin autrichien Julius Wagner-Jauregg introduit le paludisme dans le traitement de la syphilis. Il injecte du sang contaminé par *Plasmodium vivax* à des patients infectés. Les paroxysmes de fièvre provoqués par le paludisme étaient contrôlés par injection de quinine (déjà découverte à ce moment-là). Les patients présentaient des paroxysmes de fièvre pendant environ 6 heures puis la température revenait aux valeurs normales avant un nouveau cycle. La quinine était injectée après 3-4 cycles de fièvre sur une période de 2 jours. En 1927, Wagner-Jauregg reçut le prix Nobel de médecine pour sa découverte (6).

En 1928, Alexander Fleming découvre la pénicilline qui devient, à partir de 1943, le principal traitement de la syphilis (6).

Quelques grandes figures de l'histoire ont été diagnostiquées ou fortement soupçonnées d'avoir la syphilis, notamment Alphonse Daudet, Charles Baudelaire, Oscar Wilde, Friedrich Nietzsche, Arthur Schopenhauer, Edouard Manet, Paul Gauguin, Vincent Van Gogh, Francisco de Goya, Ludwig Van Beethoven ou Al Capone (6).

c) Epidémiologie

La syphilis devient une maladie à déclaration obligatoire en 1942 avec la gonococcie, la lymphogranulomatose vénérienne et le chancre mou (9). Cette déclaration est abandonnée en 2000 du fait de son manque d'exhaustivité et d'une mauvaise représentativité des cas déclarés. Depuis, elle est remplacée par la mise en place de différents réseaux sentinelles volontaires (voir figure 1) :

- ResIST : il s'agit du réseau de surveillance de la syphilis et des infections à gonocoque. Il est constitué de cliniciens volontaires exerçant dans différents lieux de diagnostic : CeGIDD (Centres Gratuits d'Information, de Dépistage et de Diagnostic de l'infection par le VIH, les hépatites virales et des autres infections sexuellement transmissibles), consultations hospitalières (dermatologie, maladies infectieuses ou médecine interne) et cabinets de médecine libérale. Après consentement du patient, des informations sociodémographiques, comportementales et biologiques sont recueillies par le médecin : âge, sexe, orientation sexuelle, antécédents d'IST, présence ou non de signes cliniques, résultats biologiques. Le clinicien propose au patient un auto-questionnaire centré sur ses comportements sexuels au cours des 12 derniers mois, en particulier le nombre et le sexe des partenaires, les pratiques sexuelles et l'utilisation ou non du préservatif (10).
- Rénago et Rénachla : il s'agit de réseaux de surveillance de la gonococcie et des infections à chlamydia. Ils sont gérés par des laboratoires volontaires.
- Réseau LGV : coordonné par le centre national de référence des *Chlamydia* (10).

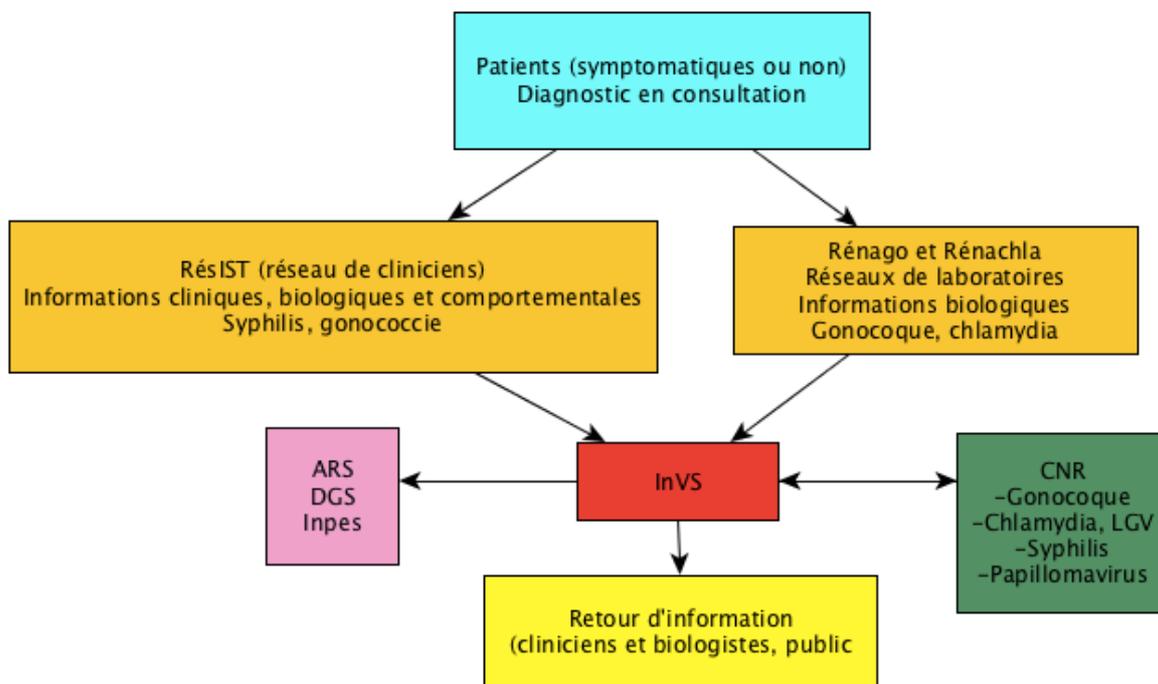


Figure 1 : Organisation des réseaux de surveillance nationale des IST (10) (ARS : Agence Régionale de santé, DGS : Direction Générale de la Santé, Inpes : Institut National de Prévention et d'Éducation pour la Santé, InVS : Institut de Veille Sanitaire, CNR : Centre National de Référence, LGV : Lymphogranulomatose Vénérienne)

Après une augmentation du nombre de cas au début des années 80, les années SIDA ont été marquées par une incidence régulièrement basse de la syphilis jusqu'à la fin des années 90 (11). Dans les pays industrialisés, le retour de la maladie dans les années 2000 a coïncidé avec le développement des trithérapies anti-VIH. L'existence de ces traitements a probablement entraîné un relâchement dans les populations les plus touchées par l'épidémie VIH expliquant la forte proportion d'Hommes ayant des rapports Sexuels avec des Hommes (HSH) et la surreprésentation de l'infection par le VIH chez les patients atteints de syphilis (11) (figure 2).

	2000-2012 N=6 355	2013 N=1 034	2014 N=1 417	2015 N=1 710
Age médian (ans)				
HSH	36	35	36	37
Hommes hétérosexuels	38	34	36	37
Femmes hétérosexuelles	30	24	27	29
Lieu de naissance (%)				
France	72,1	76,8	76,5	77,7
Autres pays européens	4,7	4,6	4,3	3,3
Afrique subsaharienne	2,7	3,0	3,2	2,5
Autres continents	6,8	7,4	7,4	7,1
Inconnu	13,7	8,2	8,6	9,4
Orientation sexuelle (%)				
HSH	81,9	85,7	81,7	84,5
Hommes hétérosexuels	11,6	9,4	10,8	9,8
Femmes hétérosexuelles	5,4	4,2	5,8	4,5
Femmes homobisexuelles	0,1	0,0	0,1	0,2
Inconnue	1,0	0,7	1,6	1,0
Stade de la syphilis (%)				
Primaire	23,1	20,2	25,6	24,6
Secondaire	40,4	39,1	35,7	37,2
Latente précoce	36,5	40,7	38,7	38,2
Statut sérologique VIH (%)				
Positif connu	34,7	32,5	28,6	20,5
Découverte de séropositivité	4,1	2,9	3,1	2,3
Négatif	55,6	60,1	61,0	61,9
Inconnu	5,6	4,5	7,3	15,3

Figure 2 : Evolution des caractéristiques des patients diagnostiqués pour une syphilis récente (12)

En 2015, le nombre de cas notifiés de syphilis récente a augmenté de 59 % par rapport à 2013 (12) (figure 3). Cette augmentation est très marquée dans les régions hors Ile-de-France et chez les HSH au cours des trois dernières années (+56 % entre 2013 et 2015). Une augmentation du nombre de cas est également observée chez les hétérosexuels depuis 2012 (surtout dans les régions hors Ile-de-France).

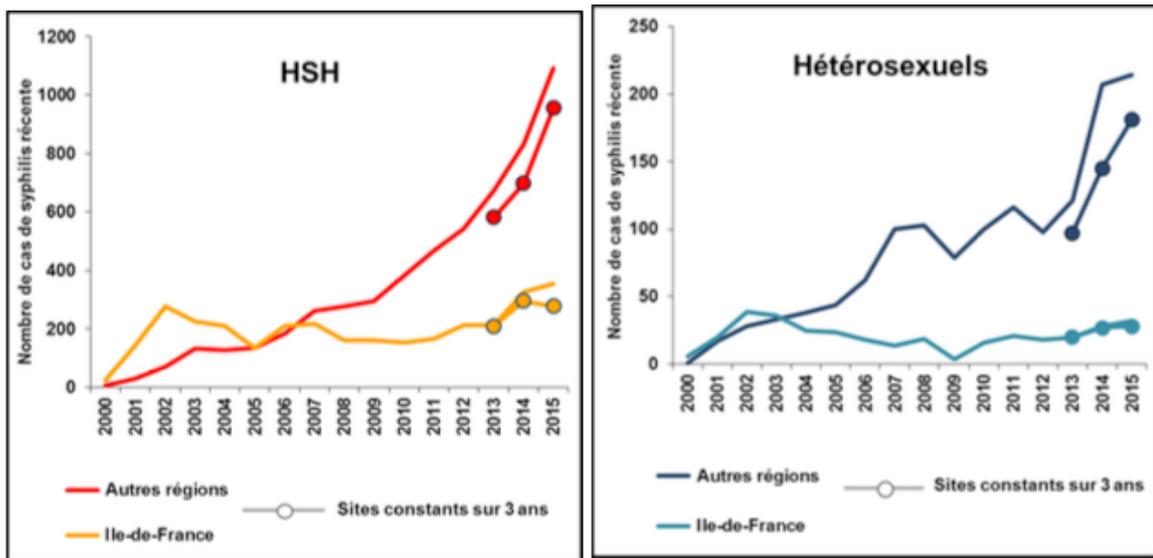


Figure 3 : Evolution du nombre de cas de syphilis récente chez les hétérosexuels et les HSH selon la région (12)

Les HSH représentent la population la plus concernée, soit 84 % des cas rapportés en 2015. L'augmentation du nombre de cas dans cette population est de 56 % entre 2013 et 2015 (figure 4).

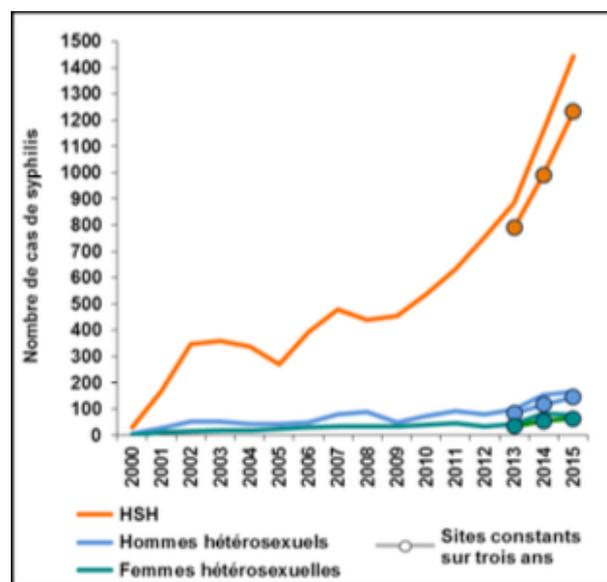


Figure 4 : Evolution du nombre de cas de syphilis récente selon l'orientation sexuelle (12)

Chez les hommes, les 20-49 ans représentent la classe d'âge la plus touchée, quelle que soit l'orientation sexuelle, tandis que la majorité des femmes ont moins de 29 ans (figure 5). L'âge médian des hommes en 2015 est de 37 ans versus 29 ans chez les femmes.

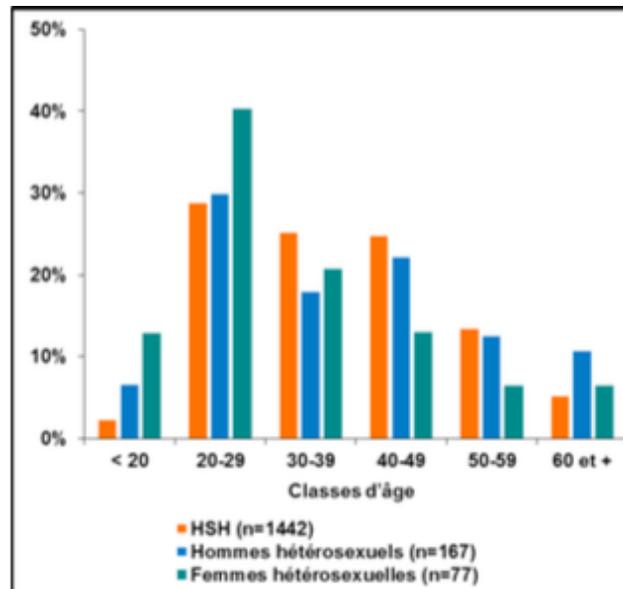


Figure 5 : Distribution des cas de syphilis récente par classe d'âge selon l'orientation sexuelle (12)

Le dépistage est obligatoire au premier semestre chez la femme enceinte. Le nombre de syphilis congénitale est extrêmement bas en France : < 1 cas/100 000 naissances. Aucun cas de transmission par transfusion ou greffe d'organe n'a à ce jour été décrit en France.

L'incidence mondiale annuelle de la syphilis était estimée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1999 à 12 millions de cas, dont 90% dans les pays en voie de développement. La prévention de la syphilis congénitale devient un objectif majeur de l'OMS en 2007. Elle publie en 2009 le rapport « l'élimination mondiale de la syphilis congénitale : raison d'être et stratégie » (13) afin de décrire un plan d'actions. Le nombre de femmes enceintes atteintes de syphilis dans le monde est alors estimé à 1,9 millions en 2008, dont moins de 10% dépistées et traitées (14). L'objectif fixé est une réduction de deux tiers de la mortalité chez les enfants de moins de cinq ans d'ici 2015 (11). Cet objectif s'est révélé difficile à atteindre du fait d'un manque de volonté politique dans les différents pays à l'échelle mondiale. En 2012, l'OMS réactualise sa stratégie d'action, en couplant la prévention de la transmission mère enfant du VIH à celle de la syphilis (14). Un test rapide « multiplex » simplifie cette démarche et permet de réaliser simultanément le dépistage du

VIH et de la syphilis. Il s'agit du SD BIOLINE Duo HIV/Syphilis Rapid d'Alere® (voir chapitre I/B/c)) (15).

L'épidémie actuellement observée dans les pays industrialisés est caractérisée par de forts contrastes Est-Ouest (11) :

- à l'Ouest (France, Irlande, Royaume-Unis) et aux Etats-Unis, l'épidémie prédomine chez les homosexuels masculins (entre 50 et 80% des patients) et les patients infectés par le VIH (entre 30 et 50% des patients) ;
- à l'Est et dans l'ex URSS, l'épidémie est davantage liée à la prostitution (sex-ratio femme/homme d'environ 10) et à l'usage de drogues intraveineuses ;
- dans le Sud des Etats-Unis, la syphilis atteint davantage des sujets hétérosexuels, en situation précaire, Afro-Américains ou Hispaniques, avec une prédominance féminine (plus de 60% des cas) et un lien fréquent avec la prostitution et la drogue (notamment le crack et la cocaïne).

d) Physiopathologie

Agent pathogène

T. pallidum est une bactérie microaérophile très fragile et non cultivable *in vitro*. Seules les souches suivantes ont pu être cultivées :

- *Treponema phagedenis* : il s'agit de la souche Reiter, possédant des antigènes communs avec le tréponème pâle, et utilisée pour la fabrication de tests de diagnostic.
- la souche Nichols : obtenue grâce à l'injection intra-testiculaire de *Treponema pallidum* à un lapin qui provoque en quelques jours une orchite riche en tréponèmes. Cette souche est utilisée pour réaliser le test diagnostique de Nelson.

L'examen au microscope à fond noir permet de mettre en évidence une bactérie mobile, de forme hélicoïdale, à spires régulières et serrées comportant des extrémités effilées faiblement réfringentes. Elle mesure de 0,10 à 0,3 μm de large sur 8 à 15 μm de long et comprend 6 à 14 spires. Sa mobilité en forme de tire-bouchon est caractéristique. La coloration de Gram ne fonctionne pas sur cette bactérie (2).

Sa structure est commune à celle des autres spirochètes (figure 6). L'organe moteur est l'endoflagelle situé dans l'espace périplasmique de la bactérie (16). La couche de

peptidoglycane est très mince ce qui en fait une bactérie très fragile, rapidement tuée par la chaleur, le froid et la dessiccation (2).

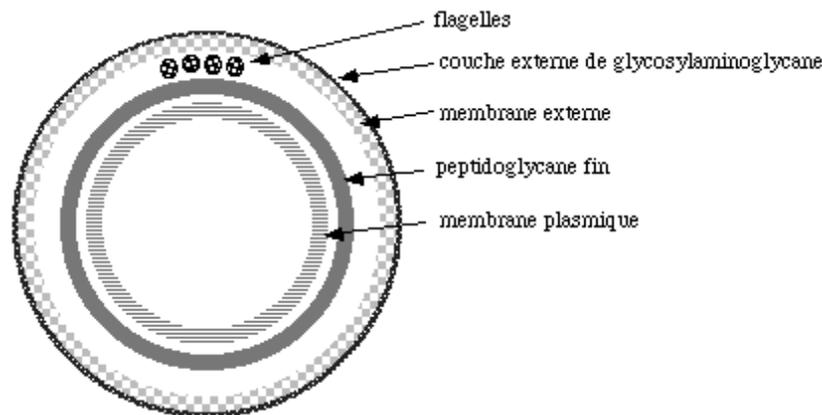


Figure 6 : Structure générale des spirochètes

Le séquençage complet de son génome a été réalisé en 1998. *T. pallidum* possède un petit génome sous la forme d'un chromosome circulaire de 1 138 006 paires de bases formant 1041 cadres ouverts de lecture, ce qui est faible (17). Elle possède donc peu de capacités métaboliques, et ne peut pas survivre en dehors de son hôte, chez qui elle récupère la plupart des métabolites nécessaires à son développement (16). Le temps de génération de la bactérie est inhabituellement bas, avec un doublement de population toutes les 30 ou 33 heures chez son hôte.

La culture de la bactérie étant impossible, sa structure antigénique reste peu connue. Elle comporte notamment les antigènes suivants :

- le cardiolipide ou haptène lipidique de Wassermann. C'est un phosphatidyl-glycérol commun à tous les tréponèmes, et qui est également présent dans les tissus animaux (cœur et foie surtout) ;
- un antigène protéique spécifique du groupe, commun à tous les tréponèmes, pathogènes ou non. Il est porté par les fibrilles. Cet antigène, extrait du tréponème Reiter, peut être utilisé en réaction de fixation du complément ;
- un antigène polypeptidique de surface de 47 kDa fortement immunogène (18) ;
- un antigène polysidique d'enveloppe spécifique de *T. pallidum* ;
- des antigènes du corps tréponémique. Leur nature est mal connue. Ils sont très spécifiques de *T. pallidum*.

Malgré sa fragilité vis à vis des facteurs environnementaux (notamment la concentration en oxygène et la température), la bactérie est capable d'envahir et de survivre dans des tissus et organes très différents. La détection de *T. pallidum* dans le LCR d'une grande proportion de patients atteints de syphilis précoce, tout comme les manifestations cliniques disséminées de syphilis secondaires, tertiaires, et congénitales, apportent la preuve de ses hautes capacités invasives (16).

T. pallidum pénètre une large variété de sites anatomiques, incluant le système nerveux central, toutes les structures oculaires, ou encore le placenta. Ce sont tous des tissus dans lesquels le système immunitaire est moins présent. Les bactéries pourraient survivre dans ces milieux en se répliquant lentement et en réensemencant régulièrement les autres tissus. Son faible métabolisme est aussi probablement exploité pour survivre dans les autres tissus dans lesquels le système immunitaire est plus présent. La présence d'un nombre minimum de bactéries est nécessaire pour déclencher une réponse immunitaire. *T. pallidum* peut donc survivre en maintenant un nombre très faible de bactéries dans des sites anatomiques différents. *T. pallidum* présente un taux de division encore plus bas lors de la phase latente. C'est pour cela que la syphilis latente doit faire l'objet d'un traitement plus long à la pénicilline. Des facteurs inconnus font que la bactérie augmente son rythme de division dans certaines zones anatomiques chez un faible pourcentage d'individus, causant des manifestations de syphilis tardive symptomatique (16).

Transmission

L'homme est le réservoir naturel et exclusif du tréponème pâle. La transmission est exclusivement interhumaine. La syphilis entraîne une réponse immunitaire cellulaire et humorale protectrice d'une nouvelle infection tant que l'infection est évolutive. Toutefois la présence d'anticorps résiduels après un traitement efficace ne protège pas d'une réinfection (16).

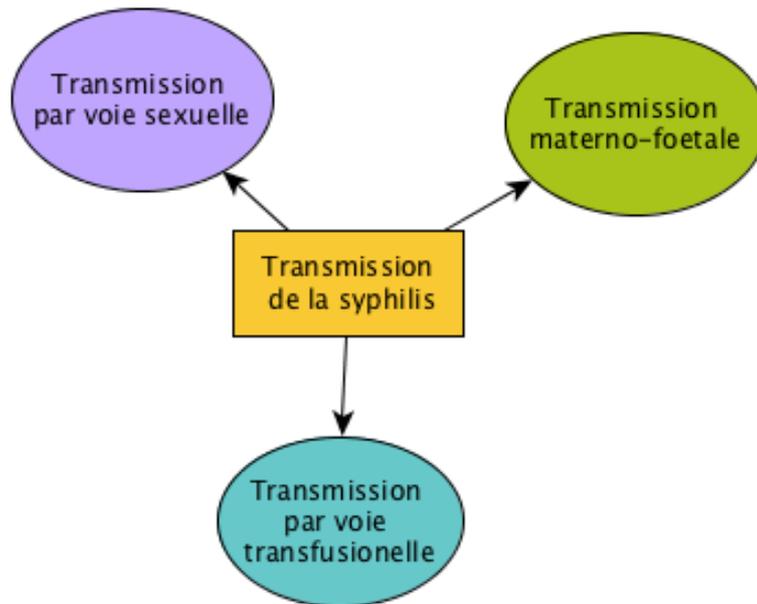


Figure 7 : Différentes voies de transmission de la syphilis

La syphilis est une maladie dont la transmission a lieu essentiellement par voie sexuelle (vaginale, anale, et bucco-génitale). La contamination se fait par contact direct avec la lésion syphilitique contagieuse, car la vitalité des tréponèmes est faible en dehors de l'organisme. Une personne infectée non traitée peut transmettre la maladie pendant les deux premières phases qui peuvent durer de une à deux années (19).

La transmission materno-foetale est gravissime (20). Elle est possible jusqu'à 8 à 10 ans après la contamination de la mère en l'absence de traitement. La majorité des nouveau-nés sont infectés *in utero*. Plus le terme est avancé, plus le risque de transmission est élevé (21). La contamination par contact avec des lésions génitales ou des sécrétions maternelles lors de l'accouchement est aussi possible (22). Aucun cas de transmission par l'allaitement n'a été rapporté. Le risque de transmission est bien plus élevé lors de la syphilis primaire que pour les autres stades de la maladie (21).

Le risque de transmission via le don de sang ou d'organe est négligeable en France du fait de la qualification des dons comportant un dépistage sérologique systématique. La transmission par le don de sang est possible en théorie puisque la bactérie peut survivre jusqu'à cinq jours dans du sang réfrigéré, et que le délai de positivité de la sérologie lors d'une primo-infection est de plusieurs semaines (22).

e) Symptomatologie

Depuis Ricord (1800–1889), l'histoire naturelle de la syphilis est décrite selon trois stades. Toutefois, aucun d'entre eux n'est constant et le stade tertiaire est actuellement rarissime dans les pays développés (11). Les nouvelles recommandations de la Société Française de Dermatologie de 2016 classent plutôt la syphilis selon deux phases d'évolution (23) (figure 8):

- La syphilis précoce : définie par une évolution datant de moins d'un an à partir du premier jour du chancre. Il s'agit de la période pendant laquelle le nombre de tréponèmes circulant dans l'organisme est le plus important (risque maximal de contagion). Elle regroupe :
 - la syphilis primaire ;
 - la syphilis secondaire ;
 - la syphilis sérologique (ou latente) précoce. Dater une syphilis latente afin d'affirmer qu'elle est précoce est difficile (notion de chancre ou d'éruption secondaire récents, antériorité sérologique récente, contamination récente...).
- La syphilis tardive : définie par une évolution datant de plus d'un an. C'est la période pendant laquelle le nombre de tréponèmes circulant dans l'organisme est le moins important (risque minime de contagion). Elle regroupe :
 - la syphilis latente tardive. Toutes les sérologies syphilitiques d'ancienneté indéterminée sont considérées, par principe et quel que soit leur taux, comme appartenant à cette phase de syphilis latente tardive (plus d'un an d'évolution) ;
 - la syphilis tertiaire définie par des manifestations viscérales ;

Au cours d'une syphilis tardive (latente tardive ou tertiaire), la possibilité d'atteinte neurologique parenchymateuse ou méningée asymptomatique doit être systématiquement envisagée. Dans la mesure où un examen neurologique même très complet peut être normal dans ce type de situation, une indication de ponction lombaire doit systématiquement être discutée, afin d'effectuer une recherche d'anticorps anti-tréponémiques ou une PCR.

L'intérêt de cette classification simplifiée est majeur : au cours de la syphilis précoce, même si l'infection est disséminée (avec présence de tréponèmes dans le LCR dès la phase

primaire), une atteinte neurologique parenchymateuse (profonde) est exceptionnelle. Il n'est donc pas utile de pratiquer une ponction lombaire, et un traitement simple par une seule injection de benzathine pénicilline G IM suffit dans la très grande majorité des cas.

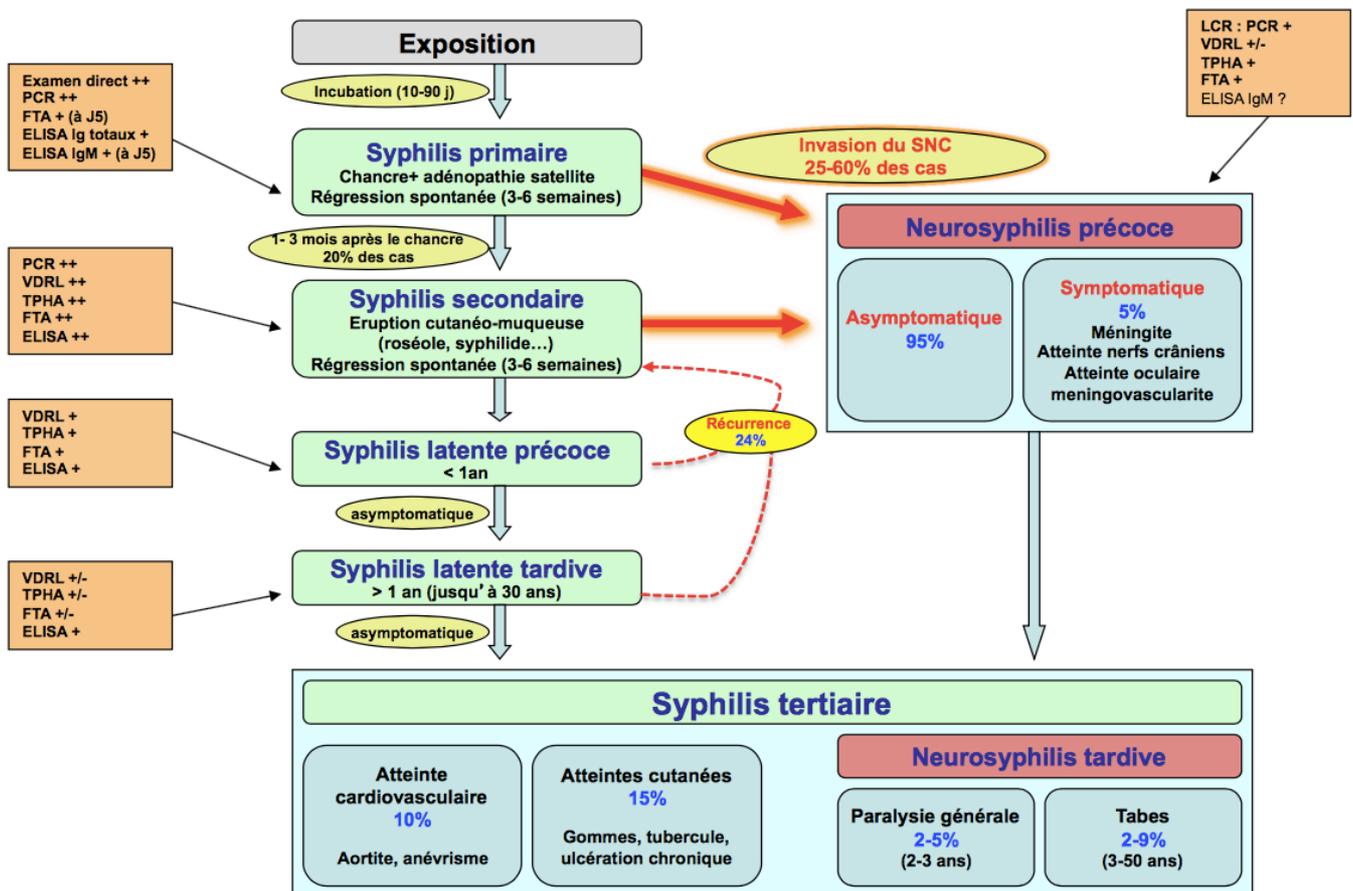


Figure 8 : Histoire naturelle de la syphilis (19)

La syphilis primaire

La syphilis primaire est associée à une diffusion bactérienne locorégionale lymphatique (11). Son apparition est constante, sauf dans la syphilis congénitale et les exceptionnelles syphilis transfusionnelles (23). L'apparition d'un chancre d'inoculation unique (figure 9) marque la première étape de l'évolution de la syphilis (2). Classiquement, elle fait suite à une incubation cliniquement silencieuse de trois semaines (pouvant varier entre 10 et 90 jours) après le rapport contaminant.

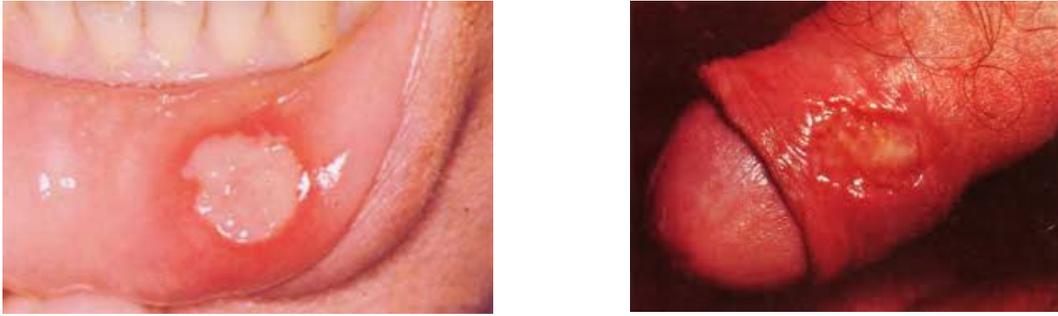


Figure 9 : Exemples de chancres syphilitiques (oral et génital)

Le chancre est une ulcération indolore, unique, à base indurée, à fond propre, siégeant au point d'inoculation (11). Il peut être situé dans des zones où sa mise en évidence est difficile. Le chancre apparaît principalement sur les parties génitales externes, le vagin, l'anus, ou le rectum. Il peut aussi être retrouvé sur les lèvres ou dans la bouche. Il disparaît spontanément après quelques semaines, avec le même délai que la personne soit traitée ou non. En absence de traitement, l'infection évolue dans 1/3 des cas vers le stade syphilis secondaire. La syphilis doit être évoquée devant toute ulcération muqueuse génitale, anale ou oropharyngée (23). Le chancre est souvent associé à une adénopathie régionale.

La syphilis secondaire

Elle succède à une syphilis primaire non traitée. Elle est inconstante et concerne environ 1/3 des patients infectés (23). Il s'agit de la phase de dissémination hémotogène des bactéries. Elle débute deux mois après la contamination. Ce stade est marqué par des lésions généralisées de la peau ou des muqueuses (23) :

- première floraison : caractérisée par une roséole pouvant évoquer une virose ou une toxidermie ;
- deuxième floraison: caractérisée par des syphilides cutanées papulo-squameuses présentant un très riche polymorphisme, d'où le surnom de cette maladie : « la grande simulatrice ». Les lésions sont rarement prurigineuses, prédominant sur le tronc et le visage. L'atteinte palmo-plantaire est évocatrice mais non spécifique. Les lésions cutanées ne sont contagieuses et accessibles à un examen au fond noir que si elles sont excoriées, érosives, ulcérées ;
- une atteinte muqueuse est fréquente avec des plaques muqueuses génito-anales et buccales ;

- d'autres types de manifestations peuvent être retrouvées : fébricule, polyadénopathies, arthrite, ostéite, hépatite, glomérulonéphrite, uvéite, méningite. Les atteintes ophtalmologiques et neurologiques peuvent engager le pronostic fonctionnel.

Les symptômes de la syphilis secondaire peuvent aussi inclure une irritation de la gorge, une alopecie, des céphalées, un amaigrissement, des douleurs musculaires, ou une asthénie (2). En l'absence de traitement, l'infection va progresser jusqu'au stade de syphilis latente précoce et possiblement vers les états de syphilis tertiaire.

La syphilis latente précoce

Ce stade concerne les patients dont la syphilis remonte à moins de un an. Seule une antériorité sérologique négative datant de moins de un an permet de l'affirmer. On peut l'évoquer devant une augmentation des titres des tests non tréponémiques (VDRL ou RPR) d'un facteur quatre dans l'année précédente, la notion d'ulcération génitale ou manifestations secondaires récentes, ou la notion d'un partenaire infecté (23). Pendant cette phase silencieuse le patient est cliniquement asymptomatique et non contagieux. Le stade latent commence lorsque les symptômes de la syphilis primaire et secondaire ont disparu (2).

La syphilis tertiaire

Elle a pratiquement disparu : en effet on considère aujourd'hui que moins de 10% des syphilis récentes non traitées vont évoluer vers le stade tertiaire (23). Les différentes manifestations de la syphilis tertiaire sont :

- des lésions cutanées : celles-ci prennent une disposition annulaire sous forme de papulo-nodules dermiques ou hypodermiques qui peuvent se ramollir et s'ouvrir à la peau : on parle alors de gomes ;
- des lésions muqueuses : forment aussi des gomes au niveau de la muqueuse buccale, nasale, et dans le palais ;
- des atteintes cardiovasculaires : insuffisance aortique et anévrisme de l'aorte thoracique ;
- des atteintes neurologiques : neurosyphilis.

Ces atteintes peuvent être létales. Durant cette phase, le patient n'est pas contagieux (11).

La neurosyphilis

La neurosyphilis peut avoir lieu à chaque stade de l'infection (y compris les stades primaires et secondaires) (11). Il s'agit dans tous les cas d'une méningite chronique syphilitique plus ou moins associée à différentes manifestations (23) :

- une atteinte vasculaire : la méningovascularite syphilitique ;
- une atteinte parenchymateuse : avec atteinte des lobes frontaux (paralysie générale) et des cordons postérieurs de la moelle (Tabès).

Par ailleurs, la méningite syphilitique chronique peut se compliquer d'une atteinte radiculaire, d'une paralysie des nerfs crâniens, d'une hypertension intracrânienne, ou d'une atteinte oculaire (rétinite, uvéite) (23). Devant toute syphilis tardive, un examen clinique neurologique, ophtalmologique et une ponction lombaire doivent être effectués.

Syphilis latente tardive

Concerne la plupart des patients dont la syphilis précoce n'a pas été prise en charge. Dans ce cas l'examen clinique devra rechercher des signes de syphilis tertiaire, en particulier des signes d'atteinte neurologique ou ophtalmique. Il sera éventuellement complété par une radiographie thoracique afin de rechercher des signes d'atteinte viscérale (23).

La syphilis chez les patients porteurs du VIH

Ces dernières années, la co-infection VIH-syphilis est de plus en plus fréquente, avec une prévalence particulièrement élevée chez les hommes ayant des rapports sexuels avec les hommes (HSH) (24).

L'infection par la syphilis augmente le risque de transmission et de contamination par le virus du VIH. En effet la présence d'un chancre est un facteur de risque aggravant pour la contamination par le VIH. Cela est dû à la fois à la discontinuité tégumentaire mais aussi à des interactions biologiques (richesse du chancre en lymphocytes CD4, régulation de la réplication du génome viral par les lipoprotéines de la bactérie, diminution du nombre de CD4 circulants) (25).

Les présentations cliniques et biologiques de la syphilis chez les patients porteurs du VIH sont similaires dans la plupart des cas à celles des patients non porteurs du virus (25). En revanche

les atteintes neurologiques symptomatiques (neurosyphilis) peuvent avoir lieu plus tôt chez le patient VIH positif que chez les autres patients (26).

La syphilis congénitale

Une syphilis non traitée chez une femme enceinte entraîne une mort fœtale *in utero* dans 40 % des cas, 30 % de mortalité périnatale et 20 % de séquelles graves. Les atteintes de l'enfant peuvent être de deux types (21) :

- infections congénitales précoces : elles surviennent dans les deux premières années de vie (20% de mortalité périnatale). La rhinorrhée est très souvent présente et a une valeur diagnostique forte, elle est riche en tréponèmes. On peut aussi voir des lésions cutanées planes ou nodulaires, des bulles palmo-plantaires, des ostéochondrites, arthrites, méningite, hépatomégalie, splénomégalie, adénopathies, ictère et cytopénies ;
- infections congénitales tardives : elles surviennent après deux ans. On observe des atteintes osseuses, dentaires, neurologiques. Le tableau typique est la triade de Hutchinson avec une kératite interstitielle, une surdité, et un défaut du palais osseux et des dents.

f) Dépistage

D'après les recommandations de la Haute Autorité de Santé, le dépistage doit avoir lieu dans les situations suivantes (27) :

- les HSH ayant des rapports non protégés (fellation comprise) ;
- les travailleurs du sexe ayant des rapports non protégés (fellation comprise) ;
- les personnes fréquentant les travailleurs du sexe et ayant des rapports non protégés (fellation comprise) ;
- lors du diagnostic ou en cas d'antécédent d'IST à type de gonococcie, de lymphogranulomatose vénérienne ou d'infection à VIH ;
- les personnes ayant des rapports non protégés (fellation comprise) avec plusieurs partenaires par an ;
- les migrants en provenance de zone d'endémie (Afrique, Asie, Europe de l'Est, Amérique du Sud) ;
- lors d'une incarcération ;

- après un viol ;
- chez les femmes enceintes. Le dépistage est obligatoire en France lors du premier examen prénatal. Il sera renouvelé en cas de comportement à risque au plus tard à 28 SA afin de pouvoir prendre en charge la patiente en cas de séroconversion. Il sera réalisé après l'accouchement en absence de notion de dépistage au cours de la grossesse (28).

La nomenclature des actes de biologie médicale impose l'utilisation d'un test tréponémique (TT) couplé à un test non tréponémique (TNT) pour le dépistage de la syphilis (29) (voir paragraphe I/B/).

g) Traitement

D'après les recommandations 2016 du collège des universitaires des maladies infectieuses et tropicales (30), la pénicilline G est l'antibiotique de référence . Cette molécule a un effet bactéricide, et est toujours efficace (pas de résistances décrites) à deux conditions (23) :

- la concentration sérique de la molécule doit être adaptée, un taux $> 0,018$ mg/L doit être obtenu ;
- cette concentration doit être atteinte pendant 7 à 10 jours minimum, du fait du très long temps de division des tréponèmes (30 à 33 heures).

La pénicilline retard par voie intramusculaire est la forme galénique la plus adaptée car elle permet de limiter le nombre d'injections. En cas d'allergie aux pénicillines, on s'orientera vers les cyclines, ou en dernière intention vers les macrolides (moins efficaces donc déconseillés). Les fluoroquinolones ne sont pas actives (23).

- Les sujets atteints de syphilis primaire, secondaire, ou latente précoce de moins de un an (30) :
 - une seule injection de 2,4 Millions d'unités de benzathine benzylpénicilline ;
 - en cas d'allergie, on utilise la doxycycline 100 mg deux fois par jour pendant quatorze jours ;
 - chez les patients VIH + : le schéma thérapeutique est le même.
- Les sujets atteints de syphilis tardive (syphilis tertiaire, syphilis latente tardive de plus de un an ou non datable) (30) :

- trois injections de 2,4 Millions d'unités de benzathine benzylpénicilline, chacune à une semaine d'intervalle (20) ;
- en cas d'allergie, on utilise la doxycycline 100mg deux fois par jour pendant vingt-huit jours.
- Les sujets atteints de neurosyphilis (atteinte oculaires compris) (30) :
 - pénicilline G à forte dose par voie IV pendant quatorze à vingt et un jours. Les taux tréponémiques de pénicilline sont rarement atteints dans le LCR avec la benzathine pénicilline ;
 - en cas d'allergie à la pénicilline, une désensibilisation doit être effectuée pour pouvoir mettre en place le traitement (31).
- Chez la femme enceinte :
 - même schéma + prévention de la réaction d'Herxheimer (voir ci-dessous) par du paracétamol systématique ou de la prednisone ;
 - chez la femme enceinte seule la pénicilline peut être utilisée pour traiter la syphilis et limiter le risque de transmission materno-fœtale. Ce traitement est très efficace pour prévenir la transmission fœto-maternelle (98% de succès) (20). Une femme enceinte allergique à la pénicilline devra subir une désensibilisation avant d'être traitée.
- Syphilis congénitale :
 - pénicilline G IV 150 000 u/kg IV en 2 à 6 injections par jour pendant dix à quatorze jours associées à la prévention de la réaction d'Herxheimer par du paracétamol (voir paragraphe suivant).

Le patient doit être gardé sous surveillance pendant trente minutes avec un matériel d'urgence prêt après l'injection de pénicilline en IV ou en IM, car le risque d'allergie immédiate avec choc anaphylactique est important (1 pour 100000 injections) (31). La réaction d'Herxheimer peut apparaître dans les heures qui suivent le traitement antibiotique, dans les cas de syphilis secondaire ou de syphilis tardive. Il s'agit souvent d'une fièvre, d'une exacerbation de l'éruption cutanée, de poly-adénopathies ou d'une hypotension. Elle est problématique chez la femme enceinte ou les personnes âgées. Cette réaction serait due à une allergie vis à vis des antigènes tréponémiques libérés par la lyse des germes due au traitement antibiotique. Elle peut être atténuée par du paracétamol, voir une corticothérapie (30).

La surveillance de l'efficacité du traitement est possible grâce au suivi de la décroissance du TNT (VDRL ou RPR). On doit observer une décroissance d'un rapport de quatre dans les trois à six mois. Une négativation est attendue au bout de un an en cas de syphilis primaire, deux ans en cas de secondaire. Souvent, la décroissance des titres est beaucoup plus lente et la négativation du TNT est rare, ce qui ne constitue pas forcément un échec thérapeutique. Une réascension du TNT signe par contre un échec de traitement ou une réinfection. Les Tests Tréponémiques (TT) (TPHA, ELISA), se négativent rarement après traitement. Au cours de la neurosyphilis, la pléiocytose disparaît en premier, suivie par l'hyperalbuminorachie et la négativation du TNT dans le LCR s'il s'était positivé (30).

h) Prévention

La prévention n'est pas spécifique à la syphilis, il s'agit des mesures de préventions communes à toutes les infections sexuellement transmissibles (30).

Prévention primaire :

- abstinence, diminution du nombre de partenaires ;
- fidélité réciproque ;
- préservatif. S'il est correctement utilisé, il constitue la protection la plus sûre, bien que non fiable à 100% (risque de rupture ou d'exposition d'un chancre situé en dehors de la zone couverte).

Prévention secondaire :

- dépistage des sujets infectés ;
- traitement précoce des sujets infectés et de leurs partenaires.

Le traitement gratuit, en dose unique, au centre de dépistage, sous surveillance médicale, permet une efficacité maximale pour l'interruption rapide de la chaîne de contamination.

B/ Diagnostic biologique de la syphilis

a) Algorithme de diagnostic

La Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (NABM) exige pour le dépistage sérologique de la syphilis deux réactions obligatoires dont une de chaque groupe (29) :

- Groupe 1: TNT : VDRL latex (Venereal Disease Research Laboratory), VDRL charbon (RPR : Rapid Plasma Reagin test), VDRL coloré.
- Groupe 2: TT : TPHA (Treponema pallidum Haemagglutination Assay), EIA (Enzyme Immuno Assay), CIA (Chemiluminescence Assay) FTA (Fluorescent Treponemal Assay), TPPA (Treponema Pallidum Particle Assay)

En cas de réaction positive ou dissociée, le titrage doit être effectué sur chaque groupe. Le titrage des anticorps et l'observation de leur cinétique au cours du temps permettent l'interprétation des sérologies positives.

Plusieurs fournisseurs de réactifs proposent aujourd'hui des tests tréponémiques automatisés. L'argumentaire de la HAS de mai 2015 (27) propose une nouvelle stratégie de dépistage simplifiée et entièrement automatisée (figure 10). Elle consiste à réaliser dans l'ordre suivant :

- une première étape avec un TT automatisé seul ;
- une seconde étape en cas de résultat positif ou douteux, de confirmation et de titrage par un TNT.
 - si le TNT de confirmation est négatif, le laboratoire doit confirmer par TT, de préférence avec des antigènes différents du premier test. Si le second TT est positif, il peut s'agir soit d'une cicatrice syphilitique, soit d'une syphilis précoce ;
 - si le TNT est positif, il s'agit d'une syphilis active.

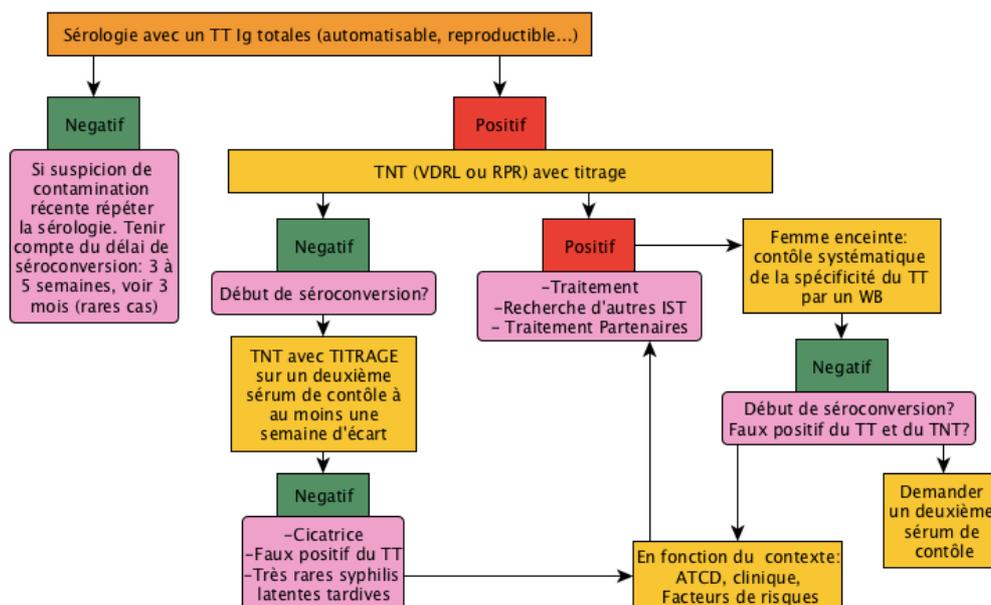


Figure 10 : Algorithme simplifié selon les recommandations de la HAS (27)

Ce document de l’HAS met aussi en avant le gain de temps et la réduction du risque d’erreur par rapport aux techniques traditionnelles manuelles. L’HAS donne un avis favorable au changement de la nomenclature en faveur de cette nouvelle stratégie diagnostique. Ce changement n’a pas eu lieu dans la dernière mise à jour de la nomenclature d’avril 2017. Ces nouvelles recommandations, bien que non applicables aujourd’hui en France, présentent de meilleures performances diagnostiques (27) (figure 11).

	Sensibilité	Spécificité
Algorithme traditionnel : TNT en dépistage puis TT si positif	99,38%	99,98%
Algorithme inverse : TT automatisé en dépistage puis TNT si positif	99,85%	100%

Figure 11 : Comparaison des sensibilités et spécificités des deux algorithmes de dépistage de la syphilis proposés par le CDC (27)

Les recommandations du CDC de juin 2015 (32) préconisent d’initier le dépistage de la syphilis par un TNT seul (figure 12). Ces recommandations ne diffèrent pas des précédentes de 2010 (33) et 2011 (34). Cependant, prenant acte du choix d’un grand nombre de laboratoires américains d’utiliser un algorithme inversé (TT automatisable seul comme test

initial de dépistage), le CDC propose une conduite à tenir dans ce cas. Un TNT quantitatif devra être fait en cas de positivité du dépistage. Cette stratégie permet d'identifier les personnes présentant une cicatrice syphilitique, celles avec une syphilis non traitée ou incomplètement traitée, mais aussi des faux positifs pouvant avoir lieu chez les personnes ayant une faible probabilité d'infection. La stratégie proposée par l'HAS est donc en vigueur dans de nombreux laboratoires aux Etats-Unis. Elle n'a pas été rejetée par le CDC, dès lors qu'un TNT quantitatif est réalisé en seconde ligne.

En mars 2017, la HAS a proposé un argumentaire concernant le suivi sérologique du traitement de la syphilis et son inscription à la NABM (35). Ce suivi peut être limité à un TNT seul associant le titrage du sérum antérieur (récupéré en sérothèque) et le sérum à tester, afin de limiter les fausses variations liées aux erreurs de manipulation. En cas de syphilis précoce, le contrôle a lieu à 3, 6 et 12 mois, et plus fréquemment chez les patients VIH positifs et la femme enceinte. En cas de syphilis tardive, le contrôle a lieu à 6, 12 et 24 mois. Une négativation ou une diminution du titre de quatre fois des Ac du TNT confirme une guérison. Une augmentation par quatre du titre des Ac du TNT permet de poser le diagnostic d'une nouvelle contamination (35). Cette modification de la nomenclature n'a, à ce jour, pas encore eu lieu (29).

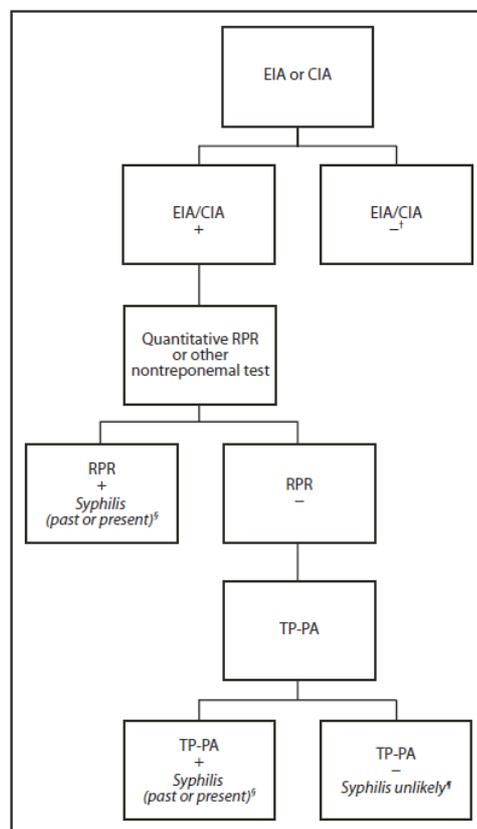


Figure 12 : Stratégie diagnostique de la syphilis selon le CDC d'Atlanta (34)

b) Diagnostic direct

Prélèvement

Les prélèvements pour diagnostic direct doivent être faits de préférence avant toute antibiothérapie (2). Le germe peut être mis en évidence aussi bien dans les lésions primaires que secondaires.

En cas de suspicion de syphilis primaire, le chancre est prélevé après nettoyage au sérum physiologique. Ce prélèvement s'effectue de préférence au laboratoire, ou à défaut, sera acheminé dans les 30 minutes. Le prélèvement doit ramener une sérosité exempte de sang qui permettra un examen microscopique direct à l'état frais ou après coloration. En cas de suspicion de syphilis secondaire, la recherche se fait à partir de lésions de la peau, des lésions tissulaires, de l'humeur vitrée ou du liquide céphalo-rachidien (36).

Le LCR doit être prélevé dans les cas de suspicion de neurosyphilis. Il permettra de mettre en évidence une pléiocytose, une hyperprotéinorachie, la présence d'anticorps spécifiques ou la présence d'ADN bactérien par PCR. L'ensemble de ces analyses est absent de la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM) (29).

Devant une suspicion de syphilis congénitale, la recherche se fait à partir du sang du cordon ombilical, du placenta, des sécrétions nasales ou buccales et de la peau (36).

Microscopie à fond noir

Cet examen consiste à observer une préparation entre lame et lamelle à partir de prélèvements de lésions primaires ou secondaires de la peau ou des muqueuses, à la recherche de bactéries spiralées dont la mobilité est caractéristique (en tire-bouchon). L'observation doit être réalisée dans le quart d'heure qui suit le prélèvement car *T. pallidum* est très sensible à l'oxygène (36).



Figure 13 : Observation de tréponèmes en microscopie à fond noir

Aucune distinction n'est possible entre *T. pallidum* et les autres tréponèmes saprophytes. Cet examen est donc peu spécifique et à l'origine de nombreux faux positifs notamment si la lésion est située au niveau des muqueuses buccales ou anales (2). La microscopie à fond noir ne doit donc jamais être réalisée sur des lésions oro-pharyngées (36).

La lecture au microscope est très subjective, le résultat est dépendant de l'expérience du lecteur. La sensibilité est estimée entre 70-80% avec un excellent lecteur en sachant que l'examen au fond noir perd de sa sensibilité dans certaines situations (36) :

- prélèvement hémorragique ;
- application d'antiseptiques locaux avant le prélèvement ;
- prise récente d'antibiotiques.

Cet examen est réservé à certains laboratoires expérimentés et à proximité des unités de consultation. Il n'apparaît pas dans la NABM (29).

Coloration

La coloration de Gram est inutilisable pour visualiser les spirochètes car ils ne prennent pas cette coloration. Ils sont faiblement colorables au Giemsa. On peut éventuellement utiliser des colorations argentiques (Fontana-Tribondeau, Warthin-Starry) mais sa réalisation est délicate et non faite en routine (2).

Immunofluorescence directe

Le frottis est recouvert d'une dilution d'anticorps anti-*T.pallidum* marqués par un fluorochrome ou révélés dans un second temps par une antiglobuline spécifique marquée à la fluorescéine. Les principaux avantages de cette technique sont un gain de sensibilité et de spécificité par rapport à la microscopie sur fond noir ou à la coloration argentique (2). Elle est cependant aujourd'hui complètement obsolète (36).

Test d'infectivité sur lapin

Cette technique est praticable uniquement dans les laboratoires spécialisés. Il s'agit de la technique directe la plus sensible et c'est la seule permettant de mettre en évidence la présence de tréponèmes virulents (par opposition aux tréponèmes saprophytes). La mise en

évidence du tréponème vivant se fait dans le testicule de lapin (orchite) après inoculation de celui-ci. La sensibilité est proche de 100% pour un malade n'ayant pas reçu d'antibiotiques (2).

Amplification génique

Cette technique a remplacé le diagnostic direct au microscope à fond noir. C'est aujourd'hui la seule encore utilisée en pratique courante pour le diagnostic direct de la syphilis. Son prix reste élevé et cette analyse n'est pas inscrite dans la nomenclature des actes de biologie médicale (29). Elle est donc peu utilisée mais peut s'avérer utile dans trois situations cliniques :

- syphilis primaire : mise en évidence du germe directement dans les chancres atypiques pour lesquels l'évocation clinique n'est pas évidente, ou en cas de syphilis primaire très précoce. Dans ce cas, la PCR sera positive avant les sérologies (37). La *Tp*-PCR présente une meilleure sensibilité et spécificité que la microscopie à fond noir pour le diagnostic de la syphilis primaire (38) ;
- neurosyphilis : mise en évidence du germe dans le LCR. Les résultats sont variables selon la littérature (2) ;
- uvéite syphilitique : mise en évidence du germe dans l'humeur vitrée ;
- syphilis congénitale : mise en évidence dans le liquide amniotique (2).

Les deux principales cibles d'amplification du génome de *T. pallidum* sont le gène codant la protéine de membrane de 47 kilodaltons (*tpp47*) et le gène codant pour l'ADN polymérase I (*poIA*). Ces deux méthodes semblent avoir les mêmes performances (39).

	Sensibilité	Spécificité
<i>tpp47-Tp-PCR</i>	79,8% (IC95 : 72,7%-85,4%)	95,3% (IC95 : 93,5 %-96,6%)
<i>poIA-Tp-PCR</i>	71,4% (IC95 : 46% -88,0%)	93,7% (IC95 : 91,8%-95,2%)

Figure 14 : Comparaison des sensibilités et spécificités des deux méthodes de PCR dans le diagnostic de la syphilis (39)

Plusieurs études montrent des performances inégales de la technique en fonction du type de prélèvement. La *Tp*-PCR présente de bien meilleures performances sur des échantillons de

lésions dermatologiques que dans le sang ou le LCR. La sensibilité et la spécificité de cette méthode dépendent aussi du stade de la maladie (voir figure 15) (40).

Les performances semblent insuffisantes pour des prélèvements de sang, que ce soit lors d'une syphilis primaire ou secondaire. Il apparaît que dans ces deux situations, le prélèvement d'un écouvillonnage ou d'une biopsie d'une lésion soit bien plus adapté (41) (42).

Cette technique est un bon outil de confirmation de la maladie devant des lésions atypiques mais sa sensibilité moyenne ne permet pas d'exclure la maladie en cas de négativité. Elle constitue un outil utile pour le diagnostic des ulcérations génitales, particulièrement en cas de sérologies négatives dans les populations à haute prévalence de syphilis (40). Les recommandations 2014 de l'IUSTI (International Union Against Sexually Transmitted Infections) proposent de l'utiliser dans le diagnostic direct de la syphilis (43).

	Sensibilité % (IC95)	Spécificité% (IC95)		Sensibilité % (IC95)	Spécificité% (IC95)
Syphilis primaire			Neurosyphilis		
Sang n=8	37,7 (18,0-62,4)	95,7 (84,3-98,9)	LCR n=8	47,4 (31.7-63.7)	85,0 (39.9-98.0)
Ulcère n=15	78,4 (68,2-86,0)	96,6 (95.5-97.5)	Syphilis latente tardive		
Syphilis secondaire			Sang n=13	31,2 (22.4-41.5)	83,5 (22.7-98.9)
Sang n=9	52,2 (37.3-66.7)	83,3 (51.1-96.0)	LCR n=3	6,0 (3.6-10.0)	87,5 (26.6-99.3)
Ecouvillonnage des lésions n=13	72,0 (57.1-83.2)	96,3 (92.1-98.3)	Syphilis congénitale		
Syphilis latente précoce			Sang n=4	83,0 (55.0-95.2)	88,8 (79.9-94.1)
Sang n=19	41,6 (28.5-56.0)	94,8 (86.0-98.2)	LCR n=3	62,2 (42.2-78.8)	96,4 (89.5-98.8)
Ecouvillonnage de lésions n=36	75.9 (68.5-82.0)	96.5 (95.0 -97.6)			

Figure 15 : Comparaison de la sensibilité et de la spécificité de la PCR tréponème dans différents types de prélèvements et dans différents stades de la maladie. Meta-analyse sur 69 études (40)

c) Diagnostic indirect

La sérologie est la technique la plus couramment utilisée pour le diagnostic, le dépistage et le suivi du traitement de la syphilis. Même avec les méthodes les plus sensibles, il existe une

période en début d'infection où la sérologie est négative. En cas de suspicion de rapport contaminant récent, il convient donc de systématiquement contrôler la sérologie à trois semaines.

Prélèvement

Le prélèvement de sérum se fait sur un tube sans anticoagulant (dit « sec »), avec ou sans gel séparateur, pour la recherche d'anticorps. On peut aussi utiliser du plasma (notamment dans les tests tréponémiques automatisés) prélevé sur un tube EDTA. Le patient n'a pas besoin d'être à jeun au moment du prélèvement. En cas de suspicion d'atteinte neurologique ou ophtalmique, il est nécessaire de faire un recueil de liquide céphalo-rachidien (36). Dans ce cas le prélèvement est fait dans un tube stérile de bactériologie.

Tests tréponémiques (TT)

Méthodes manuelles

TPHA et TPPA

Il s'agit d'une réaction d'agglutination entre des hématies (TPHA) ou des particules de gélatine (TPPA) sensibilisées avec un ultrasonat de *T. pallidum* (souche Nichols), et les anticorps anti tréponémiques du patient (2). Ces deux techniques sont de sensibilité et de spécificité équivalentes (36).

Une réaction de dépistage est d'abord effectuée, le sérum est testé au 1/80^e, 1/160^e, 1/320^e. Si cette réaction de dépistage est positive, on titre en effectuant la même réaction avec des dilutions successives de deux en deux du sérum. Le titre d'anticorps est déterminé comme la dernière dilution donnant une réaction positive.

Ces méthodes sont très spécifiques (>99% pour le TPHA et 95% pour le TPPA) (44) (45) et très sensibles, sauf dans les stades très précoces de la maladie (figure 16). Il se positive dans les dix jours suivant l'apparition du chancre. Le TPHA reste positif très longtemps, même des années après la guérison du patient. Il se négative en cas de traitement précoce (36).

	TPHA	TPPA
Syphilis primaire	76%	88%
Syphilis latente	97-100%	98%
Syphilis latente tardive	94%	98%
Syphilis secondaire	100%	100%

Figure 16 : Sensibilités du TPHA et du TPPA en fonction des stades de la maladie (44)

L'inconvénient principal de ces techniques est qu'elles ne sont réalisables que par méthode manuelle : le coût en temps technicien est élevé et la lecture difficile est moins reproductible qu'une technique automatisée car elle dépend de l'expérience du technicien. On décrit de très rares faux positifs dans des maladies auto-immunes, la lèpre, la grossesse, chez des sujets avec des taux élevés d'IgM, A ou G non spécifiques, chez les toxicomanes (36).

Fabricant	Nom du réactif	Fabricant	Nom du réactif	Fabricant	Nom du réactif
Oxoid	TPHA	Inverness	Spinreact TPHA	Biokit	Syphagen TPHA auto
Biosynex	TPHA check	Cypress diagnostics	TPHA	Sobioda	Syphilis TPHA
Biomerieux	TPHA 100	Nal von minden	TPHA latex hemagglutination	Servibio	Biotec TPHA
Elitech	TPHA	Fumouze/orgentec	Immutrep TPHA	Servibio	Servitex TPHA 200 ou 100
Eurobio	TPHA 200t	Fumouze/orgentec	TPHA liquid	Arlington	TPHA test reagent
Dako-france	Kit TPHA syphilis	Biorad	Syphilis TPHA oc2000	Randox	Syphilis TPHA
Siemens	Serodia TPPA	Biorad/Immunochip	Syphilis TPHA 200 ou 500	Mast	Mast TPHA
Siemens	Cellognost TPHA	Biokit	Syphagen TPHA	Biokit	Syphagen TPHA auto

Figure 17 : Réactifs sur le marché utilisant la technique TPHA/TPPA

FTA (Fluorescent Treponemal Assay)

Cette technique permet une détection anticorps anti-tréponémiques par immunofluorescence indirecte. Des tréponèmes entiers inactivés (souche Nichols)(46) sont fixés sur une lame que l'on met en contact avec le sérum du patient. Après lavage, on révèle les anticorps fixés par une antiglobuline humaine marquée par un fluorochrome, et la lame est lue en épifluorescence (2). Le résultat est semi-quantitatif, sous forme de titre correspondant à la dernière dilution de sérum rendant une réaction positive. Ce test donnant de nombreux faux positifs, il a été modifié pour donner le FTA-Abs (FTA absorbé) : le sérum est préalablement mis en contact d'un ultrasonat de tréponèmes saprophytes non pathogènes (souche Reiter), afin d'absorber les anticorps non spécifiques de *Treponema pallidum*. En fonction de l'antiglobuline utilisée, ce test permet de détecter spécifiquement les IgG, les IgM, ou les immunoglobulines totales.

La cinétique du FTA-Abs est superposable à celle du TPHA avant traitement. Il ne se négative aussi qu'en cas de traitement précoce (36). Les anticorps sont décelables peu après l'apparition du chancre, et à tous les stades de la maladie. Le test est sensible (84 à 100% selon les stades) et spécifique (97%) (44). Il permet de confirmer un diagnostic et de suivre l'efficacité d'un traitement. Il existe des faux positifs : maladie auto-immunes, autres spirochètoses (borréliose de Lyme, leptospirose), herpès génital (36). Ce test est devenu obsolète du fait de son important temps de manipulation, son coût élevé et les difficultés de sa lecture (43).

Fabricant	Nom du réactif
BIOMERIEUX	TREPO-SPOT IF
EUROIMMUN	Treponema pallidum FTA-Abs (IgG et IgM)

Figure 18 : Réactifs disponibles en France utilisant la technique FTA

Tests ImmunoChromatographiques (ICT)

Ce sont des Tests Rapides d'Orientation Diagnostique (TROD). Cette technique ne permet pas de tester de grandes séries d'échantillons. Il s'agit d'une variante des tests ELISA/EIA, en technique manuelle sur sang total (36). Il en existe actuellement plus d'une vingtaine sur le marché mondial (47) (figure 19). En France, un rapport de l'ANSM de décembre 2015 en identifie 10 disponibles (48). Leur utilisation n'est pas recommandée dans les régions où un diagnostic de la syphilis classique est possible (43).

Ce sont des tests qualitatifs par immunochromatographie sur bandelette ou équivalents. Ils sont recouverts d'antigènes spécifiques qui détectent la présence d'anticorps anti-Treponema pallidum. Un test « multiplex » permet de réaliser simultanément le dépistage du VIH. Il s'agit du SD BIOLINE Duo HIV/Syphilis rapid d'Alere®, il s'inscrit dans le programme de l'OMS de lutte contre la syphilis congénitale par un dépistage associé à celui du VIH chez les femmes enceintes (15).

Fabricant/mandataire/ distributeur	Nom du réactif	Présentation
All Diag/Todapharma	Syphilitop optima	bandelette
BioLytical/Emergo/Nephrotek	Insti Multiplex (dépistage des anticorps VIH-1 et VIH-2 et syphilis)	membrane Insti à l'intérieur d'une cartouche
Nal von Minden	Nadal Syphilis Test (test cassette)	cassette
	Nadal Syphilis Test (test strip)	bandelette
TrinityBiotech	Uni-Gold Syphilis Treponemal	cassette
Turklab/ Nephrotek	Toyo diagnostic syphilis TTPO1	cassette
Omega Diagnostics/Elitech	Visitech Syphilis	cassette
Standard Diagnostic/MT Procons/Alere	SD Bioline Syphilis 3	cassette
Ultimed / Biolys	Syphilis Test (Anti syphilis Card)	cassette
Vedalab/Servibio	Syphilis Sign	cassette

Figure 19 : Liste des TDR disponibles sur le marché français en 2015 (48)

Ces tests détectent la présence d'anticorps spécifiques de *T. pallidum* et sont donc équivalents aux méthodes immunoenzymatiques. Tous détectent les IgG. Quatre d'entre eux détectent les IgM et les IgG et quatre les IgG, IgM et IgA. Ces TROD permettent ainsi le dépistage de la syphilis quel que soit le stade de l'infection, notamment en phase précoce (48). La sensibilité s'échelonne de 65% à 100% selon les TROD, et la spécificité de 94,7% à 100% (48).

Le résultat est uniquement qualitatif (36). Une confirmation par un autre test en cas de positivité est nécessaire afin de déterminer le titre des anticorps (2). Ces tests sont très utiles en screening notamment dans les pays en voie de développement où la formation des techniciens et le matériel disponible (centrifugeuse) sont parfois limités.

Des applications Smartphone permettant de lire les résultats des tests rapides ont été développés afin de faciliter la lecture. Les sensibilités et spécificités semblent être comparables à une lecture visuelle (49).

PaGIA (Particle Gel ImmunoAssay)

Cette technique utilise des billes fixées avec des antigènes recombinants (TpN15, TpN17 et TpN47) placées dans une matrice en gel équivalente à celles utilisées pour les groupes sanguins. Après centrifugation, on obtient une agglutination si le sérum est positif (figure 22). Le résultat est uniquement qualitatif et obtenu en vingt minutes (2). L'intérêt de cette

technique est la rapidité et la simplicité de sa mise en œuvre avec un minimum de matériel requis (pipette et centrifugeuse). Cette technique peut s'avérer très utile pour le screening des donneurs de sang, puisqu'elle utilise le même matériel que pour la détermination des groupes sanguins. Sa mise en œuvre est plus facile que l'ELISA ou le FTA-abs (50). Elle présente une sensibilité de 89% comparable au TPPA et une meilleure spécificité de 100% (sur 650 échantillons testés dont 48 positifs) (51).

Fabricant	Nom du réactif
BIO-RAD	Id-PaGIA syphilis antibody test

Figure 20 : Réactifs disponibles en France utilisant la technique PaGIA

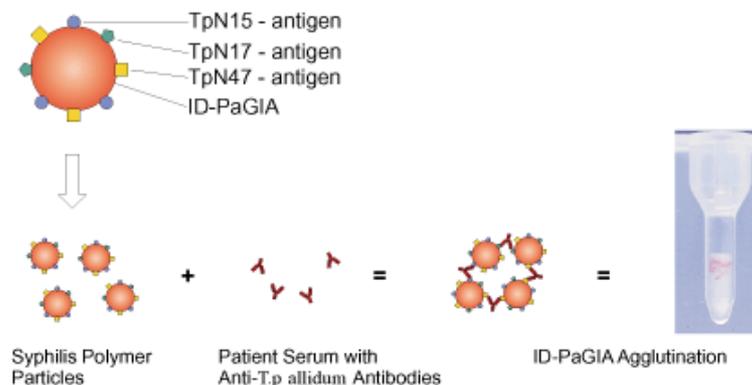


Figure 21 : Principe du test PaGIA

Méthodes automatisées

Il existe une très grande variété de tests tréponémiques automatisés disponibles sur le marché. La plupart de ces tests mettent en jeu une détection immuno-enzymatique. Ils peuvent utiliser le tréponème entier, des antigènes purifiés ou des antigènes recombinants tels que 15TpN, 17TpN, 47TpN (52). Ils permettent de détecter sélectivement les IgG, les IgM, ou les immunoglobulines totales. D'autres méthodes mettent en jeu une variante du TPHA avec une détection par turbidimétrie. En tout, quatre techniques sont utilisées en France :

- Enzyme Linked ImmunoAssay (ELISA) : l'antigène est fixé sur la cupule de réaction. Le sérum du patient contenant les anticorps à doser est mis en contact des antigènes

fixés. La réaction antigène-anticorps du patient est mise en évidence grâce à un conjugué : antiglobuline humaine associée à une enzyme. L'ajout du substrat produit une réaction colorée dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'anticorps présente dans le sérum du patient ;

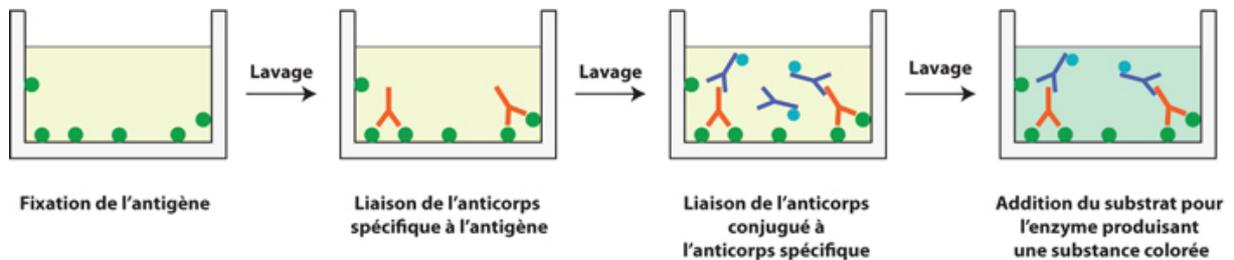


Figure 22 : Principe de l'ELISA

- Chemiluminescence ImmunoAssay (CMIA): il s'agit d'une variante de l'ELISA, le deuxième anticorps est conjugué à une enzyme qui émet de la lumière lorsqu'elle est en contact d'un substrat de chimiluminescence ;
- Multiplex Flow Immunoassay (MFI) (53): détection par cytométrie en flux de microbilles liées à des protéines recombinantes de *T. pallidum* (15kDa, 17kDa, 47kDa). Cette technique permet de réaliser en simultanée différentes immunoanalyses sur un volume qui serait insuffisant avec les techniques classiques (54). Elle permet d'étudier simultanément les IgG et les IgM et de rechercher d'autres IST (HIV, HSV). Cette technique a montré d'excellentes performances, avec une sensibilité de 98,7% et une spécificité de 98,5% (55). Une étude comparant cette technique à la CMIA sur l'automate Architect montre que la cytométrie en flux présente une spécificité bien plus importante (56) ;

Assay and result	IgG WB result (no. of samples)		% sensitivity (95% CI)	% specificity (95% CI)	% agreement (95% CI)	κ value
	Positive	Negative				
BioPlex 2200 Syphilis IgG						
Positive	352	48	100 (99–100)	89.7 (86.6–92.3)	94.2 (92.5–95.8)	0.88
Negative	0	420				
ARCHITECT Syphilis TP						
Positive	352	101	100 (99–100)	78.4 (74.4–82.1)	87.7 (85.4–89.9)	0.76
Negative	0	367				
TPHA						
Positive	351	1	99.7 (98.5–99.9)	99.8 (98.8–100)	99.8 (99.4–99.9)	0.98
Negative	1	467				

Figure 23 : Comparaison des sensibilités et spécificités des techniques Bioplex 2200 Syphilis IgG, Architect Syphilis TP, et TPHA (56)

- turbidimétrie : ces techniques sont basées sur l'agglutination de billes de latex, avec lecture de la réaction par mesure de la turbidimétrie. Ces techniques permettent, contrairement aux autres citées plus haut, d'obtenir un résultat quantitatif. D'après les notices des kits, un échantillon présentant un résultat de 1280 TU (Titer Units) correspondrait approximativement à un titre 1/1280 retrouvé avec la technique TPHA. Ces tests semblent donner des résultats assez bien corrélés entre eux et avec des titres hauts ou bas en technique FTA-Abs (52). Les taux évoluent de manière cohérente avec l'évolution clinique, et un taux d'anticorps supérieur à 1000 TU permet de suspecter une infection active par *Treponema pallidum*. L'intervalle de linéarité de ces tests est entre 0 et 300 TU, ce qui rend des dilutions nécessaires pour différencier les infections actives des cicatrices sérologiques (57). A ce jour, peu d'études sont publiées sur ces tests relativement récents.

Nom du réactif	Automate	Fabricant	Technique	Nom du réactif	Automate	Fabricant	Technique
Enzygnost syphilis	BEP III	Siemens	ELISA	Elecsys syphilis	Elecsys	Roche (58)8	CLIA
Syphilis screen recombinant	TRITURUS	Ingen	ELISA	Liaison Treponema Assay	Liaison	Diasorin	CLIA
Treponema IgM	TRITURUS	Ingen	ELISA	HISCL Anti TP assay kit		Sysmex	CLIA
Treponema IgG	TRITURUS	Ingen	ELISA	Syphilis VirClia Monotest	VirClia	Vircell	CLIA
Syphilis Total Ab	Systèmes d'ELISA automatiques	BIORAD	ELISA	ADVIA Centaur Syphilis Assay	ADVIA Centaur	Siemens (59)9	CLIA
Syphilis IgM EIA assay	Systèmes d'ELISA automatiques	BIORAD	ELISA	VITROS TPA	VITROS	ORTHO Clinical diagnostics (60)0	CLIA
Chorus Syphilis screen recombinant	Chorus	Theradiag	ELISA	IMMULITE 2000 Syphilis Screen	IMMULITE 2000	Siemens	CLIA
Chorus treponema IgG	Chorus	Theradiag	ELISA	Syphilis VirClia IgG Monotest	VirClia	Vircell	CLIA
Chorus Treponema IgM	Chorus	Theradiag	ELISA	Syphilis VirClia IgG+IgM Monotest	VirClia	Vircell	CLIA
Syphilis ELISA IgG	Systèmes d'ELISA automatiques	Vircell	ELISA	Syphilis VirClia IgM Monotest	VirClia	Vircell	CLIA
Syphilis ELISA IgG+IgM	Systèmes d'ELISA automatiques	Vircell	ELISA	Bio-Plex 2200 syphilis	Bio-Plex 2200	Bio-Rad	MFI
EIAgen TMPA screen recombinant	Systèmes d'ELISA automatiques	EUROBIO	ELISA	Immunoticles Auto 3 TP ® (57)7	/	A&T corporation	Turbidimétrie
BIOELISA SYPHILIS	Best 2000	BIOKIT	ELISA	Mediace TPLA	COBAS	Roche (61)1	Turbidimétrie
Captia Syphilis (G et M)	Systèmes d'ELISA automatiques	Trinity Biotech	ELISA	Syphilis TP	Architect	Abbott	CLIA

Figure 24 : Différents tests tréponémiques automatisés disponibles sur le marché français

Une comparaison de cinq tests tréponémiques automatisés avec le TPHA (62) a été citée dans l'argumentaire de la HAS de 2015 (27). Elle démontre l'excellente sensibilité et spécificité de ces techniques. Plus de 96% des résultats sont concordants avec le TPHA. La sensibilité et la spécificité de ces tests sont apparues supérieures à celles du TPHA, en effectuant des immunoblots sur les échantillons discordants. Cette étude a aussi montré que les performances des tests ne présentant qu'un seul antigène recombinant (type liaison Diasorin®) sont équivalentes aux techniques en utilisant plusieurs. L'analyse de sept sérums de patients présentant une syphilis primaire a démontré la meilleure sensibilité des techniques automatisées par rapport au VDRL et au TPHA dans ce type de présentation clinique.

Les TT automatisés ont une sensibilité au moins aussi bonne que les TNT, tout en étant plus spécifiques (63). Ils se positivent très précocement au cours de la syphilis (surtout les IgM) mais en cas de positivité, le recours à d'autres tests non tréponémiques (VDRL/RPR) s'avère nécessaire pour confirmer le diagnostic et différencier les cas de figures notamment liés au traitement précoce ou tardif du patient, ou à sa réinfection (36). Les IgM sont les premiers anticorps à apparaître dès la deuxième semaine de l'infection, suivis rapidement par les IgG (36). Ces différentes techniques automatisées présentent plusieurs avantages par rapport aux techniques manuelles classiques (53) :

- une meilleure cadence avec des manipulations réduites au minimum ;
- une meilleure sensibilité ;
- une interprétation plus objective des résultats ;
- une absence d'effet de zone.

La plupart de ces tests rendent un résultat final qualitatif (positif ou négatif) qui oblige à réaliser des tests complémentaires semi-quantitatifs (tréponémiques et non tréponémiques) lorsque le résultat est positif, afin d'avoir un taux d'anticorps permettant l'interprétation précise du stade de l'infection et le suivi du traitement. Cela fait d'ailleurs partie des recommandations de la HAS (27) et du CDC (32).

Assay and result	No. of FTA-ABS test results		% sensitivity	% specificity	% agreement	Kappa value (range) [SE]
	Reactive	Nonreactive				
Abbott Architect						
Reactive	152	0	96.8	100.0	99.2	0.978 (0.960-0.997) [0.010]
Nonreactive	5	458				
Roche Cobas						
Reactive	156	0	99.4	100.0	99.8	0.996 (0.987-1.000) [0.004]
Nonreactive	1	458				
ADVIA Centaur						
Reactive	156	0	99.4	100.0	99.8	0.996 (0.987-1.000) [0.004]
Nonreactive	1	458				
Sysmex HISCL						
Reactive	155	0	98.7	100.0	99.7	0.991 (0.980-1.000) [0.006]
Nonreactive	2	458				
A&T Immunoticles						
Reactive	153	2	97.5	99.6	99.0	0.974 (0.954-0.998) [0.010]
Nonreactive	4	456				
Sekisui Mediatec						
Reactive	154	9	98.1	98.0	98.0	0.949 (0.921-0.978) [0.014]
Nonreactive	3	449				

Figure 25 : Comparaison de six tests tréponémiques automatisés (52)

Tests non tréponémiques (TNT)

- Réactions à antigène non tréponémique : VDRL et RPR

Ces tests mettent en œuvre une réaction d'agglutination passive des réagines syphilitiques en présence d'un antigène, le cardiolipide, complexé à des particules de charbon (RPR) ou de latex (VDRL) (36). Cet antigène est présent chez *Treponema pallidum* et autres tréponèmes, mais aussi dans les issues de végétaux ou d'animaux (surtout le cœur et le foie) (2).

Cette technique a été utilisée historiquement par Wassermann. Celui-ci a appliqué la réaction de fixation du complément de Bordet pour le premier sérodiagnostic de la syphilis. Aujourd'hui encore certains prescripteurs appellent encore cette analyse BW pour réaction de Bordet Wassermann (2). Les tests non tréponémiques mettent en jeu deux étapes :

- le dépistage : la réaction est qualitative ;

- le titrage : concerne uniquement les sérums positifs. On quantifie la réaction en l'effectuant successivement sur des dilutions croissantes du sérum du patient allant de deux en deux. Le titre correspond à la dernière dilution où l'on observe la présence d'agglutinats (36).

Les TNT se positivent 10 à 20 jours après l'apparition du chancre (36). Les titres sont bien corrélés à l'évolutivité de la maladie. Ce sont de bons marqueurs de suivi de l'efficacité thérapeutique car ils se négativent sous traitement même tardif. Ils sont donc un marqueur de l'efficacité thérapeutique et d'un traitement bien conduit (36). C'est aujourd'hui la seule technique utilisée et recommandée pour suivre l'efficacité d'un traitement antibiotique.

Les sensibilités en fonction des différents stades de la maladie sont regroupées dans le tableau suivant (44) :

	VDRL	RPR
Syphilis primaire	78 %	86 %
Syphilis secondaire	100 %	100 %
Syphilis latente	95 %	98 %
Syphilis latente tardive	71 %	73 %

Figure 26 : Sensibilités des TNT manuels en fonction du stade de la maladie (44)

Les principaux inconvénients de la technique sont les suivants :

- le manque de spécificité. On observe de nombreux faux positifs avec cette technique : infections bactérienne (rickettsioses, lèpre, lymphogranulomatose vénérienne, tuberculose, mycoplasme), virales (hépatites, mononucléose infectieuse, varicelle, rougeole), parasitaires (paludisme, trypanosomiasés), certains états physiologiques et pathologiques (grossesse, maladies auto-immunes, toxicomanie, dysprotéinémies...) (64) (44) ;
- le manque de sensibilité dans les syphilis primaires et latentes tardives (44) ;

- un phénomène de prozone peut avoir lieu chez les patients présentant une grande quantité d'anticorps. Ce phénomène est retrouvé chez 1 à 20 % des patients atteints de syphilis secondaire (65) ;
- technique manuelle à lecture visuelle présentant des variations éventuelles de lecture d'un individu à l'autre.

Pour limiter ce dernier inconvénient, des tests non tréponémiques automatisés par immunoturbidimétrie ont été développés :

Nom du réactif	Automate	Fournisseur	Technique
Mediace RPR	COBAS Roche	Roche	Immunoturbidimétrie
Hisens Auto RPR LTIA (66)	ADVIA Siemens	HBi Corp	Immunoturbidimétrie LTIA

Figure 27 : Test non tréponémiques automatisés disponibles sur le marché

Ces deux tests mettent en œuvre une technique immunoturbidimétrique qui permet d'obtenir des résultats exploitables quantitativement. Encore très peu d'études décrivant ce type de tests ont été publiées. Le pourcentage de concordance entre le RPR automatisé Hisens Auto RPR LTIA ® et le RPR classique est de 78,6 %. Le RPR manuel semblerait plus sensible que le RPR automatisé. Les deux types de techniques peuvent être utilisés pour la surveillance de l'efficacité du traitement antibiotique. Cependant, le test automatisé permettrait de mettre en évidence une séroconversion plus tôt que la technique manuelle (67) (61).

Western Blot (WB) ou test d'immuno-empreinte

Des protéines spécifiques de *T. pallidum* sont séparées par électrophorèse et transférées sur une membrane de nitrocellulose que l'on met en contact avec le sérum du patient. En fonction de l'antiglobuline utilisée pour la révélation, on pourra rechercher séparément les IgG et les IgM (2). Il existe plus de 22 antigènes tréponémiques mais trois protéines sont suffisantes et essentielles pour affirmer la spécificité des anticorps détectés (36) :

- la protéine 17kDa : protéine membranaire ;
- la protéine 15kDa : protéine membranaire ;
- la protéine 47kDa : lipoprotéine membranaire majeure.

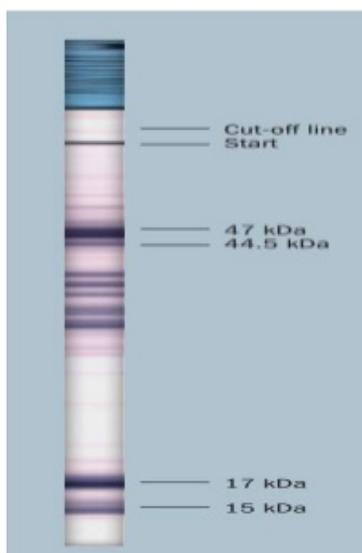


Figure 28 : Bandelettes de Western Blot et antigènes de la syphilis

La technique ne nécessite pas d'expertise technique, et l'on peut obtenir un résultat en trois heures. Cette technique présente une sensibilité et une spécificité élevées (36). Elle ne permet pas de différencier une cicatrice sérologique d'une syphilis latente, ni de distinguer la syphilis des tréponématoses endémiques. La cinétique d'apparition des protéines en fonction de l'évolution de la maladie demande encore à être décrite (36). Elle sert de méthode de confirmation dans les cas douteux. Elle présente un intérêt en cas de suspicion de syphilis congénitale. Dans ce cas, on compare la bandelette du WB IgG obtenu sur le sérum du nouveau-né et celle de la mère, et on associe un WB pour la recherche d'IgM chez le nouveau-né. Un Western blot IgG est considéré indicatif chez un nouveau-né s'il présente au moins une bande absente chez la mère (68).

Nom du réactif	Fournisseur	Antigènes
EUROLINE-WB Treponema pallidum plus cardiolipin IgG	Euroimmun France	15 kDa, 17 kDa, 45 kDa (TnpA) 47 kDa, plus purified cardiolipin
EUROLINE-WB Treponema pallidum plus cardiolipin IgM	Euroimmun France	15 kDa, 17 kDa, 45 kDa (TnpA) 47 kDa, plus purified cardiolipin
Treponema pallidum IgG	Euroimmun France	15 kDa, 17 kDa, 45 kDa (TnpA), 47 kDa
Treponema pallidum IgM	Euroimmun France	15 kDa, 17 kDa, 45 kDa (TnpA), 47 kDa
recomBlot Treponema IgG	MIKROGEN	Tp 47 TnpA Tp 37 Tp 17 Tp 15
recomBlot Treponema IgM	MIKROGEN	Tp 47 TnpA Tp 37 Tp 17 Tp 15

Figure 29 : Western blot syphilis disponibles sur le marché

d) Interprétation biologique

Syphilis primaire

Le chancre apparaît au bout de 10 à 90 jours. La sérologie est souvent négative au moment du chancre (36). Les tests de diagnostic direct (PCR et microscopie à fond noir) sur prélèvement de la lésion sont les examens les plus sensibles. Le FTA, les tests tréponémiques automatisés et la recherche d'IgM se positivent au bout de 5 jours après l'apparition du chancre. TNT et TPHA sont négatifs à ce stade (19).

Le traitement doit être administré d'emblée devant des signes cliniques évocateurs et la présence de facteurs de risques. Un contrôle sérologique sera effectué une à deux semaines après le traitement et permettra de mettre en évidence une séroconversion à posteriori. Parfois la sérologie peut rester négative si le traitement antibiotique est instauré très précocement en phase primaire (36).

Syphilis secondaire

Le TT et le TNT sont franchement positifs à ce stade de la maladie (19). Le diagnostic direct par microscopie à fond noir et la PCR sur des prélèvements des lésions secondaires de la peau permettent un diagnostic de certitude lorsqu'ils sont positifs, mais n'ont d'intérêt que lorsque la sérologie est négative.

Syphilis latente

Dans la plupart des cas TT et TNT sont positifs. Le TNT et le TPHA peuvent se négativer dans les cas de syphilis latente tardive. En revanche, le test tréponémique automatisé reste toujours positif (19).

Aucun test ne permet de différencier une syphilis latente précoce (moins de un an) d'une tardive (plus de un an). Chez les sujets à risque, la prévalence de l'infection est estimée à 0,3%. Dans ce cas la valeur prédictive positive est élevée et l'interprétation est aisée (36).

Chez la femme enceinte, le dépistage est obligatoire lors du premier examen prénatal. La grossesse peut entraîner des faux positifs transitoires pour le TNT. Dans cette population à très faible prévalence de l'infection, la valeur prédictive positive des TT est basse. En cas de positivité, il est donc indispensable de confirmer par un test plus spécifique, comme le western blot avec recherche d'IgG. Si ce test est négatif, un contrôle sur un deuxième sérum

est nécessaire afin d'éliminer une séroconversion. Devant un WB négatif persistant on peut conclure à un faux positif du TT de dépistage (36).

Diagnostic biologique d'une syphilis tertiaire et d'une neurosyphilis

Les anticorps augmentent de nouveau en phase tertiaire, mais le TNT peut dans de rares cas être négatif (69).

Le diagnostic de la neurosyphilis est orienté par l'analyse du LCR. On retrouve :

- une hyperleucocytose, parfois modérée, souvent à prédominance de lymphocytes, mais parfois à monocytes ou à plasmocytes. L'interprétation est très difficile chez les patients VIH+ qui ont souvent des hyperleucocytoses dans le LCR en l'absence de syphilis (19) ;
- une hyperprotéïnorachie, pas toujours retrouvée, plus difficile à interpréter chez le patient VIH ;
- une PCR dans le LCR peut être effectuée, mais sa sensibilité est moyenne (19) ;
- la présence d'anticorps anti-tréponémiques dans le LCR.
 - le TPHA (ou autre test tréponémique) est le plus sensible. En revanche il présente une mauvaise spécificité avec des faux positifs en raison d'un passage passif des anticorps à travers la barrière hémato-encéphalique. Un TPHA positif dans le LCR n'est pas forcément synonyme de neurosyphilis. Il s'agit d'un bon marqueur d'exclusion (36) ;
 - la positivité du test non tréponémique (type VDRL) dans le LCR est considérée par les experts comme synonyme de neurosyphilis. En revanche, la sensibilité de ce test est faible et varie de 27 à 70% selon les études (69).

Au total, sont utiles pour le diagnostic de neurosyphilis (19) :

- VDRL positif dans le LCR ;
- hyperprotéïnorachie (plus difficile à interpréter chez le VIH) ;
- une réaction cellulaire supérieure ou égale à 10 éléments/mm³.

Beaucoup d'index ont été étudiés pour essayer de différencier une synthèse intrathécale d'anticorps d'une diffusion passive à travers la barrière hémato-encéphalique. Pour l'instant aucun n'a fait preuve d'intérêt en pratique pour affirmer un diagnostic de neurosyphilis (36).

Cas particulier du patient VIH positif

Pour la plupart des patients porteurs d'une infection à VIH, les tests sérologiques sont adaptés et précis pour le diagnostic de la syphilis et le suivi de son traitement. En revanche, des résultats atypiques des TT (inhabituellement hauts, bas ou une fluctuation des titres) peuvent avoir lieu en fonction du statut de l'infection à VIH. Lorsque les tests sérologiques ne correspondent pas aux données cliniques évoquant une syphilis précoce, un traitement probabiliste est recommandé chez les personnes présentant des facteurs de risques d'infection syphilitique, et l'utilisation d'autres tests (par exemple la PCR sur biopsie) doit être considérée (32).

Diagnostic biologique d'une transmission mère-enfant de la syphilis

En cas de suspicion de transmission mère-enfant de la syphilis, une PCR doit être effectuée sur les lésions cutané-muqueuses de l'enfant s'il y en a, mais aussi sur le sang de cordon ombilical, le placenta et les sécrétions nasales ou buccales de l'enfant. La positivité de ce test confirme la syphilis congénitale (19).

Une sérologie tréponémique doit être effectuée chez la mère et chez l'enfant : sérologie de dépistage avec TNT et TT chez la mère, et sérologie de dépistage associée à une recherche d'IgM (par ELISA ou Western blot) chez l'enfant. Le LCR de l'enfant doit être prélevé avec TNT, TT, et recherche d'IgM (19).

L'enfant et la mère doivent systématiquement être traités dans les cas suivants (19) :

- TT positif, confirmé par un autre TT et un TNT positif chez la mère en l'absence de traitement bien conduit ;
- TNT de l'enfant supérieur à quatre fois le TNT de la mère ou recherche d'IgM spécifique positive ;
- TNT positif dans le LCR de l'enfant.

Le suivi sérologique du traitement de l'enfant s'effectue à 3, 6 et 12 mois ou jusqu'à ce que tous les tests soient négatifs.

Suivi sérologique du traitement de la syphilis et réinfection

Le suivi sérologique du traitement antibiotique de la syphilis se fait sur le TNT. Le contrôle sérologique a lieu à 3, 6 et 12 mois après le traitement, voire plus régulièrement chez les

patients VIH positifs et chez la femme enceinte. Une négativation peut se voir après traitement d'une syphilis primaire, sinon une diminution du titre de quatre fois (si possible sur sérums testés en parallèle) confirme une guérison (19).

Une augmentation du titre de quatre fois est en faveur d'une nouvelle contamination (36) (19).

Cinétique des anticorps

Les tests biologiques se positivent dans l'ordre suivant (69) (figure 31) :

- 1) FTA IgM, ELISA IgM, WB IgM, TT automatisés Ig totaux : on peut les retrouver dès la phase primaire ;
- 2) TPHA et TPPA : 30 à 40 jours après la contamination ;
- 3) les TNT se positivent généralement après les TT sauf dans quelques cas.

Le titre des anticorps augmente ensuite jusqu'à un titre élevé (>1280-2560 en TPHA) en phase secondaire (après 6 à 18 mois d'évolution).

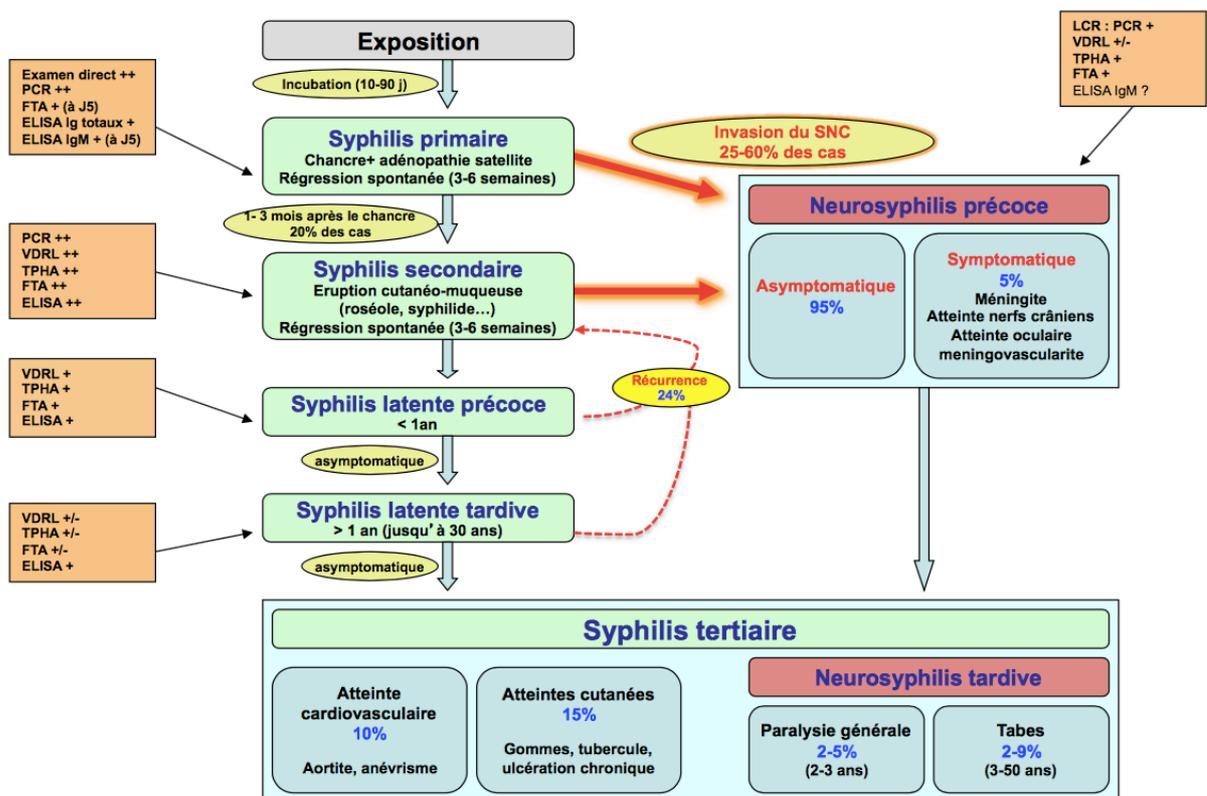


Figure 30 : Histoire naturelle de la syphilis et positivité des tests de diagnostic (19)

C/ Le management de la qualité au laboratoire

a) International Organization for Standardization (ISO)

Les normes internationales sont publiées par l'ISO. Il s'agit d'une organisation internationale non gouvernementale et indépendante. Elle est basée à Genève et est composée de 163 membres représentant d'organisations nationales de normalisation dans leur pays respectifs (un représentant par pays) (70).

Une norme est « un document établi par consensus et approuvé par un organisme reconnu, qui fournit, pour des usages communs et répétés, des règles, des lignes directrices ou des caractéristiques, pour des activités ou leurs résultats garantissant un niveau d'ordre optimal dans un contexte donné » (70).

Une norme ne doit en principe pas être confondue avec un texte législatif. Cependant, certaines normes ont été rendues d'applications obligatoires, c'est le cas de la norme NF EN ISO 15189 : 2012 d'application réglementaire dans les laboratoires de biologie médicale en France.

L'ISO publie différents types de normes :

- normes centrées sur les méthodes d'organisation et de management, sans spécifications techniques : elles permettent une certification par un organisme autorisé. Il s'agit par exemple de la norme ISO 9001 : 2015.
- normes sur les méthodes d'organisation et de management, mais aussi sur les spécifications techniques. Ces normes permettent l'accréditation par un organisme autorisé. Il s'agit par exemple des normes ISO/CEI 17025 et NF EN ISO 15189 : 2012.

b) La norme ISO 9001 : 2015

Il s'agit d'une norme internationale. Elle sert de référence aux entreprises qui souhaitent mettre en place un Système de Management de la Qualité (SMQ) (71).

Le système de management de la qualité est l'organisation mise en place dans une entreprise pour atteindre ses objectifs et augmenter la satisfaction de ses clients. Le système de management de la qualité est construit autour d'acteurs, de processus, de moyens matériels, et il est piloté par la direction de l'entreprise.

Cette norme concerne le management de la qualité dans tous les secteurs industriels et de service (72). La certification des laboratoires selon ISO 9001 : 2015 n'est pas obligatoire en France. La partie 4 relative au management de la norme NF EN ISO 15189 : 2012 est tirée de ce document.

Les grands principes de l'ISO 9001 : 2015 sont les suivants (71) :

- il s'agit d'un cadre général qui doit être adapté à chaque entreprise ;
- l'entreprise identifie elle-même le champ d'action de son SMQ ;
- l'orientation client est fondamentale ;
- la direction doit avoir un rôle moteur au sein du SMQ ;
- l'ensemble des collaborateurs doit être impliqué dans la démarche qualité ;
- l'approche par les processus constitue la base du SMQ ;
- le principe d'amélioration continue gouverne le SMQ ;
- la notion de prévention des risques doit être totalement intégrée à la démarche qualité.

c) La norme ISO/CEI 17025

Il s'agit d'une norme internationale qui spécifie les exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. Elle permet l'accréditation des laboratoires en dehors de la biologie médicale. La partie sur le management du laboratoire est fondée sur la norme ISO 9001. C'est selon cette norme que la partie 5 sur les exigences techniques de la norme ISO 15189 est fondée.

d) La norme NF EN ISO 15189 :2012

Cette norme spécifie les exigences de qualité et de compétence applicables aux laboratoires de biologie médicale. Elle est fondée sur l'ISO/CEI 17025 et sur l'ISO 9001. Elle est composée de cinq chapitres, dont trois chapitres introductifs (1 à 3) et deux chapitres principaux (4 et 5) :

- Chapitre 1 : Domaine d'application ;
- Chapitre 2 : Références normatives ;
- Chapitre 3 : Termes et définitions ;
- Chapitre 4 : Exigences relatives au management ;
- Chapitre 5 : Exigences techniques.

La démarche d'accréditation par le COFRAC des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012 est une obligation réglementaire en France depuis le 16 janvier 2010. Tous les laboratoires de biologie médicale doivent être accrédités sur 100% de leur activité au plus tard le 31 octobre 2020 (73).

Selon l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale ratifiée par la loi n°2013-442 du 30 mai 2013 portant sur la réforme de la biologie médicale, l'accréditation est obligatoire pour :

- les laboratoires de biologie médicale (LBM) ;
- les structures de l'EFS qui assurent la qualification biologique du don pour les activités susceptibles de donner lieu à la réalisation d'examens de biologie médicale ;
- les structures qui réalisent des activités biologiques d'assistance médicale à la procréation ;

Elle n'est pas obligatoire pour les laboratoires d'anatomie et de cytologie pathologique, ni pour les laboratoires de biologie médico-légale.

e) Le Comité Français d'Accréditation (COFRAC)

Le COFRAC est une association loi 1901 créée en 1994. Il reconnaît la compétence des laboratoires d'analyse médicale selon la norme NF EN ISO 15189. Il a été désigné par le décret du 19 décembre 2008 comme étant l'unique instance nationale d'accréditation (73). Le COFRAC est composé de quatre sections :

- Section Laboratoires : composée de quatre pôles : Biologie-Agroalimentaire, Chimie-Environnement, Physique-Mécanique, Bâtiment-Electricité ;
- Section Inspection ;
- Section Certifications ;
- Section Santé Humaine : créée en octobre 2009, elle est essentiellement dédiée à l'accréditation des Laboratoires de Biologie Médicale. Elle se base sur les normes NF EN ISO 15189 et EN ISO 22870 (biologie délocalisée). Cette section s'occupe aussi de l'accréditation des structures d'anatomie et de cytologie pathologiques et des laboratoires de biologie médico-légale. Elle pourrait à terme s'élargir à l'accréditation d'autres domaines médicotechniques comme l'imagerie médicale.

f) Les référentiels COFRAC

Le COFRAC propose une série de documents pour aider le laboratoire à l'application de la norme NF EN ISO 15189. Les documents « SH REF » sont des documents opposables par le COFRAC : leur non application entraîne des écarts. Il s'agit des documents suivants :

- SH REF 02 : Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (74) ;
- SH REF 04 : Recueil des critères complémentaires pour l'évaluation selon la norme NF ISO 15189 ;
- SH REF 05 : Règlement d'accréditation (75) ;
- SH REF 08 : Expression et évaluation des portées d'accréditation (76).

Le document « SH INF 50 : Portées-types d'accréditation » (77) décrit les différents sous domaines, sous familles, portées-types et lignes d'accréditation du domaine de la biologie médicale.

Le document « SH FORM 43 : Vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale » (78) est le document type à compléter pour le dossier de validation d'une méthode analytique.

Le COFRAC propose aussi différents guides techniques d'accréditation. Ce sont des documents destinés à aider le laboratoire dans sa démarche d'assurance qualité. Ils ne constituent en aucun cas des documents opposables, l'absence de suivi de ces documents ne peut pas donner lieu à des écarts :

- SH GTA 01 : Guide technique d'accréditation en biologie médicale (79) ;
- SH GTA 02 : Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des systèmes informatiques en biologie médicale (80) ;
- SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/ validation (portée B) des méthodes de biologie médicale (81) ;
- SH GTA 06 : Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale (82) ;
- SH GTA 14 : Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes en biologie médicale (83).

g) Portée d'accréditation

Le document SH REF 08 (76) présente les différents modes d'expression de la portée d'accréditation des structures et leurs modalités d'évaluation par le COFRAC. Une portée d'accréditation est un « énoncé formel et précis des activités pour lesquelles le laboratoire est accrédité (ou demande l'accréditation) » (76).

Portée flexible standard (A): correspond à une demande d'accréditation du laboratoire souhaitant avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du COFRAC, d'utiliser sous accréditation les révisions successives **de méthodes reconnues** et d'adopter des méthodes reconnues reposant sur des compétences techniques qu'il a précédemment démontrées (76). Toutes les méthodes étudiées dans ce travail sont concernées car elles sont porteuses du marquage CE.

Portée flexible étendue (B): portée correspondant à une demande d'accréditation du laboratoire souhaitant avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du COFRAC, de mettre en œuvre sous accréditation, **des méthodes qu'il a adaptées ou développées**.

Sous-famille: activité à compétence technique cohérente et identifiée par le COFRAC dont les limites sont usuellement reconnues et acceptées par les pairs.

Le document SH INF 50 (77) présente les portées-types recensant les examens classiques de biologie médicale, dans le but de faciliter et d'harmoniser l'expression des portées d'accréditation. Ces portées-types sont définies en application des règles d'expression des portées d'accréditation (76). Le laboratoire doit disposer d'une liste détaillée des examens correspondant à sa portée d'accréditation, qu'il peut rentrer dans le formulaire SH FORM 06 (84) du COFRAC organisé comme l'exemple ci-dessous :

LBMMS HCL N° accréditation		Liste détaillée des examens/analyses couverts par l'accréditation					Référence et Date/Version
Lieu de réalisation des opérations techniques	Domaine	Sous-Famille	Examen / analyse	Nature de l'échantillon biologique	Principe de la méthode	Référence de la méthode	Remarque
IAI, laboratoire GHN	Biologie médicale	Sérologie infectieuse (ISEROBM)	TPHA	Sérum, LCR	Agglutination		/
IAI, laboratoire GHN	Biologie médicale	Sérologie infectieuse (ISEROBM)	RPR	Sérum, LCR	Agglutination		/
IAI, laboratoire GHN	Biologie médicale	Sérologie infectieuse (ISEROBM)	TT automatisé	Sérum	CMIA sur Architect de Abbott		/
IAI, laboratoire GHN	Biologie médicale	Sérologie infectieuse (ISEROBM)	IGM syphilis	Sérum	Immuno-enzymatique, sur Evolis de Biorad		/
IAI, laboratoire GHN	Biologie médicale	Sérologie infectieuse (ISEROBM)	Western blot syphilis IgG et IgM	Sérum	Immunoblot sur Euroblotmaster de Euroimmun		/

Figure 31 : Formulaire SH FORM 06 décrivant la portée d'accréditation (84)

h) L'approche processus

Un processus est « un ensemble d'activités corrélées ou en interaction qui utilisent des éléments d'entrée pour produire un résultat escompté » (85). Il peut être considéré comme une chaîne d'activités à valeur ajoutée ayant un début et une fin entre deux limites (71). Les éléments d'entrée expriment le besoin du client que le processus doit satisfaire.

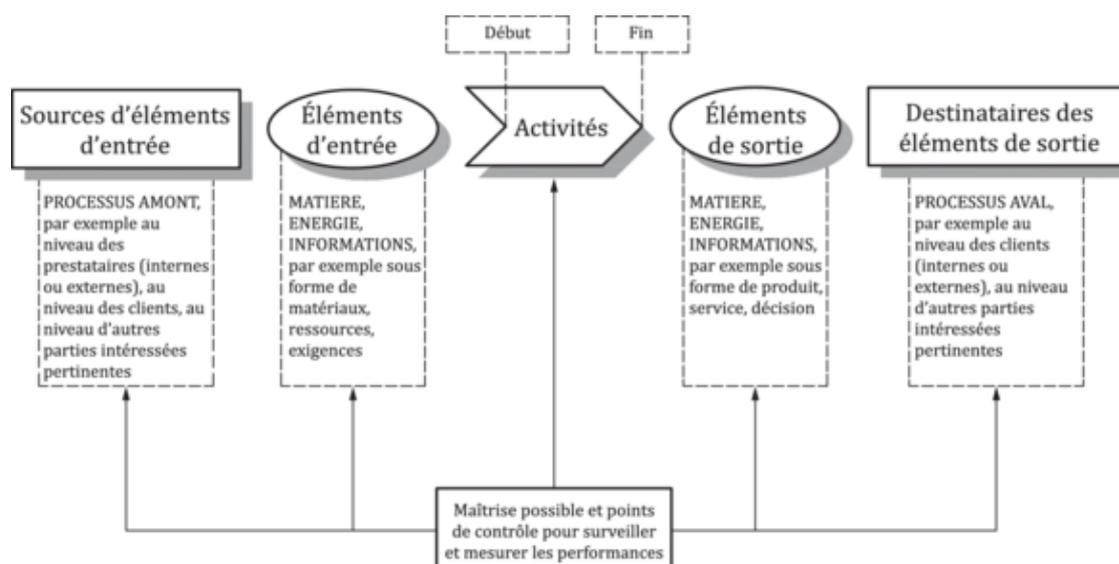


Figure 32 : Représentation schématique des éléments d'un processus d'après la norme ISO 9001(85)

L'approche processus constitue la base du système de Management de la Qualité selon la norme ISO 9001 (85). Elle permet une approche transversale et globale, sans cloisonnement entre les services. Elle permet également d'agir sur un ensemble cohérent d'activités étroitement liées mais qui, dans la pratique, peuvent dépendre de plusieurs départements de l'entreprise (71). Depuis sa révision en 2012, la norme ISO 15189 impose un management par processus au laboratoire :

4.2.1 : « Le système de management de la qualité doit assurer l'intégration de tous les processus nécessaires pour répondre à sa politique et à ses objectifs qualité, ainsi qu'aux besoins et exigences des utilisateurs.

Le laboratoire doit :

- a) Déterminer les processus nécessaires (...)* ;
- b) Déterminer la séquence et l'interaction de ces processus ;*
- c) Déterminer les critères et les méthodes nécessaires pour assurer l'efficacité du fonctionnement et la maîtrise de ces processus ;*
- d) Surveiller et évaluer ces processus ;*
- e) Mettre en œuvre les actions nécessaires pour obtenir les résultats prévus et l'amélioration continue de ces processus » (86).*

On distingue en pratique trois catégories de processus (71) :

- processus métier (ou réalisation) : leur impact est immédiat et direct sur le client. Ils partent du besoin du client pour aboutir à sa satisfaction finale. Exemples : Processus analytique, pré analytique, post analytique...
- processus support (ou processus de soutien) : permettent aux processus métier de se réaliser efficacement, leurs résultats ne sont pas ressentis directement par les clients. Exemples : Achat, logistique, transport, maintenance...
- processus de management (ou processus pilote) : permettent au dirigeant de l'entreprise de contrôler et d'améliorer le système. Ils correspondent aux activités d'organisation et d'amélioration du fonctionnement de l'organisme. Ex : Management de la qualité, direction...

Ces trois types de processus interagissent à partir d'une demande client pour fournir un produit ou service fini qui répond à sa demande.

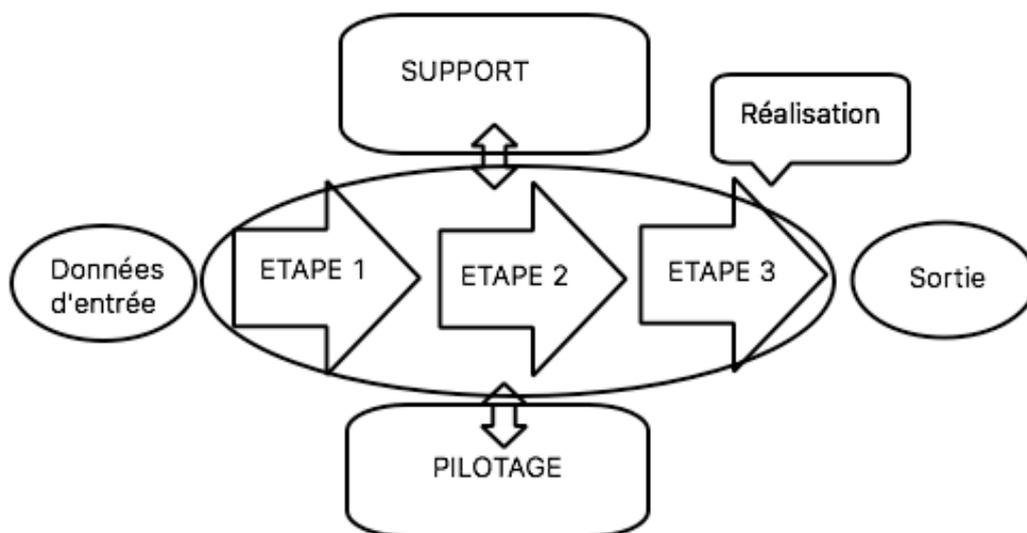


Figure 33 : Interaction des différents types de processus

Un processus doit avoir :

- des objectifs ;
- un responsable (pilote) ;
- des indicateurs de performance permettant l'amélioration continue du processus.

i) Contrôles Internes de Qualité (CIQ) et Evaluation Externes de la Qualité (EEQ)

L'utilisation de contrôles pour garantir la qualité des examens de biologie médicale est une des exigences de la norme NF EN ISO 15189. Elle fait d'ailleurs l'objet de la partie 5.6 « garantie de la qualité des résultats ».

5.6.2.2. « Le laboratoire doit concevoir des procédures de contrôle de qualité permettant de vérifier que la qualité prévue des résultats est bien obtenue » (86).

5.6.2.2. « La laboratoire doit utiliser des matériaux de contrôle de qualité qui se comportent par rapport au système d'analyse de manière à être le plus fidèle possible aux échantillons patients » (86).

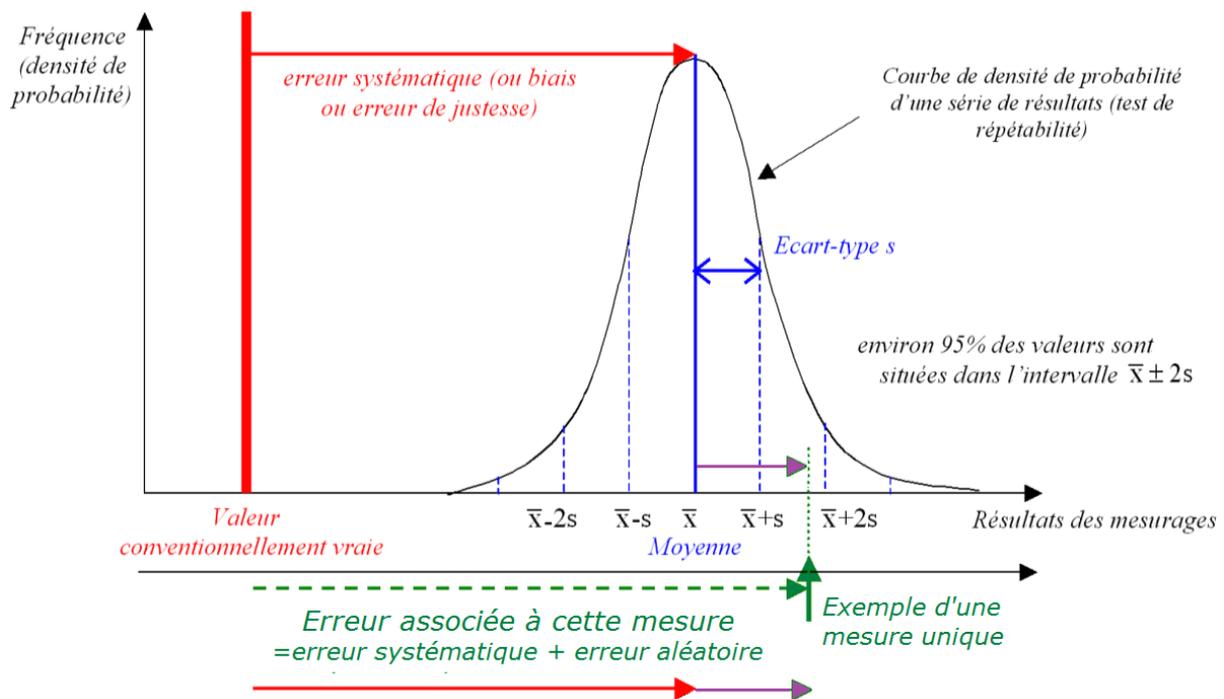


Figure 34 : Différents types d'erreurs possibles pour une valeur donnée

Il existe plusieurs types d'erreur pour le résultat d'un test (figure 35) :

- l'erreur aléatoire : elle correspond à la dispersion de la valeur autour d'une moyenne (en bleu). La valeur peut être surévaluée ou sous-évaluée par rapport à la valeur réelle. Elle est estimée par la répétabilité et la fidélité intermédiaire de la méthode ;
- l'erreur systématique : elle est toujours unidirectionnelle, soit positive, soit négative. Elle peut être estimée par la justesse ou par l'exactitude ;
- l'erreur totale : elle correspond à la somme de l'erreur systématique et de l'erreur aléatoire.

Les CIQ sont réalisés en association avec l'analyse des échantillons de patients. Ils permettent de voir si le système analytique opère correctement en fonction des limites établies lors des essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Ils évaluent l'erreur aléatoire. Ils permettent de contrôler en temps réel le processus analytique et de détecter le plus rapidement possible une déviation de la méthode analytique.

Le SH REF 02 rend obligatoire l'utilisation de Contrôles Internes de Qualité (CIQ) :

5.6.2 : « Le laboratoire doit utiliser régulièrement des contrôles internes de qualité (CIQ) (...). Le laboratoire définit et décrit la notion de série en fonction de son activité et des types

d'examens réalisés. Il met en œuvre des CIQ à plusieurs niveaux de concentration, en début et en fin de série (...). Des seuils d'alarme et d'action sont à définir. En cas de CIQ non conforme, le laboratoire s'attache à évaluer l'impact sur les résultats rendus depuis le précédent CIQ non conforme » (74).

Il existe trois types de CIQ (82) :

- les CIQ de trousse (ou de kit) et contrôles dépendants du fournisseur: ils sont souvent inclus dans la boîte du réactif et sont fabriqués par le même fournisseur que les réactifs. Ils sont mis au point et fabriqués pour l'évaluation spécifique d'un réactif ou d'un appareil ;
- les CIQ indépendants : il s'agit d'un réactif ou échantillon de CIQ mis au point indépendamment de tout réactif ou appareil spécifique et fourni isolément ;
- les CIQ à l'aide de pools d'échantillons biologiques : L'interprétation des pools est basée sur les mêmes règles que les autres types de CIQ. Le laboratoire doit clairement définir dans ce cas les méthodes de fabrication des pools et s'assurer de leur stabilité dans le temps ;
- les CIQ externalisés : ils sont produits par un fournisseur différent de celui des réactifs. Les résultats sont communiqués au fournisseur, ce qui permet de se comparer aux autres abonnés du programme de contrôle et de déterminer la justesse de l'analyse.

5.6.2 : « Les CIQ peuvent faire (...) l'objet d'une comparaison avec les résultats d'autres laboratoires en participant à des programmes de CIQ externalisés. La comparaison de la moyenne obtenue avec la valeur cible permet d'obtenir une approche de la justesse » (74).

L'idéal pour le laboratoire est d'avoir des CIQ de plusieurs origines (Dépendants et indépendants du fournisseur) et non pas seulement des contrôles dépendants du fournisseur (82).

D'après le SH GTA 06, référentiel du COFRAC traitant des contrôles de qualité, le laboratoire doit anticiper les valeurs cibles et les seuils d'interprétation à chaque changement de lot de contrôle. Ces données sont obtenues grâce aux essais probatoires, effectués avant l'utilisation en routine du lot de contrôles. Au cours de ces essais, le nouveau lot est analysé comme un échantillon de patient sur un nombre d'essais suffisant pour obtenir des données

statistiquement interprétables. La moyenne, et les intervalles d'acceptation sont déterminés en fonction des résultats de l'essai (82).

Les EEQ sont des contrôles fournis par un organisme extérieur au laboratoire. Ils permettent d'évaluer l'exactitude de l'analyse en se comparant aux autres laboratoires. Il s'agit d'un contrôle ponctuel. L'utilisation obligatoire de ces contrôles est mentionnée dans la norme NF EN ISO 15189 :

5.6.3.1 : « Le laboratoire doit participer à des programmes de comparaison interlaboratoires (...) appropriés aux analyses et interprétations des résultats d'analyses. Le laboratoire doit (...) participer à la mise en œuvre d'actions correctives lorsque les critères de performances préalablement déterminés ne sont pas satisfaits » (86).

Dans le SH REF 02, il est précisé que :

5.6.3 : « Les LBM participent, dans la mesure où ils existent, à des programmes d'évaluation externe de la qualité pour l'ensemble des examens de biologie médicale qu'ils réalisent (...). Ils participent également au Contrôle national de la qualité (CNQ) organisé par l'ANSM » (74).

Une liste non exhaustive des organisateurs d'évaluation externe de la qualité est publiée dans le document COFRAC SH INF 19 (87).

j) Maîtrise des risques

La norme ISO 31000 : 2009 fournit des principes, un cadre et des lignes directrices pour gérer toutes formes de risques, sans distinction d'activité ou de taille d'organisation (88). Elle est accompagnée de l'IEC 31010 : 2009 (89) qui fournit les lignes directrices permettant de choisir et d'appliquer des techniques d'évaluation des risques. La notion de gestion des risques apparaît aussi dans la version 2012 de la norme NF EN ISO 15189 :

*4.14.6 « : Le laboratoire doit évaluer l'impact des processus de travail et défaillances potentielles sur la sécurité des résultats des examens et doit modifier les processus pour réduire ou éliminer les **risques** identifiés, et documenter les décisions et actions à mener » (86).*

SH REF 02 4.14.6 : « Le laboratoire identifie les phases critiques des sous processus pré-analytiques, analytiques et post analytiques pour la fiabilité de ses résultats et la permanence

de son activité. Pour chaque phase y compris les activités « support » (...) il identifie les risques potentiels et les moyens d'en assurer la maîtrise » (74).

L'analyse de risque identifie les menaces et prend en compte trois composantes du risque : la gravité, la fréquence et la détectabilité. Le but est d'évaluer sa criticité afin de permettre sa hiérarchisation, et de mettre en place un traitement des risques jugés critiques et un suivi sous forme de plans d'actions. Ces plans d'actions sont ensuite suivis lors de revues de processus.

Deux stratégies peuvent être mises en place pour identifier les risques :

- la méthode ascendante : à partir de non conformités ou des réclamations, on identifie les menaces et leur causes ;
- la méthode descendante : il s'agit d'un processus de veille : on identifie d'abord les menaces pour diminuer leur risque avant que cela se produise.

D/ Le dossier de vérification/validation de méthode

a) Introduction

Une obligation normative

Le dossier de validation/vérification de méthode permet de vérifier les performances d'une analyse dans les conditions du laboratoire avant son utilisation en routine. Cette démarche permet aussi de calculer l'incertitude de mesure des analyses quantitatives ou semi-quantitatives. Le calcul de l'incertitude est basé sur l'étude et la maîtrise des risques, la justesse, l'exactitude et la reproductibilité de chaque analyse.

L'élaboration d'un dossier de vérification/validation de méthode est une obligation pour répondre à la norme NF EN ISO 15189 :

5.3.1.2 : « Le laboratoire doit vérifier, lors de l'installation et avant utilisation, que le matériel est capable d'atteindre la performance nécessaire et qu'il est conforme aux exigences relatives aux examens concernés » (86).

5.5.1.2 : « Les procédures d'examen validées utilisées sans modification doivent faire l'objet d'une vérification indépendante par le laboratoire avant d'être utilisées régulièrement » (86)

Cette exigence est formulée dans le document imposable SH REF 02 « Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale » :

5.5.1.1 « Chaque examen réalisé par méthode quantitative ou qualitative doit être vérifié/validé » (74).

5.5.1.2 « Dans le cas d'utilisation de méthodes reconnues (...) la validation des méthodes utilisées est réduite à une « vérification sur site » (...) Le laboratoire peut dans ce cas revendiquer une portée flexible standard de type A » (74).

Le marquage CE consiste en une auto-certification du fournisseur qui permet à la méthode d'être reconnue mais qui n'est vérifiée par aucun organisme indépendant. Cette démarche de vérification permet donc au laboratoire de garantir la qualité de ses examens. Comme les cinq méthodes étudiées dans ce travail sont toutes dotées d'un marquage CE, nous avons mis en place une vérification en portée flexible standard de type A et non pas une validation de méthode. Nous avons utilisé les réactifs dans les conditions recommandées par le fournisseur.

Le SH GTA 04 : « Guide Technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale » (81) est l'aide à la lecture de la norme. Un formulaire, le SH FORM 43 (78) est proposé comme modèle à remplir pour la validation ou la vérification d'une méthode d'analyse. Son utilisation n'est pas obligatoire.

Problématiques du dossier de vérification de méthode en sérologie infectieuse

Pour les analyses biochimiques quantitatives, le criblage de la population générale montre une distribution gaussienne. Pour les analyses de sérologie infectieuse, la distribution des résultats est différente. Seuls les Ac anti-HBs, les IgG anti rubéoleux, les IgG anti-*Toxoplasma gondii*, les anticorps anti-tétanos et anti-diphtérie sont titrés par rapport à un échantillon international. Les autres analyses de sérologie automatisées rendent une valeur chiffrée (ratio, unité arbitraire ou index) qui définit un résultat qualitatif (négatif, positif, douteux) : il s'agit d'analyses semi-quantitatives (90). Concernant les techniques manuelles telles que le RPR ou le TPHA, l'analyse est qualitative. Le résultat chiffré sous forme de titre est le résultat d'une suite d'analyses qualitatives réalisées à différentes dilutions. La dernière dilution donnant une réaction positive est interprétée comme le titre d'anticorps présent dans le sérum.

L'objectif de notre travail initial a été de déterminer la liste d'essais nécessaires à une vérification pertinente de ces méthodes. D'après le SH GTA 04 :

9.6.2 : « Dans le cadre d'une technique qualitative, la vérification expérimentale sur site est plus réduite, et s'appuie fortement sur des études de risques (méthode des 5M), sur

l'habilitation des opérateurs, ou sur l'étude des performances des Evaluations Externes de la Qualité » (81).

b) Etude de la répétabilité

D'après le document COFRAC SH GTA 04 :

9.6.1.1 : « L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactif, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour l'analyse concernée. L'évaluation de la répétabilité est indispensable lors de l'installation d'un nouvel analyseur afin de connaître les performances initiales » (81).

Ce travail est demandé dans le SH GTA 04 pour les analyses quantitatives, le calcul doit être répété pour chacune des matrices d'échantillon pouvant être amenés à être testés en routine, en utilisant des échantillons biologiques ou des contrôles de qualité interne. Plusieurs niveaux de concentration doivent être testés pour un même analyseur.

En pratique, il est recommandé d'utiliser au minimum deux niveaux de concentration, avec si possible un niveau proche du seuil décisionnel. D'après le SH GTA 04, le nombre d'essais à effectuer dépend de la cadence de l'analyseur à vérifier en tenant compte du coût des réactifs. Le nombre d'essais minimum requis est de 30 pour permettre une interprétation statistiquement recevable. Un nombre d'essais inférieur devra être argumenté.

c) Etude de la fidélité intermédiaire (ou reproductibilité intra-laboratoire)

D'après le document COFRAC SH GTA 04 :

9.6.1.2 : « L'essai de fidélité intermédiaire consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages... Il permet de paramétrer les critères d'acceptation des antériorités en combinaison avec les variations biologiques notamment dans le cas de systèmes d'aide à la décision » (81).

Elle est classiquement calculée à partir des résultats des CIQ. Elle est généralement établie au cours d'une à deux séries par jour, sur au moins 15 jours avec 30 déterminations à deux

niveaux au minimum. Un nombre inférieur d'essais doit être justifié de manière pertinente. Sa mise en œuvre n'a aucun intérêt pour les méthodes qualitatives.

Des résultats obtenus équivalents pour la fidélité intermédiaire et la répétabilité illustrent la robustesse de la méthode.

d) Variabilité inter-opérateur

D'après le document COFRAC SH GTA 04 :

9.6.2.1: « La variabilité inter-opérateur constitue un indicateur de la maîtrise de la réalisation des méthodes non automatisées. Un moyen d'assurer cette maîtrise repose sur la vérification de la compétence des opérateurs (habilitation) et de son maintien. Des critères objectifs pourront être établis, par exemple, par l'intermédiaire d'une analyse de la robustesse » (81).

e) Etude de la justesse

D'après le document COFRAC SH GTA 04 :

9.6.1.3 : « La justesse est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence (...) Une approche de la justesse peut être envisagée en comparant la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible, assimilée à la « valeur vraie ». L'écart observé correspond au biais. Le biais peut être obtenu avec (...) des valeurs observées dans des programmes de contrôle interne couplés à une comparaison inter-laboratoire (externalisation des CIQ)» (81).

f) Exactitude de mesure

D'après le document COFRAC SH GTA 04 :

9.6.1.4 : « L'exactitude est définie comme l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande (...) A ce jour, les laboratoires évaluent l'exactitude à partir de résultats des Evaluations Externes de la Qualité » (81).

En pratique, il s'agit de la comparaison du résultat d'un seul dosage d'un échantillon inconnu à la valeur cible obtenue par l'ensemble des participants au programme ou seulement le groupe de pairs (utilisateurs de la même technique).

g) Etude de l'incertitude de mesure

D'après la norme ISO 15189 :

5.5.1.4 : « Le laboratoire doit déterminer l'incertitude de mesure de chaque procédure de mesure dans la phase analytique utilisée pour consigner les grandeurs mesurées sur les échantillons des patients (...) et régulièrement examiner les estimations d'incertitude de mesure » (86).

Pour les analyses quantitatives, on utilise le guide SH GTA 14 (83) sur les incertitudes de mesures pour les calculer. L'incertitude est un paramètre qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande, à partir des informations utilisées (83). Il s'agit d'un outil d'aide à la décision et à l'interprétation biologique, notamment dans les situations où le biologiste ou le clinicien est amené à comparer un résultat à une antériorité ou à un seuil.

Le calcul de l'incertitude est utile en sérologie infectieuse car il permet de déterminer la zone grise d'incertitude décisionnelle autour du seuil de positivité pour les appareils rendant un résultat chiffré.

h) Etude de l'étendue de mesure

D'après le document COFRAC SH GTA 04 :

9.6.1.7 : « L'étendue de mesure comprend la limite de détection, la limite de quantification et la limite supérieure de linéarité » (81).

i) Comparaison de méthodes

D'après la norme ISO 15189 :

5.6.4 : « Il doit exister un moyen défini permettant de comparer les procédures, équipements et méthodes utilisés et d'établir la comparabilité des résultats des échantillons de patients dans les intervalles cliniques appropriés pour des procédures et/ou équipements identiques et/ou des sites différents » (86).

D'après le SF REF 02 :

5.6.4 : « Le laboratoire doit s'assurer de la comparabilité des résultats obtenus pour l'ensemble des systèmes analytiques utilisés pour un même examen (...) ainsi que pour les analyseurs multi-modules » (74).

En pratique, cette comparaison de méthodes doit avoir lieu lors de la validation initiale, et de façon continue sur les appareils en miroir, ou lors d'un changement de technique pour vérifier que les résultats de patient ne sont pas impactés.

j) Contamination

D'après le document SH GTA 04 :

9.6.1.9 : « Une étude de contamination inter-échantillon est à effectuer pour tous les systèmes automatisés (...) Le phénomène de contamination inter-réactif peut se produire sur un analyseur lorsque le système de distribution est commun à tous les réactifs » (81).

k) Robustesse et fiabilité des réactifs

D'après le document SH GTA 04 :

10.11 : « L'évaluation de la robustesse n'est indispensable que pour les tests développés en interne » (81).

Ce type d'essai concerne uniquement les méthodes accréditées en portée B.

II/ Travail personnel

A/ Objectifs

La restructuration de la biologie des Hospices Civils de Lyon (HCL) a abouti à la création de l'Institut des Agents Infectieux (IAI) qui regroupe depuis 2017 l'ensemble des activités de Bactériologie, Virologie et Parasitologie-Mycologie des HCL sur le Centre de Biologie et de Pathologie Nord (CBPN). L'ensemble de ce travail a été effectué au sein du plateau de sérologie infectieuse de l'IAI récemment réorganisé. Les techniciens issus des différents laboratoires ont dû se former aux différentes techniques des trois disciplines. La validation des résultats demeure sous la responsabilité des biologistes ou internes habilités de chaque discipline.

Actuellement, le laboratoire analyse environ 22 000 échantillons par an pour la sérologie syphilitique. Parmi ces dépistages, environ 10% sont positifs et nécessitent des examens complémentaires.

L'objectif de ce travail a été de constituer l'ensemble des dossiers de vérification des méthodes employées pour le sérodiagnostic de la syphilis dans le but de présenter l'ensemble de ces examens à une accréditation COFRAC. Le travail initial a consisté en l'identification des activités à risques étape par étape, de la phase pré-analytique à la phase post-analytique. Pour la phase analytique, le prérequis indispensable a été une bonne connaissance de chacune des techniques employées et du fonctionnement des automates dans leur environnement.

B/ Tests sérologiques de diagnostic de la syphilis

a) Méthodes utilisées pour la sérologie syphilitique

CMIA TP sur Architect

L'Architect i1000 est un automate d'immunoanalyse commercialisé par la société Abbott®. C'est un appareil fermé à flux continu. Sa cadence est de 100 tests/heure. Il se compose de trois éléments principaux :

- un module d'analyse d'immunologie sous forme d'une couronne réactionnelle thermostatée à 37°C ;
- un passeur d'échantillons et de réactifs. Ceux-ci peuvent être chargés en continu ;
- un centre de contrôle informatique qui contrôle le fonctionnement du passeur d'échantillons et du module d'analyses. Il est relié au « middleware » Pgp®, lui-même relié au Système Informatique du Laboratoire (SIL) GLIMS®. L'utilisation d'un mot de passe obligatoire pour la connexion au logiciel permet de simplifier la traçabilité de l'opérateur ;
- un bras unique est utilisé pour pipeter les échantillons, réactifs et contrôles. Il subit un lavage entre chaque prélèvement, mais peut être à l'origine d'éventuelles contaminations inter-réactifs ou inter-échantillons.

Le réactif Syphilis TP (fiche technique en annexe 1) met en jeu une réaction immunologique en deux temps pour la détection qualitative des anticorps anti-*Treponema pallidum* dans les sérums ou plasma humain. La technologie CMIA (Chemiluminescent Microparticle ImmunoAssay) est ainsi utilisée. Il s'agit d'une forme modifiée et améliorée de l'ELISA :

- dans une première étape, le sérum du patient est mis en contact avec des microparticules fixées à des antigènes recombinants de syphilis (TpN15, TpN17, TpN47). Les anticorps anti-*Treponema pallidum* présents dans l'échantillon se fixent aux antigènes associés aux microparticules ;
- après un lavage, on ajoute le conjugué : une antiglobuline humaine anti IgG et IgM liée à l'acridinium. Le conjugué se fixe aux couples antigène-anticorps du patient formés ;
- après une nouvelle étape de lavage, on ajoute les réactifs révélateurs des couples antigènes anticorps. L'acridinium démarre une réaction oxydative quand il est exposé à ces réactifs. Cette réaction entraîne des émissions lumineuses (chimiluminescence) .

La réaction de chimiluminescence est mesurée en unités de lumière relatives (RLU). Une relation directe existe entre la quantité d'anticorps anti- *Treponema pallidum* dans l'échantillon et les RLU détectées par le système optique de l'appareil. Le signal lumineux obtenu lors de la réaction avec le sérum à analyser est comparé à la valeur seuil déterminée par une calibration préalable. Si le signal de l'échantillon est plus élevé ou équivalent au signal « seuil de positivité », l'échantillon est considéré comme positif.

ELISA IgM sur Evolis

L'Evolis est un appareil permettant une gestion automatisée des dosages immunoenzymatiques en microplaques. Il s'agit d'un appareil ouvert commercialisé par la société Biorad ®. Il est constitué de différents modules (figure 35) :

1. Bras du pipeteur
2. Plaques d'embouts de prélèvement 300 µl et 1100 µl
3. Module plaques prédilution et/ou sérothèque en plaque ou microtubes en plaque
4. Bouteilles solutions de lavage
5. Station de lavage
6. Lecteur
7. Incubateurs
8. Module microplaques en distribution
9. Module portoirs échantillons et réactifs

10. Transporteur et chargement des microplaques

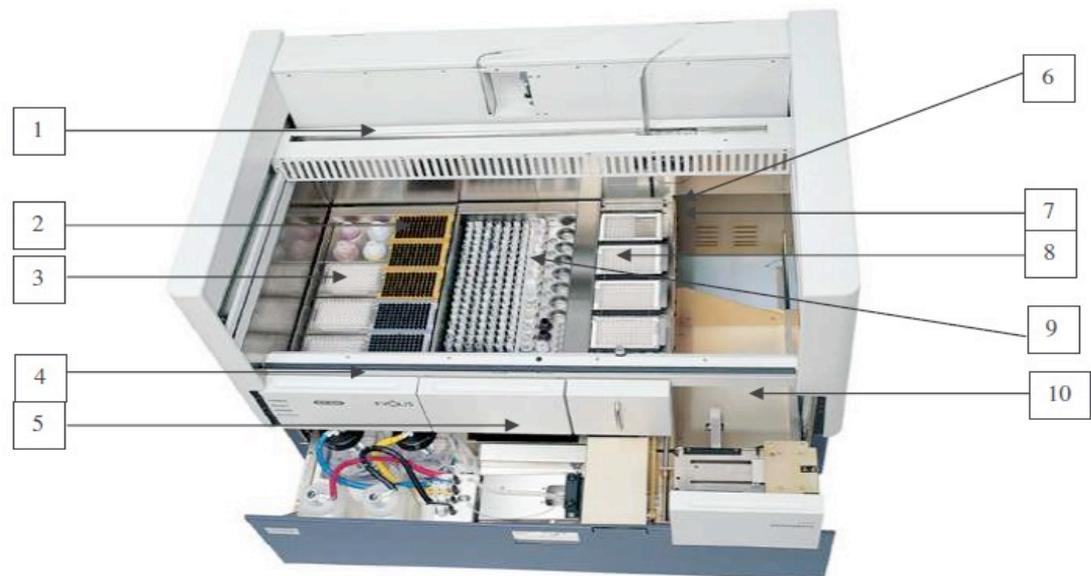


Figure 35 : Schéma des principaux modules de l'Evolis

Il permet de traiter simultanément quatre microplaques. Les échantillons, réactifs et microplaques peuvent être chargés en continu. Cet appareil est relié au logiciel Middleware PgP, lui-même relié au SIL GLIMS, ce qui limite les erreurs de recopiage manuel des résultats. L'automate utilise des embouts à usage unique avec détection des caillots pour les réactifs et les échantillons. Le risque de contamination inter-échantillon ou inter-réactif est écarté. La présence d'un mot de passe obligatoire pour l'utilisation du logiciel permet de simplifier la traçabilité de l'opérateur ayant effectué l'analyse.

Le kit CAPTIA NMT Syphilis IgM commercialisé par la société Trinity Biotech® (fiche technique en annexe 4) est utilisé pour cette analyse. Il s'agit d'un test ELISA utilisable en manuel ou adaptable sur des automates de microplaques. La technique a été programmée sur l'automate Evolis avec l'aide des ingénieurs d'application des deux sociétés. La société Trinity Biotech® doit fournir un certificat de validation de méthode sur le système Biorad® pour que l'examen soit considéré en portée A. Le déroulement de l'analyse est le suivant :

- les microplaques utilisées sont recouvertes d'anticorps anti-IgM humains. Dans un premier temps, on incube le sérum du patient dans les puits. Les IgM spécifiques anti-*Treponema pallidum* se fixent au support, ainsi que tous les autres types d'IgM du patient ;
- après un lavage, on ajoute des antigènes tréponémiques conjugués à une peroxydase.

Ceux-ci se fixent spécifiquement aux IgM spécifiques anti-*Treponema pallidum* fixés sur le support ;

- après un lavage, le substrat/chromogène est ajouté à la réaction. La présence de complexes immuns IgM-antigène tréponémique conjugué à la peroxydase est révélée par un changement de couleur du chromogène ;
- l'absorbance optique de chaque puits est lue à la longueur d'onde de 550 nm, et la valeur obtenue est comparée aux contrôles pour déterminer la présence ou l'absence des IgM anti- *Treponema pallidum*.

RPR

Le RPR est un test non tréponémique manuel utilisé pour la détection qualitative et semi quantitative des réagines dans des échantillons de sérum ou de plasma. Le laboratoire utilise le kit IMMUTREP RPR de la société Omega DIAGNOSTICS® (fiche technique en annexe 3).

Cette méthode est une variante du VDRL. Elle utilise des particules de charbon pour faciliter la lecture visuelle du résultat (figure 36). Lorsque les anticorps anti-tréponémiques du patient se lient au cardiolipide du réactif, le résultat est lu macroscopiquement sous la forme d'agglutinats noirs.

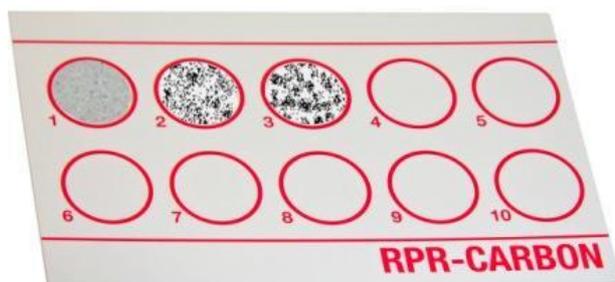


Figure 36 : Exemples de réactions RPR positives

TPHA

Il s'agit d'un test tréponémique manuel. Le laboratoire utilise le kit IMMUTREP TPHA de la société Omega DIAGNOSTICS® (fiche technique en annexe 2).

Cette technique met en contact des hématies associées à des antigènes de tréponème avec le sérum du patient. Lorsque le sérum du patient est positif, une agglutination a lieu. Les cellules forment un anneau caractéristique au fond de la cupule (figure 37). En absence d'anticorps dans le sérum du patient, les cellules forment un bouton compact au fond de la cupule.



Figure 37 : Exemples de TPHA positifs à plusieurs dilutions

Western Blot

Le laboratoire utilise les coffrets Anti-*Treponema pallidum* EUROLINE Western Blot IgG et IgM d'EUROIMMUN® (fiches techniques en annexes 5 et 6). Il s'agit de bandelettes de nitrocellulose présentant des bandes de différents antigènes tréponémiques préalablement séparés par électrophorèse.

- dans une première étape, les bandelettes sont incubées avec les échantillons de patients dilués. Dans le cas de sérums positifs, les anticorps spécifiques se lient aux différents antigènes fixés sur la bandelette (figure 38) ;
- après un lavage, une seconde incubation est effectuée en utilisant une antiglobuline humaine (anti-IgM ou anti-IgG selon le test) conjuguée à une enzyme (phosphatase alcaline) qui catalyse une réaction colorée : des bandes apparaissent au niveau des antigènes contre lesquels les anticorps du patient se sont fixés ;
- la réaction est finalement stoppée en utilisant de l'eau distillée.

47 kDa	Protéine membranaire TpN47, spécifique
45 kDa	tmpA, spécifique
17 kDa	Protéine membranaire TpN17, spécifique
15 kDa	Protéine membranaire TpN15, spécifique

Figure 38 : Liste des antigènes présents sur les bandelettes Anti-*Treponema pallidum* EUROLINE Western Blot IgG et IgM

L'interprétation des résultats se fait suivant le tableau ci-dessous :

	<u>IgG</u>	<u>IgM</u>
Négatif	Aucune bande	Aucune bande
Douteux	Présence d'une bande distincte en p15, p17, p45 ou p47	Présence d'une bande faible en p15, p17, p45 ou p47
Positif	Présence de 2 bandes bien distinctes en p15, p17, p45 ou p47	Présence d'au moins 1 bande bien distincte en p15, p17, p45 ou p47

Figure 39 : Interprétation des Anti-Treponema pallidum EUROLINE Western Blot IgG et IgM

Ces tests sont programmés sur l'automate à immunoblots EUROBlotMaster de la société EUROIMMUN® (fiche technique en annexe 7). Il peut réaliser 30 tests simultanément. Les échantillons sont disposés à la main dans chaque puits, limitant le risque de contamination entre bandelettes. L'appareil effectue automatiquement les étapes de lavage et d'incubation.

Les bandelettes sont lues une première fois grâce à un scanner de bureau par le logiciel EUROLinScan d'EUROIMMUN®. Ce programme permet d'identifier les bandes et de mesurer leur intensité. Une deuxième lecture visuelle permet de vérifier l'absence de bandes artéfactuelles détectées par le scanner. La technique est validée par la présence d'une bande de contrôle présente sur la bandelette. L'interprétation du Western blot se fait automatiquement en fonction du nombre, de la nature des bandes et de leur intensité. Par contre il n'y a pas de liaison informatique entre ce lecteur et le SIL imposant une saisie manuelle des résultats dans GLIMS.

Système informatique

GLIMS est un Système d'Information de Laboratoire (SIL) commercialisé par la société belge MIPS. Il est utilisé dans le cadre de la sérologie syphilis pour l'enregistrement des analyses prescrites, la saisie manuelle des résultats, la communication avec les analyseurs (par le biais du middleware PgP), la validation biologique des résultats et leur communication dans les services via le logiciel Easily.

PgP's Lab Production Manager est un « Middleware » commercialisé par la société Data Innovations. Il permet de faire le lien entre les logiciels internes des analyseurs et GLIMS. La

vérification technique avant envoi sur le SIL ainsi que la vérification des contrôles a lieu sur ce logiciel.

Kalilab est un logiciel de management de la qualité, commercialisé par la société Strasbourgeoise Netika. Il a été conçu en conformité avec les exigences des normes ISO 15189 et ISO 9001. Il est utilisé au Laboratoire de Biologie Multi-Site (LBMMS) des HCL pour la gestion des équipements, de la documentation, des Non Conformités et du personnel (habilitations).

Easily est un Système d'informatisation des hôpitaux commercialisé par la société Alma solutions santé. Il s'agit du serveur de résultats qui permet aux services cliniques de consulter les résultats biologiques.

b) Stratégie diagnostique

Dépistage

La nomenclature impose l'association d'un test tréponémique est d'un test non tréponémique. Le laboratoire utilise en dépistage l'association du test Syphilis TP par CMIA sur Architect et un test non tréponémique RPR Omega diagnostics (figure 40).

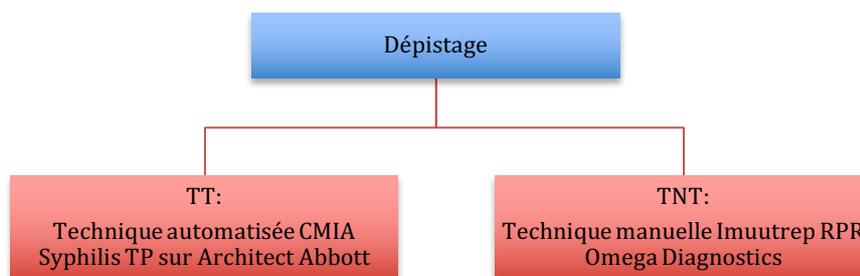


Figure 40 : Algorithme de dépistage de la syphilis à l'IAI (TT= Test tréponémique, TNT= Test non tréponémique)

Interprétation (figure 41)

En cas de dépistage négatif la sérologie syphilis est rendue négative. En cas de dépistage positif, les analyses sont poursuivies par des titrages d'après les consignes suivantes (figure 41) :

Criblage	Conduite à tenir
TT CMIA - et RPR-	Résultat négatif - Pas d'ajout d'analyses
TT CMIA + et RPR+	Ajout titrage RPR et TPHA
TT CMIA - et RPR+	Ajout titrage RPR
TT CMIA + et RPR-	Ajout titrage TPHA et RPR (recherche d'un phénomène de zone)

Figure 41 : Conduite à tenir en cas de dépistage syphilis positif à l'IAI

Des analyses complémentaires peuvent être ajoutées d'après les consignes suivantes :

Résultat	Conduite à tenir
TT CMIA + et RPR +/-	<ul style="list-style-type: none"> Femme enceinte Nouveau-né → Ajout du dosage IgM et Western blot
TT CMIA -/RPR+/TPHA -	<ul style="list-style-type: none"> RPR ≤ 4 : Faux Positif probable RPR ≥ 4 : suspicion syphilis primaire → Ajout du dosage IgM et Western blot
TT CMIA +/RPR -/TPHA -	<ul style="list-style-type: none"> TT CMIA proche du seuil de positivité et contexte peu probable de syphilis (patients transplantés, procréation médicale assistée...) → Ajout du dosage IgM et Western Blot

Figure 42 : Conduite à tenir en fonction des résultats obtenus pour les titrages du TPHA et du RPR

C/ Processus de réalisation de la sérologie syphilis

La représentation graphique du processus permet d'avoir une synthèse de toutes les étapes de l'analyse (figure 43) :

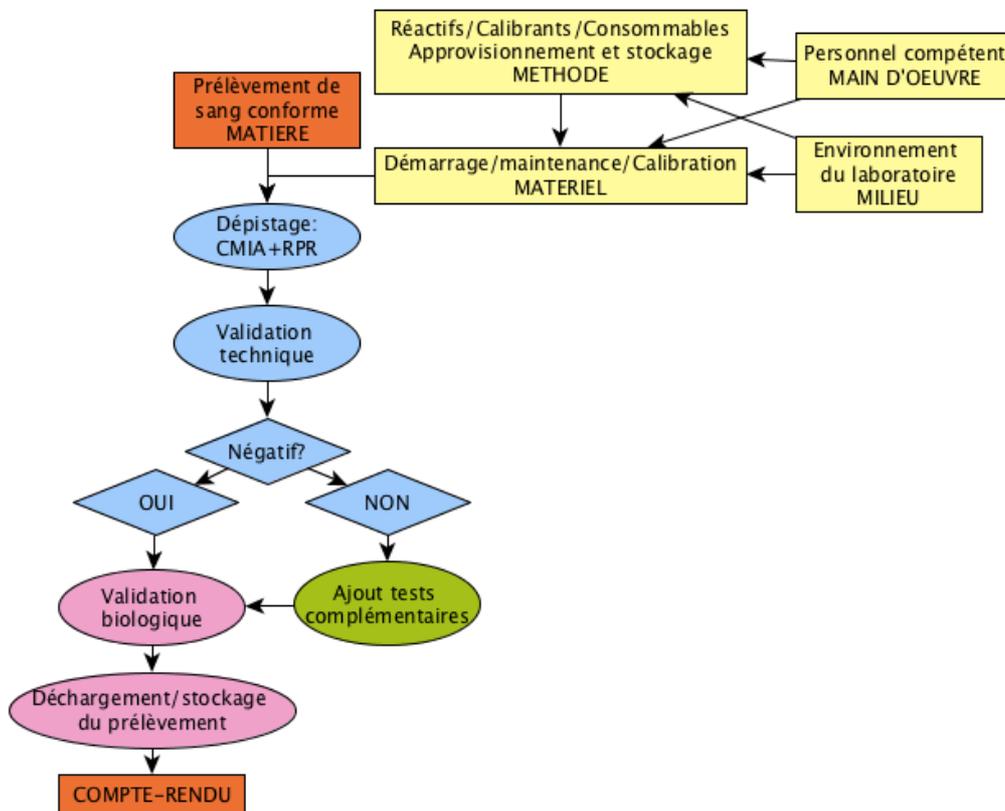


Figure 43 : Cartographie du processus de sérologie de la syphilis

- la donnée d'entrée est le prélèvement de sang conforme ;
- la donnée de sortie est le compte-rendu de l'analyse ;
- le processus support est représenté par les carrés jaunes, qui correspondent aux 5 M (Matériel, Main d'œuvre, Matière, Méthode, Milieu) ;
 - Main d'œuvre : ressources humaines : techniciens habilités ;
 - Matière : qualité du prélèvement : les critères d'acceptation des prélèvements sont définis dans les procédures d'analyse et méthodes de prélèvement détaillés dans le catalogue des examens de laboratoire disponible sur l'intranet ;
 - Matériel : service achats, pipettes, système informatique, automate Architect, automate Evolis ;

- Milieu : locaux du plateau de sérologie infectieuse ;
- Méthodes : procédures revues lors de ce travail d'accréditation et enregistrées dans Kalilab.

Le processus pilotage comprend :

- la définition de l'organisation du plateau de sérologie infectieuse ;
- la surveillance et l'amélioration des performances.

a) Gestion des Contrôles de qualité internes (CIQ) et Externes (EEQ)

Les cinq analyses concernées par ce travail sont toutes réalisées en séries.

Différents types de contrôles internes de qualité sont utilisés :

- des CIQ de kit (contrôle fournisseur) :
 - RPR et TPHA : le contrôle positif du kit est passé et titré à chaque série ;
 - test tréponémique par CMIA : Les contrôles (niveau bas et haut) du fournisseur sont passés à chaque série.
- des CIQ externalisés : l'Accurun 2 multiparamétrique de la société Ingen ® permet de contrôler la performance analytique de la technique CMIA en la comparant à un groupe de pairs (utilisateurs de la même technique). Il est passé chaque série.

Concernant les contrôles de qualité externes de sérologie syphilis, le laboratoire est abonné à deux programmes d'évaluation externe de la qualité :

- le programme ProBioQual (six sérums par an) ;
- le programme du CTCB (trois sérums par an).

b) Maîtrise des risques

Afin d'identifier les risques liés au processus de réalisation de la sérologie syphilis, nous avons appliqué la procédure du LBMMS de gestion des risques intitulée « LBMMS-Gestion des risques : Méthodologie d'analyse de risques ». L'analyse de risques a été réalisée en présence de différents acteurs du plateau de sérologie infectieuse : ouvriers professionnels (OP), techniciens, cadres, biologistes, issus des trois disciplines de sérologie infectieuse (virologie, parasitologie-mycologie, bactériologie). Nous avons utilisé une méthode reconnue : l'AMDEC, afin d'analyser les risques.

Mode de défaillance potentielle	Effets potentiels	Occurrence O	Gravité G	Défectabilité D	Causes possibles	Plan de surveillance	Criticité C
Qu'est-ce qui pourrait aller mal ?	Quels pourraient être les effets ?	Quelle est la probabilité relative d'apparition des causes ?	Quelle est la gravité relative des effets ?	Quelle est l'efficacité des contrôles ?	Quelles pourraient être les causes ?	Comment faire pour voir ça ?	Quelle est la priorité des points listés ?

Figure 44 : Les questions génériques de l'AMDEC (91)

Pour identifier les modes de défaillances, l'utilisation de la méthode des 5 M a été utilisée. Elle permet de classer les risques comme vu précédemment en cinq catégories : Matériel, Méthodes, Milieu, Main d'œuvre, Matière première.

Pour analyser les risques identifiés nous les avons pondérés selon trois critères :

- l'occurrence (fréquence) : celle-ci a été mesurée grâce au tableau ci-dessous. Nous avons utilisé une évaluation à priori (basée sur une appréciation subjective consensuelle des participants) ainsi qu'une étude des non conformités existantes pour déterminer la fréquence ;

1	Très peu fréquent	Le risque n'est jamais survenu dans les 2 dernières années (non-conformité non enregistrée à ce jour)
2	Occasionnel	Le risque est survenu au moins une fois au cours des 2 dernières années
3	Fréquent	Le risque peut survenir une fois par mois
4	Très fréquent	Le risque peut survenir une fois par semaine

Figure 45 : Critères d'estimation de l'occurrence d'un risque

- la gravité : celle-ci a été évaluée selon l'échelle d'impact du tableau ci-dessous (figure 46). La procédure de gestion des risques du LBMMS impose une évaluation sur au moins une des quatre thématiques. Si l'évaluation est faite sur plusieurs thématiques, la gravité la plus forte est prise en compte dans l'analyse de risque : au cours de nos travaux, la thématique « fiabilité des résultats » a été principalement retenue.

	Fiabilité des résultats des examens	Prise en charge du patient	Satisfaction des clients du processus	Fonctionnement du processus
1	Pas d'impact sur les résultats	Pas d'impact sur la prise en charge	Pas d'impact sur la satisfaction du client du processus	Pas d'impact sur le fonctionnement du processus
2	Défaut de précision des résultats	Retard de prise en charge du patient (transmission hors délai)	Impact sur la satisfaction d'une exigence non formellement identifiée	Identification d'une action d'amélioration
3	Résultat erroné n'entraînant pas d'erreur d'interprétation	Défaut de prise en charge du patient sans engagement du pronostic vital	Enregistrement d'une non-conformité pour un client interne ou d'une réclamation pour un client externe	Atteinte du seuil d'alerte de l'indicateur de surveillance (dysfonctionnement)
4	Résultat erroné entraînant une erreur d'interprétation	Défaut de prise en charge du patient avec engagement du pronostic vital	Nécessite une médiation au niveau de la direction (en interne) Rupture du contrat (externe)	L'élément de sortie du processus ne peut pas être fourni

Figure 46 : Critères d'estimation de la gravité d'un risque

- la déteçtabilité : celle-ci a été évaluée selon l'échelle de cotation du tableau ci-dessous ;

1	Détection assurée car facilement déteçtable
2	Détection réalisée par l'acteur du processus lors de la réalisation de l'activité
3	Détection réalisée à posteriori (surveillance de l'activité)
4	Non déteçtable (détection impossible avant que la défaillance n'atteigne le « client » ou que l'effet de la défaillance ne se produise)

Figure 47 : Critères d'estimation de la déteçtabilité d'un risque

Dans notre travail, les risques ont été quantifiés par un indice de priorité de risque appelé « criticité ». La criticité a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{CRITICITE} = \text{OCCURRENCE} \times \text{GRAVITE} \times \text{DETECTABILITE}$$

Les risques présentant la criticité la plus élevée ont été retenus pour la mise en place de mesures prioritaires.

D/ Méthodes de vérification/validation d'un processus analytique

a) Etude de la répétabilité

Le nombre d'essais de répétabilité effectués par analyse sont répertoriés dans le tableau 48. Pour les tests manuels il a été réalisé une estimation à minima de la variabilité intra-opérateur (5 essais).

Type d'analyse	Analyses concernées	Echantillon testé	Nombre d'essais
Automatisée Semi quantitative	CMIA	Contrôle kit positif	30
		Contrôle kit négatif	30
		Contrôle Accurun	30
	ELISA IgM	Contrôle kit positif	30
		Contrôle kit négatif	30
Manuelle semi quantitative	RPR	Echantillon patient	5
	TPHA	Echantillon patient	5
Manuelle qualitative	WB	Non réalisé (trop onéreux)	/

Figure 48 : Méthodes des essais de répétabilité

Les CV obtenus ont été comparés aux mesures de CV établies par le fournisseur.

b) Etude de la fidélité intermédiaire

Nous avons utilisé les résultats de 30 CQI passés à chaque série lors du passage des séries de patients en routine (figure 49).

Type d'analyse	Analyses concernées	Echantillon testé	Nombre d'essais
Automatisée Semi quantitative	CMIA	Contrôle kit positif	30
		Contrôle kit négatif	30
		Contrôle Accurun	30
	ELISA IgM	Contrôle kit positif	30
		Contrôle kit négatif	30
Manuelle semi quantitative	RPR	Contrôle kit positif	30
	TPHA	Contrôle kit positif	30
Manuelle qualitative	WB	Non réalisé (trop onéreux)	/

Figure 49 : Méthodes des essais de fidélité intermédiaire

c) Etude de la sensibilité et de la spécificité analytique

L'étude de la sensibilité et de la spécificité analytique a été effectuée de trois manières :

- analyse des données du fournisseur présentes dans les notices des kits ;
- étude des résultats des EEQ du groupe de pair utilisant la technique lorsqu'ils sont disponibles ;
- étude des données disponibles dans la littérature par une étude bibliographique.

d) Variabilité inter-opérateur

L'objectif de cet essai a été de vérifier que le changement d'opérateur n'induit qu'une faible variation des résultats pour ces deux examens. D'après l'analyse de risque, cet essai n'est pertinent que pour les examens non automatisés. Nous avons donc effectué ce test uniquement pour les deux analyses manuelles : RPR et TPHA. Pour cela, nous avons fait réaliser les deux tests sur un même sérum par l'ensemble des sept techniciens habilités.

e) Etude de la justesse

La justesse pouvant être établie par une externalisation du CIQ, elle a été calculée en comparant la moyenne obtenue lors des essais de fidélité intermédiaire du contrôle interne externalisé à la moyenne du groupe de pairs du programme. La justesse a été calculée pour la technique CMIA, seule technique pour laquelle nous disposions d'un contrôle interne externalisé.

f) Exactitude de mesure

L'exactitude est estimée à l'aide du calcul d'un biais par rapport à une valeur de consensus fournie par un organisme d'EEQ. Aucun EEQ ne proposant de comparaison concernant le Western Blot syphilis, l'exactitude de mesure n'a pu être calculée pour cette analyse. Dix échantillons de contrôles externes des deux programmes annuels de contrôles (ProBioQual et CTCB) ont été utilisés pour évaluer les performances des tests de dépistage. Les examens (CMIA et ELISA) fournissent un résultat qualitatif et semi-quantitatif (sous forme d'un ratio). Cependant les organismes d'EEQ, faute d'un nombre suffisant de participants, ne permettent qu'une exploitation qualitative des résultats.

g) Etude de l'incertitude de mesure

Nous avons calculé l'incertitude de mesure pour les deux méthodes semi-quantitatives : la CMIA et l'ELISA IgM.

Nous avons utilisé la méthode « CIQ/EEQ » proposée dans le SH GTA 14 (83) qui repose sur l'exploitation des données des contrôles internes et des EEQ ou des CIQ externalisés. L'incertitude est liée à la somme de l'incertitude liée à la fidélité intermédiaire (CIQ) et à celle liée au biais (cas des EEQ) ou à la justesse (cas des CIQ externalisés). Les deux formules suivantes peuvent être utilisées.

L'incertitude sur le résultat d'analyse est obtenue en prenant la racine carrée de la somme quadratique des composantes de l'incertitude issues du CIQ et de l'EEQ :

$$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(EEQ)}$$

L'utilisation des CIQ externalisés est une alternative à l'évaluation d'une justesse lorsqu'il n'existe pas d'EEQ exploitable :

$$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(CIQ_{externalisé})}$$

L'incertitude liée à la fidélité intermédiaire est calculée grâce au coefficient de variation obtenu lors des essais de fidélité intermédiaire. L'indicateur de variabilité (CV ou écart-type du CIQ) sert à estimer la variabilité du processus analytique.

La fidélité intermédiaire se quantifie par le coefficient de variation issu du CIQ. Le coefficient de variation (CV%) se calcule à partir de l'écart-type et de la moyenne des résultats du CIQ :

$$\hat{\sigma}_{\text{fidélité-intermédiaire}} = u(CIQ) = \frac{CV \times m}{100}$$

En l'absence de CIQ externalisé proche du seuil décisionnel au moment de l'étude, nous avons utilisé uniquement l'incertitude liée à la fidélité intermédiaire. Cette approche, dite méthode intra-laboratoire ou incertitude élargie, peut minorer la valeur de l'incertitude de mesure obtenue (90).

Dans les cas des techniques qualitatives : RPR, TPHA et Western Blot, l'évaluation de l'incertitude a consisté principalement à faire une analyse de risques et démontrer la maîtrise des facteurs jugés significatifs.

A l'issue de cette analyse, une estimation des principales composantes d'incertitude a été conduite ainsi que l'impact sur les résultats.

h) Etude de l'étendue de mesure

Cette étude n'a pas d'intérêt dans le cadre de nos analyses, puisqu'elles sont toutes semi-quantitatives. Nous étudions un signal par rapport à un seuil, ou une dilution de sérum. Nous n'avons donc pas mis en œuvre ces essais.

i) Comparaison de méthodes

Concernant les cinq analyses de notre travail :

- CMIA Ig totaux sur Architect : Aucune comparaison de méthode n'a été réalisée au cours de notre étude. Une comparaison de méthode a été réalisée en 2013 dans un précédent travail avec la technique TPHA (1) (voir annexe 9). L'HAS, sur avis du CNR de la syphilis, recommande depuis 2015 l'utilisation de tests tréponémiques automatisés plus sensibles (27). La comparaison de méthodes avec un test plus ancien moins performant s'avère d'autant moins utile et n'a donc pas été réalisée ;
- ELISA IgM sur Evolis : une comparaison de technique a été réalisée lors du changement de méthode avec l'ancien test FTA IgM. Pour cela, nous avons testé 42 sérums par les deux techniques (sérums de patients suspects d'infections récentes et positifs en CMIA). Seuls les résultats qualitatifs ont été comparés. Les dossiers cliniques des patients dont les sérums discordants ont été analysés en Western Blot ;
- RPR, TPHA, Western Blot : Aucune comparaison de ces méthodes n'a été réalisée au cours de notre étude.

Des comparaisons de ces techniques entre elles ne sont pas justifiées puisque ces tests ne se substituent pas l'un à l'autre mais sont complémentaires selon l'algorithme recommandé par la NABM. Ils ne détectent pas les mêmes épitopes bactériens et la cinétique des Ac qu'ils détectent est différente.

j) Etude des Interférences

Pour les cinq analyses effectuées, nous avons réalisé une vérification en portée A. Nous avons uniquement pris en compte les interférences indiquées dans la notice du fabricant (hémolyse...).

k) Etude de la contamination inter-essais

Un essai de contamination commun testant l'intégralité des analyses effectuées en CMIA sur l'Architect a été réalisé. Cet essai a été réalisé sur l'Antigène HBs de l'hépatite B, qui est supposé être le paramètre le plus sensible aux contaminations. Cet essai a été mis en place de la manière suivante (81) :

- un échantillon positif fort a été analysé trois fois après rinçage de l'appareil (H1, H2, H3, de moyenne H) ;
- un échantillon à valeur basse a été ensuite analysé trois fois (B1, B2, B3) ;
- les séquences (H1, H2, H3, B1, B2, B3) ont été répétées plusieurs fois (5 fois) afin d'établir la moyenne des B1, et la moyenne des B3 ;
- le pourcentage de contamination entre les échantillons a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Contamination} = ((mB1-mB3) / (mH-mB3)) \times 100$$

D'après l'analyse de risques, ce type d'étude n'a pas d'intérêt dans le cadre des analyses manuelles, puisque les embouts de pipettes sont jetés entre chaque essai. Ces tests de contamination ne sont pas non plus pertinents sur l'automate Evolis pour lequel des embouts jetables sont utilisés pour les prises d'essais.

l) Robustesse et fiabilité des réactifs

En portée A, ces essais ne sont pas nécessaires. Les spécifications du fournisseur ont été suivies, les notices des fournisseurs et les fiches de stress des réactifs étudiées.

m) Intervalle de référence

Les valeurs seuils proposées par le fournisseur ont été appliquées. Pour la technique CMIA, le calcul d'incertitude de mesure a été réalisé pour définir une zone grise selon la méthode de Ly et al. (90).

III/ Résultats

A/ Phase pré-analytique

L'analyse de risques de la phase pré-analytique a été réalisée pour l'ensemble des sérologies infectieuses et sera jointe à chaque dossier de validation de méthode. Elle sera mise à jour une fois par an avec l'ensemble des acteurs du plateau de sérologie.

5M	Points critiques	O	G	D	C	Elément à maîtriser	Moyen de maîtrise
Milieu	Respect des recommandations du fournisseur avant centrifugation des échantillons : délais avant traitement analytique	3	2	1	6	Gestion logistique (transport des examens urgents, dons d'organes)	-Procédure d'acheminement des prélèvements aux RTE : MU-PréA-PG-004
		3	2	2	12	Service de soin : condition de conservation du prélèvement avant envoi	Sensibilisation des préleveurs sur les conditions et durée de conservation des prélèvements avant envoi : Catalogue des analyses Easily Biobook Renseignement de la date et de l'heure de prélèvement exigée sur le bon du laboratoire pour contrôle au RTE : -Gestion des non-conformités MU-SMP-PG-001 -LBMMS-Non-conformité étiquetage prélèvement (absence, discordance, erreur) : MU-SMQ-IT-005
Matériel (équipements)	Prétraitement consiste en une centrifugation de 10 min à 2000g : risque de dysfonctionnement de la centrifugeuse	1	2	2	4	Centrifugeuse : respect des accélérations, vitesses préconisées et températures maximum	Qualification du matériel : -contrat de maintenance -Maintenance régulière par les utilisateurs -Métrologie NE-ACHAT-MT-030-02 IAI Maintenances des centrifugeuses

	<p>Conservation des prélèvements centrifugés avant analyses dans des enceintes réfrigérées</p> <p>(2-8°C) en dehors des plages d'ouverture du laboratoire</p>	3	1	1	3	<p>Maîtrise de la métrologie et suivi des enceintes critiques</p>	<p>Qualification de l'installation :</p> <p>Contrat de maintenance</p> <p>Maintenances annuelles</p> <p>Métrologie : suivi des températures par sonde JRI (étalonnée par un prestataire de métrologie accrédité COFRAC) et cartographies</p> <p>LBMMS- Procédure de gestion et suivi des températures MU-ACHAT-PG-001</p> <p>Alarme en cas de sortie de l'appareil en dehors des limites de températures fixées</p> <p>-Circuit des tubes de sérologies infectieuses NE-PréA-PG-001</p>
--	---	---	---	---	---	---	---

Matière (échantillons)	Réalisation des prélèvements sur Tubes secs et/ou EDTA	2	4	1	8	Vérification au RTE et au laboratoire et gestion des non-conformités	Bon de demande d'analyse -LBMMS Pré analytique : Contrôle des prélèvements MU-préA-IT-022 -Gestion des non conformités MU-SMP-PG-001
		2	1	1	2	Nature et volume des échantillons prélevés stérilement sur tube sec avec ou sans gel séparateur et/ou EDTA Formation des préleveurs	MU-PréA-PG-007LBMMS-procédure de gestion des demandes et des échantillons LBMMS Manuel de prélèvement MU-PréA-PG-003 Catalogue des analyses EasilyBiobook Bon de demande d'analyse
	Identification du prélèvement primaire	3	3	3	27	Formation et information des préleveurs	LBMMS Manuel de prélèvement MU-PréA-PG-003 Gestion des non-conformités MU-SMP-PG-001 LBMMS-Non-conformité étiquetage prélèvement (absence, discordance, erreur) : MU-SMQ-IT-005 LBMMS-Dérogation pour une non-conformité d'étiquetage (identitovigilance) MU-PréA-DE-001
	Qualité du prélèvement : prélèvements non hémolysés, sans fibrine	4	4	1	16	Contrôle visuel du prélèvement au poste avant analyse	Centrifugation du prélèvement entre 10000 et 11000 tr/min pendant 2 min et/ou enregistrement d'une non-conformité sur GLIMS par le personnel technique, et rejet du prélèvement. LBMMS Pré analytique : Contrôle des prélèvements MU-préA-IT-022 Gestion des non conformités MU-SMP-PG-001
	Volume de l'échantillon insuffisant	3	2	1	6	Contrôle du volume au poste avant analyse	Demande d'un deuxième prélèvement auprès du service et/ou enregistrement d'une non-conformité sur GLIMS
Méthode	Etiquetages tubes	3	3	3	27	Etiquetage correct du tube	MU-PréA-PG-007LBMMS-procédure de gestion des demandes et

	Bon de demande correctement rempli et associé au bon nombre de tube	3	4	2	24	Respect des zones échantillons et du nombre de tubes à envoyer en respectant leur nature (tubes secs et ou plasma)	des échantillons LBMMS Manuel de prélèvement MU-PréA-PG-003 Catalogue des analyses EasilyBiobook Bon de demande d'analyse
	Association tube et bon de demande	3	2	1	6	S'assurer de la concordance entre l'identité du patient du bon et l'identité patient des tubes envoyés	Gestion des non-conformités MU-SMP-PG-001 LBMMS-Non-conformité étiquetage prélèvement (absence, discordance, erreur) : MU-SMQ-IT-005 LBMMS-Dérogation pour une non-conformité d'étiquetage (identitovigilance) MU-PréA-DE-001
Main d'œuvre (Personnel)	Compétence et maintien des compétences du personnel du RTE : risque d'erreur d'étiquetage des tubes primaires	3	3	3	27	Maîtrise de la conformité à la prescription : Identité du patient Enregistrement des demandes Identification / étiquetage des prélèvements et du bon de demande	Formation et habilitation du personnel du RTE et maîtrise du SIL : LBMMS-RTE Fiche de qualification/habilitation personnel réception tri enregistrement MU-RH-DE-052 LBMMS Manuel de prélèvement MU-PréA-PG-003 Gestion des non-conformités MU-SMP-PG-001 LBMMS-Non-conformité étiquetage prélèvement (absence, discordance, erreur) : MU-SMQ-IT-005 LBMMS-Dérogation pour une non-conformité d'étiquetage (identitovigilance) MU-PréA-DE-001

Au niveau de la phase pré analytique, le risque majeur identifié a été l'identification correcte des prélèvements (criticité égale à 27). Ce risque, qui concerne l'ensemble des disciplines, fait l'objet d'actions menées à un niveau institutionnel. Le nombre insuffisant de tubes prélevés par rapport à la prescription (criticité égale à 24) a été un autre point critique. Le mauvais agencement du bon de demande étant en cause, une nouvelle version a été créé en limitant le nombre de « zones échantillons ». Deux tubes doivent être prélevés : un pour la zone des techniques automatisées et un pour les techniques manuelles.

B/ Phase analytique Syphilis TP sur Architect i1000

a) Risques identifiés, criticité et moyens de maîtrise mis en place

5M	Points critiques	O	G	D	C	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Matériel	Automate	2	3	3	18	Maîtrise du bon fonctionnement de l'automate	NE-ANA-DE-038-01 SERO-Guide d'utilisation de l'Architect annoté Classeur Abbott : guide d'utilisation
		2	3	3	18	Maintenance utilisateur	Suivi et traçabilité des maintenances dans Kalilab
		2	4	3	24	Contamination (inter-réactifs ou inter-patients)	Essais de contamination du dossier de vérification de méthode
		2	4	3	24	Maintien des performances analytiques Maîtrise statistique des procédés	Suivi des contrôles qualités CIQ ET EEQ MU-ANA-PG-005-03 : LBMMS-Procédure générale de gestion des contrôles de qualité MU-ANA-PG-006-02 : LBMMS –Procédure de gestion des contrôles de qualité des méthodes quantitatives
		3	3	3	18	Panne de l'automate	Définition de la fonction de référents et liste nominative : NE-ANA-PG-004-01 organisation du plateau de sérologie infectieuse Gestion des pannes non bloquantes par un technicien habilité en poste : Classeur Abbott Architect Auto dépannage disponible pièce 0-03-40 Gestion des pannes bloquantes via la Hotline Abbott et/ou planification d'une intervention d'un ingénieur technique Abbott Traçabilité des pannes via Kalilab Back up sur les analyses demandées en urgence uniquement : TPHA en méthode manuelle
Méthodes	Contrôles Qualité	3	3	2	18	Contrôles qualité interne : CIQ et contrôles fournisseurs Contrôles de qualité externes : EEQ/CTCB/ProBioQual	Passage de contrôle à chaque série et suivi des résultats selon les règles d'acceptabilité établies MU-ANA-PG-005-03 : LBMMS-Procédure générale de gestion des contrôles de qualité MU-ANA-PG-006-02 : LBMMS –Procédure de gestion des contrôles de qualité des méthodes quantitatives

	Réactovigilance ascendante et descendante	2	4	3	24	<p>Etre au courant d'une alerte réactovigilance</p> <p>Faire remonter une anomalie</p>	<p>Référent réactovigilance</p> <p>Informez le biologiste qui fait une déclaration des alertes ANSM</p> <p>MU-ACHAT-DX-007-01 : LBMMS-Procédure Ascendante de réactovigilance : déclaration à l'ANSM</p>
Main d'œuvre	Communication techniciens et biologistes	3	3	3	27	<p>Information des pannes/ anomalies/ non-conformités</p>	<p>Planning de validation des biologistes d'astreintes accessibles</p> <p>Listes de numéro de téléphones des différents biologistes accessibles</p> <p>Information des référents automate</p>
Matière première	Qualité du prélèvement	3	3	2	18	<p>S'assurer que le prélèvement est conforme aux critères définis par le laboratoire</p>	<p>Le personnel technique responsable de la mise en route de l'analyse s'assure de la conformité du prélèvement : absence d'hémolyse, de fibrine, quantité suffisante</p> <p>Suivi des recommandations du fournisseur :</p> <p>NE-PréA-IT-014-01 : SERO-ARCHITECT-Gestion des échantillons</p>

L'analyse des risques a mis en évidence plusieurs points critiques dans le processus analytique :

- les problématiques de maîtrise statistique des procédés (périodes probatoires, détection des dérives...), le manque d'harmonisation de gestion des CIQ ;
- la contamination inter-échantillon : vérifiée par un test de contamination ;
- la gestion d'une panne avec des résultats demandés en urgence (dons) ;
- l'absence de validation du test par le fournisseur sur le LCR : maintien obligatoire du TPHA ;
- les critères d'acceptabilité technique des échantillons (Interférences) ;
- la réactovigilance : nécessité d'avoir des correspondants « réactovigilance » ;
- les maintenances.

b) Résultats des essais

REPETABILITE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV fournisseur (%)	CV retenu par le laboratoire (%)	Conclusion
Syphilis TP ctrl-lot N°58310L100	30	0.050	0.0024	2,7	15	15	Conforme
Syphilis TP ctrl+lot N°58310L100	30	2.7	0.07	2.47	15	15	Conforme
Accurun 155 lot N°10090051	30	3.04	0.08	2.55	15	15	Conforme

En l'absence de données bibliographiques, nous avons donc choisi de retenir le CV maximum du fournisseur pour les études de répétabilité (voir annexe 1). Les résultats sont décrits dans le tableau ci-dessus. Les CV de répétabilité obtenus sont tous inférieurs aux CV du fournisseur. Nous avons donc considéré ces essais comme conformes.

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV fournisseur (%)	CV retenu par le laboratoire (%)	Conclusion
Syphilis TP ctrl-lot N°55119Q500	30	0.06	0.01	12.70	15	15	Conforme
Syphilis TP ctrl+lot N°55119Q500	30	2.60	0.08	3.19	15	15	Conforme
Accurun 155 lot N°10050254	30	25.07	0.80	3	15	15	Conforme

Comme pour les essais de répétabilité, nous nous sommes basés sur le CV maximum du fournisseur, faute de données bibliographiques.

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)								
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (Groupe de pairs)	Biais /groupe de pairs (%)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais / moyenne générale (%)	Biais Limite (%)	Conclusion
Accurun 155 lot N°10090051	30	3.04	3.04	0	3.04	0%	25	Conforme
Accurun 155 lot N°10050254	30	25.07	25.75	2,6%	25.75	2,6%	25	Conforme

L'avantage de l'utilisation d'un CIQ externalisé et de permettre la comparaison de notre CIQ à ceux du groupe de pairs. Nous avons choisi comme biais limite acceptable 25%, qui est la limite classiquement retenue en sérologie infectieuse.

EXACTITUDE					
Contrôles quantitatifs <input type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input checked="" type="checkbox"/>					
Echantillons	Date	Valeur Labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Conclusion
CTCB	13/11/2015	Négatif	Négatif	Négatif	Conforme
CTCB 162	05/07/2016	Positif	Positif	Positif	Conforme
CTCB 151	10/04/2015	Négatif	Négatif	Négatif	Conforme
CTCB 154	07/12/2015	Positif	Positif	Positif	Conforme
CTCB 161	06/04/2016	Négatif	Négatif	Négatif	Conforme
PBQ 15SD02	27/03/2015	Positif	Positif	Positif	Conforme
PBQ16SD06	05/09/2016	Positif	Positif	Positif	Conforme
PBQ16SD04	06/06/2016	Positif	Positif	Positif	Conforme
PBQ 16SD03	28/03/2016	Positif	Positif	Positif	Conforme
PBQ 15SD06	26/10/2015	Positif	Positif	Positif	Conforme

L'exactitude n'a pu être évaluée que sur le résultat qualitatif. L'effectif des groupes de pairs des techniques automatisées est encore insuffisant pour que les organismes d'évaluation externe de la qualité fournissent une analyse quantitative des résultats de contrôle. Les résultats sont conformes dans 100 % des cas (concordance catégorielle).

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE		
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>		
D'après la fiche technique du fournisseur (voir annexe 1) :		
Spécificité > 99% (2496 échantillons testés) Sensibilité : 100% (131 positifs étudiés)		
Résultats des EEQ des utilisateurs de la technique ARCHITECT Syphilis :		
CQE	Résultat	
CQE ProBioQual 06/15	100% ont rendu Positif (12/13) ou Douteux (1/13) pour une valeur attendue positive	
CQE ProBioQual 10/15	100% ont rendu Positif (15/15) pour une valeur attendue positive	
CQE CTCB 10/04/15	100% ont rendu Négatif (48/48) pour une valeur attendue négative.	
CQE CTCB 25/01/2016	100% ont rendu Positif (56/56) pour une valeur attendue positive.	
Données bibliographiques :		
Article	Sensibilité	Spécificité
Yoshioka et al, 2007 (92)	Sensibilité 100%	Spécificité 100%
Youg et al, 2009 (93)	Sensibilité 97,5%	Spécificité 99,1%
Wellinghausen et Dietberger, 2011 (94)	Sensibilité 100%	Spécificité 99,8%

L'exploitation des résultats des EEQ permet d'avoir une idée de la sensibilité et de la spécificité appliquées de la méthode pour l'ensemble du groupe de pair. Les données obtenues sur la fiche technique sont concordantes avec celles des EEQ et les données bibliographiques et attestent de l'excellente performance du test.

INCERTITUDE DE MESURE :	
Méthodologie choisie : analyse des risques <input type="checkbox"/> ; calcul <input checked="" type="checkbox"/>	
	Incertitudes calculées
Mode de calcul :	CIQ/EEQ
Quantification de l'incertitude :	u(C)=0,2 En prenant en compte les trois niveaux de contrôles passés dans les tests de reproductibilité.

On utilise la valeur de l'incertitude de mesure pour calculer la zone grise autour de la valeur seuil fournie par le fournisseur. Le seuil fournisseur pour cette analyse est 1 (voir fiche technique en annexe 1) : on met en place une zone grise entre 0,8 et 1,2 pour laquelle les résultats sont rendus douteux. Au-dessus, les résultats sont rendus positifs, et en dessous, négatifs.

COMPARAISON DE METHODES :
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>
Non réalisé

Une étude antérieure au changement de technique a été réalisée en 2013 sur 60 sérums non sélectionnés de routine : 53 patients négatifs et sept patients atteints de syphilis (2 syphilis primaires TNT négatifs et cinq syphilis secondaires TNT positifs). Seules deux discordances ont été mises en évidence (test CMIA Architect positif, test TPHA négatif), la présence d'anticorps spécifiques a été confirmée en Western blot (voir annexe 9).

Dans le cadre de notre travail, une nouvelle comparaison de méthode s'est avérée inutile. Depuis 2015, l'HAS recommande en dépistage l'utilisation des tests tréponémiques automatisés qui ont une sensibilité supérieure au TPHA (27). Ces données sont confortées par nos résultats obtenus en routine puisque sur l'année 2015, seuls 85% des sérodiagnostics positifs en CMIA ont été également positifs en TPHA.

INTERFERENCES	
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Hémolyse	5 g/ L
Triglycérides	30 g/ L
Bilirubine, ictère	200 g/ L (34 000 µmol/l)
Protéine	120 g/ L

D'après les documents du fournisseur, de telles concentrations ont pour conséquences :

- une variation < 0.4 de l'indice chiffré obtenu pour les échantillons négatifs ;
- une variation de 20% sur les échantillons positifs.

Les concentrations d'hémoglobine et de triglycérides présentant un risque d'interférence sont relativement basses et correspondent à des sérums d'aspect hémolysé ou lactescent. En l'absence de mesure tangible de ces interférences colorimétriques, nous avons pris l'option de refuser ces types d'échantillons. Les concentrations de bilirubine pouvant avoir une interférence sont beaucoup trop hautes pour être retrouvée chez un patient, même en cas de cholestase sévère. L'ictère n'est donc pas un problème. Une concentration sérique élevée en protéines, notamment dans les cas de déshydratation sévère, peut avoir une interférence et doit être évoqué en cas de résultat inattendu.

CONTAMINATION	
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles	3 séries de 5 échantillons positifs forts en Ag HBs entrecoupées de 3 séries de 5 échantillons négatifs Calculs effectués selon le SHGTA04 0% de contamination inter-échantillon

Nous avons fait le choix d'effectuer des essais de contamination communs pour tous les paramètres testés sur l'Architect. Le paramètre apparaissant le plus sensible pour cet automate est l'antigène HBs. Nous avons fait les essais sur ce paramètre.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS	
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés	Température de stockage et position sur le support testés dans les données fournisseur
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité des réactifs 30 jours à bord (données fournisseur) • Conservation entre 2 et 8°C jusqu'à la date de péremption • Les réactifs doivent toujours être conservés en position debout (données fournisseurs)

Les conditions de conservation et d'utilisation des réactifs Architect Syphilis TP au laboratoire de sérologie correspondent parfaitement aux recommandations du fournisseur. Dans ces conditions aucune étude expérimentale supplémentaire n'a été nécessaire.

SEUILS DE DECISION CLINIQUE	
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Valeurs seuils	Positif si >1,2 S/CO Douteux si 0,8<S/CO<1,2 Négatif si <0,8 S/CO

A ce jour, le choix a été fait de rendre aux cliniciens les résultats qualitatifs (positif ou négatifs) et semi quantitatifs (valeur du ratio). Ce choix concerne l'ensemble des méthodes de sérologie bactérienne à seuil dite semi-quantitatives.

C/ Phase analytique RPR

a) Maîtrise des risques et choix des points à vérifier

L'analyse de risques a fait ressortir les points critiques suivants :

5M	Points critiques	O	G	D	C	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Matériel	Données	3	4	2	24	Intégrité des résultats saisis manuellement dans le SIL	Deuxième vérification de la saisie manuelle des résultats au moment de la validation biologique à l'aide des feuilles de paillasse
	Réactifs	3	3	3	27	Gestion des dates de péremption	Gestion des stocks et inventaire lors du déstockage via le logiciel Kalilab
Méthode	Utilisation correcte des réactifs	3	4	3	36	Maîtrise des modalités de préparation et d'utilisation des réactifs	Procédure RPR sur Kalilab, attestation de lecture par les techniciens : NE-ANA-MT-202-02 SERO Sérologie Syphilis RPR
	Utilisation correcte des pipettes	3	4	3	36	Risque de contamination : -Réactifs -Patients	Changement d'embout entre chaque patient et chaque réactif. Formation/habilitation/maintien des compétences. Tests de variabilité inter-opérateurs NE-RH-DE-002-01 : SERO fiche de qualification sérologie Syphilis tests manuels et semi-automatisés NE-RH-DE-003-01 SERO Questionnaire habilitation syphilis

	Lecture	3	4	3	36	Lecture fiable et reproductible entre techniciens	Formation, habilitation des techniciens, maintien des compétences NE-RH-DE-002-01 : SERO fiche de qualification sérologie Syphilis tests manuels et semi-automatisés NE-RH-DE-003-01 SERO Questionnaire habilitation syphilis
	Identification des patients	3	4	2	24	La bonne étiquette du bon patient sur le bon tube : lecture correcte manuelle : Pas d'échanges de patients	Dernière vérification manuelle avant analyse et après analyse au moment du rangement en sérothèque : formation du personnel, procédure RPR NE-RH-DE-002-01 : SERO fiche de qualification sérologie Syphilis tests manuels et semi-automatisés NE-RH-DE-003-01 SERO Questionnaire habilitation syphilis
	Réactovigilance ascendante	2	4	3	24	Utilisation d'un réactif toujours conforme	Informez le biologiste qui fait une déclaration des alertes ANSM MU-ACHAT-DX-007-01 : LBMMS-Procédure Ascendante de réactovigilance : déclaration à l'ANSM
Main d'oeuvre	Qualification, compétence et habilitation du personnel technique	3	4	3	36	Un technicien doit toujours rendre le même résultat pour un échantillon donné à deux moments différents. Deux techniciens doivent toujours rendre le même résultat pour un échantillon donné -Mise en œuvre de la technique manuelle	Formation et Habilitation du personnel technique : NE-RH-DE-002-01 : SERO fiche de qualification sérologie Syphilis tests manuels et semi-automatisés NE-RH-DE-003-01 SERO Questionnaire habilitation syphilis
	Communication techniciens/biologiste	3	3	3	27	Information des pannes/anomalies /non-conformités	Planning de validation des biologistes d'astreintes accessibles Liste de numéros de téléphones des différents biologistes accessible

Sur ce type de méthode, l'analyse des risques met en évidence plusieurs points critiques dans le processus analytique qu'il paraît indispensable de vérifier grâce au dossier de vérification de méthode :

- qualification des techniciens : mise en œuvre et lecture finale de la réaction. La bonne qualification sera maîtrisée par des essais de variabilité inter opérateurs et par la vérification de l'exactitude des résultats d'EEQ. Elle est aussi vérifiée par des essais de fidélité intermédiaire et de répétabilité qui vérifient l'absence de variation du titre pour un même échantillon ;
- retranscription manuelle des résultats ;
- communication technicien/biologiste ;
- réactovigilance, Robustesse et fiabilité des réactifs, interférences.

b) Résultats des essais

REPETABILITE					
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>					
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeur cible	Variation de dilution observée	Variation de dilution retenue par le laboratoire	Conclusion
Sérum patient n° 16180928203	5	1/16	0	+/- 1 dilution	Conforme

Un résultat est conforme s'il ne s'écarte pas de plus d'une dilution de la valeur attendue. Pour cette analyse, nous avons limité le nombre d'essais de répétabilité à cinq pour trois raisons :

- les essais de répétabilité (n=5) sont excellents : le résultat est positif à la dilution 1/16 pour les cinq essais ;
- la fidélité intermédiaire a révélé une absence de variation sur 30 contrôles passés 30 jours différents (voir plus bas) ;
- de plus, cette analyse rend un résultat chiffré mais est en réalité une succession d'analyses qualitatives à des dilutions de raison 2 dont le résultat est rendu sous forme de dilution après interprétation (dernière dilution donnant lieu à une réaction positive). On peut donc s'interroger sur la pertinence réelle d'un essai de répétabilité ou de fidélité intermédiaire dans ce type d'analyse. Cet essai permet surtout de vérifier la bonne application du mode opératoire et l'absence de variation intra opérateur.

Classiquement dans les techniques manuelles, il est toléré une variation de plus ou moins une dilution, et il s'agit de la limite que nous nous étions fixée pour cet essai. Les essais de répétabilité sont donc conformes pour cette analyse.

FIDELITE INTERMEDIAIRE					
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>					
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeur cible	Variation de dilution observée	Variation de dilution retenue par le laboratoire	Conclusion
CQI du kit	30	Positif sans dilution	Aucune	+/- 1 dilution	Conforme

Pour cet essai, nous avons repris les résultats du CQI fourni dans le kit du fournisseur des réactifs RPR qui est passé et titré à chaque série de patient. Nous avons récupéré les résultats des 30 dernières séries. Nous avons toujours retrouvé le même résultat à chacun des passages de contrôle. L'essai est donc considéré comme conforme.

VARIABILITE INTER-OPERATEURS					
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>					
Lot Accurun 155	Date	Opérateur	Lot RPR	RPR criblage	RPR titrage
101859456	01/02/17	MG	7052575	Positif	1/2
10189456	18/11/16	BA	7052575	Positif	1/4
101859456	07/03/17	LZ	7052575	Positif	1/2
101859456	15/03/17	BM	7052575	Positif	1/2
101859456	13/02/17	DL	7052575	Positif	1/2
10189456	06/02/17	LB	7052575	Positif	1/2
101859456	20/02/17	GB	7052575	Positif	1/4

Le résultat est conforme s'il ne s'écarte pas de plus d'une dilution de la valeur cible égale à 1/2. Les résultats montrent une faible variabilité inter opérateur.

EXACTITUDE					
Contrôles quantitatifs <input type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input checked="" type="checkbox"/>					
Echantillons	Date	Valeur Labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Conclusion
CTCB	13/11/2015	Négatif	Négatif	Négatif	Conforme
CTCB 162	05/07/2016	Positif	Positif	Positif	Conforme
PBQ 15SD01	27/03/2015	Négatif	Négatif	Négatif	Conforme
PBQ 15SD02	27/03/2015	Positif 1/2	Positif 1/2	1/2	Conforme
CTCB 161	07/03/2016	Négatif	Négatif	Négatif	Conforme
CTCB 154	07/12/2015	Positif	Positif	Positif	Conforme
CTCB 152	08/07/2015	Positif	Positif	Positif	Conforme
CTCB 151	10/04/2015	Négatif	Négatif	Négatif	Conforme
CTCB 153	13/11/2015	Négatif	Négatif	Négatif	Conforme
PBQ 16SD03	28/03/2016	Positif 1/4	Positif 1/8	Positif 1/8	Conforme, écart d'une dilution accepté
PBQ 16SD04	06/06/2016	Positif 1/8	Positif 1/4	Positif 1/4	Conforme, écart d'une dilution accepté
PBQ 16SD06	05/09/2016	Positif	Positif	Positif	Conforme
PBQ 15SD01	02/03/2015	Positif 1/2	Positif 1/2	Positif 1/2	Conforme
PBQ 15SD03	20/04/2015	Positif 1/2	Positif 1/2	Positif 1/2	Conforme
PBQ 15SD06	26/10/2015	Positif 1/1	Positif 1/2	Positif 1/2	Conforme, écart d'une dilution accepté

Les organismes d'EEQ ne fournissent pas tous une exploitation à la fois qualitative et quantitative des résultats. On admet que les résultats sont conformes si les résultats ne s'écartent pas de plus d'une dilution pour les CQE quantitatifs. 100% de nos CQE sont conformes.

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUEApplicable ; non applicable **D'après les données de la notice du fournisseur :**Spécificité : 100% Sensibilité : 100%
VPN=1 VPP=1**D'après les données des CQE :**

CQE	Résultat du groupe de pair
CQE PBQ 06/15	1/1 a rendu négatif pour une valeur attendue négative.
CQE PBQ 10/15	3/3 ont rendu positif pour une valeur attendue positive.
CQE CTCB 04/15	4/4 ont rendu négatif pour une valeur attendue négative.
CQE CTCB 01/16	3/5 ont rendu un résultat positif pour une valeur attendue positive Il s'agissait d'une infection tréponémique récente avec un faible taux d'anticorps. Un nombre important de participants (toutes techniques) ont rendu des résultats non conformes pour ce sérum.

D'après les données bibliographiques :

Article	Sensibilité	Spécificité
Larsen et al., 1995 (44)	Syphilis primaire : 78% Syphilis secondaire : 100% Syphilis latente : 98%	Spécificité toutes phases : 98%

L'exploitation des résultats des EEQ permet d'avoir une idée de la sensibilité et de la spécificité appliquées de la méthode pour l'ensemble du groupe de pair. Les données obtenues sur la fiche technique ont été complétées par des données bibliographiques et celles des EEQ. Elles attestent de la bonne performance du test.

COMPARAISON DE METHODES :																																																							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>																																																							
Méthodes comparées :	RPR automate Roche Cobas utilisé à Saint Joseph Saint Luc (SJSJ)																																																						
Nombre de mesures :	15																																																						
Intervalle de comparaison :	RPR manuel : 1/1 à 1/512																																																						
Méthode d'exploitation des résultats :	Comparaison qualitative des résultats																																																						
Exploitation des résultats de comparaison :	<table border="1"> <thead> <tr> <th>N°</th> <th>X Rousse</th> <th>SLSJ</th> <th>N°</th> <th>X Rousse</th> <th>SJSJ</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>1/16</td> <td>29,88</td> <td>9</td> <td>1/512</td> <td>3,35</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>1/1</td> <td>14,21</td> <td>10</td> <td>1/16</td> <td>75,52</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>1/8</td> <td>2,25</td> <td>11</td> <td>1/1</td> <td>17,29</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>1/8</td> <td>12,85</td> <td>12</td> <td>1/16</td> <td>87,75</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>1/1</td> <td>0,5</td> <td>13</td> <td>1/16</td> <td>3,97</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>1/8</td> <td>0,64</td> <td>14</td> <td>1/1</td> <td>2,32</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>1/16</td> <td>84,07</td> <td>15</td> <td>1/1</td> <td>2,3</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>1/32</td> <td>25,01</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Dans la technique automatisée, un résultat est considéré positif quand il est supérieur à 1. Les résultats ont été comparés d'un point de vue qualitatif. Deux résultats sont discordants car rendus négatifs dans la technique automatisée, et positifs avec notre technique. Après étude des dossiers cliniques des patients, les deux cas sont de vrais positifs (cicatrice et syphilis active débutante), donc plutôt en accord avec les résultats de notre technique RPR manuelle.</p>	N°	X Rousse	SLSJ	N°	X Rousse	SJSJ	1	1/16	29,88	9	1/512	3,35	2	1/1	14,21	10	1/16	75,52	3	1/8	2,25	11	1/1	17,29	4	1/8	12,85	12	1/16	87,75	5	1/1	0,5	13	1/16	3,97	6	1/8	0,64	14	1/1	2,32	7	1/16	84,07	15	1/1	2,3	8	1/32	25,01			
	N°	X Rousse	SLSJ	N°	X Rousse	SJSJ																																																	
	1	1/16	29,88	9	1/512	3,35																																																	
	2	1/1	14,21	10	1/16	75,52																																																	
	3	1/8	2,25	11	1/1	17,29																																																	
	4	1/8	12,85	12	1/16	87,75																																																	
	5	1/1	0,5	13	1/16	3,97																																																	
	6	1/8	0,64	14	1/1	2,32																																																	
	7	1/16	84,07	15	1/1	2,3																																																	
	8	1/32	25,01																																																				

INTERFERENCES	
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Hémolyse	Oui (données fournisseur). Pas de niveau d'hémolyse précisé dans la notice.
Turbidité	Oui (données fournisseur). Pas de niveau de turbidimétrie précisé dans la notice.

Les sérums hémolysés ou lactescents font l'objet d'une non-conformité.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS	
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés	Température
Stabilité des réactifs	Données fournisseurs : stockage entre 2 et 8°C, ne pas congeler, ne pas exposer à la lumière du soleil. Entre 2 et 8°C, jusqu'au dernier jour du mois de la date de péremption inscrite sur le kit.

Les conditions de stockage des réactifs sont adaptées aux conditions imposées par la notice de la technique.

D/ Phase analytique TPHA

a) Maîtrise des risques et choix des points à vérifier

5M	Points critiques	O	G	D	C	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Matériel	Données	3	4	2	24	Intégrité des résultats saisis manuellement dans le SIL	Deuxième vérification de la saisie manuelle des résultats au moment de la validation biologique à l'aide des feuilles de paillasse
	Réactifs	3	3	3	27	Gestion des dates de péremption	Gestion des stocks et inventaire lors du déstockage via le KMS
Méthode	Utilisation correcte des réactifs	3	4	3	36	Maîtrise des modalités de préparation et d'utilisation des réactifs	Procédure TPHA sur Kalilab, attestée par tous les techniciens : NE-ANA-MT-202-02 SERO Sérologie Syphilis TPHA
	Utilisation correcte des pipettes	3	4	3	36	Risque de contamination : -réactifs -Patient négatif avec un patient positif	Changement d'embout entre chaque patient et chaque réactif. -Formation/habilitation/maintien des compétences. NE-RH-DE-002-01 : SERO fiche de qualification sérologie Syphilis tests manuels et semi-automatisés NE-RH-DE-003-01 SERO Questionnaire habilitation syphilis
	Lecture	3	4	3	36	Lecture correcte et reproductible entre techniciens	Formation, habilitation des techniciens, maintien des compétences NE-RH-DE-002-01 : SERO fiche de qualification sérologie Syphilis tests manuels et semi-automatisés NE-RH-DE-003-01 SERO Questionnaire habilitation syphilis

	Identification des patients	3	4	2	24	La bonne étiquette pour le bon patient sur le bon tube : lecture correcte manuelle : Pas d'échanges inter patients	Double vérification visuelle avant analyse et après analyse au moment du rangement en sérothèque : formation du personnel, procédure RPR NE-RH-DE-002-01 : SERO fiche de qualification sérologie Syphilis tests manuels et semi-automatisés NE-RH-DE-003-01 SERO Questionnaire habilitation syphilis
	Réactovigilance ascendante	2	4	3	24	Utilisation d'un réactif toujours conforme	Information du biologiste qui fait une déclaration des alertes ANSM MU-ACHAT-DX-007-01 : LBMMS-Procédure Ascendante de réactovigilance : déclaration à l'ANSM
Main d'œuvre	Qualification, compétence et habilitation du personnel technique	3	4	3	36	Un technicien doit toujours rendre le même résultat pour un échantillon donné à deux moments différents. Deux techniciens doivent toujours rendre le même résultat pour un échantillon donné -Mise en œuvre de la technique manuelle	Formation et Habilitation du personnel technique : NE-RH-DE-002-01 : SERO fiche de qualification sérologie Syphilis tests manuels et semi-automatisés NE-RH-DE-003-01 SERO Questionnaire habilitation syphilis
	Communication techniciens/biologiste	3	3	3	27	Information des pannes/anomalies /non-conformités	Planning de validation des biologistes d'astreintes accessibles Liste de numéros de téléphone des différents biologistes accessible

L'analyse des risques met en évidence plusieurs points critiques dans le processus analytique qu'il paraît indispensable de vérifier grâce au dossier de vérification de méthode :

- qualification des techniciens : mise en œuvre et lecture finale de la réaction. La bonne qualification sera maîtrisée par des essais de variabilité inter opérateurs et par la vérification de l'exactitude de nos résultats lors des CQE. Elle est aussi vérifiée par des essais de fidélité intermédiaire et de répétabilité qui vérifient l'absence de variation du titre pour un même échantillon ;
- retranscription manuelle des résultats ;
- communication technicien/biologiste ;

- réactovigilance, Robustesse et fiabilité des réactifs, interférences ;
- sensibilité et spécificités analytiques.

b) Résultats des essais

REPETABILITE					
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>					
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeur cible	Variation de dilution observée	Variation de dilution retenue par le laboratoire	Conclusion
Echantillon patient sérum n° 16180928203	5	1/5120	0	+/-1 dilution	Conforme

Pour les mêmes raisons que pour le RPR, nous avons effectué les essais de répétabilité pour le TPHA sur 5 dosages d'un sérum de patient sur un seul niveau. Nous avons aussi considéré comme acceptable un écart de plus ou moins une dilution. Nous n'avons observé aucune variation sur ces cinq essais.

FIDELITE INTERMEDIAIRE						
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>						
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeur cible	Valeur minimum	Valeur maximum	Variation de dilution retenue par le laboratoire	Conclusion
Control + du kit lot N° 7051497	30	1/2560	1/2560	1/5120	+ /- 1 dilution	Conforme

Nous avons récupéré les résultats des CQI fournis dans le kit du réactif, qui est passé et titré lors de chaque série. Une variation de plus ou moins une dilution d'écart a été acceptée comme pour les autres essais.

VARIABILITE INTER-OPERATEURS				
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>				
Lot Accurun 155	Date	Opérateur	Lot TPHA	TPHA
101859456	01/02/17	MG	7055387	1/1280
10189456	18/11/16	BA	7054138	1/640
101859456	07/03/17	LZ	7055387	1/2560
101859456	15/03/17	BM	7055387	1/1280
101859456	13/02/17	DL	7055387	1/2560
10189456	06/02/17	LB	7055387	1/1280
101859456	20/02/17	GB	7055387	1/640

Le résultat est conforme s'il ne s'écarte pas de plus d'une dilution de la valeur cible 1/1280.

Les résultats montrent une faible variabilité inter opérateur.

EXACTITUDE					
Contrôles quantitatifs <input type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input checked="" type="checkbox"/>					
Echantillons	Date	Valeur Labo	Cible (Groupe de paires)	Cible (toutes techniques)	Conclusion
CTCB	13/11/2015	Négatif	Négatif	Négatif	Conforme
CTCB 162	05/07/2016	Positif	Positif	Positif	Conforme
PBQ 15SD02	27/03/2015	Positif 1/640	Positif 1/160	Positif 1/320	Conforme
CTCB 161	07/03/2016	Négatif	Négatif	Négatif	Conforme
CTCB 154	07/12/2015	Positif	Positif	Positif	Conforme
CTCB 152	08/07/2015	Positif	Positif	Positif	Conforme
CTCB 151	10/04/2015	Négatif	Négatif	Négatif	Conforme
CTCB 153	13/11/2015	Négatif	Négatif	Négatif	Conforme
PBQ16SD03	28/03/2016	Positif 1/320	Positif 1/320	Positif 1/320	Conforme
PBQ 16SD04	06/06/2016	Positif 1/320	Positif 1/320	Positif 1/320	Conforme
PBQ 16SD06	05/09/2016	Positif	Positif	Positif	Conforme
PBQ15SD06	26/10/2015	Positif 1/80	Positif 1/80	Positif 1/80	Conforme
PBQ 15SD03	20/04/2015	Positif 1/80	Positif 1/80	Positif 1/80	Conforme
PBQ 15SD02	02/03/2015	Positif 1/640	Positif 1/160	Positif 1/320	Conforme
PBQ 15SD01	02/03/2015	Négatif	Négatif	Négatif	Conforme

Ces données démontrent une très bonne exactitude de notre technique puisque 100% des CQE sont conformes.

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUEApplicable ; non applicable **D'après les données du fournisseur :**

Spécificité : 99,6% Sensibilité : 98,5%

VPN=0,99 VPP=0,98

D'après les données des CQE :

CQE	Résultat du groupe de pairs
CQE PBQ 06/15	4/7 ont rendu positif pour une valeur attendue positive (57,1%). Ce sérum était faiblement positif et une majorité des techniques manuelles ont eu de mauvais résultats sur ce CQE
CQE PBQ 10/15	1/1 a rendu positif pour une valeur attendue positive (100%)
CQE CTCB 04/15	6/6 ont rendu négatif pour une valeur attendue négative (100%)
CQE CTCB 01/16	2/4 ont rendu Positif ou douteux pour une valeur attendue positive (50%). Ce sérum était faiblement positif et une majorité des techniques manuelles ont donné lieu à des résultats non conformes

D'après les données bibliographiques :

Article	Sensibilité	Spécificité
Larsen et al., 1995 (44)	Syphilis primaire : 76% Syphilis latente : 97-100% Syphilis latente tardive : 94%	Spécificité toutes phases : 99%

L'exploitation des résultats des EEQ permet d'avoir une idée de la sensibilité et de la spécificité appliquées de la méthode pour l'ensemble du groupe de pairs. Ils démontrent de mauvais résultats pour beaucoup d'utilisateurs de TPHA manuels (pas uniquement pour le groupe de pairs). Ces résultats sont probablement dus à des erreurs de manipulation sur des sérums douteux dans des laboratoires ayant peu l'habitude d'être confrontés à des résultats positifs. Notre laboratoire a lui montré de bons résultats (voir exactitude plus haut). Les données obtenues sur la fiche technique ont été complétées par des données bibliographiques et celles des EEQ.

On constate que les performances de ce test sont moins bonnes que celles du test tréponémique automatisé par CMIA sur Architect.

INTERFERENCES	
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Hémolyse	Oui (données fournisseur). Pas de niveau d'hémolyse précisé dans la notice.
Turbidité	Oui (données fournisseur). Pas de niveau de turbidité précisé dans la notice.
Bilirubine, ictère	Non (données fournisseur)

Au vu des données du fournisseur présentes dans la notice et résumées dans le tableau ci-dessus, les sérums hémolysés ou lactescents font l'objet d'une non-conformité.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS	
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés	Données fournisseurs : stockage entre 2 et 8°C, ne pas congeler, ne pas exposer à la lumière du soleil.
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	Entre 2 et 8°C, jusqu'au dernier jour du mois de la date de péremption inscrite sur le kit.

Ces conditions de stockage des réactifs sont respectées au laboratoire.

E/ Phase analytique IgM sur Evolis

a) Maîtrise des risques et choix des points à vérifier

5M	Points critiques	O	G	D	C	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise	
Matériel (équipements)	Fonctionnement de l'automate	2	3	3	18	Maintenance utilisateur	NE-ANA-MT-066-01 : SERO IgM syphilis sur EVOLIS (fiche simplifiée)	
								NE-ANA-IT-061-01 : Fiche de poste pour automate Evolis
		2	3	3	18	Maintenance SAV bi annuelle	NE-ANA-IT-061-01 : SERO Recherche des IgM Syphilis sur Evolis NE-ACHAT-IT-003-01 : Maintenance de l'automate Evolis Suivi et traçabilité des maintenances dans Kalilab	
							Suivi des contrôles qualités CIQ ET CQE	
	2	3	3	18	Maintien des performances analytiques	MU-ANA-PG-005-03 : LBMMS-Procédure générale de gestion des contrôles de qualité IT de gestion des CIQ/CQE		
	Données Informatiques	3	3	2	18	Intégrité des résultats transmis par l'automate au SIL, et Easily	Test de transfert effectué dans le cadre de la validation de méthode	
3		3	2	18	Intégrité des résultats transmis par l'automate au SIL, et Easily	Test de transfert effectué dans le cadre de la validation de méthode		
Matière première	Contrôles de qualité : EEQ et CIQ	3	3	2	16	Conservation et gestion date de péremption	Métrologie : suivi des températures par sonde JRI (étalonnée par un prestataire de métrologie accrédité COFRAC) et cartographies LBMMS- Procédure de gestion et suivi des températures MU-ACHAT-PG-001 Procédure des gestions des CIQ/CQE	
Méthode	Utilisation correcte des réactifs	2	3	3	18	Maîtrise des modalités de préparation et d'utilisation des réactifs : préparation tampon d'échantillon R2, du conjugué R3, de la solution de lavage R5. Installation des réactifs dans l'automate	Suivi des recommandations du fournisseur : NE-RH-DE-013-01 : Evolis - Fiche de qualification technicien NE-ANA-IT-061-01 : SERO Recherche des IgM Syphilis sur Evolis IT Gestion des réactifs	

	Contrôles Qualité	3	3	2	18	Contrôles qualité interne : CIQ et contrôles fournisseurs Contrôles de qualité externes : CTCB/ProBioQual...	Passage à chaque série et suivi des résultats selon les règles d'acceptabilité établies Règles à suivre si contrôles hors limites Vérification des CIQ à chaque série par le biologiste responsable de validation MU-ANA-PG-005-03 : LBMMS-Procédure générale de gestion des contrôles de qualité
	Réactovigilance ascendante	2	4	3	24	Utilisation d'un réactif toujours conforme	Informer le biologiste qui fait une déclaration des alertes ANSM MU-ACHAT-DX-007-01 : LBMMS-Procédure Ascendante de réactovigilance : déclaration à l'ANSM
Main d'œuvre (Personnel)	Communication techniciens/biologiste	2	4	3	24	Information des pannes/anomalies/non-conformités	Planning de validation des biologistes d'astreintes accessibles Listes de numéro de téléphones des différents biologistes accessibles

Sur ce type de méthode, l'analyse des risques met en évidence plusieurs points critiques dans le processus analytique qu'il paraît indispensable de vérifier grâce au dossier de vérification de méthode :

- les maintenances ;
- la déviation des résultats, détectable grâce aux contrôles de qualité. L'absence de déviation de l'appareil est mesurable grâce aux essais de répétabilité, de fidélité intermédiaire, de justesse, d'exactitude. La variabilité normale liée à la technique d'un résultat est mesurée grâce à l'incertitude de mesure ;
- prélèvement : Connaître les critères d'acceptabilité et de rejet d'un prélèvement : Interférences ;
- réactovigilance : Robustesse et fiabilité des réactifs.

b) Résultats des essais

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
Contrôle + kit	30	16,75	2,06	12	7,6	25	Conforme
Contrôle - kit	30	0,22	0,05	23	12,4	25	Conforme

Les valeurs de CV obtenues au cours de nos essais sont supérieures aux CV du fournisseur. Les CV du fournisseur pour la fidélité intermédiaire ont été calculé en passant 4 fois le même échantillon dans cinq séries différentes, cette analyse ne correspond pas à une mesure fiable de la fidélité intermédiaire. En sérologie infectieuse, les CV sont acceptables jusqu'à 25 %. En absence d'autres données disponibles nous retenons cette valeur. En raison de la variation sur le résultat d'analyse seul le résultat qualitatif sera rendu au prescripteur.

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE		
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>		
D'après les données du fournisseur :		
Spécificité : 100% Sensibilité : 82,5% VPN=1 VPP=0,93		
D'après les données bibliographiques :		
Article	Sensibilité	Spécificité
Lefevre et al., 1990 (95)	Sensibilité : 94% en syphilis primaire, 85% pour la syphilis secondaire, 82% pour la syphilis latente précoce.	/
Schmidt et al., 2000 (96)	Sensibilité globale : 86,5%	/
Pas de données sur la spécificité analytique		

Le principe de la technique basée sur une immunocapture permet d'assurer une spécificité maximale, indispensable en cas de syphilis congénitale. La prise en compte récente de la recherche d'IgM dans les EEQ syphilis ne nous a pas permis de vérifier l'exactitude de la méthode sur un nombre suffisant d'échantillons de contrôle.

COMPARAISON DE METHODES :																																											
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>																																											
Méthodes comparées :	Méthode CAPTIA NMT Syphilis IgM actuellement utilisée et méthode FTA IgM de détection par immunofluorescence sur lame précédemment utilisée (technique maison adaptée du FTA-Ig total TREPO-SPOT IF, BioMérieux ®)																																										
Nombre de mesures :	44 sérums dont 38 positifs en CMIA																																										
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	Méthode qualitative (CAPTIA) comparée avec une méthode semi-quantitative (FTA IgM) : on ne s'intéresse qu'à l'aspect qualitatif des deux méthodes, puisque c'est le seul qui concerne la méthode à accréditer.																																										
Méthode d'exploitation des résultats :	Etude des discordances																																										
Exploitation des résultats de comparaison :	Nous avons constaté 6 discordants sur 44 sérums testés, négatifs en FTA IGM et positif en ELISA IGM.																																										
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Numéro</th> <th>FTAIGM</th> <th>SYPIE</th> <th>RPR</th> <th>TPHA</th> <th>ELISA IGM</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>15225674201</td> <td>Négatif</td> <td>32.5</td> <td>Positif</td> <td>1/5120</td> <td>Positif</td> </tr> <tr> <td>15226166101</td> <td>Négatif</td> <td>13.83</td> <td>Positif</td> <td>1/80</td> <td>Positif</td> </tr> <tr> <td>15239790901</td> <td>Négatif</td> <td>27.84</td> <td>Positif</td> <td>1/2560</td> <td>Positif</td> </tr> <tr> <td>15243022201</td> <td>Négatif</td> <td>35.03</td> <td>Positif</td> <td>1/1280</td> <td>Positif</td> </tr> <tr> <td>15243952703</td> <td>Négatif</td> <td>29.89</td> <td>Positif</td> <td>1/640</td> <td>Douteux</td> </tr> <tr> <td>15244018301</td> <td>Négatif</td> <td>26.96</td> <td>Positif</td> <td>1/160</td> <td>Positif</td> </tr> </tbody> </table>	Numéro	FTAIGM	SYPIE	RPR	TPHA	ELISA IGM	15225674201	Négatif	32.5	Positif	1/5120	Positif	15226166101	Négatif	13.83	Positif	1/80	Positif	15239790901	Négatif	27.84	Positif	1/2560	Positif	15243022201	Négatif	35.03	Positif	1/1280	Positif	15243952703	Négatif	29.89	Positif	1/640	Douteux	15244018301	Négatif	26.96	Positif	1/160	Positif
	Numéro	FTAIGM	SYPIE	RPR	TPHA	ELISA IGM																																					
	15225674201	Négatif	32.5	Positif	1/5120	Positif																																					
	15226166101	Négatif	13.83	Positif	1/80	Positif																																					
	15239790901	Négatif	27.84	Positif	1/2560	Positif																																					
	15243022201	Négatif	35.03	Positif	1/1280	Positif																																					
	15243952703	Négatif	29.89	Positif	1/640	Douteux																																					
15244018301	Négatif	26.96	Positif	1/160	Positif																																						
Ces résultats démontrent une meilleure sensibilité de l'ELISA IgM par rapport au FTA IgM après vérification des données cliniques.																																											

INTERFERENCES	
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Hémolyse	Oui (données fournisseur). Pas de niveau d'hémolyse précisé dans la notice.
Turbidité	Oui (données fournisseur). Pas de niveau de turbidité précisé dans la notice.
Bilirubine, ictère	Oui (données fournisseur). Pas de niveau d'ictère précisé dans la notice.

Les sérums hémolysés, lactescents ou ictériques font l'objet d'une non-conformité.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS	
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés	Température et position dans le lieu de stockage
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	<p>Données fournisseurs : stockage entre 2 et 8°C, ne pas congeler, ne pas exposer à la lumière du soleil Entre 2 et 8°C, jusqu'au dernier jours du mois de la date de péremption inscrite sur le kit.</p> <p>Les bouteilles de réactif doivent être entreposées debout.</p> <p>Les cuvettes sorties de leur emballage doivent être conservées entre 2 et 8°C et jetées 4 semaines après ouverture.</p>

Toutes ces conditions sont respectées au laboratoire.

F/ Phase analytique Western blot

a) Maîtrise des risques et choix des points à vérifier

5M	Points critiques	O	G	D	C	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Matériel	Blotteur : EuroBlotMaster	2	3	3	18	Maintenances	NE-ANA-IT-061-01 : Utilisation de l'EuroBlotMaster- blot Lyme et Syphilis NE-ACHAT-IT-006-01 SERO Maintenances de l'EuroBlotMaster
	Réactifs	3	3	3	27	Gestion des dates de péremption	Gestion des stocks et inventaire lors du déstockage via le KMS
	Données	3	4	2	24	Intégrité des résultats saisis manuellement dans le SIL	Deuxième vérification de la rentrée manuelle des résultats au moment de la validation biologique à l'aide des feuilles de paillasse
Méthode	Utilisation correcte des pipettes	3	4	3	36	Risque de contamination : Inter-réactifs Inter-échantillons	Changement d'embout entre chaque patient Formation/habilitation/maintien des compétences.

	Identification des patients	3	4	2	24	La bonne étiquette du bon patient sur le bon tube : lecture correcte manuelle : Pas d'échanges de patients	Dernière vérification manuelle avant analyse et après analyse au moment du rangement en sérothèque : formation du personnel, procédure RPR
	Réactovigilance ascendante	2	4	3	24	Utilisation d'un réactif toujours conforme	Informier le biologiste qui fait une déclaration des alertes ANSM MU-ACHAT-DX-007-01 : LBMMS- Procédure Ascendante de réactovigilance : déclaration à l'ANSM
Main d'œuvre	Communication techniciens/ biologiste	3	3	3	27	Information des pannes/ anomalies /non-conformités	Planning de validation des biologistes d'astreintes accessibles Listes de numéro de téléphones des différents biologistes accessibles

L'analyse de risques montre que le principal point à maîtriser est la formation du personnel technique : lecture, pipetage des échantillons.

b) Résultats des essais

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>
D'après les données du fournisseur : Spécificité : 100% Sensibilité : 100% VPN=1 VPP=1

Les données fournies dans la notice fournisseur ont été résumées dans le tableau ci-dessus. L'absence d'interprétation des résultats de WB dans les EEQ syphilis ne nous a pas permis de vérifier l'exactitude de la méthode. Aucune donnée bibliographique n'est disponible pour décrire la sensibilité et la spécificité de ce test.

INTERFERENCES	
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Hémolyse	Non (données fournisseur)
Turbidité	Non (données fournisseur)
Bilirubine, ictère	Non (données fournisseur)
Médicaments	Pas de données fournisseur

Du fait de ces interférences indiquées dans la notice du kit, les sérums hémolysés ou lactescents font l'objet d'une non-conformité.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS	
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés	Données fournisseurs : stockage entre 2 et 8°C, ne pas congeler, ne pas exposer à la lumière du soleil.
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	Entre 2 et 8°C, jusqu'au dernier jours du mois de la date de péremption inscrite sur le kit.

Les fiches techniques des réactifs indiquent les conditions de conservation résumées dans le tableau ci-dessus. Les réactifs sont conservés selon les recommandations du fournisseur.

G/ Phase post-analytique

5M	Points critiques	O	G	D	C	Elément à maîtriser	Moyen de maîtrise
Matière	Conservation des échantillons après analyses : modalités et durée	1	1	4	4	Maîtrise des conditions de conservation des prélèvements (sérum/plasma) après analyses : mise en place d'une sérothèque Maîtrise des modalités d'élimination des échantillons	Métrieologie des enceintes froides et de la serobox Procédure spécifique de conservation et d'élimination des échantillons
	Elimination des déchets	1	4	1	4	Maîtrise des conditions d'éliminations des déchets	Procédure spécifique d'élimination des déchets en fonction du risque chimique ou infectieux Classeur Hygiène et sécurité pièce 0-03-01 Classeur Fiche de Sécurité (FDS) Architect pièce 0-03-40

Milieu	Organisation des locaux	1	2	1	2	Maîtrise de l'organisation du froid destiné à la conservation des échantillons après analyse.	Plan des locaux et des sérothèque
Matériel	Transmission des résultats	2	3	3	18	Maîtrise de la connexion Automate-SIL : Gestion de l'unité de rendu de résultat	Validation de la connexion Automate-SIL et de la connexion SIL-Serveur de résultats : Traçabilité des vérifications Information des cliniciens lors d'un changement technique ou lors de changement des modalités de rendu du résultat
	Conservation des résultats	1	2	1	2	Maîtrise de la sauvegarde des données	Procédure de sauvegarde et d'archivage des données : NE-ANA-DE-038-01 SERO-Guide d'utilisation de l'Architect annotés
Méthode	Validation des résultats	2	3	3	18	Maîtrise des critères de validation, de vérification des résultats	NE-RH-DE-032-01 SERO-Fiche de qualification ARCHITECT IT Gestion des résultats positifs sur Architect
Main d'œuvre	Capacité d'analyses des résultats	3	3	3	27	Maîtrise de la capacité d'analyse des résultats particuliers (résultats positifs faibles, résultats positifs sans antécédent) Prise en charge des résultats dits « invalides » Confrontation avec les antécédents	NE-RH-DE-032-01 SERO-Fiche de qualification ARCHITECT IT Gestion des résultats positifs sur Architect Procédure de validation biologique des sérologies bactériennes : codes commentaires systématiques sur les comptes rendus Habilitation avant prise de poste des techniciens et biologistes
	Contamination des prélèvements en sortie d'automates	1	2	4	8	Manipulations des tubes entre les différents portoirs Décantation en tube secondaires par l'OP	Limitations des risques avec le bouchage des tubes à la sortie des automates Décantation sous hottes par l'OP habilité en poste Cf : Procédure décantation OP

Au niveau de la phase post analytique, l'importance de l'interprétation des résultats pour la prise en charge des patients, a conduit à proposer des codes commentaires systématiques sur

les comptes rendus de résultats (disponibles en annexe 8). Le rendu d'un résultat chiffré ou uniquement l'interprétation qualitative peut être discuté avec les cliniciens.

Discussion

L'analyse critique de la bibliographie est indispensable à la rédaction des dossiers de vérification de méthode. La partie bibliographique de ce travail de thèse a permis de décrire et de comparer les performances des tests de diagnostic sérologique de la syphilis disponibles sur le marché. L'algorithme de dépistage de la HAS de 2015 (27) (figure 10), fondé sur les données du CNR, recommande l'utilisation d'un seul test tréponémique automatisé par immunoanalyse pour le dépistage. En cas de positivité, celui-ci doit être complété par un test non tréponémique avec titrage. Cette recommandation n'est à ce jour pas encore applicable puisque la NABM exige encore l'utilisation combinée d'un test tréponémique et d'un test non tréponémique en dépistage.

Cette première partie bibliographique a permis de conforter nos choix techniques : utiliser un TT automatisé en dépistage. A ce jour, pour être conforme à la NABM, le laboratoire a choisi de maintenir le titrage du TPHA en cas de dépistage positif et la réalisation du TNT en systématique. Le surcoût engendré (réactif et temps technique) peut remettre ce choix en question si la NABM n'évolue pas dans un avenir proche. L'exploitation des résultats sérologiques des deux dernières années confirment l'inutilité de maintenir le TNT en dépistage (résultats non rapportés dans ce travail).

Le déploiement de l'analyse de risque au sein du LBMMS est une priorité. En identifiant les points critiques sur l'ensemble du processus de réalisation d'un examen, le biologiste peut prioriser les actions à mettre en place. Un des avantages majeurs de la méthode AMDEC utilisée pour l'analyse de risque est l'amélioration de la communication entre les différents services et les différents types de postes. Ainsi, l'analyse de risque pré-analytique réalisée de manière collégiale a nécessité plusieurs heures de réunions mais pourra être jointe à l'ensemble des dossiers de validation de méthodes des trois disciplines du plateau de sérologie.

Pour la phase analytique, le choix des différents essais de vérification de méthode présentés dans ce travail a également reposé sur l'étude de risques. La criticité, évaluée pour les tests non automatisés dans le précédent travail de thèse de Céleste Lacour (1), a évolué du fait d'importants changements organisationnels du service de sérologie bactérienne : plateau multidisciplinaire, harmonisation des trois disciplines (bactériologie, virologie, parasitologie-mycologie). Auparavant, une petite équipe de techniciens spécialisés réalisait très

régulièrement ces analyses avec une grande expertise. Aujourd'hui ils sont pratiqués par un pool de techniciens plus important, récemment formés, qui ne réalise pas aussi souvent la manipulation et la lecture. Les études de variabilité inter techniciens montrent que ce risque lié à la compétence et à la fréquence de réalisation des techniques est aujourd'hui maîtrisé. La compétence du personnel devra par contre être réévaluée régulièrement (passage régulier au poste, réalisation des EEQ).

La constitution du dossier de vérification des méthodes de sérologie infectieuse ne rentre pas dans le cadre strict d'un dossier soit de type quantitatif, soit de type qualitatif. Les méthodes automatisées étant semi-quantitatives, elles fournissent un résultat de type qualitatif (positif/négatif) extrapolé à partir de la mesure d'une donnée quantifiable (signal continu). Quant aux méthodes qualitatives (RPR et TPHA) elles fournissent une réponse de type présence ou absence d'anticorps mais également un résultat « quantitatif » en dilution. Pour le COFRAC, une méthode semi-quantitative est assimilable à une méthode quantitative mais les essais à réaliser peuvent être limité, le résultat ne nécessitant pas la même précision. Ainsi, les tests de répétabilité et de fidélité intermédiaire sur les CIQ négatifs ne nous semblent pas pertinents. Le choix des tests et la définition des critères d'acceptabilité des méthodes en sérologie infectieuse mériteraient une discussion d'experts car nous ne disposons pas de recommandations de sociétés savantes pour les CV maximum acceptables. La conformité des résultats est évaluée uniquement au regard des spécifications des fiches techniques du fournisseur alors même que les conditions d'obtention de leurs résultats sont peu détaillées.

Les essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire pour les méthodes manuelles (RPR et TPHA) ont été effectués à minima puisqu'il s'agit d'un test qualitatif. Différentes discussions avec plusieurs auditeurs COFRAC ont montré des désaccords sur la pertinence de ces essais. Dans le cas des méthodes qualitatives, c'est surtout l'identification des facteurs d'influence qui est importante : respect strict du mode opératoire, maîtrise de la variabilité inter opérateur.

Pour les techniques automatisées, l'analyse collégiale des risques a permis de produire un document qui sera utile pour l'ensemble des dossiers de vérification de méthode des différents paramètres testés sur les automates. Pour l'automate Architect (CMIA), un seul test de contamination inter-essais répondra aussi pour l'ensemble des examens réalisés sur cet automate.

La gestion des CIQ est critique pour les deux techniques de sérologie automatisées (ELISA IgM et CMIA). Les critères d'acceptation des CIQ reposent sur les bornes d'acceptabilité des fournisseurs sans réelle gestion de périodes probatoires, jugée trop lourde et non satisfaisante. En effet, la mise en place de courtes périodes probatoires avec un nombre insuffisant de résultats de CIQ expose à une définition hasardeuse des cibles des cartes de contrôle et à un risque de rendu de résultats inexacts. Par approche Bayésienne, il est possible de mettre sous contrôle les méthodes en s'appuyant sur les données a priori du fournisseur telles que le CV maximum acceptable et la valeur cible a priori des CIQ de la trousse de réactif (97). Il est ainsi possible de se libérer de cette phase probatoire coûteuse. Cette approche utilisée dans les laboratoires d'hémostase du LBMMS a été récemment présentée aux biologistes et techniciens du plateau de sérologie infectieuse. Elle pourrait être mise en place pour les différentes techniques automatisées de sérologie infectieuse.

Une des limites de nos essais est le calcul de l'incertitude de mesure pertinent pour le TT automatisé en raison de l'absence de zone « douteuse ». Celui-ci n'a pas pu être réalisé de façon fiable en l'absence d'un nombre suffisant de valeurs d'EEQ proches des valeurs des CIQ. La proposition de Ly (90), de rajouter un commentaire nous semble plus pertinente qu'une estimation erronée de l'incertitude de mesure. Lorsqu'une valeur proche du seuil de positivité est obtenue, il pourrait être rajouté sur le compte rendu un commentaire du type : « compte tenu de la valeur obtenue et de l'incertitude de mesure, il est conseillé de contrôler la sérologie dans 2-3 semaines pour conclure sur le statut sérologique vis-à-vis de la syphilis ». Il n'existe pas de recommandation relative à l'incertitude de mesure en sérologie mais un laboratoire omettant d'utiliser la valeur de l'incertitude de mesure s'est vu notifié un écart par le COFRAC.

Il est important de souligner que chaque dossier de validation de méthode est rédigé par rapport à un type d'échantillon analysé, la matrice de l'échantillon ayant un impact sur la performance des méthodes. A ce titre, notre travail qui a porté spécifiquement sur l'examen de sérums devra faire l'objet d'un nouveau dossier pour les autres types d'échantillons tels que le sang de cordon et le LCR. Ces types d'échantillons ne sont décrits dans aucune des fiches techniques des fournisseurs (voir fiches techniques des fournisseurs des différents coffrets en annexes) à part pour le TPHA qui est validé pour les LCR. L'accréditation des méthodes relèvera alors d'une validation en portée B. Confrontés à la lourdeur de ces dossiers

de validation de méthodes, certains laboratoires ne réalisent plus certains examens spécialisés au risque de surcharger les centres de références ou les laboratoires de recours.

Ce travail n'est pas définitif, l'analyse de risque de l'ensemble du processus de réalisation devra être réévaluée périodiquement pour tenir compte des nouvelles dispositions mises en place à l'issue d'un plan d'action commun pour l'ensemble des disciplines du plateau de sérologie.

CONCLUSIONS

ISPB - FACULTE DE PHARMACIE

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : Mme Cécile Guillerme

Depuis les années 2000, la syphilis connaît une recrudescence en France. Le plateau de sérologie infectieuse de l'Institut des Agents Infectieux (IAI) des Hospices Civils de Lyon réalise aujourd'hui plus d'une centaine de sérologies syphilis par jour, avec en moyenne 10 % de dépistages positifs nécessitant des examens complémentaires. Ce sérodiagnostic repose sur des méthodes très diverses : automatisées, semi-automatisées et manuelles. Le dépistage de la syphilis au LBMMS associe un test tréponémique automatisé (Architect Syphilis TP) et un test non tréponémique manuel (RPR). En cas de positivité, ces tests sont complétés par un titrage manuel du RPR et un test tréponémique manuel titré (TPHA). La recherche des IgM par ELISA et les techniques de confirmation par Western Blot IgG et IgM sont réalisées en seconde intention dans des contextes cliniques particuliers (femmes enceintes, infections néonatales, patients en attente de greffe, suspicion de neurosyphilis...).

Obligatoire depuis 2008, l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012 permet d'améliorer l'organisation des structures et la maîtrise des méthodes de travail. D'ici 2020, l'ensemble des examens de biologie médicale réalisés au sein du Laboratoire de Biologie Médicale Multi-Site (LBMMS) devra être accrédité. En 2018, certains examens de sérologies bactériennes, virales et parasitaires seront ajoutés à la portée d'accréditation de sérologie infectieuse du laboratoire. Pour les sérologies bactériennes, le choix s'est porté sur le sérodiagnostic de la syphilis qui est l'un des examens les plus prescrits. Pour répondre aux exigences de l'accréditation, le laboratoire doit disposer de dossiers de validation de méthode pour l'ensemble des techniques de ce processus complexe. A la différence des examens biochimiques ou hématologiques dont la distribution suit une courbe de Gauss, les résultats sérologiques sont distribués de manière bimodale (résultat positif ou négatif) autour d'une valeur seuil. L'ensemble des techniques étudiées dans ce

travail sont en réalité semi-quantitatives : des tests qualitatifs effectués à plusieurs dilutions pour obtenir un titre (RPR et TPHA), ou des tests automatisés rendant un indice chiffré comparé ensuite à une valeur seuil pour finalement rendre un résultat qualitatif (positif, négatif, +/- douteux) (ELISA IgM et Architect Syphilis TP). Aucun exemple d'accréditation de méthode de ce type n'est pour l'instant proposé dans les référentiels du COFRAC ou de la discipline (SH GTA 04, QUAMIC).

L'objectif de notre travail a été de préparer le dossier l'accréditation de ces cinq techniques de sérodiagnostic (CMIA sur Architect, ELISA IgM Captia, RPR et TPHA manuels, Western Blot IgM et IgG). Pour cela nous nous sommes basés sur l'identification et la pondération des risques sur l'ensemble des sous-processus identifiés. Nous avons ensuite réalisé les tests de vérification appropriés, choisis en fonction de cette étude des risques. Nous avons ensuite rédigé les dossiers de validation de méthode selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012.

Pour ce qui concerne la phase pré-analytique, le risque majeur est l'identification des prélèvements. Ce risque, qui concerne l'ensemble des disciplines, fait l'objet d'actions menées à un niveau institutionnel. En ce qui concerne la phase analytique, pour les techniques manuelles, le point à maîtriser en priorité est la variabilité inter-opérateurs. Elle a été vérifiée lors d'essais de comparaisons entre techniciens et par la vérification de l'exactitude des résultats grâce aux contrôles de qualité externes. Pour les techniques automatisées, la gestion des plans de contrôles internes de qualité et la quantification de l'incertitude de mesure sont les points les plus critiques. Pour la gestion des contrôles internes, nous proposons de s'approprier la logique bayésienne qui serait applicable à l'ensemble des techniques automatisées de sérologie infectieuse automatisées. Cette approche permet de s'affranchir de la gestion de périodes probatoires lors de changement de lots de contrôles internes de qualité. Le calcul de l'incertitude est un autre point critique pour le test tréponémique automatisé. Ce calcul s'avère en effet indispensable pour les tests qui ne proposent pas de zone « douteuse » pour le rendu du résultat. Ce calcul d'incertitude a été obtenu avec les résultats des essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire réalisés en pratique au laboratoire. Faute de contrôles externes adaptés (c'est-à-dire avec des résultats proches du seuil), nous n'avons pu que l'estimer sur la base des résultats des contrôles internes. Il est donc indispensable de solliciter les différents organismes d'évaluation externe de la qualité afin qu'ils fournissent des matériels de contrôles et une exploitation des résultats permettant un calcul fiable de l'incertitude de mesure.

Au niveau de la phase post-analytique, l'importance de l'interprétation des résultats pour la prise en charge des patients, a conduit à proposer des codes de commentaires systématiques sur les comptes rendus de résultats. L'approche pragmatique des résultats qui constitue le cœur de l'approche AMDEC (Analyse des Modes de défaillance, de leurs Effet et de leur Criticité) nous a permis de rédiger les cinq dossiers de validation de méthode dans l'esprit de la norme NF EN ISO 15189 : 2012 pour l'ensemble des tests de dépistage et examens complémentaires du sérodiagnostic de la syphilis.

L'application de l'approche méthodologique utilisée pour l'élaboration de ces dossiers de validation de méthode est novatrice dans le champ de la sérologie infectieuse car non décrite dans les différents référentiels du Cofrac ou de la discipline (Quamic, SH GTA 04). Elle pourra être déclinée pour l'accréditation de l'ensemble des techniques de sérologie, manuelles ou automatisées.

Le Président de la thèse,
Nom : LAURENT

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 21 août 2017
Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

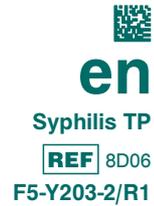


Professeure C. VINCIGUERRA



Annexes

Annexe 1: Fiche technique du test tréponémique automatisé Syphilis TP sur Architect



Syphilis TP

Customer Service: Contact your local representative or find country specific contact information on www.abbottdiagnostics.com

Package insert instructions must be carefully followed. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions in this package insert.

Key to symbols used			
REF	List Number	REAGENT LOT	Reagent Lot
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device	SN	Serial Number
LOT	Lot Number	REACTION VESSELS	Reaction Vessels
	Expiration Date	SAMPLE CUPS	Sample Cups
	Store at 2-8°C	SEPTUM	Septum
	Consult instructions for use	REPLACEMENT CAPS	Replacement Caps
	Manufacturer	ASSAY CD-ROM	Assay CD-ROM
		CONTROL NO.	Control Number

See **REAGENTS** section for a full explanation of symbols used in reagent component naming.



NAME

ARCHITECT Syphilis TP

INTENDED USE

The ARCHITECT Syphilis TP assay is a chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) for the qualitative detection of antibody to *Treponema pallidum* (TP) in human serum and plasma on the ARCHITECT *i* System as an aid to diagnosis of syphilis.

SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST

Syphilis is caused by infection with the bacterium TP¹ which can be transmitted congenitally or by sexual contact. The disease can evolve into a latent phase in which syphilis is clinically inapparent. Serological tests (nontreponemal and treponemal specific), in addition to patients' clinical history, are currently the primary methods for the diagnosis and management of syphilis.

BIOLOGICAL PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The ARCHITECT Syphilis TP assay is a two-step immunoassay for the qualitative detection of antibody to TP in human serum or plasma using CMIA technology with flexible assay protocols, referred to as Chemiflex. In the first step, sample, microparticles coated with recombinant TP antigens (TpN15, TpN17 and TpN47) and Assay Diluent are combined. Anti-TP antibodies present in the sample bind to the TP coated microparticles. After washing, the acridinium-labeled anti-human IgG and IgM conjugate is added in the second step. Following another wash cycle, Pre-Trigger and Trigger Solutions are added to the reaction mixture. The resulting chemiluminescent reaction is measured as relative light units (RLUs). A direct relationship exists between the amount of anti-TP antibodies in the sample and the RLUs detected by the ARCHITECT *i** optical system.

The presence or absence of anti-TP antibodies in the specimen is determined by comparing the chemiluminescent signal in the reaction to the cutoff signal determined from a previous ARCHITECT Syphilis TP calibration. If the chemiluminescent signal in the specimen is greater than or equal to the cutoff signal, the specimen is considered reactive for anti-TP.

For additional information on system and assay technology, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 3.

* *i* = immunoassay

REAGENTS

Reagent Kit, 100 Tests/500 Tests

NOTE: Some kit sizes are not available in all countries or for use on all ARCHITECT *i* Systems. Please contact your local distributor.

ARCHITECT Syphilis TP Reagent Kit (8D06)

- **MICROPARTICLES** 1 Bottle (6.6 mL per 100 test bottle/27.0 mL per 500 test bottle) Microparticles: TP (*E.coli*, recombinant) antigen coated microparticles in MES buffer. Minimum concentration: 0.08% solids. Preservatives: sodium azide and other antimicrobial agents.
- **CONJUGATE** 1 Bottle (5.9 mL per 100 test bottle/26.3 mL per 500 test bottle) Conjugate: Murine anti-IgG/anti-IgM acridinium-labeled conjugate in MES buffer with protein (bovine) stabilizer. Minimum concentration: (anti-IgG) 26.6 ng/mL / (anti-IgM) 1.34 ng/mL. Preservatives: sodium azide and other antimicrobial agents.
- **ASSAY DILUENT** 1 Bottle (10.0 mL per 100 test bottle/52.5 mL per 500 test bottle) Syphilis TP Assay Diluent containing MES buffer. Preservatives: sodium azide and other antimicrobial agent.

Other Reagents

ARCHITECT *i* Pre-Trigger Solution

- **PRE-TRIGGER SOLUTION** Pre-Trigger Solution containing 1.32% (w/v) hydrogen peroxide.

ARCHITECT *i* Trigger Solution

- **TRIGGER SOLUTION** Trigger Solution containing 0.35 N sodium hydroxide.

ARCHITECT *i* Wash Buffer

- **WASH BUFFER** Wash Buffer containing phosphate buffered saline solution. Preservatives: antimicrobial agents.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- **IVD**
- For *In Vitro* Diagnostic Use
- Package insert instructions must be carefully followed. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions in this package insert.

Safety Precautions

- **CAUTION:** This product requires the handling of human specimens. It is recommended that all human sourced materials be considered potentially infectious and handled in accordance with the OSHA Standard on Bloodborne Pathogens.² Biosafety Level 2³ or other appropriate biosafety practices^{4,5} should be used for materials that contain or are suspected of containing infectious agents.
- This product contains sodium azide; for a specific listing, refer to the **REAGENTS** section. Contact with acids liberates very toxic gas. This material and its container must be disposed of in a safe way.
- For product not classified as dangerous per European Directive 1999/45/EC as amended - Safety data sheet available for professional user on request.
- For information on the safe disposal of sodium azide and a detailed discussion of safety precautions during system operation, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 8.

Handling Precautions

- Do not use reagent kits beyond the expiration date.
- **Do not pool reagents within a kit or between reagent kits.**
- Before loading the ARCHITECT Syphilis TP Reagent Kit on the system for the first time, the microparticle bottle requires mixing to resuspend microparticles that have settled during shipment. For microparticle mixing instructions, refer to the **PROCEDURE, Assay Procedure** section of this package insert.
- **Septums MUST be used to prevent reagent evaporation and contamination and to ensure reagent integrity. Reliability of assay results cannot be guaranteed if septums are not used according to the instructions in this package insert.**
- To avoid contamination, wear clean gloves when placing a septum on an uncapped reagent bottle.
 - When handling conjugate vials, change gloves that have contacted human serum or plasma, since introduction of human IgG/IgM will result in a neutralized conjugate.
 - Once a septum has been placed on an open reagent bottle, **do not invert the bottle** as this will result in reagent leakage and may compromise assay results.
 - Over time, residual liquids may dry on the septum surface. These are typically dried salts which have no effect on assay efficacy.
- For a detailed discussion of handling precautions during system operation, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 7.

Storage Instructions

-  The ARCHITECT Syphilis TP Reagent Kit must be stored at 2-8°C in an upright position and may be used immediately after removal from 2-8°C storage.
- When stored and handled as directed, reagents are stable until the expiration date.
- The ARCHITECT Syphilis TP Reagent Kit may be stored on board the ARCHITECT *i* System for a maximum of 30 days. After 30 days, the reagent kit must be discarded. For information on tracking onboard time, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 5.
- Reagents may be stored on or off the ARCHITECT *i* System. If reagents are removed from the system, store them at 2-8°C (with septums and replacement caps) in an upright position. For reagents stored off the system, it is recommended that they be stored in their original trays and boxes to ensure they remain upright. **If the microparticle bottle does not remain upright (with a septum installed) while in refrigerated storage off the system, the reagent kit must be discarded.** For information on unloading reagents, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 5.

Indications of Reagent Deterioration

When a control value is out of the specified range, it may indicate deterioration of the reagents or errors in technique. Associated test results are invalid and samples must be retested. Assay recalibration may be necessary. For troubleshooting information, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 10.

INSTRUMENT PROCEDURE

- The ARCHITECT Syphilis TP assay file must be installed on the ARCHITECT *i* System from the ARCHITECT *i* Assay CD-ROM (Addition C) prior to performing the assay. For detailed information on assay file installation and on viewing and editing assay parameters, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 2.
- For information on printing assay parameters, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 5.
- For a detailed description of system procedures, refer to the ARCHITECT System Operations Manual.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION FOR ANALYSIS

Specimen Types

The specimen collection tubes listed below were verified to be used with the ARCHITECT Syphilis TP assay. Other specimen collection tubes have not been tested with this assay.

- Human serum (including serum collected in serum separator tubes)
- Human plasma collected in:
 - Potassium EDTA
 - Sodium citrate
 - Lithium heparin
 - CPD
 - Sodium heparin
- Liquid anticoagulants may have a dilution effect resulting in lower concentrations for individual patient specimens.
- The ARCHITECT *i* System does not provide the capability to verify specimen type. It is the responsibility of the operator to verify that the correct specimen types are used in the ARCHITECT Syphilis TP assay.

Specimen Conditions

- Do not use specimens with the following conditions:
 - heat-inactivated
 - grossly hemolyzed (> 500 mg/dL)
 - obvious microbial contamination
 - cadaver specimens or any other body fluids
- For accurate results, serum and plasma specimens should be free of fibrin, red blood cells, and other particulate matter. Serum specimens from patients receiving anticoagulant or thrombolytic therapy may contain fibrin due to incomplete clot formation.
- Use caution when handling patient specimens to prevent cross contamination. Use of disposable pipettes or pipette tips is recommended.
- For optimal results, inspect all specimens for bubbles. Remove bubbles with an applicator stick before analysis. Use a new applicator stick for each specimen to prevent cross contamination.

Preparation for Analysis

- Follow the tube manufacturer's processing instructions for serum and plasma collection tubes. Gravity separation is not sufficient for specimen preparation.
- Mix thawed specimens thoroughly by low speed vortexing or by inverting 10 times. Visually inspect the specimens. If layering or stratification is observed, continue mixing until specimens are visibly homogeneous.
- To ensure consistency in results, specimens must be transferred to a centrifuge tube and centrifuged at ≥ 10000 RCF (Relative Centrifugal Force) for 10 minutes before testing if
 - they contain fibrin, red blood cells, or other particulate matter,
 - they require repeat testing, or
 - they were frozen and thawed.

Transfer clarified specimen to a sample cup or secondary tube for testing.

- Centrifuged specimens with a lipid layer on the top must be transferred to a sample cup or secondary tube. Care must be taken to transfer only the clarified specimen without the lipemic material.

Storage

- If testing will be delayed, serum or plasma should be removed from the clot, red blood cells, or separator gel. Specimens may be stored for 24 hours at room temperature or up to 7 days at 2-8°C.
- Avoid multiple freeze/thaw cycles.

Shipping

- Before shipping specimens, it is recommended that specimens be removed from the clot, red blood cells, or separator gel.
- When shipping specimens, package and label specimens in compliance with applicable state, federal, and international regulations covering the transport of clinical specimens and infectious substances.
- Specimens may be shipped on wet or dry ice. Do not exceed the storage time limitations listed above.

PROCEDURE

Materials Provided

- 8D06 ARCHITECT Syphilis TP Reagent Kit

Materials Required but not Provided

- ARCHITECT *i* System
- ARCHITECT *i* **ASSAY CD-ROM** Addition C Version 3.0 or higher
- 8D06-02 ARCHITECT Syphilis TP Calibrator
- 8D06-11 ARCHITECT Syphilis TP Controls
- ARCHITECT *i* **PRE-TRIGGER SOLUTION**
- ARCHITECT *i* **TRIGGER SOLUTION**
- ARCHITECT *i* **WASH BUFFER**
- ARCHITECT *i* **REACTION VESSELS**
- ARCHITECT *i* **SAMPLE CUPS**
- ARCHITECT *i* **SEPTUM**
- ARCHITECT *i* **REPLACEMENT CAPS**
- Pipettes or pipette tips (optional)

For information on materials required for maintenance procedures, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 9.

Assay Procedure

- Before loading the ARCHITECT Syphilis TP Reagent Kit on the system for the first time, the microparticle bottle requires mixing to resuspend microparticles that have settled during shipment. After the first time the microparticles have been loaded, no further mixing is required.
 - **Invert the microparticle bottle 30 times.**
 - Visually inspect the bottle to ensure microparticles are resuspended. If microparticles remain adhered to the bottle, continue inverting the bottle until the microparticles have been completely resuspended.
 - **If the microparticles do not resuspend, DO NOT USE. Contact your local Abbott representative.**
 - Once the microparticles have been resuspended, place a septum on the bottle. For instructions on placing septums on bottles refer to the **Handling Precautions** section of this package insert.
- Load the ARCHITECT Syphilis TP Reagent Kit on the ARCHITECT *i* System.
 - Verify that all necessary assay reagents are present.
 - Ensure that septums are present on all reagent bottles.
- Order calibration, if necessary.
 - For information on ordering calibrations, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 6.
- Order tests.
 - For information on ordering patient specimens and controls and for general operating procedures, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 5.
- The minimum sample cup volume is calculated by the system and is printed on the Orderlist report. No more than 10 replicates may be sampled from the same sample cup. To minimize the effects of evaporation, verify adequate sample cup volume is present before running the test.

- Priority: 150 µL for the first ARCHITECT Syphilis TP test plus 30 µL for each additional ARCHITECT Syphilis TP test from the same sample cup.
- ≤ 3 hours on board: 150 µL for the first ARCHITECT Syphilis TP test plus 30 µL for each additional ARCHITECT Syphilis TP test from the same sample cup.
- > 3 hours on board: additional sample volume is required. For information on sample evaporation and volumes, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 5.
- If using primary or aliquot tubes, use the sample gauge to ensure sufficient patient specimen is present.
- Prepare calibrator and controls.
 - Mix ARCHITECT Syphilis TP Calibrator and Controls by gentle inversion before use.
 - To obtain the recommended volume requirements for the ARCHITECT Syphilis TP Calibrator and Controls, hold the bottles **vertically** and dispense 5 drops of calibrator or 5 drops of each control into each respective sample cup.
- Load samples.
 - For information on loading samples, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 5.
- Press RUN.
- For additional information on principles of operation, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 3.
- For optimal performance, it is important to perform routine maintenance as described in the ARCHITECT System Operations Manual, Section 9. Perform maintenance more frequently when required by laboratory procedures.

Specimen Dilution Procedures

Specimens cannot be diluted for the ARCHITECT Syphilis TP assay.

Calibration

- To perform an ARCHITECT Syphilis TP calibration, test Calibrator 1 in replicates of three. A single sample of each ARCHITECT Syphilis TP Control must be tested to evaluate the assay calibration. Ensure that assay control values are within the S/CO ranges specified in the control package insert. Calibrator 1 should be priority loaded.
- Once an ARCHITECT Syphilis TP calibration is accepted and stored, all subsequent samples may be tested without further calibration unless one or both of the following occur:
 - A reagent kit with a new lot number is used.
 - Controls are out of range.
- For detailed information on how to perform an assay calibration, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 6.

QUALITY CONTROL PROCEDURES

The recommended control requirement for the ARCHITECT Syphilis TP assay is that a single sample of each control be tested once every 24 hours each day of use for each reagent lot. If the quality control procedures in your laboratory require more frequent use of controls to verify test results, follow your laboratory-specific procedures. Ensure that assay control values are within the acceptable ranges specified in the control package insert. If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid and must be retested. Recalibration may be indicated.

Verification of Assay Claims

For protocols to verify package insert claims, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Appendix B.

RESULTS

The ARCHITECT *i* System calculates the cutoff (CO) using the mean chemiluminescent signal (RLU) from three replicates of the Calibrator 1 and stores the result.

Calculation

The ARCHITECT Syphilis TP assay calculates a result based on a cutoff determined by the following calculation.

- Cutoff (CO) = Calibrator 1 Mean RLU x 0.20
- S/CO = Sample RLU / Cutoff RLU
- The cutoff RLU is stored for each reagent lot calibration.

Interpretation of Results

- Specimens with S/CO values < 1.0 are considered nonreactive by the ARCHITECT Syphilis TP assay.
- Specimens with S/CO values ≥ 1.0 are considered reactive by the ARCHITECT Syphilis TP assay.

Flags

- Some results may contain information in the Flags field. For a description of the flags that may appear in this field, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 5.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- False positive results can be expected with any test kit. The proportion of these falsely reactive specimens is dependent upon the specificity of the test kit, specimen integrity, and the characteristics of the local population being screened.
- If the ARCHITECT Syphilis TP results are inconsistent with clinical evidence, additional testing is suggested to confirm the result.
- No diagnostic test provides absolute assurance that a sample does not contain low levels of antibodies to TP, such as those present at a very early stage of infection. Therefore, a negative result at any time does not preclude the possibility of exposure to infection with syphilis. Additional information may be required for diagnosis.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision

The ARCHITECT Syphilis TP assay precision is ≤ 15% for the positive control. Precision was determined as described in the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Protocol EP5-A2.⁶ Six samples consisting of four serum based panels and both of Syphilis TP Controls were assayed in replicates of two at two separate times per day for twenty days (n=80 for each sample), using three lots of reagents. Data from this study are summarized in the following table.*

ARCHITECT Syphilis TP Precision						
Sample	Lot	Mean (S/CO)	Repeatability		Within-laboratory	
			SD	%CV	SD	%CV
Negative Control	1	0.09	0.0028	3.1	0.0052	5.8
	2	0.09	0.0024	2.7	0.0080	8.8
	3	0.08	0.0026	3.3	0.0062	7.7
Positive Control	1	2.53	0.059	2.3	0.094	3.7
	2	2.48	0.097	3.9	0.134	5.4
	3	2.49	0.114	4.6	0.127	5.1
Panel 1	1	6.13	0.200	3.1	0.294	4.8
	2	6.59	0.241	3.7	0.330	5.0
	3	6.49	0.173	2.7	0.293	4.5
Panel 2	1	3.20	0.100	3.1	0.143	4.5
	2	3.37	0.098	2.9	0.154	4.6
	3	3.30	0.141	4.3	0.196	5.9
Panel 3	1	1.54	0.095	6.1	0.133	7.3
	2	1.60	0.068	4.3	0.101	6.3
	3	1.63	0.063	3.9	0.083	5.1
Panel 4	1	0.74	0.033	4.4	0.042	5.6
	2	0.79	0.032	4.1	0.040	5.0
	3	0.80	0.041	5.2	0.045	5.6

* Representative data; results in individual laboratories may vary from these data.

Specificity

- The ARCHITECT Syphilis TP assay demonstrated a specificity of ≥ 99.0% in a study testing serum and plasma specimens from the following population:
 - Randomly selected blood donors (BD)
 - Randomly selected hospitalized patients (HP)

The testing was performed at two clinical sites and one internal site. Of 1800 BD specimens, 4 specimens were confirmed falsely reactive by ARCHITECT Syphilis TP assay, after a resolution using TPPA and FTA-ABS or other confirmatory techniques. Of 696 HP specimens, 2 specimens were confirmed falsely reactive by ARCHITECT Syphilis TP assay, after a resolution using TPPA and FTA-ABS or other confirmatory techniques. The data from this study are summarized in the following table.*

**Specificity Results Using Random Blood Donors
and Hospitalized Patients**

Population	n	False Reactive	Specificity (%)
BD	1800	4	99.78
HP	696	2	99.71
Total	2496	6	99.76

* Representative data; results in individual laboratories may vary from these data.

Sensitivity

- The ARCHITECT Syphilis TP assay demonstrated a sensitivity of $\geq 99.0\%$ in a study testing samples that were concordantly positive in TPPA, or were confirmed as true positive after resolution of discordants by FTA-ABS or other confirmatory data. The data from this study are summarized in the following table.*

Sensitivity Result			
n	Reactive	Nonreactive	Observed Sensitivity
131	131	0	100.0%

* Representative data; results in individual laboratories may vary from these data.

Interference

Potential interference from elevated levels of triglycerides, bilirubin, protein and hemoglobin in the ARCHITECT Syphilis TP assay is < 0.4 S/CO difference on negative specimens and $< 20\%$ S/CO difference on positive samples with the following concentrations.

Test Compound	Test Concentration
Triglycerides	3000 mg/dL
Bilirubin	20 mg/dL
Protein	12 g/dL
Hemoglobin	500 mg/dL

BIBLIOGRAPHY

- Meyer JC. Laboratory Diagnosis of Syphilis. *Curr Probl Dermatol.* 1996; 24: 1-11.
- US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Bloodborne pathogens.
- US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.* 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office, January 2007.
- World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual.* 3rd ed. Geneva: World Health Organization; 2004.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline - Third Edition.* CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
- NCCLS. *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-Second Edition.* NCCLS document EP5-A2 (ISBN 1-56238-542-9). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.

ARCHITECT and Chemiflex are trademarks of Abbott Laboratories in various jurisdictions.

 **ABBOTT**
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580



Produced by DENKA SEIKEN CO., LTD. Tokyo, Japan, for ABBOTT Diagnostics Division

October 2009
© 2009 Abbott Laboratories

Annexe 2 : Fiche technique du test tréponémique TPHA

IMMUTREP® TPHA Ref OD221/OD071/OD081

Treponema pallidum haemagglutination test for the Serodiagnosis of Syphilis.

Store at 2°C to 8°C. DO NOT FREEZE.

For in-vitro diagnostic use only.

INTRODUCTION AND INTENDED USE

Syphilis is a complex disease which is normally sexually transmitted. The causative organism, *Treponema pallidum* cannot be grown on conventional laboratory culture media or in the tissue culture. Infection is normally diagnosed by detecting antibodies specific for *T. pallidum* in the patient's serum or CSF. Antibody becomes detectable at about 3-4 weeks following exposure, and may remain at detectable levels for long periods after treatment. Two groups of antibodies are formed; one reacting with the non-treponemal antigens used in the VDRL/Carbon Antigen and RPR tests, and the other reacting with the specific antigens of *T. pallidum*. Antibody to non-treponemal antigens is found (normally) in active disease and the levels subside after successful treatment. Specific antibody persists long after the infection has been successfully treated. It is necessary to test for both groups of antibody since the non-treponemal antibody may arise for reasons other than Syphilitic infection. **IMMUTREP TPHA** is a specific, sensitive passive haemagglutination test for the detection of antibodies to *Treponema pallidum* in serum or CSF.

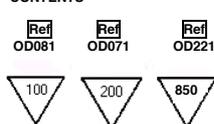
For professional use only.

PRINCIPLE OF THE TEST

IMMUTREP TPHA comprises *T. pallidum* sensitised formalised tanned fowl erythrocytes; unsensitised formalised tanned fowl erythrocytes, diluent and control sera. When diluted positive samples are mixed with sensitised erythrocytes, antibody to the sensitising antigen causes agglutination of the cells. The cells form a characteristic pattern of cells in the bottom of a microtitration plate well. In the absence of antibody, they form a compact button in the well.

This test has been calibrated to WHO Reference Serum for Serodiagnostic tests for Treponemal Infections- Ref 3-1980 +/- one double dilution to ensure the correct sensitivity.

CONTENTS



Test	Cells	8.5ml	2x8.5 ml	2x33 ml
Ref OD081				
Ref OD071				
Ref OD221				
Control	Cells	8.5ml	2x8.5ml	2x33 ml
Preserved fowl erythrocytes (approx 0.36% w/v) in buffer. Working Strength.				
DIL		20ml	2x20ml	3x57ml
Diluent. Selected rabbit serum (approximately 0.4%) in buffer. Working Strength.				
Control	+	1ml	1ml	9ml
Positive Control. Serum prediluted (1/20) in buffer containing antibodies to <i>T. pallidum</i> . Working Strength.				
Control	-	1ml	1ml	9ml
Negative Control. Serum prediluted (1/20) in buffer free of antibodies to <i>T. pallidum</i> . Working Strength.				
CELL DROPPERS		2	2	0
INSTRUCTION LEAFLET		1	1	1

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Dynex M24A U-well microtitration plates are recommended. Microtitration droppers to deliver 25µl or Micropipettes to deliver 10, 25, 75, 100µl and 190µl volumes.

Note: 75µl droppers do not fit and are not supplied for bottles in the 850 Test Kit.

PRECAUTIONS

IMMUTREP TPHA reagents contain material of human origin and have been tested and confirmed negative for HCV, HIV I and HIV II antibodies, and HBSAg by approved procedures at single donor level. Because no test can offer complete assurance that products derived from human source will not transmit infectious agents it is recommended that the reagents within this kit be handled with due care and attention during use and disposal. All reagents should, however, be treated as potential biohazards in use and for disposal. Do not ingest.

IMMUTREP TPHA reagents do not contain dangerous substances as defined by current UK Chemicals (Hazardous Information and Packaging for Supply) regulations. All reagents should, however, be treated as potential biohazards in use and disposal. Final disposal must be in accordance with local legislation.

IMMUTREP TPHA reagents contain 0.095% sodium azide as a preservative which may be toxic if ingested. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive salts. On disposal, flush with large quantities of water.

STORAGE

Reagents must be stored upright at temperatures between 2°C to 8°C.

The kit will perform within specification until the stated expiry date as determined from date of product manufacture and stated on kit and components. Expiry date is the last day of the month on the bottle and the kit label. Do not use reagents after the expiry date.

Exposure of reagents to excessive temperatures should be avoided. Do not expose to direct sunlight.

DO NOT FREEZE ANY OF THE REAGENTS as this will cause irreversible damage.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Obtain a sample of venous blood from the patient and allow a clot to form and retract. Centrifuge clotted blood sample and collect clear serum. Fresh serum samples are required.

Obtain a sample of CSF from the patient.

Do not use haemolysed, contaminated or lipaemic samples for testing as this will adversely affect the results.

Samples may be stored at 2°C to 8°C for up to 48 hours prior to testing. If longer storage is required, store at -20°C for up to 1 year. Thawed samples must be mixed prior to testing.

Do not repeatedly freeze-thaw the specimens as this will cause false results.

REAGENT PREPARATION

All reagents should be brought to room temperature (20°C to 25°C) and fully resuspended prior to use. Do not induce foaming.

The Cell Droppers are provided for use with the Test and Control Cell suspensions. These droppers dispense 75µl drops and these integral droppers should be placed on their corresponding suspensions as follows:

Red Dropper – Test Cells
White Dropper – Control Cells

LIMITATIONS OF USE

The use of samples other than serum or CSF have not been validated in this test.

No serological haemagglutination test can discriminate between antibody due to **T.pallidum** infection and antibody due to infection with other pathogenic treponemes, i.e. **T.pertenuis** and **T.carateum**.

No other interfering factors have been specifically identified however positive results should be confirmed, eg. by FTA-Abs, and complemented by clinical findings.

There is no reuse protocol for this product.

A low or suspected positive result should be re-assessed. Diagnosis should not be made solely on the findings of one clinical assay. When making an interpretation of the test it is strongly advised to take all clinical data into consideration.

The test may also be negative in early active Syphilis or in late latent Syphilis. To complete the profile of results to aid the physician, it is also recommended that a VDRL/Carbon Antigen or RPR test is performed on the patient's sample since these tests will detect an active case of Syphilis. OMEGA's IMMUTREP VDRL, IMMUTREP CARBON ANTIGEN and IMMUTREP RPR are available for this purpose.

ASSAY PROCEDURE

Allow samples and reagents to reach room temperature and ensure that samples and all reagents are fully resuspended before use. Samples do not require any pretreatment.

QUALITATIVE (SCREENING) PROCEDURE

Each test requires 4 wells of a microtitre plate.

1. Dispense Diluent into the microtitre plate as follows:
 - 25µl in rows 1, 3 & 4 and 100µl in row 2.
 2. Dispense 25µl of each sample into a well in row 1.
 - Mix well and transfer 25µl from row 1 to row 2.
 - Mix well and transfer 25µl from row 2 to row 3.
 - Mix well and discard 25µl from row 3.
 - Transfer 25µl from row 2 to row 4.
 - Mix well and discard 25µl from row 4.
 3. Add 75µl of well mixed Control Cells to row 3.
 4. Add 75µl of well mixed Test Cells to row 4.
 - Tap plate gently to mix.
 - The final dilutions in row 3 and 4 are 1/80.
 5. Cover and let stand at room temperature for 45 to 60 minutes (alternatively the plates can be left overnight).
 6. Examine for agglutination patterns.
- Note: Kit controls are prediluted and should be added directly into individual wells in row 3 and 4 (no diluent required).

ALTERNATIVE ONE WELL DILUTION PROTOCOL FOR SCREENING.

1. Dispense 190µl of diluent into row 1
2. Dispense 10µl of sample to row 1 and mix
3. Discard 150µl from row 1
4. Add 25µl from row 1 to row 2
5. Add 75µl of well mixed Test Cells to row 1
 - Add 75µl of well mixed Control Cells to row 2
 - Tap plate gently to mix.
 - The final dilutions in wells in rows 1 and 2 are 1/80.
6. Cover and let stand at room temperature for 45 to 60 minutes (alternatively the plates can be left overnight).
7. Examine for agglutination patterns.

QUANTITATIVE PROCEDURE

If it is intended to routinely quantitate positive results the screening procedure may be modified by omitting the Control Cells and preparing only one final dilution. Most samples will be negative or genuinely positive, and the Control Cells may be used in the quantitative procedure below.

1. Prepare dilutions in a microtitre plate as follows:
 - For each sample, dispense 25µl of diluent into each well in one column of the plate. For titrations of controls dispensing should commence from row 3.
 - Transfer 25µl from row 2 of the original screening plate to row 1 of the quantitative plate.
 - Mix and discard 25µl.
 - Transfer 25µl from row 2 of the original screening plate to row 2 of the quantitative plate.
 - Prepare 25µl doubling dilutions from row 2 to row 8 (for controls doubling dilutions should commence from row 3).
2. Add 75µl of well mixed Control Cells to row 1.
3. Add 75µl of well mixed Test Cells to rows 2 to 8.
4. Mix by gentle tapping.
 - The final dilutions in row 1 and row 2 are 1/80.
5. Cover and let stand for 45 to 60 minutes at room temperature (or overnight).

Note: Kit controls are prediluted and 25µl should be added directly into individual wells in rows 1, 2 and 3 with doubling dilutions commencing from row 3 (no diluent is required in row 1 or row 2).

RESULTS AND INTERPRETATION

Kit controls or known level value samples should be tested with each test run. The kit negative control should give a negative result after 45 minutes. The kit positive control should give a positive result after 45 minutes. If levels of controls or users known samples do not give expected results, test results must be considered invalid.

Screening Procedure

Agglutinated cells form an even layer over the bottom of the well. Non-agglutinated cells form a compact button in the centre of the well. Weakly agglutinated cells form a characteristic ring pattern. Agglutination of the Test Cells but not the Control Cells indicates the presence of specific antibody to **T.pallidum**. Absence of agglutination indicates that antibody is below the limit of detection of the system. Do not use the Control Cell pattern as an indication of a negative result since they give a more compact button of cells.

Agglutination of the Control Cells as well as the Test Cells indicates the presence of anti-cell antibody. In this event the test is not valid and should be repeated.

Should the test not be valid the test should be repeated after first performing an absorption of the test serum. To achieve this, dilute the test serum 1/4 with Control Cells and allow to stand at room temperature for 45-60 minutes. After centrifuging the sample (1000rpm/5 mins) dilute the supernatant 1/5 in Diluent. Test this dilution directly, without any further dilution, using Test and Control Cell suspensions. A confirmatory FTA ABS test is also recommended.

Quantitative Procedure

As screening procedure. The titre is the highest dilution showing agglutination. The Reactive Control serum should produce a titre within one doubling dilution of 1/2560. The starting dilution for the quantitative procedure is 1/80. Titres of 1/164000 have been detected with **IMMUTREP TPHA** with no prozone (Hook) effect.

TROUBLESHOOTING

Hemagglutination tests are sensitive to the effects of heat, direct sunlight and vibration. Keep away from such sources during test incubation periods.

Do not allow saliva to contaminate the samples or reagents as this will cause erroneous results.

Use a separate disposable tip for each sample to prevent cross contamination.

Replace caps on all reagents immediately after use.

Do not allow reagent to run down the sides of the well. Prior to the start of the assay bring all reagents to room temperature (20°C to 25°C). Gently mix all reagents by gentle inversion or swirling.

For use by operatives with at least a minimum of basic laboratory training.

Do not use damaged or contaminated kit components.

Kit components are matched and should not be interchanged.

EVALUATION DATA

Samples were tested at a European reference centre. These samples originated from Antenatal Clinics, Genito – Urinary Medical Clinical and Public Health Laboratories.

	Positive Samples	Negative Samples	Total
Syphilis Positive	406	6	412
Syphilis Negative	3	669	672
	409	675	1084

This study demonstrates:

A sensitivity of 98.5%

A specificity of 99.6%

Reproducibility of **IMMUTREP TPHA** is 100% (+/- one doubling dilution).

REFERENCES

1. Tomizawa, T. and Kasamatsu, S. Jap. J. Med. Sci. Biol. 19,305 (1966).
2. Rathlev, T., Brit. J. Vener. Dis., 43,181 (1967).
3. Tringali, G., Ann. Sc. Pav., 12,311 (1970).
4. Uete, T., Fukazawa, S., Ogi, K. and Takeuchi, Y., Brit., J. Vener. Dis., 47,73 (1971)
5. Garner, M.F., Backhouse, J. L., Daskalopoulos, G. and Walsh, J.L., 48,474 (1972)
6. Johnston, N.A., Brit. J. Vener. Dis. 1972, 48,474 (1972)
7. Sequeira, P.J.L. and Eldridge, A. E., Brit. J. Vener. Dis. 43,242 (1973)
8. Lensinski, J., Krach, J. and Kadziewics, E., Brit. J. Vener. Dis. 50, 33 (1974)
9. O'Neill, P., Warner, R.W. and Nicol, C.S., Brit. J. Vener. Dis. 49,427 (1973)
10. Young, H., Hennischen, C. and Robertson, D.H.H., Brit. J. Vener. Dis. 50,341 (1975)

8010 Issue 5 Revised January 2012

© Omega Diagnostics Ltd 2012.



OMEGA DIAGNOSTICS LTD.
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001 AND ISO 13485 CERTIFIED COMPANY

Annexe 3 : Fiche technique du test non tréponémique RPR

IMMUTREP® RPR Ref OD051/OD061 Rapid Plasma Reagin Card test for the Serodiagnosis of Syphilis. Store at 2°C to 8°C. DO NOT FREEZE. For in-vitro diagnostic use only.

INTRODUCTION AND INTENDED USE

IMMUTREP RPR is for use in the non-treponemal flocculation test for the qualitative and semi-quantitative determination of reagin antibodies in serum or plasma. For professional use only.

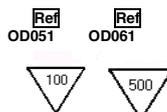
PRINCIPLE OF THE TEST

IMMUTREP RPR is a modified form of IMMUTREP VDRL ANTIGEN which contains carbon particles to improve the visual reading of the result. When binding occurs between cholesterol/ cardiolipin/ lecithin in the reagent and the reagin antibodies in the sample, the results can be seen macroscopically in the form of black clumps. No visual flocculation indicates a negative result.

The test can be performed on heated, unheated serum or plasma and is therefore very versatile. IMMUTREP RPR can be used in the manual slide test and on single and multi-channel autoanalyser instruments that are used in blood banks for mass Syphilis screening of routine blood bank donations.

This test has been calibrated to WHO Reference Serum for Serodiagnostic tests for Treponemal Infections- Ref 3-1980.

CONTENTS



RPR	Ag
-----	----

Suspension of Carbon approximately 0.2g/L, 0.003% Cardiolipin, 0.02% Lecithin and 0.09% Cholesterol . Working Strength.

CONTROL	+	0.5ml	0.5ml
---------	---	-------	-------

Positive Control. Serum containing antibodies against Treponema Pallidum. Working Strength.

CONTROL	-	0.5ml	0.5ml
---------	---	-------	-------

Negative Control. Serum free of antibodies against Treponema Pallidum. Working Strength.

STIRRERS	100	500
DISPOSABLE TEST SLIDES	1x10	5x10
INSTRUCTION LEAFLET	1	1
DISPENSING BOTTLES (PLASTIC)	1	2
DISPENSING NEEDLE	1	2

MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

Micropipettes capable of dispensing 50µl and 16µl.
 Test tubes 75 x 12mm
 Rotator set at 100 r.p.m.
 Isotonic saline: 0.9% NaCl

PRECAUTIONS

The serum controls are of human origin and have been tested for and confirmed negative for HCV, HIV I and HIV II antibodies, and HBSAg by FDA approved procedures. Because no test can offer complete assurance that products derived from human source will not transmit infectious agents it is recommended that the reagents within this kit be handled with due care and attention during use and disposal. All reagents should, however, be treated as potential biohazards in use and for disposal. Do not ingest.

IMMUTREP RPR Reagents do not contain dangerous substances as defined by current UK Chemicals (Hazardous Information and Packaging for Supply) regulations. All reagents should, however, be treated as potential biohazards in use and disposal. Final disposal must be in accordance with local legislation.

IMMUTREP RPR contains 0.095% sodium azide as a preservative which may be toxic if ingested. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive salts. On disposal, flush with large quantities of water.

STORAGE

Reagents must be stored at temperatures between 2°C to 8°C.

The kit will perform within specification until the stated expiry date as determined from date of product manufacture and stated on kit and components. Expiry date is the last day of the month on the bottle and the kit label. Do not use reagents after the expiry date.

Exposure of reagents to excessive temperatures should be avoided. Do not expose to direct sunlight.

DO NOT FREEZE ANY OF THE REAGENTS as this will cause irreversible damage.

Do not store the test cards in the refrigerator, store at room temperature and ensure that the test circles are not touched by the fingers. This could leave oily deposits on the test surface which might invalidate the test results.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum:

Obtain a sample of venous blood from the patient and allow a clot to form and retract. Centrifuge clotted blood sample and collect clear serum. Fresh serum samples are required.

Plasma:

Obtain a sample of venous blood from the patient and add to plasma collection vial. Centrifuge sample and collect clear plasma. Fresh plasma samples are required.

Do not use haemolysed, contaminated or lipaemic serum or plasma for testing as this will adversely affect the results.

Serum may be stored at 2°C to 8°C for up to 48 hours prior to testing. If longer storage is required, store at -20°C for up to 6 weeks. Thawed samples must be mixed prior to testing.

Do not repeatedly freeze-thaw the specimens as this will cause false results.

DO NOT DILUTE THE PATIENT SERUM PRIOR TO USE IN THE QUALITATIVE TEST.

REAGENT PREPARATION

All reagents should be brought to room temperature (20°C to 25°C) and mixed gently prior to use. Do not induce foaming.

Shake the Antigen suspension well to ensure a homogeneous suspension before use. The kit contains an antigen dispensing system comprising a plastic bottle and a blunt ended 20 ga. needle.

For use, remove the cap from the plastic bottle and fit the needle hub securely on the nozzle of the bottle. To fill the bottle, squeeze the vial and insert the end of the needle into the well shaken antigen suspension. Then allow the plastic bottle to expand and this will then allow the antigen up into the bottle. Storage of the antigen in the plastic bottle reduces the shelf life of the product. It is recommended that any remaining antigen in the bottle after a day's testing should be returned to the original glass vial. The plastic bottle/needle dispenser should then be rinsed through with distilled water and air dried.

LIMITATIONS OF USE

The use of samples other than serum or plasma has not been validated in this test.

There is no reuse protocol for this product.

A low or suspected positive result should be re-assessed. Diagnosis should not be made solely on the findings of one clinical assay. When making an interpretation of the test it is strongly advised to take all clinical data into consideration.

False positive reactions are known to occur with RPR tests when the patient has infections other than Syphilis. If a positive RPR result is found, a specific treponemal test should be performed. OMEGA manufacture and supply IMMUTREP TPHA for the detection of specific anti-treponemal antibodies.

ASSAY PROCEDURE

Manual Slide Method

1. Dispense one drop (50µl) of patient sample onto a glass slide or RPR Test Card. Spread to cover the entire circle.
2. Spread the sample over the entire area of the test circle using the flat end of the pipette/stirrer.
3. Using the dispensing bottle/needle assembly allow one free-falling drop (16µl) of antigen to drop onto the test specimen. Do not restir.
4. Rotate the test card at 100 r.p.m. for 8 minutes only on an automatic rotator.
5. Immediately after the 8 minutes inspect the result visually in good light.

Semi Quantitative Method

1. Using isotonic saline prepare serial dilutions (50µl) of the patients serum (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 and so on)
2. Transfer one drop of each serum dilution to the test circle on the slide.
3. Add one drop (16µl) of shaken antigen to the sample. (There is no need to mix these two components).
4. Rotate the slide/card for 8 minutes at 100 r.p.m.
5. Immediately after the 8 minutes, inspect the result visually in good light.

RESULTS AND INTERPRETATION

Kit controls or known level value samples should be tested with each test run. The kit negative control should give a negative result after 8 minutes. The kit positive control should give a positive result at a titre of 1/4 +/- one double dilution after 8 minutes. If levels of controls or users known samples do not give expected results, test results must be considered invalid.

Qualitative Method

Medium and large aggregates	Reactive
Finely dispersed aggregates	Weak Reactive
No aggregates visible, smooth grey appearance	Non Reactive

Semi-Quantitative Method

The titre is the last dilution that produces a reactive result. Titres of 1/128 have been detected with IMMUTREP RPR with no prozone (Hook) effect.

TROUBLESHOOTING

Use a separate disposable tip for each sample to prevent cross contamination.

Replace caps on all reagents immediately after use. Prior to the start of the assay bring all reagents to room temperature (20°C to 25°C). Gently mix all reagents by gentle inversion or swirling.

For use by operatives with at least a minimum of basic laboratory training.

Do not use damaged or contaminated kit components.

EVALUATION DATA

In 1995 the Syphilis Reference Centre at Bristol Public Health Laboratory in the UK assessed the performance of IMMUTREP RPR.

IMMUTREP RPR

	+	-
Negative Samples	0	645
Positive Samples	30	0

All samples tested with IMMUTREP RPR gave the correct result.

REFERENCES

1. McGrew, B.E, et al., Amer. J. Med Tech., 34, 634 (1968).
2. McGrew, B.E, et al., Amer. J. Clin Path, 50, 52 (1968).
3. Portnoy, J. and Garson, W. Pub. Hlth. Rep. 75, 985-988 (1960).
4. Portnoy, J., Brewer, J.H. and Harris, A.D., U.S. Pub. Hlth. Rep. 77, 654 (1962).
5. Manual of tests for Syphilis, PHS Publications, No. 411, U.S. Govt. Printing Office (1969).

8002A Issue 4A Revised March 2008.

© Omega Diagnostics Ltd 2008.



OMEGA DIAGNOSTICS LTD.
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odi@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 900 ISO 13485 CERTIFIED COMPANY

Annexe 4 : Fiche technique du test ELISA IgM



CAPTIA™ NMT Syphilis IgM

REF 2329360

CAPTIA™ NMT Syphilis IgM 96

Pour d'autres langues
Für andere Sprachen
Para otras lenguas
Per le altre lingue
Dla innych języków

Para outras línguas
Για τις άλλεςλώσσες
For andra språk
For andre språk
For andre språk



www.trinitybiotech.com

INTENDED USE

This kit is intended for the detection of IgM specific antibodies to *Treponema pallidum* (*T. pallidum*) in human serum or plasma and is used in the differential diagnosis of syphilis infections.

SUMMARY AND PRINCIPLE

In infections with the spirochaete *T. pallidum* the primary response to the organism is the production of IgM class antibodies. This is followed by the appearance of IgG class antibodies which are detectable throughout all stages of the disease. Specific IgM antibodies tend to decline and eventually disappear – their presence is therefore a useful indicator of whether an infection is recent.

In conjunction with screening tests such as the CAPTIA™ Syphilis TA EIA (Ref: 2322170/2322171) the CAPTIA™ NMT Syphilis IgM can be used to aid in the diagnosis and investigation of cases of syphilis.

Maternal syphilis can be transmitted to the unborn foetus. IgM class antibodies cannot pass through the placenta, therefore detection of *T. pallidum*-specific IgM antibodies in neonatal blood samples can aid in the diagnosis of congenital syphilis.

Microtitre plate wells are supplied coated with anti-human IgM antibodies. IgM specific antibodies to *T. pallidum* present in a sample of plasma or serum will bind when the sample is incubated in the coated well. After unbound material is washed away, peroxidase-conjugated treponemal antigens are added, and in turn attach to any specific human antibodies captured. After another washing step, a substrate/chromogen mixture is added to the wells, and the presence of the enzyme label is revealed by a colour change in the chromogen.

The optical absorbance of each well is read at appropriate wavelengths, and compared to controls to determine the presence or absence of anti-*Treponema pallidum* IgM antibodies.

REAGENTS

REAGENT DESCRIPTION

R1: Plate	Polystyrene coated with anti-human IgM. 96 wells in 12 strips of 8. 1 plate per kit.
R2: Sample buffer	Buffer containing protein and surfactant. Red. 20 mL.
R3: Conjugate	11x concentrate. <i>T. pallidum</i> antigens, peroxidase conjugated. Colourless/Pale Blue. 1.2 mL.
R4: Conjugate buffer	Buffer containing surfactant and stabilisers. Blue. 12 mL.
R5: Wash	20x concentrate. Saline containing surfactant. Colourless. 125 mL.
R6: Positive control	Positive human serum. 0.5 mL. Orange.
R7: Negative control	Negative human serum. 0.5 mL. Yellow.
R8: Substrate	Urea peroxide and tetramethyl benzidine. Pink. 12 mL.
R9: Stop solution	0.5M H ₂ SO ₄ . Colourless. 12 mL.

Instructions for Use

Bag for storing unused wells

ADDITIONAL MATERIALS REQUIRED

- Properly calibrated and maintained pipetting devices capable of delivering volumes of 10, 50 and 100 µL (specimens and reagents) and approx 300 µL (wash fluids).
- Plate or strip reader to read at 450 nm, 550 nm and 620 nm.
- 37°C incubator.
- Plate shaker.

INSTRUMENTS

Captia™ Syphilis NMT IgM may be automated for both liquid handling and result interpretation. A variety of systems have been used for this, please consult the manufacturers of both the kit and the automation system for advice on automation.

Equipment should be able to support the following tolerances:

Volume dispensed	+/- 10%
Incubation temperature	+/- 2°C
Incubation time	+/- 2 minutes

STORAGE AND STABILITY

- All reagents as supplied may be used up to their expiry date if stored at 2-8°C in their original containers.
- Store bottles upright.
- Do not freeze.
- Do not expose substrate to direct sunlight.
- Diluted Wash is stable for 4 weeks at 2-8°C.
- Coated strips removed from the original packaging and stored in the bag provided at 2-8°C may be used for up to 4 weeks after opening.
- Make up sufficient diluted conjugate only for the number of strips to be run; the diluted conjugate is stable for 12 hours.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

- Serum or plasma (collected into EDTA, sodium citrate or heparin) samples may be used.
- Specimens may be stored at 2-8°C for up to 7 days before testing.
- Specimens needing longer storage should be frozen at -20°C or lower and be well mixed after thawing.
- Samples that are haemolysed, icteric or lipaemic may be run in the assay but the sample indicator system may not be relied upon.
- Samples that have been heated to 56°C for viral inactivation may be used in the assay.

WARNING AND PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.**
- For professional use only.
- This test is designed to be used by appropriately trained laboratory personnel in the clinical laboratory.
- All human materials used have been tested and found negative for indicators of HIV, Hepatitis B, and Hepatitis C infection. They should nevertheless be regarded as potentially infectious and treated and discarded according to applicable regulations for such materials.
- Blood samples may contain pathogenic organisms. Gloves should be worn throughout, and all discarded materials sterilised by appropriate methods.
- All equipment should be properly maintained and calibrated according to the manufacturers' instructions.
- Do not combine or interchange reagents from kits with different lot numbers.
- Ensure that bottle caps are returned to the correct bottles.
- Do not use the kit after its expiry date.

PROCEDURE

PROCEDURAL NOTES AND PRECAUTIONS

- Bring all reagents and specimens to room temperature prior to use.
- Washing must be thorough, with complete filling and emptying of the wells at each cycle.
- The Negative control must be tested three times with each lot of tests, and the Positive control twice.
- Immediately after use return to recommended storage conditions.
- Take as many strips of wells as are needed for the number of samples to be tested, plus 5 wells for the controls. Store unused strips in the re-sealable plastic bag provided, and return to storage at 2-8°C.

REAGENT PREPARATION

- Dilute wash (R5) 1 in 20 with distilled or deionised water prior to use, plus the volume necessary for filling tubing, priming pumps, etc.
- Dilute conjugate (R3) 1 + 10 in Conjugate buffer (R4) (50 µL + 500 µL per 10 wells).
- Only prepare sufficient conjugate for the number of samples and controls being run; 50 µL of diluted conjugate is added per well. Discard any excess diluted conjugate after 12 hours. For example, for 2 strips add 100 µL concentrated conjugate to 1 mL conjugate buffer. Only dilute the quantity necessary for the assays.

TEST PROCEDURE

- Add 100 µL **sample buffer (R2)** to each well followed by 10 µL of sample or control (R6 or R7) into each well as appropriate. Ensure the contents of the wells are mixed after sample addition.
- Incubate at 37°C for 30 minutes, covered to reduce evaporation.
- Aspirate the well contents and wash x5 with working strength wash ensuring complete filling and emptying at each cycle. If required, finally tap the inverted plate sharply on a layer of absorbent paper to remove any residual fluid.
- Add 50 µL of **diluted conjugate (R3 + R4)** to each well.
- Incubate at 37°C for 60 minutes, covered to reduce evaporation.
- Wash x5 as described in step 3.
- Add 50 µL **substrate/chromogen (R8)** mixture to each well.
- Incubate at 18-25°C for 30 minutes, **protected from light**.
- Add 50 µL **stop solution (R9)** to each well, and mix (blue colour changes to yellow).
- Within 10 minutes, read and record the absorbance of each well at 450 nm, preferably with a reference reading at 600-630 nm to eliminate the effects of any optical imperfection in the wells.

Verification of Sample and Reagent Addition

Visually:

Sample buffer will change from red/pink to clear/yellow upon addition of sample. Quality control sera which have been diluted during their manufacture may not give this colour change. The colour change is not quantitative for the amount of sample added.

Automatic Reading:

Addition of the samples and controls is verified by reading at 550 nm after the addition sample buffer and 450 nm after the addition of sample. An increase in optical density when compared to the blank reading of the sample addition buffer will occur for wells that have had sample added.

Addition of conjugate is verified by reading at 550 nm, a well with conjugate added must have an absorbance greater than 0.080.

Addition of substrate is verified by reading at 550 nm, a well with substrate added must have an absorbance greater than 0.080.

RESULTS

ASSAY VALIDATION

Mean Absorbance of the Negative controls must be <0.100 and **each** negative must give an antibody index <0.7.

Mean Absorbance of the Positive controls must be >1.200 and **each** positive must give an antibody index >8.0.

If any of the controls give results lying outside of these limits, the test should be repeated.

CUT-OFF CALCULATION

The Cut-Off Point (COP) is calculated as the mean of the Negative controls (NC) + 0.100 absorbance units.

$$\text{i.e. } \frac{(NC1 + NC2 + NC3)}{3} + 0.100$$

Example: $\frac{0.030 + 0.025 + 0.035}{3} = 0.030$

\therefore Cut-Off Point = $0.030 + 0.100 = 0.130$
 The antibody index (AI) is determined by dividing the absorbance of the control or test sample by the cut-off point (COP).

AI = $\frac{\text{absorbance of control or test sample}}{\text{Cut-off point}}$

INTERPRETATION OF RESULTS

Samples giving AI values less than 0.9 are **NEGATIVE** for Syphilis IgM antibody.
 Samples giving AI values greater than 1.1 are **POSITIVE** for Syphilis IgM antibody.
 Samples giving AI values between 0.9 and 1.1 inclusive ($0.9 \leq \text{EQL} \leq 1.1$) are **EQUIVOCAL**.
 If an equivocal result is obtained, the samples must be retested in duplicate. If upon retest equivocal results are obtained a fresh specimen should be requested.
 The diagnosis of an active syphilis infection should not be made on the sole basis of a positive syphilis IgM result but in conjunction with other tests and clinical evidence.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision

Intra and inter assay precision was assessed at 3 levels using a negative sample and 2 positive samples representing an intermediate and strong IgM response. Intra-assay precision was calculated using 48 replicate measurements at the levels indicated. Inter-assay precision was calculated by running the samples in quadruplicate over 5 different assays.

	Intra-assay %CV	Intra-assay %CV
Negative	11.7	12.4
Intermediate Positive	2.9	5.0
Strong Positive	3.6	7.6

Specificity

Clinical specificity was assessed by testing 87 plasma and serum samples from blood donors. The samples were tested using the CAPTIA™ NMT Syphilis IgM assay and a competitor assay. The CAPTIA™ NMT Syphilis IgM assay scored all samples as negative thus giving a specificity of 100%.

Sensitivity

Several studies were conducted comparing the performance of this kit with other commercially available CE marked kits on samples submitted to reference laboratories for specialist syphilis serology.

The combined results were as follows:

	IgM Pos (Both kits)	IgM Pos (CAPTIA™ NMT Syphilis IgM only)	IgM (Other kit only)
Confirmed case	26	7	7
Other syphilis serology positive	0	0	2
Other syphilis serology negative			

Additional sensitivity studies were performed using a syphilis seroconversion panel (Serologicals Inc., USA); 100% agreement between the CAPTIA™ NMT Syphilis IgM kit and two other commercially available syphilis IgM kits was obtained.

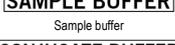
REFERENCES

- Larson S.A. et al Laboratory Diagnosis and interpretation of Tests for Syphilis. Clinical Microbiology Reviews 1995; 8: 1-21.
- Pope V. et al A manual of tests for Syphilis.
- Norris S.J. Polypeptides of Treponema pallidum: Progress toward understanding their structural, functional and immunological role. Microbiological Reviews, 1993; 57:750-779.
- Egglestone S.I. & Turner A.J.L. Serological Diagnosis of syphilis, Communicable Disease and Public Health 2000; 3: 158-162.

ORDERING INFORMATION

KIT	Item	Quantity
2329360	CAPTIA™ NMT Syphilis IgM	96 Tests

GUIDE TO SYMBOLS

 Consult Instructions for Use	 Temperature limitation
 Catalog number	 For in vitro Diagnostic Use
 Manufacturer	 Batch code
 Use by	 CE
 Coated microtitre plate	 Sample buffer
 Conjugate	 Conjugate buffer
 Concentrated wash buffer	 Positive control
 Negative control	 Substrate
 Stop solution	
 Trinity Biotech USA 2323 Girls Road Jamestown, NY 14701 Tel: 1800 325 3424 Fax: 938 898 1539	 Trinity Biotech Plc Bray, Co. Wicklow, Ireland Tel: 353 1 2769800 Fax: 353 1 2769888 www.trinitybiotech.com

9360-29 Rev B
09/2014

Annexe 5 : Fiche technique du test Western blot IgG

EUROIMMUN France

Espace Villa Parc - l'Erable
1, avenue Marne et Gondore
77800 Bussy Saint Martin - France
Tel : 01-64-61-66-66
Fax : 01-64-61-62-20
www.euroimmun.fr



WESTERNBLOT Anti-Treponema pallidum (IgG) Mode d'emploi

REFERENCE	ANTICORPS ANTI-	CLASSE D'IG	SUBSTRAT	FORMAT
DY 2111-1601 G DY 2111-2401 G	Treponema pallidum	IgG	Bandelettes de membrane coatées avec l'antigène	16 x 01 (16) 24 x 01 (24)

Indication: Ce WESTERNBLOT est un test qualitatif in vitro pour la détection des anticorps humains de classe d'immunoglobuline IgG dirigés contre le Treponema pallidum dans le sérum ou le plasma pour le diagnostic des infections par Treponema pallidum et des maladies associées (Syphilis).

Application: Le WESTERNBLOT anti-Treponema pallidum est adapté en tant que test de confirmation dans une stratégie en 2 étapes pour la détection spécifique d'une infection par Treponema pallidum. Grâce à l'utilisation d'antigènes purifiés par électrophorèse du Treponema pallidum, les anticorps spécifiques peuvent être détectés.

Principe du test: Le coffret contient des bandelettes sur lesquelles ont été séparés par électrophorèse les antigènes extraits du Treponema pallidum. Dans la première étape, les bandelettes sont saturées puis incubées avec les échantillons dilués des patients. Dans le cas d'échantillons positifs, les anticorps spécifiques de la classe IgG (mais aussi IgA et IgM) se fixent sur les antigènes. Pour détecter les anticorps fixés, une seconde incubation est réalisée en utilisant un anticorps anti-IgG humaine couplé à une enzyme (conjugué enzymatique) catalysant une réaction colorée.

Composition du coffret:

Composants	Format	Format	Symbole
1. Bandelettes tests avec les antigènes de Treponema pallidum séparés par électrophorèse	16 x 1	24 x 1	
2. Matrice d'évaluation avec bandelette de contrôle bandelette incubée avec un sérum de contrôle positif	1 gabarit	1 gabarit	---
3. Conjugué enzymatique anti-IgG humaine (chèvre) couplé à la phosphatase alcaline, concentré 10x	1 x 3 ml	2 x 3 ml	
4. Tampon universel concentré 10x	1 x 50 ml	1 x 100 ml	
5. Solution de substrat Nitroblue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (NBT/BCIP), prête à l'emploi	1 x 30 ml	1 x 50 ml	
6. Bac d'incubation	2 x 8 rigoles	3 x 8 rigoles	
7. Mode d'emploi	1 livret	1 livret	---
Lot			Température de conservation
Dispositif médical de diagnostic in vitro			Non ouvert, utilisable jusqu'à

Conservation et stabilité: Le coffret doit être conservé à une température comprise entre +2°C et +8°C. Ne pas congeler. Non ouvert, tous les composants du coffret sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le coffret.

Elimination des déchets: Les échantillons patients non-dilués et les bandelettes de blot incubées doivent être manipulés comme des déchets infectieux. Les autres réactifs n'ont pas besoin d'être collectés séparément, à moins que les réglementations officielles ne le préconisent.



Les composants suivants ne sont pas fournis dans les coffrets mais peuvent être commandés séparément sous les références suivantes. La réalisation du test nécessite l'utilisation d'un **bac d'incubation**:

ZD 9895-0130 bac d'incubation avec 30 rigoles (noir)

ZD 9898-0144 bac d'incubation avec 44 rigoles (noir, pour l'EUROBlotOne et le système EUROBlotCamera)

Pour la création des protocoles de travail et l'évaluation des bandelettes incubées avec l'**EUROLineScan** du papier vert et un film adhésif sont nécessaires:

ZD 9880-0101 Papier vert (1 feuille)

ZD 9885-0116 Film adhésif pour environ 16 bandelettes

ZD 9885-0130 Film adhésif pour environ 30 bandelettes

Si une **évaluation visuelle** doit être réalisée dans des cas particuliers, le protocole d'évaluation nécessaire peut être commandé sous la référence: ZD 2111-0101 Protocole d'évaluation WESTERNBLOT Anti-Treponema pallidum.

Préparation et stabilité des réactifs

Remarque: Sur le sachet contenant les bandelettes de blot, un numéro est imprimé en plus du numéro de lot du coffret. Ce numéro correspond au numéro de lot des bandelettes. Il est également imprimé sur la matrice d'évaluation correspondante. Les deux numéros doivent concorder pour assurer une évaluation correcte des résultats du test.

Tous les réactifs doivent être mis à température ambiante (+18°C à +25°C) environ 30 minutes avant utilisation. Non-ouvert, les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée s'ils sont conservés entre +2°C et +8°C. Après la première ouverture, les réactifs sont stables pendant 12 mois ou jusqu'à la date d'expiration si elle est plus récente, sauf s'il est stipulé autrement dans ce mode d'emploi. Les réactifs ouverts doivent aussi être conservés entre +2°C et +8°C et protégés de toute contamination.

- **Bandelettes:** Prêtes à l'emploi. N'ouvrir la pochette protectrice avec les bandelettes que lorsque les bandelettes ont atteint la température ambiante afin d'éviter toute condensation sur les bandelettes. Après le prélèvement des bandelettes, la pochette doit être refermée hermétiquement et conservée entre +2°C et +8°C. Pour garantir une évaluation correcte des résultats, le numéro de lot sur la pochette doit être identique au numéro de lot inscrit sur des bandelettes mais aussi sur la matrice d'évaluation.
- **Conjugué enzymatique:** Le conjugué enzymatique est concentré 10x. Pour la préparation de conjugué enzymatique prêt à être utilisée, la quantité requise doit être prélevée du flacon avec une pipette propre et diluée au 1:10 avec du tampon universel dilué prêt à être utilisé. Pour 1 bandelette, diluer 0,15 ml de conjugué Anti-IgG humaine concentré avec 1,35 ml de tampon universel dilué prêt à être utilisé. Le conjugué dilué doit être utilisé le jour même.
- **Tampon universel:** Le tampon universel est concentré 10x. Pour la préparation du tampon universel dilué prêt à être utilisé, la quantité requise doit être prélevée du flacon avec une pipette propre et diluée au 1:10 avec de l'eau distillée ou déionisée. Pour l'incubation d'1 bandelette, diluer 1,5 ml de tampon concentré dans 13,5 ml d'eau distillée ou déionisée. Le tampon dilué doit être utilisé le jour même.
- **Solution du substrat:** Prête à l'emploi. Fermer le flacon immédiatement après utilisation, puisque son contenu est sensible à la lumière ☼.

Précaution d'utilisation: Le contrôle d'origine humaine utilisés pour incuber la bandelette sur la matrice d'évaluation a été testé négatif pour le HBsAg, l'anti-VHC, l'anti-VIH-1 et anti-VIH-2. Néanmoins, les réactifs du test doivent être traités comme étant potentiellement infectieux et doivent être manipulés avec précautions. Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium en concentration non-déclarable. Eviter tout contact avec la peau.



Préparation et stabilité des échantillons patients

Echantillon: Sérum ou plasma (sur EDTA, héparine ou citrate) humains.

Stabilité: Les **échantillons patients** à tester peuvent généralement être conservés jusqu'à 14 jours entre +2°C et +8°C. Les échantillons dilués doivent être incubés le jour même.

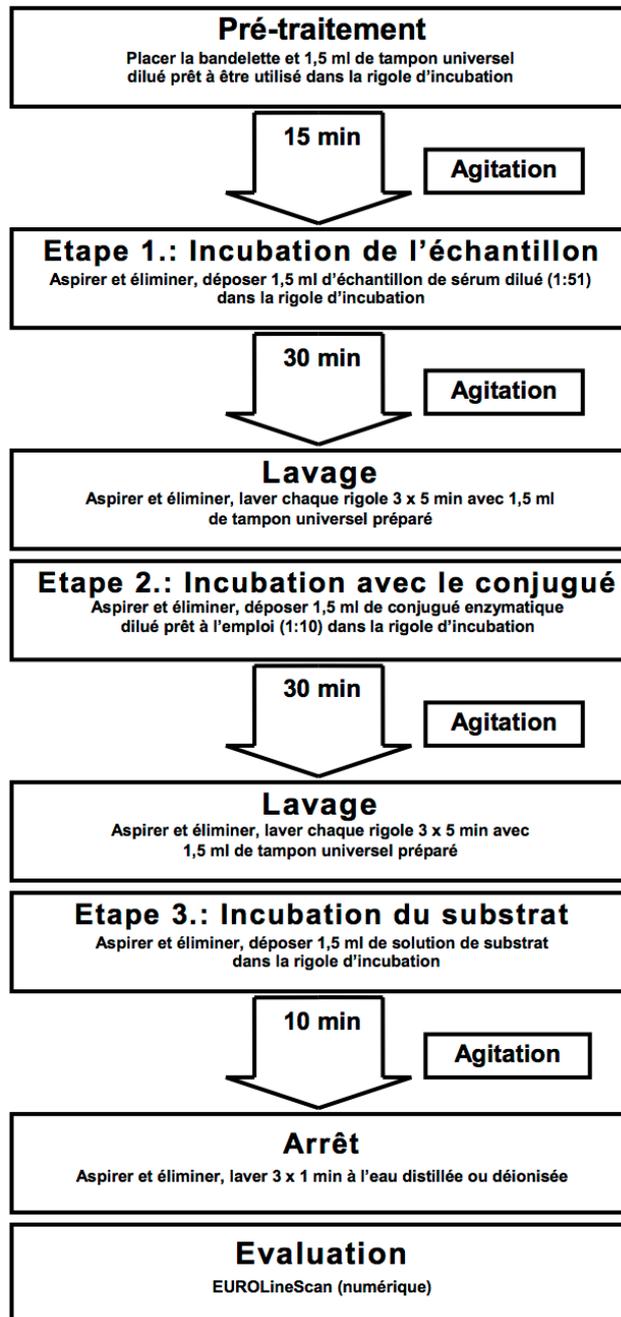
Dilution de l'échantillon: Les **échantillons patients** à analyser doivent être dilués au **1:51** avec du tampon universel dilué prêt à être utilisé. Par exemple, ajouter 30 µl d'échantillon à 1,5 ml de tampon universel dilué prêt à être utilisé et bien mélanger au vortex. Le mélange d'échantillon à la pipette n'est pas adapté.

Incubation

- Saturation:** Remplir chaque rigole du bac d'incubation avec 1,5 ml de tampon universel dilué prêt à être utilisé en fonction du nombre d'échantillons de sérum à tester. Prendre dans la pochette protectrice le nombre de bandelettes nécessaires avec une paire de pince. Le numéro inscrit sur la bandelette doit être visible.
Incuber pendant **15 minutes** à température ambiante (+18°C à +25°C) sur un agitateur à bascule. Ensuite aspirer et éliminer tout le liquide.
- Incubation de l'échantillon:**
(1^{ère} étape) Remplir chaque rigole avec 1,5 ml d'échantillon de sérum dilué.
Incuber à température ambiante (+18°C à +25°C) pendant **30 minutes** sur un agitateur à bascule.
- Lavage:** Aspirer et éliminer le liquide de chaque rigole et laver chaque rigole **3 x 5 minutes** avec 1,5 ml de tampon universel sur un agitateur à bascule.
- Incubation du conjugué:**
(2^{ème} étape) Déposer 1,5 ml de conjugué enzymatique dilué prêt à être utilisé (anti-IgG humaine couplé à la phosphatase alcaline) dans chaque rigole.
Incuber pendant **30 minutes** à température ambiante (+18°C à +25°C) sur un agitateur à bascule.
- Lavage:** Aspirer et éliminer le liquide de chaque rigole. Laver comme décrit ci-dessus.
- Incubation du substrat:**
(3^{ème} étape) Déposer 1,5 ml de solution de substrat dans les rigoles du bac d'incubation.
Incuber pendant **10 minutes** à température ambiante (+18°C à +25°C) sur un agitateur à bascule.
- Arrêt:** Aspirer et éliminer le liquide de chaque rigole et laver chaque bandelette **3 x 1 minute** avec de l'eau déionisée ou distillée.

Pour les incubations automatisées sur l'EUROBlotMaster choisir le programme **Euro02 Inf WB30**.

Pour les incubations automatisées sur l'EUROBlotOne choisir le programme **Euro 01/02**.

**WESTERNBLOT Anti-Treponema pallidum (IgG)****Protocole d'incubation**



WESTERNBLOT Anti-Treponema pallidum (IgG) Évaluation et interprétation

Manipulation: Pour l'évaluation des bandelettes de test incubées nous recommandons généralement d'utiliser le logiciel **EUROLineScan**. Après l'arrêt de la réaction avec de l'eau distillée ou déionisée, placer les bandelettes incubées sur la feuille adhésive du protocole d'évaluation (feuille verte) en utilisant une paire de pinces. La position des bandelettes peut être corrigée tant qu'elles sont humides. Dès que toutes les bandelettes ont été placées sur le protocole d'évaluation, elles doivent être fortement pressées avec du papier filtre et laissées à l'air libre. Après avoir complètement séché, les bandelettes se collent sur la feuille adhésive. Les bandelettes sèches sont alors scannées en utilisant un scanner à plat (EUROIMMUN AG) et évaluées avec le logiciel **EUROLineScan**. Sinon, l'acquisition d'image et l'évaluation est possible directement dans les rigoles d'incubation (EUROBlotCamera et EUROBlotOne). Pour plus d'informations concernant le programme EUROLineScan, veuillez-vous référer au manuel d'utilisation de l'EUROLineScan (EUROIMMUN AG). Le code pour accéder au **test** dans le logiciel EUROLineScan est **T_pal_WB_IgG**.

Si une évaluation visuelle doit être réalisée dans des cas exceptionnels, positionner la matrice d'évaluation à côté de la bandelette collée de manière à ce que la bande noire au-dessus du numéro de lot sur les bandelettes coïncide avec la barre d'alignement de la matrice d'évaluation. **Le numéro de lot sur la matrice d'évaluation doit correspondre au numéro de lot inscrit sur les bandelettes.** Les bandes clairement reconnaissables sur la bandelette coïncidant avec les bandes marquées sur la matrice d'évaluation doivent être notées sur le protocole d'évaluation.

Antigènes: La source antigénique pour le **WESTERNBLOT Anti-Treponema pallidum d'EUROIMMUN** provient d'une préparation d'antigène de *Treponema pallidum* particulièrement adaptée. Cet antigène a été solubilisé en utilisant du dodécylsulfate de sodium suivi d'une séparation des protéines solubilisées selon le poids moléculaire en utilisant une électrophorèse discontinue sur gel de polyacrylamide puis d'un transfert des protéines séparées sur une membrane de nitrocellulose. 2 bandelettes contrôles sont prélevées de chaque coffret et incubées avec un sérum de référence. Une de ces bandelettes révélées est incluse dans le coffret, l'autre est conservée par EUROIMMUN à des fins de documentation.

Spécificité des antigènes sur les bandelettes:

Bande	Antigène	Spécificité
47 kDa	protéine de membrane, TpN47	spécifique
45 kDa	tmpA	spécifique
17 kDa	protéine de membrane, TpN17	spécifique
15 kDa	protéine de membrane, TpN15	spécifique

Dans la partie inférieure de la bandelette se trouve un morceau de membrane de contrôle du conjugué (IgA, IgG et IgM). En dessous du contrôle du conjugué se trouve un morceau de membrane avec une bande contrôle (Contrôle).

Attention: Une détermination correctement réalisée des anticorps de classe IgG dirigés contre les antigènes décrits ci-dessus est indiquée par une réaction positive de la bande contrôle et une réaction positive de la bande IgG.

Si l'une de ces bandes ne montre qu'une réaction très faible ou pas de réaction du tout, le résultat n'est pas valide.



Anticorps anti-Treponema pallidum de classe IgG

Interprétation des résultats: Les résultats du test WESTERNBLOT Anti-Treponema pallidum peuvent être divisés en résultats négatif, douteux et positif. Pour évaluer les signaux, les positions des bandes et l'intensité du marquage doivent être prises en compte, puisque les sérums négatifs produisent parfois des signaux faibles sur des bandes particulières.

Résultat	Caractéristiques
Négatif	Aucune bande d'antigènes spécifiques.
Douteux	Une bande distincte correspondant à un des antigènes spécifiques: p15 kDa, p17 kDa, p45 kDa ou p47 kDa.
Positif	Plus d'une bande distincte correspondant à des antigènes spécifiques: p15 kDa, p17 kDa, p45 kDa ou p47 kDa.

Anticorps anti-Treponema pallidum de classe IgM

Interprétation des résultats: Les résultats du test WESTERNBLOT Anti-Treponema pallidum peuvent être divisés en résultats négatif, douteux et positif. Pour évaluer les signaux, les positions des bandes et l'intensité du marquage doivent être prises en compte, puisque les sérums négatifs produisent parfois des signaux faibles sur des bandes particulières.

Pour le diagnostic d'une infection Treponema récente, un résultat IgM positif doit être confirmé par un résultat IgG positif en utilisant un nouvel échantillon de sang prélevé après 3 à 6 semaines.

Résultat	Caractéristiques
Négatif	Aucune bande d'antigènes spécifiques.
Douteux	Une bande faible des antigènes spécifiques: p15 kDa, p17 kDa, p45 kDa ou p47 kDa. Il est recommandé de réaliser un second test sur un échantillon frais après quelques semaines.
Positif	Au moins une bande distincte des antigènes spécifiques: p15 kDa, p17 kDa, p45 kDa ou p47 kDa.

Dans le cadre du diagnostic, le tableau clinique du patient doivent être toujours pris en compte en association avec les résultats sérologiques.

Caractéristiques du test

Gamme de mesure: Le Westernblot est une méthode qualitative. Aucune gamme de mesure n'est fournie.

Variation inter- et intra-dosage: La variation inter-dosage a été déterminée par des analyses multiples réalisées en plusieurs jours sur des échantillons caractérisés. La variation intra-dosage a été déterminée par des analyses multiples réalisées en une journée sur des échantillons caractérisés. Dans tous les cas, l'intensité de coloration des bandes a été trouvée dans la limite de la gamme spécifiée. Ce Westernblot présente d'excellentes reproductibilités inter- et intra-dosage.

Interférence: Des sérums hémolysés, lipémiques et ictériques ne montrent aucun effet sur les résultats analytiques.

Réactions croisées: La qualité des substrats antigéniques et la source d'antigène garantissent la forte spécificité de ce Westernblot. La détermination des réactions croisées n'est pas nécessaire pour le Westernblot car une différenciation directe entre les antigènes spécifiques et non-spécifiques est possible avec cette technique.



Spécificité et sensibilité: Un panel de 19 échantillons sérologiquement définis, pré-caractérisés par un test de référence approuvé (certifié par l'Institut Paul-Ehrlich) et 50 échantillons de donneurs de sang en bonne santé, ayant tous des résultats négatifs en test TPHA, ont été étudiés avec le Westernblot Anti-Treponema pallidum d'EUROIMMUN.

IgG	n = 69	Panel caractérisé (voir ci-dessus)	
		positif	négatif
Westernblot Anti-Treponema pallidum d'EUROIMMUN	positif	19	0
	négatif	0	50

Le Westernblot Anti-Treponema pallidum IgG a une spécificité de 100% et une sensibilité de 100%. La valeur prédictive positive est de 100%.

IgM	n = 69	Panel caractérisé (voir ci-dessus)	
		positif	négatif
Westernblot Anti-Treponema pallidum d'EUROIMMUN	positif	17	1
	négatif	0	51

Le Westernblot Anti-Treponema pallidum IgM a une spécificité de 98% et a sensibilité de 100%. La valeur prédictive positive est de 94%.

Ni les anticorps anti-Treponema pallidum IgM, ni les IgG n'ont été détectés dans les échantillons des donneurs de sang en bonne santé.

Signification clinique

Le **Treponema pallidum pallidum** est une bactérie hélicoïdale appartenant à la famille des Spirochètes. Cette famille comprend 5 genres: Borrelia, Spirochaeta, Cristispira, Treponema et Leptospira. Treponema pallidum est l'agent responsable de la syphilis, une maladie infectieuse chronique. Les sous espèces T. pallidum endemicum provoque la syphilis vénérienne (bejel); T. pallidum pertenue conduit à une infection non vénérienne retrouvée dans les régions tropicales et appelée framboesia (pian); T. pallidum carateum est l'agent responsable du Pinta (Carate).

En 1905 Fritz Schaudinn (Zoologiste Allemand, 1871-1906) et Erich Hoffmann (Dermatologue Allemand, 1868-1959) de la Charité à Berlin ont été les premiers à détecter par microscopie l'agent responsable de la syphilis. Le Spirochète a été trouvé pour la première fois en 1913 par le microbiologiste et médecin Japonais Noguchi Hideyo (1876-1928) dans le tissu cérébral d'un patient ayant une paralysie progressive.

La Syphilis est sexuellement transmise entre les êtres humains via les muqueuses. La transmission indirecte par transfusions sanguines et par des blessures est également possible. Les nouveau-nés peuvent être infectés par leur mère au cours de la grossesse ainsi qu'à la naissance (syphilis connata). La Syphilis est un facteur de risque connu d'avortement et de mortalité.

La maladie est divisée en différents stades, dont le nombre varie dans la littérature, selon la région du monde. Dans les régions germanophones, quatre stades sont différenciés (primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire). En Asie et parfois au Etats-Unis d'Amérique, les troisième et quatrième étapes sont regroupées dans le stade tertiaire. Le stade secondaire a une signification plus large et est subdivisé en phase latente précoce et phase latente tardive. La phase latente précoce est décrite comme étant séronégative, asymptomatique et infectieuse (environ une année après l'infection), alors que la phase latente tardive est caractérisée comme étant séroréactive, asymptomatique et non-infectieuse (plus d'un an après l'infection). En Europe Centrale l'infection est divisée selon les quatre stades suivants:



Stade primaire: L'ulcus durum (ulcère induré) est caractéristique de la lésion primaire de la syphilis (stade I) et apparaît normalement 3 semaines après l'infection. Il se développe au point d'inoculation du pathogène (ex: pénis). C'est un ulcère indolore, qui contient une grande quantité du pathogène et qui est donc fortement contagieux. Une érosion limitée fibreuse ou creusée a typiquement un bord ourlé et dur. Un gonflement localisé des ganglions lymphatiques sans douleur est possible et les ganglions lymphatiques restent déplaçables. A partir de moment, la maladie peut être diagnostiquée en utilisant par exemple le test TPHA (Treponema pallidum haemagglutination assay). Après 2 à 6 semaines l'ulcère guérit en laissant une cicatrice. L'infection persiste généralement et évolue vers le stade II.

Stade secondaire: Environ 8 semaines après l'infection, la maladie se manifeste avec des symptômes grippaux comme de la fièvre, une fatigue ou des maux de tête et des douleurs articulaires. En plus du gonflement généralisé des ganglions lymphatiques, 90% des patients présentent des troubles cutanés locaux ou généralisés, qui s'accompagnent ou non de faibles démangeaisons. Des taches roses claires se forment en premier et évoluent ensuite en nodules cuivrés durs (papules). Au premier plan sont trouvés des condylomata lata, de larges papules, qui affectent surtout les plis cutanés. Le liquide excrété par les papules ouvertes et suitantes est fortement contagieux. De plus, divers troubles organiques peuvent se développer, par exemple, cataracte, irrite, hépatite, vascularite, et troubles du myocarde.

Tous les troubles cutanés (syphilides) guérissent après environ 4 mois. La syphilis secondaire est suivie par un stade cliniquement silencieux (syphilis latente), qui peut durer pendant des années.

Stade tertiaire: Les manifestations typiques de l'infection Treponema pallidum en stade III sont de larges papules et des ulcères sur la peau et les membranes muqueuses. Elles sont généralement accompagnées d'une syphilis organique ou viscérale, incluant des lésions nodulaires (gommées) et une inflammation interstitielle, une périvasculite, une syphilis cardiovasculaire, une neurosyphilis (formes asymptomatique et symptomatique), une ostéite, et une périostite.

Stade quaternaire: Dix à trente ans après une infection non traitée, 8% à 10% des patients présentent des troubles neurologiques sévères comme la neurosyphilis avec une paralysie progressive et un Tabes dorsalis avec des troubles mentaux et végétatifs sévères.

Le **diagnostic** de la syphilis est basé sur les résultats cliniques selon le stade de la maladie, la détection microscopique de l'agent infectieux (fond noir) et la détection sérologique des anticorps anti-Treponema pallidum.

Le Treponema pallidum a une longueur de 5 à 15 µm et une largeur de 0,2 µm avec 10 à 20 tours et peut pivoter autour de son axe longitudinal. En raison de sa structure fine, il est difficile de le rendre observable par coloration sous le microscope. Cependant, les bactéries vivantes peuvent être analysées en utilisant un microscope à fond noir. La détection en cultures n'a pas encore été réussie.

Le TPHA (Treponema pallidum haemagglutination assay) est un test pour la détection indirecte des anticorps anti-Treponema pallidum. Les érythrocytes marqués à leur surface avec des protéines et des polysaccharides de Treponema pallidum sont mélangés avec le sérum de patient. La présence des anticorps anti-Treponema pallidum dans le sérum de patient provoque une agglutination des érythrocytes (hémagglutination) qui est visible à l'œil nu.

Si le test de dépistage est positif, une recherche sérologique approfondie est recommandée pour confirmer le résultat obtenu, soit en utilisant le test FTA-ABS Anti-Treponema pallidum soit en utilisant des méthodes de test sérologiques modernes comme l'ELISA anti-Treponema pallidum ou le Western blot anti-Treponema pallidum (par ex: EUROLINE WB anti-Treponema pallidum). Les anticorps anti-cardiolipides servent de marqueur d'activité de l'infection (tests VDRL ou RPR, EUROLINE WB).



Les anticorps anti-Treponema pallidum peuvent être détectés dans le sérum et le LCR. Ceci a un intérêt diagnostique par exemple chez les enfants ayant une syphilis congénitale. Pour la détection quantitative in vitro des anticorps humain d'immunoglobulines de classe IgG dirigés contre Treponema pallidum dans le LCR, le même ELISA que celui utilisé pour la détection des anticorps dirigés contre Treponema pallidum dans le sérum est adapté. Lors de la détermination d'une infection dans le LCR, il est nécessaire de faire la distinction entre des anticorps produits de façon intrathécale et ceux qui ont migrés du sang vers le LCR. La production intrathécale d'anticorps spécifiques du pathogène est déterminé par le calcul du quotient relatif LCR/sérum LSQrel. (synonyme: Indice de spécificité de l'anticorps). Le quotient est calculé à partir du ratio des anticorps spécifiques du pathogène sur les IgG totales dans le LCR par rapport au ratio des anticorps spécifiques du pathogène sur les IgG totales dans le sérum. Avec cette méthode, une infection par Treponema pallidum dans le LCR peut être facilement déterminée de façon fiable.

Références bibliographiques

1. Brown DL, Frank JE. **Diagnosis and management of syphilis.** Am Fam Physician 68 (2003) 283-290.
2. Centurion-Lara A, Molini BJ, Godomes C, Sun E, Hevner K, Van Voorhis WC, Lukehart SA. **Molecular differentiation of Treponema pallidum subspecies.** J Clin Microbiol 44 (2006) 3377-3380.
3. Dang Q, Feng J, Lu X, Zhang X, Xu H, Liu C, Nu X. **Evaluation of specific antibodies for early diagnosis and management of syphilis.** Int J Dermatol 45 (2006) 1169-1171.
4. Department of Health and Human Services. CDC. **Syphilis - Physician's Pocket Guide.** www.cdc.gov/std/see/.
5. EUROIMMUN AG. **Testkit für die Labordiagnostik.** Deutsches Gebrauchsmuster DE 20 2012 004 404 (angemeldet 2012).
6. Herbert LJ, Middleton SI. **An estimate of syphilis incidence in Eastern Europe.** J Glob Health 2 (2012) 10402. 1-7.
7. Kent ME, Romanelli F. **Reexamining syphilis: an update on epidemiology, clinical manifestations, and management.** Ann Pharmacother 42 (2008) 226-236.
8. Manavi K, Young H, McMillan A. **The sensitivity of syphilis assays in detecting different stages of early syphilis.** Int J STD AIDS 17 (2006) 768-771.
9. Muller I, Brade V, Hagedorn HJ, Straube E, Schorner C, Frosch M, Hlobil H, Stanek G, Hunfeld KP. **Is serological testing a reliable tool in laboratory diagnosis of syphilis? Meta-analysis of eight external quality control surveys performed by the german infection serology proficiency testing program.** J Clin Microbiol 44 (2006) 1335-1341.
10. Rawstron SA, Mehta S, Bromberg K. **Evaluation of a Treponema pallidum-specific IgM enzyme immunoassay and Treponema pallidum western blot antibody detection in the diagnosis of maternal and congenital syphilis.** Sex Transm Dis 31 (2004) 123-126.
11. Rigsby P, Ison C, Brierley M, Ballard R, Hagedorn HJ, Lewis DA, Notermans DW, Riis J, Robertson P, Seppälä IJ, Rijpkema S. **Evaluation of two human plasma pools as candidate international standard preparations for syphilitic antibodies.** Biologicals 37 (2009) 245-251.
12. EUROIMMUN AG. Stöcker W, Ehling T. **Vorrichtung und Verfahren zur Untersuchung einer biologischen Probe.** Deutsche Patentanmeldung DE 10 2011 011 795.4 (angemeldet 2011).
13. Stöcker* W, Fauer* H, Krause* C, Barth E, Martinez A. (*EUROIMMUN AG). **Verfahren zur Optimierung der automatischen Fluoreszenzerkennung in der Immundiagnostik.** Deutsche Patentanmeldung (Offenlegungsschrift) DE 10 2006 027 516.0 und WO2007140952 (2006).
14. Sun R, Lai DH, Ren RX, Lian S, Zhang HP. **Treponema pallidum-specific antibody expression for the diagnosis of different stages of syphilis.** Chin Med J (Engl) 126 (2013) 206-210.

Annexe 6 : Fiche technique du test Western Blot IgM

EUROIMMUN France

Espace Villa Parc - l'Erable
1, avenue Mame et Condore
77800 Bussy Saint Martin - France
Tel : 01-64-61-66-66
Fax : 01-64-61-62-20
www.euroimmun.fr



WESTERNBLOT Anti-Treponema pallidum (IgM) Mode d'emploi

REFERENCE	ANTICORPS ANTI-	CLASSE D'IG	SUBSTRAT	FORMAT
DY 2111-1601 M DY 2111-2401 M	Treponema pallidum	IgM	Bandelettes de membrane coatées avec l'antigène	16 x 01 (16) 24 x 01 (24)

Indication: Ce WESTERNBLOT est un test qualitatif in vitro pour la détection des anticorps humains de classe d'immunoglobuline IgM dirigés contre le Treponema pallidum dans le sérum ou le plasma pour le diagnostic des infections par Treponema pallidum et des maladies associées (Syphilis).

Application: Le WESTERNBLOT anti-Treponema pallidum est adapté en tant que test de confirmation dans une stratégie en 2 étapes pour la détection spécifique d'une infection par Treponema pallidum. Grâce à l'utilisation d'antigènes purifiés par électrophorèse du Treponema pallidum, les anticorps spécifiques peuvent être détectés.

Principe du test: Le coffret contient des bandelettes sur lesquelles ont été séparés par électrophorèse les antigènes extraits du Treponema pallidum. Dans la première étape, les bandelettes sont saturées puis incubées avec les échantillons dilués des patients. Dans le cas d'échantillons positifs, les anticorps spécifiques de la classe IgM (mais aussi IgA et IgG) se fixent sur les antigènes. Pour détecter les anticorps fixés, une seconde incubation est réalisée en utilisant un anticorps anti-IgM humaine couplé à une enzyme (conjugué enzymatique) catalysant une réaction colorée.

Composition du coffret:

Composants	Format	Format	Symbole
1. Bandelettes tests avec les antigènes de Treponema pallidum séparés par électrophorèse	16 x 1	24 x 1	
2. Matrice d'évaluation avec bandelette de contrôle bandelette incubée avec un sérum de contrôle positif	1 gabarit	1 gabarit	---
3. Conjugué enzymatique anti-IgM humaine (chèvre) couplé à la phosphatase alcaline, concentré 10x	1 x 3 ml	2 x 3 ml	
4. Tampon universel concentré 10x	1 x 50 ml	1 x 100 ml	
5. Solution de substrat nitrobleu tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3- indolylphosphate (NBT/BCIP), prête à l'emploi	1 x 30 ml	1 x 50 ml	
6. Bac d'incubation	2 x 8 rigoles	3 x 8 rigoles	
7. Mode d'emploi	1 livret	1 livret	---
Lot			Température de conservation
Dispositif médical de diagnostic in vitro			Non ouvert, utilisable jusqu'à

Conservation et stabilité: Le coffret doit être conservé à une température comprise entre +2°C et +8°C. Ne pas congeler. Non ouvert, tous les composants du coffret sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le coffret.

Elimination des déchets: Les échantillons patients non-dilués et les bandelettes de blot incubées doivent être manipulés comme des déchets infectieux. Les autres réactifs n'ont pas besoin d'être collectés séparément, à moins que les réglementations officielles ne le préconisent.



Les composants suivants ne sont pas fournis dans les coffrets mais peuvent être commandés séparément sous les références suivantes. La réalisation du test nécessite l'utilisation d'un **bac d'incubation**:

ZD 9895-0130 bac d'incubation avec 30 rigoles (noir)

ZD 9898-0144 bac d'incubation avec 44 rigoles (noire, pour l'EUROBlotOne et le système EUROBlotCamera)

Pour la création des protocoles de travail et l'évaluation des bandelettes incubées avec l'**EUROLineScan** du papier vert et un film adhésif sont nécessaires:

ZD 9880-0101 Papier vert (1 feuille)

ZD 9885-0116 Film adhésif pour environ 16 bandelettes

ZD 9885-0130 Film adhésif pour environ 30 bandelettes

Si une **évaluation visuelle** doit être réalisée dans des cas particuliers, le protocole d'évaluation nécessaire peut être commandé sous la référence: ZD 2111-0101 Protocole d'évaluation WESTERNBLOT Anti-Treponema pallidum.

Préparation et stabilité des réactifs

Remarque: Sur le sachet contenant les bandelettes de blot un numéro, est imprimé en plus du numéro de lot du coffret. Ce numéro correspond au numéro de lot des bandelettes. Il est également imprimé sur la matrice d'évaluation correspondante. Les deux numéros doivent concorder pour assurer une évaluation correcte des résultats du test.

Tous les réactifs doivent être mis à température ambiante (+18°C à +25°C) environ 30 minutes avant utilisation. Non-ouvert, les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée s'ils sont conservés entre +2°C et +8°C. Après la première ouverture, les réactifs sont stables pendant 12 mois ou jusqu'à la date d'expiration si elle est plus récente, sauf s'il est stipulé autrement dans ce mode d'emploi. Les réactifs ouverts doivent aussi être conservés entre +2°C et +8°C et protégés de toute contamination.

- **Bandelettes:** Prêtes à l'emploi. N'ouvrir la pochette protectrice avec les bandelettes que lorsque les bandelettes ont atteint la température ambiante afin d'éviter toute condensation sur les bandelettes. Après le prélèvement des bandelettes, la pochette doit être refermée hermétiquement et conservée entre +2°C et +8°C. Pour garantir une évaluation correcte des résultats, le numéro de lot sur la pochette doit être identique au numéro de lot inscrit sur des bandelettes mais aussi sur la matrice d'évaluation.
- **Conjugué enzymatique:** Le conjugué enzymatique est concentré 10x. Pour la préparation de conjugué enzymatique prêt à être utilisée, la quantité requise doit être prélevée du flacon avec une pipette propre et diluée au 1:10 avec du tampon universel dilué prêt à être utilisé. Pour 1 bandelette, diluer 0,15 ml de conjugué Anti-IgM humaine concentré avec 1,35 ml de tampon universel dilué prêt à être utilisé. Le conjugué dilué doit être utilisé le jour même.
- **Tampon universel:** Le tampon universel est concentré 10x. Pour la préparation du tampon universel dilué prêt à être utilisé, la quantité requise doit être prélevée du flacon avec une pipette propre et diluée au 1:10 avec de l'eau distillée ou déionisée. Pour l'incubation d'1 bandelette, diluer 1,5 ml de tampon concentré dans 13,5 ml d'eau distillée ou déionisée. Le tampon dilué doit être utilisé le jour même.
- **Solution du substrat:** Prête à l'emploi. Fermer le flacon immédiatement après utilisation, puisque son contenu est sensible à la lumière ☼.

Précaution d'utilisation: Le contrôle d'origine humaine utilisés pour incuber la bandelette sur la matrice d'évaluation a été testé négatif pour le HBsAg, l'anti-VHC, l'anti-VIH-1 et anti-VIH-2. Néanmoins, les réactifs du test doivent être traités comme étant potentiellement infectieux et doivent être manipulés avec précautions. Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium en concentration non-déclarable. Eviter tout contact avec la peau.



Préparation et stabilité des échantillons patients

Echantillon: Sérum ou plasma (sur EDTA, héparine ou citrate) humains.

Stabilité: Les **échantillons patients** à tester peuvent généralement être conservés jusqu'à 14 jours entre +2°C et +8°C. Les échantillons dilués doivent être incubés le jour même.

Dilution de l'échantillon: Les **échantillons patients** à analyser doivent être dilués au **1:51** avec du tampon universel dilué prêt à être utilisé. Par exemple, ajouter 30 µl d'échantillon à 1,5 ml de tampon universel dilué prêt à être utilisé et bien mélanger au vortex. Le mélange d'échantillon à la pipette n'est pas adapté.

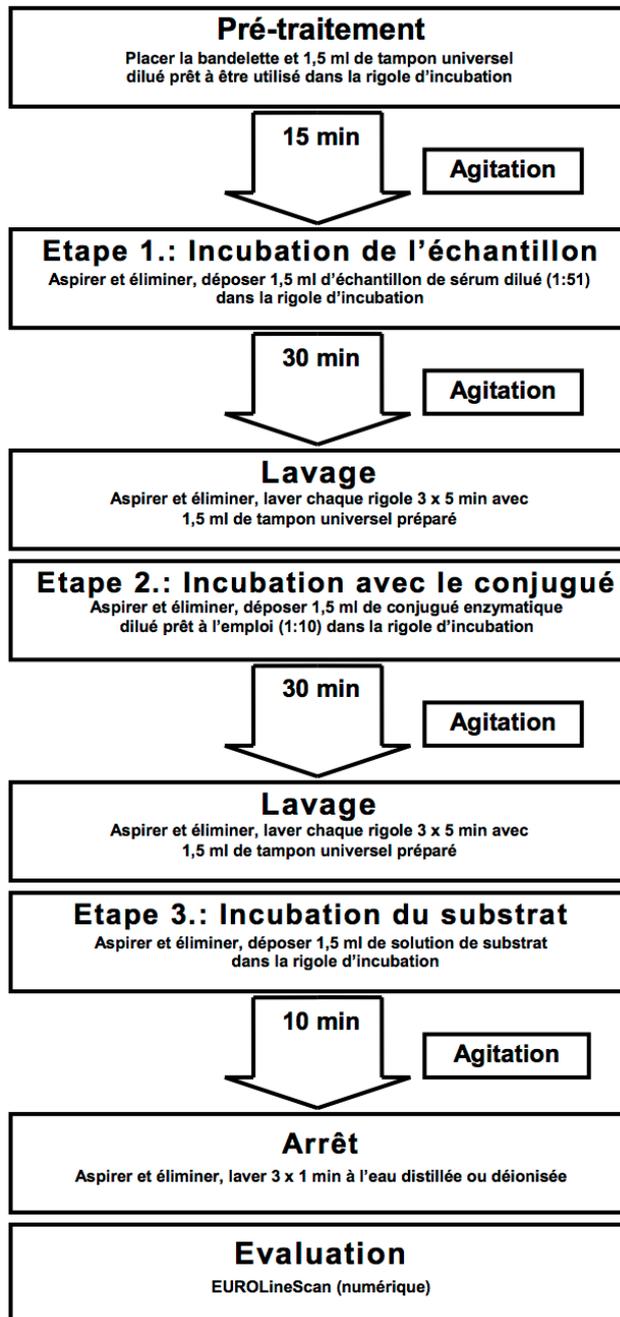
En alternative, le tampon échantillon EUROSORB IgM pour le blot anti-Treponema pallidum (ZD 1270-0130-3 M) peut être utilisé.

Incubation

- Saturation:** Remplir chaque rigole du bac d'incubation avec 1,5 ml de tampon universel dilué prêt à être utilisé en fonction du nombre d'échantillons de sérum à tester. Prendre dans la pochette protectrice le nombre de bandelettes nécessaires avec une paire de pince. Le numéro inscrit sur la bandelette doit être visible.
Incuber pendant **15 minutes** à température ambiante (+18°C à +25°C) sur un agitateur à bascule. Ensuite aspirer et éliminer tout le liquide.
- Incubation de l'échantillon:**
(1^{ère} étape) Remplir chaque rigole avec 1,5 ml d'échantillon de sérum dilué.
Incuber à température ambiante (+18°C à +25°C) pendant **30 minutes** sur un agitateur à bascule.
- Lavage:** Aspirer et éliminer le liquide de chaque rigole et laver chaque rigole **3 x 5 minutes** avec 1,5 ml de tampon universel sur un agitateur à bascule.
- Incubation du conjugué:**
(2^{ème} étape) Déposer 1,5 ml de conjugué enzymatique dilué prêt à être utilisé (anti-IgM humaine couplé à la phosphatase alcaline) dans chaque rigole.
Incuber pendant **30 minutes** à température ambiante (+18°C à +25°C) sur un agitateur à bascule.
- Lavage:** Aspirer et éliminer le liquide de chaque rigole. Laver comme décrit ci-dessus.
- Incubation du substrat:**
(3^{ème} étape) Déposer 1,5 ml de solution de substrat dans les rigoles du bac d'incubation.
Incuber pendant **10 minutes** à température ambiante (+18°C à +25°C) sur un agitateur à bascule.
- Arrêt:** Aspirer et éliminer le liquide de chaque rigole et laver chaque bandelette **3 x 1 minute** avec de l'eau déionisée ou distillée.

Pour les incubations automatisées sur l'EUROBlotMaster choisir le programme **Euro02 Inf WB30**.

Pour les incubations automatisées sur l'EUROBlotOne choisir le programme **Euro 01/02**.

**WESTERNBLOT Anti-Treponema pallidum (IgM)****Protocole d'incubation**



WESTERNBLOT Anti-Treponema pallidum (IgM) Évaluation et interprétation

Manipulation: Pour l'évaluation des bandelettes de test incubées nous recommandons généralement d'utiliser le logiciel **EUROLineScan**. Après l'arrêt de la réaction avec de l'eau distillée ou déionisée, placer les bandelettes incubées sur la feuille adhésive du protocole d'évaluation (feuille verte) en utilisant une paire de pinces. La position des bandelettes peut être corrigée tant qu'elles sont humides. Dès que toutes les bandelettes ont été placées sur le protocole d'évaluation, elles doivent être fortement pressées avec du papier filtre et laissées à l'air libre. Après avoir complètement séché, les bandelettes se collent sur la feuille adhésive. Les bandelettes sèches sont alors scannées en utilisant un scanner à plat (EUROIMMUN AG) et évaluées avec le logiciel **EUROLineScan**. Sinon, l'acquisition d'image et l'évaluation est possible directement dans les rigoles d'incubation (EUROBlotCamera et EUROBlotOne). Pour plus d'informations concernant le programme EUROLineScan, veuillez-vous référer au manuel d'utilisation de l'EUROLineScan (EUROIMMUN AG). Le code pour accéder au **test** dans le logiciel EUROLineScan est **T_pal_WB_IgM**.

Si une évaluation visuelle doit être réalisée dans des cas exceptionnels, positionner la matrice d'évaluation à côté de la bandelette collée de manière à ce que la bande noire au-dessus du numéro de lot sur les bandelettes coïncide avec la barre d'alignement de la matrice d'évaluation. **Le numéro de lot sur la matrice d'évaluation doit correspondre au numéro de lot inscrit sur les bandelettes.** Les bandes clairement reconnaissables sur la bandelette coïncidant avec les bandes marquées sur la matrice d'évaluation doivent être notées sur le protocole d'évaluation.

Antigènes: La source antigénique pour le **WESTERNBLOT Anti-Treponema pallidum d'EUROIMMUN** provient d'une préparation d'antigène de *Treponema pallidum* particulièrement adaptée. Cet antigène a été solubilisé en utilisant du dodécylsulfate de sodium suivi d'une séparation des protéines solubilisées selon le poids moléculaire en utilisant une électrophorèse discontinue sur gel de polyacrylamide puis d'un transfert des protéines séparées sur une membrane de nitrocellulose. 2 bandelettes contrôles sont prélevées de chaque coffret et incubées avec un sérum de référence. Une de ces bandelettes révélées est incluse dans le coffret, l'autre est conservée par EUROIMMUN à des fins de documentation.

Spécificité des antigènes sur les bandelettes:

Bande	Antigène	Spécificité
47 kDa	protéine de membrane, TpN47	spécifique
45 kDa	tmpA	spécifique
17 kDa	protéine de membrane, TpN17	spécifique
15 kDa	protéine de membrane, TpN15	spécifique

Dans la partie inférieure de la bandelette se trouve un morceau de membrane de contrôle du conjugué (IgA, IgG et IgM). En dessous du contrôle du conjugué se trouve un morceau de membrane avec une bande contrôle (Contrôle).

Attention: Une détermination correctement réalisée des anticorps de classe IgM dirigés contre les antigènes décrits ci-dessus est indiquée par une réaction positive de la bande contrôle et une réaction positive de la bande IgM.

Si l'une de ces bandes ne montre qu'une réaction très faible ou pas de réaction du tout, le résultat n'est pas valide.



Anticorps anti-Treponema pallidum de classe IgG

Interprétation des résultats: Les résultats du test WESTERNBLOT Anti-Treponema pallidum peuvent être divisés en résultats négatif, douteux et positif. Pour évaluer les signaux, les positions des bandes et l'intensité du marquage doivent être prises en compte, puisque les sérums négatifs produisent parfois des signaux faibles sur des bandes particulières.

Résultat	Caractéristiques
Négatif	Aucune bande d'antigènes spécifiques.
Douteux	Une bande distincte correspondant à un des antigènes spécifiques: p15 kDa, p17 kDa, p45 kDa ou p47 kDa.
Positif	Plus d'une bande distincte correspondant à des antigènes spécifiques: p15 kDa, p17 kDa, p45 kDa ou p47 kDa.

Anticorps anti-Treponema pallidum de classe IgM

Interprétation des résultats: Les résultats du test WESTERNBLOT Anti-Treponema pallidum peuvent être divisés en résultats négatif, douteux et positif. Pour évaluer les signaux, les positions des bandes et l'intensité du marquage doivent être prises en compte, puisque les sérums négatifs produisent parfois des signaux faibles sur des bandes particulières.

Pour le diagnostic d'une infection Treponema récente, un résultat IgM positif doit être confirmé par un résultat IgG positif en utilisant un nouvel échantillon de sang prélevé après 3 à 6 semaines.

Résultat	Caractéristiques
Négatif	Aucune bande d'antigènes spécifiques.
Douteux	Une bande faible des antigènes spécifiques: p15 kDa, p17 kDa, p45 kDa ou p47 kDa. Il est recommandé de réaliser un second test sur un échantillon frais après quelques semaines.
Positif	Au moins une bande distincte des antigènes spécifiques: p15 kDa, p17 kDa, p45 kDa ou p47 kDa.

Dans le cadre du diagnostic, le tableau clinique du patient doivent être toujours pris en compte en association avec les résultats sérologiques.

Caractéristiques du test

Gamme de mesure: Le Westernblot est une méthode qualitative. Aucune gamme de mesure n'est fournie.

Variation inter- et intra-dosage: La variation inter-dosage a été déterminée par des analyses multiples réalisées en plusieurs jours sur des échantillons caractérisés. La variation intra-dosage a été déterminée par des analyses multiples réalisées en une journée sur des échantillons caractérisés. Dans tous les cas, l'intensité de coloration des bandes a été trouvée dans la limite de la gamme spécifiée. Ce Westernblot présente d'excellentes reproductibilités inter- et intra-dosage.

Interférence: Des sérums hémolysés, lipémiques et ictériques ne montrent aucun effet sur les résultats analytiques.

Réactions croisées: La qualité des substrats antigéniques et la source d'antigène garantissent la forte spécificité de ce Westernblot. La détermination des réactions croisées n'est pas nécessaire pour le Westernblot car une différenciation directe entre les antigènes spécifiques et non-spécifiques est possible avec cette technique.



Spécificité et sensibilité: Un panel de 19 échantillons sérologiquement définis, pré-caractérisés par un test de référence approuvé (certifié par l'Institut Paul-Ehrlich) et 50 échantillons de donneurs de sang en bonne santé, ayant tous des résultats négatifs en test TPHA, ont été étudiés avec le Westernblot Anti-Treponema pallidum d'EUROIMMUN.

IgG	n = 69	Panel caractérisé (voir ci-dessus)	
		positif	négatif
Westernblot Anti-Treponema pallidum d'EUROIMMUN	positif	19	0
	négatif	0	50

Le Westernblot Anti-Treponema pallidum IgG a une spécificité de 100% et une sensibilité de 100%. La valeur prédictive positive est de 100%.

IgM	n = 69	Panel caractérisé (voir ci-dessus)	
		positif	négatif
Westernblot Anti-Treponema pallidum d'EUROIMMUN	positif	17	1
	négatif	0	51

Le Westernblot Anti-Treponema pallidum IgM a une spécificité de 98% et a sensibilité de 100%. La valeur prédictive positive est de 94%.

Ni les anticorps anti-Treponema pallidum IgM, ni les IgG n'ont été détectés dans les échantillons des donneurs de sang en bonne santé.

Signification clinique

Le **Treponema pallidum pallidum** est une bactérie hélicoïdale appartenant à la famille des Spirochètes. Cette famille comprend 5 genres: Borrelia, Spirochaeta, Cristispira, Treponema et Leptospira. Treponema pallidum est l'agent responsable de la syphilis, une maladie infectieuse chronique. Les sous espèces T. pallidum endemicum provoque la syphilis vénérienne (bejel); T. pallidum pertenue conduit à une infection non vénérienne retrouvée dans les régions tropicales et appelée framboesia (pian); T. pallidum carateum est l'agent responsable du Pinta (Carate).

En 1905 Fritz Schaudinn (Zoologiste Allemand, 1871-1906) et Erich Hoffmann (Dermatologue Allemand, 1868-1959) de la Charité à Berlin ont été les premiers à détecter par microscopie l'agent responsable de la syphilis. Le Spirochète a été trouvé pour la première fois en 1913 par le microbiologiste et médecin Japonais Noguchi Hideyo (1876-1928) dans le tissu cérébral d'un patient ayant une paralysie progressive.

La Syphilis est sexuellement transmise entre les êtres humains via les muqueuses. La transmission indirecte par transfusions sanguines et par des blessures est également possible. Les nouveau-nés peuvent être infectés par leur mère au cours de la grossesse ainsi qu'à la naissance (syphilis connata). La Syphilis est un facteur de risque connu d'avortement et de mortalité.

La maladie est divisée en différents stades, dont le nombre varie dans la littérature, selon la région du monde. Dans les régions germanophones, quatre stades sont différenciés (primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire). En Asie et parfois au Etats-Unis d'Amérique, les troisième et quatrième étapes sont regroupées dans le stade tertiaire. Le stade secondaire a une signification plus large et est subdivisé en phase latente précoce et phase latente tardive. La phase latente précoce est décrite comme étant séronégative, asymptomatique et infectieuse (environ une année après l'infection), alors que la phase latente tardive est caractérisée comme étant séroréactive, asymptomatique et non-infectieuse (plus d'un an après l'infection). En Europe Centrale l'infection est divisée selon les quatre stades suivants:



Stade primaire: L'ulcus durum (ulcère induré) est caractéristique de la lésion primaire de la syphilis (stade I) et apparaît normalement 3 semaines après l'infection. Il se développe au point d'inoculation du pathogène (ex: pénis). C'est un ulcère indolore, qui contient une grande quantité du pathogène et qui est donc fortement contagieux. Une érosion limitée fibreuse ou creusée a typiquement un bord ourlé et dur. Un gonflement localisé des ganglions lymphatiques sans douleur est possible et les ganglions lymphatiques restent déplaçables. A partir de moment, la maladie peut être diagnostiquée en utilisant par exemple le test TPHA (Treponema pallidum haemagglutination assay). Après 2 à 6 semaines l'ulcère guérit en laissant une cicatrice. L'infection persiste généralement et évolue vers le stade II.

Stade secondaire: Environ 8 semaines après l'infection, la maladie se manifeste avec des symptômes grippaux comme de la fièvre, une fatigue ou des maux de tête et des douleurs articulaires. En plus du gonflement généralisé des ganglions lymphatiques, 90% des patients présentent des troubles cutanés locaux ou généralisés, qui s'accompagnent ou non de faibles démangeaisons. Des taches roses claires se forment en premier et évoluent ensuite en nodules cuivrés durs (papules). Au premier plan sont trouvés des condylomata lata, de larges papules, qui affectent surtout les plis cutanés. Le liquide excrété par les papules ouvertes et suitantes est fortement contagieux. De plus, divers troubles organiques peuvent se développer, par exemple, cataracte, irrite, hépatite, vascularite, et troubles du myocarde.

Tous les troubles cutanés (syphilides) guérissent après environ 4 mois. La syphilis secondaire est suivie par un stade cliniquement silencieux (syphilis latente), qui peut durer pendant des années.

Stade tertiaire: Les manifestations typiques de l'infection Treponema pallidum en stade III sont de larges papules et des ulcères sur la peau et les membranes muqueuses. Elles sont généralement accompagnées d'une syphilis organique ou viscérale, incluant des lésions nodulaires (gommés) et une inflammation interstitielle, une périvasculite, une syphilis cardiovasculaire, une neurosyphilis (formes asymptomatique et symptomatique), une ostéite, et une périostite.

Stade quaternaire: Dix à trente ans après une infection non traitée, 8% à 10% des patients présentent des troubles neurologiques sévères comme la neurosyphilis avec une paralysie progressive et un Tabes dorsalis avec des troubles mentaux et végétatifs sévères.

Le **diagnostic** de la syphilis est basé sur les résultats cliniques selon le stade de la maladie, la détection microscopique de l'agent infectieux (fond noir) et la détection sérologique des anticorps anti-Treponema pallidum.

Le Treponema pallidum a une longueur de 5 à 15 µm et une largeur de 0,2 µm avec 10 à 20 tours et peut pivoter autour de son axe longitudinal. En raison de sa structure fine, il est difficile de le rendre observable par coloration sous le microscope. Cependant, les bactéries vivantes peuvent être analysées en utilisant un microscope à fond noir. La détection en cultures n'a pas encore été réussie.

Le TPHA (Treponema pallidum haemagglutination assay) est un test pour la détection indirecte des anticorps anti-Treponema pallidum. Les érythrocytes marqués à leur surface avec des protéines et des polysaccharides de Treponema pallidum sont mélangés avec le sérum de patient. La présence des anticorps anti-Treponema pallidum dans le sérum de patient provoque une agglutination des érythrocytes (hémagglutination) qui est visible à l'œil nu.

Si le test de dépistage est positif, une recherche sérologique approfondie est recommandée pour confirmer le résultat obtenu, soit en utilisant le test FTA-ABS Anti-Treponema pallidum soit en utilisant des méthodes de test sérologiques modernes comme l'ELISA anti-Treponema pallidum ou le Western blot anti-Treponema pallidum (par ex: EUROLINE WB anti-Treponema pallidum). Les anticorps anti-cardiolipides servent de marqueur d'activité de l'infection (tests VDRL ou RPR, EUROLINE WB).



Les anticorps anti-Treponema pallidum peuvent être détectés dans le sérum et le LCR. Ceci a un intérêt diagnostique par exemple chez les enfants ayant une syphilis congénitale. Pour la détection quantitative in vitro des anticorps humain d'immunoglobulines de classe IgG dirigés contre Treponema pallidum dans le LCR, le même ELISA que celui utilisé pour la détection des anticorps dirigés contre Treponema pallidum dans le sérum est adapté. Lors de la détermination d'une infection dans le LCR, il est nécessaire de faire la distinction entre des anticorps produits de façon intrathécale et ceux qui ont migrés du sang vers le LCR. La production intrathécale d'anticorps spécifiques du pathogène est déterminé par le calcul du quotient relatif LCR/sérum LSQrel. (synonyme: Indice de spécificité de l'anticorps). Le quotient est calculé à partir du ratio des anticorps spécifiques du pathogène sur les IgG totales dans le LCR par rapport au ratio des anticorps spécifiques du pathogène sur les IgG totales dans le sérum. Avec cette méthode, une infection par Treponema pallidum dans le LCR peut être facilement déterminée de façon fiable.

Références bibliographiques

1. Brown DL, Frank JE. **Diagnosis and management of syphilis.** Am Fam Physician 68 (2003) 283-290.
2. Centurion-Lara A, Molini BJ, Godomes C, Sun E, Hevner K, Van Voorhis WC, Lukehart SA. **Molecular differentiation of Treponema pallidum subspecies.** J Clin Microbiol 44 (2006) 3377-3380.
3. Dang Q, Feng J, Lu X, Zhang X, Xu H, Liu C, Nu X. **Evaluation of specific antibodies for early diagnosis and management of syphilis.** Int J Dermatol 45 (2006) 1169-1171.
4. Department of Health and Human Services. CDC. **Syphilis - Physician's Pocket Guide.** www.cdc.gov/std/see/
5. EUROIMMUN AG. **Testkit für die Labordiagnostik.** Deutsches Gebrauchsmuster DE 20 2012 004 404 (angemeldet 2012).
6. Herbert LJ, Middleton SI. **An estimate of syphilis incidence in Eastern Europe.** J Glob Health 2 (2012) 10402. 1-7.
7. Kent ME, Romanelli F. **Reexamining syphilis: an update on epidemiology, clinical manifestations, and management.** Ann Pharmacother 42 (2008) 226-236.
8. Manavi K, Young H, McMillan A. **The sensitivity of syphilis assays in detecting different stages of early syphilis.** Int J STD AIDS 17 (2006) 768-771.
9. Muller I, Brade V, Hagedorn HJ, Straube E, Schorner C, Frosch M, Hlobil H, Stanek G, Hunfeld KP. **Is serological testing a reliable tool in laboratory diagnosis of syphilis? Meta-analysis of eight external quality control surveys performed by the german infection serology proficiency testing program.** J Clin Microbiol 44 (2006) 1335-1341.
10. Rawstron SA, Mehta S, Bromberg K. **Evaluation of a Treponema pallidum-specific IgM enzyme immunoassay and Treponema pallidum western blot antibody detection in the diagnosis of maternal and congenital syphilis.** Sex Transm Dis 31 (2004) 123-126.
11. Rigsby P, Ison C, Brierley M, Ballard R, Hagedorn HJ, Lewis DA, Notermans DW, Riis J, Robertson P, Seppälä IJ, Rijpkema S. **Evaluation of two human plasma pools as candidate international standard preparations for syphilitic antibodies.** Biologicals 37 (2009) 245-251.
12. EUROIMMUN AG. Stöcker W, Ehling T. **Vorrichtung und Verfahren zur Untersuchung einer biologischen Probe.** Deutsche Patentanmeldung DE 10 2011 011 795.4 (angemeldet 2011).
13. Stöcker* W, Fauer* H, Krause* C, Barth E, Martinez A. (*EUROIMMUN AG). **Verfahren zur Optimierung der automatischen Fluoreszenzerkennung in der Immundiagnostik.** Deutsche Patentanmeldung (Offenlegungsschrift) DE 10 2006 027 516.0 und WO2007140952 (2006).
14. Sun R, Lai DH, Ren RX, Lian S, Zhang HP. **Treponema pallidum-specific antibody expression for the diagnosis of different stages of syphilis.** Chin Med J (Engl) 126 (2013) 206-210.

Annexe 7 : Fiche technique EUROBlot Master

EUROIMMUN

Medizinische
Labordiagnostika
AG



The EUROBlotMaster is a compact tabletop device for fully automated processing of immunoblots. The system carries out the preparation of strips as well as all incubation and washing steps. The incubated strips can then be digitalised by means of the EUROBlotCamera or EUROBlotScanner and evaluated using the EUROLineScan software. Thus, diagnoses are made within a few minutes, while the corresponding data and strip images are electronically archived.



EUROBlotCamera



EUROBlotScanner



EUROLineScan

System

Quantity of stored tests	maximally 20
Quantity of analysis steps.....	maximally 14
Quantity of step cycles.....	1 – 20
Incubation time	00:00–30:59 (hh:mm) in steps of 1 min
Overall incubation time.....	maximally 99:59 (hh:mm)
Quantity of strips.....	maximally 30 or 44
Incubation tray.....	plastic, disposable
Strip shaking	rocking shaker
Number of dispensing channels ..	6
Dispensing volume	0.1 – 5 ml in steps of 0.1 ml
Dispensing accuracy	CV < 10%
Capacity of reagent bottles.....	4x100 ml, 2x 250 ml, 1x500 ml
Capacity of waste container	2000 ml

Technical details

Display	illuminated liquid crystal display (LCD), 2 rows with 40 characters each
Control panel.....	membrane keyboard with 6 keys, 7 LED control lamps
Dialogue languages.....	German, English, French, Spanish, Portuguese, Italian, Turkish, and Czech
Computer interface.....	USB
Power supply	100–240V, 50/60 Hz, 30 VA
Width x depth x height	52 cm x 31 cm x 25 cm
Weight	14.5 kg

EUROIMMUN AG - 23560 Luebeck (Germany) - Seekamp 31 - Telephone +49 451 58550 - Fax 5855591 - E-mail euroimmun@euroimmun.de

YG_0151_LUK_003_04/2017

Annexe 8 : Liste des codes commentaires systématiques sur les comptes rendus des résultats

Profil sérologique	Commentaire	Code
TT CMIA – <1 RPR –	Absence d'Ac syphilitiques A contrôler dans 2-3 semaines en cas de suspicion de syphilis primaire	Syp 1
TT CMIA + RPR + ≥ 4 TPHAT +	Probable syphilis active. A confronter au contexte clinique.	Syp 2
TT CMIA + (Proche du seuil de positivité) RPR – ou 1 TPHAT + ≤ 640	Probable cicatrice sérologique. A contrôler dans 2 ou 3 semaines si suspicion d'infection récente.	Syp 3
TT CMIA + > 20 RPR – TPHAT + ≥ 1280	Profil pouvant correspondre à une syphilis latente ou à une cicatrice sérologique. A confronter au contexte clinique. A contrôler dans 2 ou 3 semaines si suspicion d'infection récente.	Syp 4
TT CMIA + RPR + 1 ou 2 TPHAT +	Syphilis active, traitée ou latente ? A confronter au contexte clinique et à contrôler dans 2 ou 3 semaines si suspicion d'infection récente.	Syp 5
TT CMIA + RPR + ≥ 4 TPHAT négatif ou ≤ 160	Syphilis primaire active vue précocement. En dehors de ce contexte, à contrôler dans 2 ou 3 semaines. A confronter au contexte clinique.	Syp 6
TT CMIA – <1 RPR + ≤ 4 Isolé TPHAT – < 80	Absence d'Ac syphilitiques. Faux positif probable (pathologies auto-immunes, grossesse, infections virales, hépatopathie, néoplasie...). En dehors de ce contexte, à contrôler dans 2 ou 3 semaines. A confronter au contexte clinique.	Syp 7
TT CMIA+ Isolé RPR – TPHAT –	Test de dépistage positif non confirmé par le titrage du TPHAT. Faux positif, contact ancien ou infection récente ? A confronter au contexte clinique. Contrôler la sérologie dans 2 à 3 semaines si suspicion d'infection récente.	Syp 8
TT CMIA + Isolé RPR – TPHAT 80	Test de dépistage positif et titrage du TPHAT faiblement positif. Faux positif, contact ancien ou infection récente ? A confronter au contexte clinique. Contrôler la sérologie dans 2 à 3 semaines si suspicion d'infection récente.	Syp 9
SUIVI :		
Décroissance significative du RPR (2 dilutions en 3 mois ou 3 dilutions en 6 mois) Poursuivre le suivi sérologique jusqu'à négativation du RPR.	Décroissance significative du RPR en faveur d'un traitement efficace. Poursuivre le suivi sérologique jusqu'à négativation du RPR. OU Négativation du RPR en faveur d'un traitement efficace. Cicatrice sérologique.	Syps1
Décroissance non significative du RPR (<2 dilutions en 3 mois ou <3 dilutions en 6 mois)	Décroissance non significative du RPR (cf antécédents), peu en faveur d'un traitement efficace. Poursuivre le suivi sérologique.	Syps 3
Réascension significative du RPR si x 2 dilutions	Réascension des titres sérologiques en faveur d'une nouvelle contamination.	Syps 5
Si 2 prélèvements trop rapprochés (<3 mois) pour le suivi	Le suivi de l'évolution du RPR s'effectue classiquement à 3, 6 et 12 mois.	Syp12

Annexe 9 : Comparaison du TT CMIA (SYPIE) et du TPHA (1)

fait du 7/01/13 au 9/01/13

n°	échantillon	SYPIE	TPHA	VDRL	Conclusion
1	13015002	0,04	< 80	-	concordant
2	13015007	0,06	< 80	-	concordant
3	13015015	45,8	5120	+ 8	concordant
4	13015016	0,12	< 80	-	concordant
5	13015027	0,06	< 80	-	concordant
6	13015044	0,06	< 80	-	concordant
7	13015050	0,06	< 80	-	concordant
8	13015066	0,08	< 80	-	concordant
9	13015069	20,26	320	+ 2	concordant
10	13015073	41,28	2560	+ 4	concordant
11	13015077	0,05	< 80	-	concordant
12	13015081	0,05	< 80	-	concordant
13	13015084	0,05	< 80	-	concordant

14	13015099	0,05	< 80	-	concordant
15	13015102	0,04	< 80	-	concordant
16	13015105	0,06	< 80	-	concordant
17	13016010	0,1	< 80	-	concordant
18	13016021	0,09	< 80	-	concordant
19	13016032	0,07	< 80	-	concordant
20	13016038	0,06	< 80	-	concordant
21	13021002	0,06	< 80	-	concordant
22	13021016	0,04	< 80	-	concordant
23	13021023	2,97	< 80	-	discordant
24	13021031	0,09	< 80	-	concordant
25	13021034	0,05	< 80	-	concordant
26	13021036	0,04	< 80	-	concordant
27	13021044	0,1	< 80	-	concordant
28	13021045	0,07	< 80	-	concordant
29	13021048	0,06	< 80	-	concordant
30	13021053	0,03	< 80	-	concordant
31	13021057	0,05	< 80	-	concordant
32	13021068	0,05	< 80	-	concordant
33	13021072	0,04	< 80	-	concordant
34	13021076	0,11	< 80	-	concordant
35	13021078	0,08	< 80	-	concordant
36	13021081	0,06	< 80	-	concordant
37	13021087	0,03	< 80	-	concordant
38	13021101	50,1	20480	+ 1	concordant
39	13021111	23,86	160	+ 4	concordant
40	13021113	0,05	< 80	-	concordant
41	13022004	0,09	< 80	-	concordant
42	13022008	0,05	< 80	-	concordant
43	13022016	0,08	< 80	-	concordant
44	13022018	1,21	< 80	-	discordant
45	13022022	0,05	< 80	-	concordant
46	13022028	0,07	< 80	-	concordant
47	13022038	0,08	< 80	-	concordant
48	13022044	0,23	< 80	-	concordant
49	13022054	0,07	< 80	-	concordant
50	13022076	0,05	< 80	-	concordant
51	13022078	0,11	< 80	-	concordant
52	13022081	0,08	< 80	-	concordant
53	13022097	0,15	< 80	-	concordant
54	13022109	0,07	< 80	-	concordant

Références bibliographiques

1. Lacour C. Validation de méthodes du TPHA et VDRL dans le diagnostic de la syphilis au laboratoire de bactériologie de l'hôpital de la croix rousse [Thèse d'exercice pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie]. Lyon, France : Université Claude Bernard ; 2013.
2. Denis F, Ploy M-C, Martin C, Cattoir V. Bactériologie Médicale, techniques usuelles. Paris, France: Elsevier Masson, 2016. 640 p.
3. WHO. World Health Organisation programmes, Yaws eradication. [En ligne]. 2016 [cité le 20 Oct 2016]. Disponible : <http://www.who.int/yaws>
4. Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales. ePILLY Trop 2016, Maladies infectieuses et tropicales. Paris, France : Alinéa Plus, 2016. 976 p.
5. Rothschild BM. History of Syphilis. Clin Infect Dis. 2005;40(10):1454–63.
6. Tampa M, Sarbu I, Matei C, Benea V, Georgescu S. Brief History of Syphilis. J Med Life. 2014;7(1):4–10.
7. Frith J. Syphilis - its early history and treatment until penicillin, and the debate on its origins. J Mil Veterans Health. 2012;20(4):49.
8. Tilles G. Il y a 100 ans: le BW. Presse Médicale. 2007;36(2):366–9.
9. Viriot D, Fournet N, Ndeikoundan N, Lot F. Institut National de Veille Sanitaire, Epidémiologie des IST en France et en Europe [En ligne]. 2015 [cité le 24 juil 2017] Disponible: http://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/S2_M_Epidemiologie_des_IST_France_et_Europe_F_LOT.pdf
10. Institut De Veille Sanitaire. Comment surveiller les IST? [En ligne]. 2009 [cité le 24 juil 2017]. Disponible: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/VIH-sida-IST/Infections-sexuellement-transmissibles-IST/Comment-surveiller-les-IST>
11. Dupin N. Syphilis. Rev Med Interne. 2016;37(11):735–42.
12. Institut National de Veille Sanitaire. Bulletins des réseaux de surveillance des IST- Données au 31 décembre 2015 [En ligne]. 2015 [cité le 24 juil 2017]. Disponible:

<http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/VIH-sida-IST/Infections-sexuellement-transmissibles-IST/Bulletins-des-reseaux-de-surveillance-des-IST>

13. WHO. L'élimination mondiale de la syphilis congénitale : raison d'être et stratégie [En ligne]. 2015 [cité le 4 avr 2017]. Disponible :

<http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241595858/fr/>

14. WHO. Syphilis congénitale : un silence lourd de conséquences pour les nouveau-nés [En ligne]. 2013 [cité le 5 avr 2017]. Disponible :

<http://www.who.int/bulletin/volumes/91/3/13-118604/fr/>

15. Bristow CC, Adu-Sarkodie Y, Ondondo RO, Bukusi EA, Dagnra CA, Oo KY, et al. Multisite Laboratory Evaluation of a Dual Human Immunodeficiency Virus (HIV)/Syphilis Point-of-Care Rapid Test for Simultaneous Detection of HIV and Syphilis Infection. *Open Forum Infect Dis.* 2014;1(1):ofu015.

16. Lafond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):29–49.

17. Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science.* 1998;281(5375):375–88.

18. Whang KK, Lee MG, Lew W, Lee JB. Production and characterization of monoclonal antibodies to *Treponema pallidum*. *J Dermatol Sci.* 1992;4(1):26–32.

19. CNR syphilis. Centre National de Référence de la Syphilis [En ligne]. 2015 [cité le 01 aou 2017]. Disponible : <http://www.cnr-syphilis.fr>

20. Center for Disease Control and prevention. Sexually transmitted diseases, Syphilis , CDC Fact Sheet [En ligne]. 2015 [cité le 17 septembre 2016]. Disponible :

<https://www.cdc.gov/std/syphilis/stdfact-syphilis-detailed.htm>

21. Charlier C, Benhaddou N, Dupin N. Syphilis et grossesse. *Presse Medicale Paris Fr* 1983. 2015;44(6 Pt 1):631–8.

22. Singh AE, Romanowski B. Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic,

and some biologic features. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(2):187–209.

23. Janier M, Recommandations thérapeutiques de la section MST-sida de la SFD. Recommandations diagnostiques et thérapeutiques pour les Maladies Sexuellement Transmissibles. *Ann Dermatol Venereol.* 2016;143(11):701–2.
24. Courjon J, Hubiche T, Dupin N, Grange PA, Del Giudice P. Clinical Aspects of Syphilis Reinfection in HIV-Infected Patients. *Dermatol Basel Switz.* 2015;230(4):302–7.
25. Farhi D, Dupin N. Management of syphilis in the HIV-infected patient: facts and controversies. *Clin Dermatol.* 2010;28(5):539–45.
26. Hook EW. Syphilis. *Lancet Lond Engl.* 2017;389(10078):1550-1557.
27. Haute Autorité de Santé. Argumentaire : Modification de la Nomenclature des actes de biologie médicale pour les actes de recherche du *Treponema pallidum* (bactérie responsable de la syphilis) [En ligne]. 2015 [cité le 19 septembre 2016] Disponible : https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2021758/fr/modification-de-la-nomenclature-des-actes-de-biologie-medicale-pour-les-actes-de-recherche-du-treponema-pallidum-bacterie-responsable-de-la-syphilis
28. Laboratoire Biomnis. Précis de biopathologie -Analyses médicales spécialisées [En ligne]. 2016 [cité le 19 septembre 2016]. Disponible : <https://www.biomnis.com/ressources/precis-de-biopathologie/>
29. Caisse Nationale de l'Assurance Maladie desTravailleurs Salariés. Biologie médicale- Nomenclature des Actes. 2017.
30. Collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales. E. pilly, Maladies infectieuses et tropicales. Paris, France: Alinéa Plus, DL 2015; 2015. 648 p.
31. Société Française de Dermatologie. Recommandations diagnostiques et thérapeutiques pour les maladies sexuellement transmissibles [En ligne]. 2016 [cité le 20 mai 2017]. Disponible : [http://www.sfdermato.org/media/image/upload-editor/files/Guidelines%202016\(2\).pdf](http://www.sfdermato.org/media/image/upload-editor/files/Guidelines%202016(2).pdf)
32. Workowski KA, Bolan GA, Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly*

Rep Recomm Rep. 2015 Jun 5;64(RR-03):1–137.

33. Workowski KA, Berman S, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep.* 2010;59(RR-12):1–110.

34. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Discordant results from reverse sequence syphilis screening--five laboratories, United States, 2006-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2011;60(5):133–7.

35. Haute Autorité de Santé. Modification de la Nomenclature des actes de biologie médicale pour l'acte de suivi thérapeutique des patients infectés par *Treponema pallidum* (bactérie responsable de la syphilis) [En ligne]. 2017 [cité le 13 juillet 2017] Disponible : https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-03/dir3/argumentaire_syphilis.pdf

36. Société française de microbiologie, Bourlet T, Courcol R, Herrmann J-L, Lachaud L, Lamy B, et al., editors. *Rémic: référentiel en microbiologie médicale*. 5e édition 2015. Paris: Société française de microbiologie; 2015. 856 p.

37. Shields M, Guy RJ, Jeffreys NJ, Finlayson RJ, Donovan B. A longitudinal evaluation of *Treponema pallidum* PCR testing in early syphilis. *BMC Infect Dis.* 2012;12:353.

38. Gayet-Ageron A, Sednaoui P, Lautenschlager S, Ferry T, Toutous-Trellu L, Cavassini M, et al. Use of *Treponema pallidum* PCR in testing of ulcers for diagnosis of primary syphilis. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(1):127–9.

39. Gayet-Ageron A, Combescure C, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger TV. Comparison of Diagnostic Accuracy of PCR Targeting the 47-Kilodalton Protein Membrane Gene of *Treponema pallidum* and PCR Targeting the DNA Polymerase I Gene: Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2015;53(11):3522–9.

40. Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger TV, Combescure C. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect.* 2013;89(3):251–6.

41. Grange PA, Gressier L, Dion PL, Farhi D, Benhaddou N, Gerhardt P, et al. Evaluation

of a PCR test for detection of *treponema pallidum* in swabs and blood. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3):546–52.

42. Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trellu L, Lautenschlager S, Furrer H, Piguet V, et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. *Sex Transm Infect*. 2009;85(4):264–9.

43. Janier M, Unemo M, Dupin N, Tiplica GS, Patel R. 2014 European guideline on the management of syphilis: giving evidence priority. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2016;30(10):e78–9.

44. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(1):1–21.

45. Pope V, Fears MB, Morrill WE, Castro A, Kikkert SE. Comparison of the Serodia *Treponema pallidum* particle agglutination, Captia Syphilis-G, and SpiroTek Reagin II tests with standard test techniques for diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol*. 2000;38(7):2543–5.

46. Neuza Satomi Sato. Laboratorial Diagnosis of Syphilis, Syphilis - Recognition, Description and Diagnosis [En ligne]. 2011[cité le 25 juillet 2017]. Disponible : <https://www.intechopen.com/books/syphilis-recognition-description-and-diagnosis/laboratorial-diagnosis-of-syphilis>

47. WHO. Utilisation des Tests de Diagnostic Rapides de la Syphilis [En ligne]. 2015 [cité le 10 juillet 2017]. Disponible : http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43710/1/TDR_SDI_06.1_fre.pdf

48. ANSM. Contrôle du marché des tests rapides d'orientation diagnostique de la syphilis Bilan de la sensibilité et de la spécificité [En ligne]. 2015 [cité le 10 juillet 2017]. Disponible : http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/312edcae6bde10cadd654e6ecf12dde.pdf

49. Herbst de Cortina S, Bristow CC, Humphries R, Vargas SK, Konda KA, Caceres CF, et al. Laboratory Evaluation of a Smartphone-Based Electronic Reader of Rapid Dual Point-of-Care Tests for Antibodies to Human Immunodeficiency Virus and *Treponema pallidum* Infections. *Sex Transm Dis*. 2017;44(7):412–6.

50. Naaber P, Makoid E, Aus A, Loivukene K, Poder A. Evaluation of ID-PaGIA syphilis antibody test. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2009;75(5):492–4.
51. Borelli S, Monn A, Meyer J, Berger U, Honegger HP, Lautenschlager S. Evaluation of a particle gel immunoassay as a screening test for syphilis. *Infection.* 2009;37(1):26–8.
52. Park BG, Yoon JG, Rim JH, Lee A, Kim H-S. Comparison of Six Automated Treponema-Specific Antibody Assays. *J Clin Microbiol.* 2016;54(1):163–7.
53. Binnicker MJ, Jespersen DJ, Rollins LO. Treponema-Specific Tests for Serodiagnosis of Syphilis: Comparative Evaluation of Seven Assays. *J Clin Microbiol.* 2011;49(4):1313–7.
54. Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J, et al. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2004;110(3):252–66.
55. Gomez E, Jespersen DJ, Harring JA, Binnicker MJ. Evaluation of the Bio-Rad BioPlex 2200 syphilis multiplex flow immunoassay for the detection of IgM- and IgG-class antitreponemal antibodies. *Clin Vaccine Immunol CVI.* 2010;17(6):966–8.
56. Marangoni A, Nardini P, Foschi C, Moroni A, D’Antuono A, Bacchi Reggiani L, et al. Evaluation of the BioPlex 2200 syphilis system as a first-line method of reverse-sequence screening for syphilis diagnosis. *Clin Vaccine Immunol CVI.* 2013;20(7):1084–8.
57. Yukimasa N, Miura K, Miyagawa Y, Fukuchi K. Evaluation of new automated syphilis test reagents “IMMUNOTICLES AUTO3” series: performance, biochemical reactivity, and clinical significance. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* 2015;21(1):1–7.
58. Enders M, Hunjet A, Gleich M, Imdahl R, Mühlbacher A, Schennach H, et al. Performance Evaluation of the Elecsys Syphilis Assay for the Detection of Total Antibodies to *Treponema pallidum*. *Clin Vaccine Immunol CVI.* 2015;22(1):17–26.
59. Donkers A, Levy HR, Letens-van Vliet A. Syphilis detection using the Siemens ADVIA Centaur Syphilis treponemal assay. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2014;433:84–7.
60. Van den Bossche D, Florence E, Kenyon C, Van Esbroeck M. Vitros 5600 Syphilis TPA assay: evaluation of an automated chemiluminescence assay for detection of *Treponema*

pallidum antibodies in a high prevalence setting. *Sex Transm Dis.* 2014;41(11):680–3.

61. Huh HJ, Chung J-W, Park SY, Chae SL. Comparison of Automated Treponemal and Nontreponemal Test Algorithms as First-Line Syphilis Screening Assays. *Ann Lab Med.* 2016;36(1):23–7.
62. Ly TD, C. Coignard. Evaluation of five fully-automated immunoassays for diagnosis of syphilis [En ligne]. 2014 [cité le 3 sep 2017]. Disponible : http://www.biomnis.com/wp-content/uploads/2015/09/Biomnis_Poster_2014_Ly_15.pdf
63. Loeffelholz MJ, Binnicker MJ. Point-Counterpoint: It Is Time To Use Treponema-Specific Antibody Screening Tests for Diagnosis of Syphilis. *J Clin Microbiol.* 2012;50(1):2–6.
64. Hook EW, Marra CM. Acquired syphilis in adults. *N Engl J Med.* 1992;326(16):1060–9.
65. Jurado RL, Campbell J, Martin PD. Prozone phenomenon in secondary syphilis. Has its time arrived? *Arch Intern Med.* 1993;153(21):2496–8.
66. Hwang HY, Kim MH. Practical Application of Quantitative HiSens Auto Rapid Plasma Reagin Latex Turbidimetric Immunoagglutination for Diagnosing Syphilis; Comparison Analysis between Rapid Plasma Reagin Latex Turbidimetric Immunoagglutination Test and Rapid Plasma Reagin Card. *Infect Chemother.* 2009;41(3):154–9.
67. Lee J-H, Lim CS, Lee M-G, Kim H-S. Comparison of an automated rapid plasma reagin (RPR) test with the conventional RPR card test in syphilis testing. *BMJ Open.* 2014;4(12):e005664.
68. Marangoni A, Foschi C, Capretti MG, Nardini P, Compri M, Corvaglia LT, et al. Contribution of a Comparative Western Blot Method to Early Postnatal Diagnosis of Congenital Syphilis. *Clin Vaccine Immunol CVI.* 2016;23(5):410–6.
69. Janier M, Caumes E. Syphilis. Dans: *Encyclo Méd Chir, Maladies Infectieuses* [Article 08-039-10.], 2011.
70. Organisation internationale de normalisation [En ligne]. 2015 [cité le 13 avr 2017].

Disponible : <https://www.iso.org/home.html>

71. Paris F, Gandy J-M. Établir mes documents ISO 9001 version 2015 : le couteau suisse de la qualité. La Plaine Saint-Denis, France : AFNOR éditions, 2016. 209 p.
72. Preynat-Boucher P. Cours DU Management de la Qualité dans les Laboratoires de Biologie Médicale. 2016.
73. Comité Français d'Accréditation (COFRAC) [En ligne]. 2015 [cité le 13 avr 2017]. <https://www.cofrac.fr/>
74. COFRAC. SH REF 02 : Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale. 2016.
75. COFRAC. SH REF 05 : Règlement d'accréditation. 2017.
76. COFRAC. SH REF 08 : Expression et évaluation des portées d'accréditation. 2017.
77. COFRAC. SH INF 50 : Portées types d'accréditation. 2017.
78. COFRAC. SH FORM 43 : Vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale. 2015.
79. COFRAC. SH GTA 01 : Guide Technique d'Accréditation en biologie médicale. 2015.
80. COFRAC. SH GTA 02 : Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des systèmes informatiques en biologie médicale. 2013.
81. COFRAC. SH-GTA-04 rev 01. Guide technique de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. 2015.
82. COFRAC. SH GTA 06 : Guide technique d'Accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale. 2012.
83. COFRAC. SH GTA 14 : Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale. 2011.
84. COFRAC. SH FORM 06 : Liste détaillée des examens/analyses demandés à

l'accréditation. 2016.

85. Association française de normalisation. Norme internationale ISO 9000 : 2015. La Plaine Saint-Denis, France : AFNOR ; 2015. 31p.
86. Association française de normalisation. Norme internationale NF EN ISO 15189 : 2012. Plaine Saint-Denis, France : AFNOR ; 2012. 56p.
87. COFRAC. SH INF 19- révision 3 : Liste des organisateurs d'évaluations externes de la qualité. 2016.
88. ISO. ISO 31000 : 2009 Principes et lignes directrices-management du risque. 2009.
89. ISO. IEC 31010 : 2009, Gestion des risques – Techniques d'évaluation des risques. 2009.
90. Ly TD, Coignard C. Incertitude de mesure et sérologie infectieuse. *Feuill Biol.* 2016;(332):51–5.
91. Landy G. AMDEC, Guide pratique. Plaine Saint-Denis: AFNOR Editions, 2011. 248p.
92. Yoshioka N, Deguchi M, Kagita M, Kita M, Watanabe M, Asari S, et al. Evaluation of a chemiluminescent microparticle immunoassay for determination of *Treponema pallidum* antibodies. *Clin Lab.* 2007;53(9-12):597–603.
93. Young H, Pryde J, Duncan L, Dave J. The Architect Syphilis assay for antibodies to *Treponema pallidum*: an automated screening assay with high sensitivity in primary syphilis. *Sex Transm Infect.* 2009;85(1):19–23.
94. Wellinghausen N, Diitenberger H. Evaluation of two automated chemiluminescence immunoassays, the LIAISON *Treponema* Screen and the ARCHITECT Syphilis TP, and the *Treponema pallidum* particle agglutination test for laboratory diagnosis of syphilis. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(8):1375–7.
95. Lefevre JC, Bertrand MA, Bauriaud R. Evaluation of the Captia enzyme immunoassays for detection of immunoglobulins G and M to *Treponema pallidum* in syphilis. *J Clin Microbiol.* 1990;28(8):1704–7.
96. Schmidt BL, Edjlalipour M, Luger A. Comparative evaluation of nine different

enzyme-linked immunosorbent assays for determination of antibodies against *Treponema pallidum* in patients with primary syphilis. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1279–82.

97. Tsiamyrtzis P, Sobas F, Négrier C. Use of prior manufacturer specifications with Bayesian logic eludes preliminary phase issues in quality control: an example in hemostasis laboratory. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2015;26(5):590-6.

MENTION A FAIRE FIGURER SUR LA DERNIERE PAGE DU MEMOIRE OU DE LA THESE

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

Guillerme Cécile

ACCREDITATION DES METHODES DE SEROLOGIE DE LA SYPHILIS A L'INSTITUT DES AGENTS INFECTIEUX DES HOSPICES CIVILS DE LYON

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2017, 190 p.

RESUME

La syphilis connaît une recrudescence en France depuis les années 2000. Le laboratoire de l'Institut des Agents Infectieux (IAI) des Hospices Civils de Lyon traite aujourd'hui plus d'une centaine de sérologies syphilis par jour, avec approximativement 10 % de dépistage positifs nécessitant des examens complémentaires. L'objectif de ce travail a été l'accréditation des différentes analyses du processus de diagnostic sérologique de la syphilis au sein de l'Institut des Agents Infectieux des Hospices Civils de Lyon. L'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012 est une obligation réglementaire depuis 2008. Pour pouvoir faire rentrer une analyse dans sa portée d'accréditation, le laboratoire doit remplir un dossier de vérification ou de validation de méthode en s'aidant des différents documents proposés par le COFRAC. La sérologie syphilis à l'IAI est un processus complexe. Le dépistage a lieu en associant un test tréponémique automatisé et un test non tréponémique manuel (RPR). En cas de positivité, un titrage manuel du RPR associé à un titrage du TPHA est proposé. Des tests complémentaires comme le dosage des IgM par ELISA et les Western blot IgG et IgM peuvent aussi être rajoutés en cas d'interprétation difficile. Des méthodes variées sont mises en jeu : automatisées, manuelles, semi-automatisées. L'ensemble des techniques étudiées dans ce travail sont en réalité semi-quantitatives : des tests qualitatifs effectués à plusieurs dilutions pour obtenir un titre (RPR et TPHA), ou des tests automatisés rendant un indice chiffré comparé ensuite à une valeur seuil pour finalement rendre un résultat qualitatif (positif, négatif, +/- douteux) (ELISA IgM et Architect Syphilis TP). La mise au point du dossier de vérification de méthode a nécessité une réflexion importante car aucun référentiel (QUAMIC, SH GTA 04) ne propose de méthodologie préétablie pour ce type de méthodes. L'étude des risques a été une étape préliminaire décisive afin de déterminer les essais pertinents et nécessaires à mettre en œuvre. La variété des techniques et de leurs risques implique que chacune d'entre elle a nécessité des essais différents. Au total, cinq dossiers ont été préparés au cours de ce travail : Architect Syphilis TP, CAPTIA IgM sur EVOLIS, TPHA et RPR EUROIMMUN, Western blot IgG et IgM EUROIMMUN. Les essais ont permis de vérifier les performances des cinq méthodes utilisées en routine et de mieux en connaître les limites. Ce travail sera utilisé pour ajouter le diagnostic sérologique de la syphilis à la portée d'accréditation du laboratoire lors du prochain audit COFRAC. Par ailleurs, ce travail de thèse a permis de faire une synthèse bibliographique sur la syphilis, et sur l'ensemble des méthodes permettant son diagnostic biologique disponibles sur le marché, ainsi que leurs performances.

MOTS CLES

Syphilis
Accréditation
COFRAC
Assurance qualité
Analyse de risques
AMDEC

JURY

Mr LAURENT Frederic, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
Mr LINA Gérard, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
Mme ROURE SOBAS Chantal, Praticien Hospitalier
Mme DOLEANS JORDHEIM Anne, Maître de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier
Mme PIETROPAOLI Carole, Praticien Hospitalier

DATE DE SOUTENANCE

Vendredi 1^{er} Septembre 2017

ADRESSE DE L'AUTEUR

3, rue du curé d'Ars, 69570 Dardilly

