



BU bibliothèque Lyon 1

<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

2013

THESE n°80

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 05 juillet 2013

par

Mme LACOUR Céleste

Née le.04/10/1989.

à. BELLEY (01).

**VALIDATION DE METHODES DU TPHA ET VDRL DANS LE
DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS AU LABORATOIRE DE
BACTERIOLOGIE DE L'HOPITAL DE LA CROIX ROUSSE**

JURY

Madame GOUDABLE Joëlle, Professeur
Madame PREYNAT Pascale, Maître de Conférences
Madame SOBAS ROURE Chantal, Biologiste
Madame BAUME Maud, Ingénieur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon
Directrice : Madame la Professeure Christine VINCIGUERRA
Directeurs Adjoints : Madame S. BRIANCON, Monsieur P. LAWTON, Monsieur P. NEBOIS
Madame S. SENTIS, Monsieur M. TOD

Directrice Administrative : Madame P. SILVEIRA

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

- CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE
Monsieur Jean-François SABOT (Pr)
Monsieur Alain BANNIER (MCU)
Monsieur Philippe BERNARD (MCU)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Raphaël TERREUX (MCU – HDR)
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)
- PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Madame Joëlle BARDON (MCU - HDR)
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (MCU - HDR)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDİ-DEGOBERT (MCU)
Monsieur Plawen KIRILOV (MCU)
Monsieur Fabrice PIROT (MCU - PH - HDR)
Monsieur Patrice SEBERT (MCU - HDR)
- BIOPHYSIQUE
Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU)

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 FERDJAOUİ MOUMJID (MCU - HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)
- INFORMATION ET DOCUMENTATION
Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)
- HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT
Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- DISPOSITIFS MEDICAUX
Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
- QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE
Madame Alexandra CLAYER-MONTEBAULT (MCU)
Monsieur François COMET (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU PAST)
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- MATHEMATIQUES – STATISTIQUES
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule PAULTRE (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 Roland BARRET (Pr)
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Anne-Emmanuelle DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT
Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)
Madame Catherine RIOUFOL (MCU - PH)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

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

- PHARMACOLOGIE
 - Monsieur Bernard RENAUD (Pr)
 - Monsieur Michel TOD (PU – PH)
 - Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
 - Madame Bernadette ASTIER (MCU - HDR)
 - Monsieur Roger BESANCON (MCU)
 - Madame Evelyne CHANUT (MCU)
 - Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
 - Madame Dominique MARCEL-CHATELAIN (MCU - HDR)
 - Monsieur Olivier CATALA (Pr PAST)
 - Monsieur Pascal THOLLOT (MCU PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- IMMUNOLOGIE
 - Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)
 - Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
- HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE
 - Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU - PH)
 - Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
 - Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)
- MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIE INDUSTRIELLES
 - Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
 - Madame Ghislaine DESCOURS (AHU)
 - Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
 - Madame Florence MORFIN (PU – PH)
 - Monsieur Didier BLAHA (MCU)
 - Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU)
 - Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
 - Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU)
- PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE
 - Madame Anne-Françoise PETAVY (Pr)
 - Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
 - Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)
 - Monsieur Philippe LAWTON (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE
 - Madame Pascale COHEN (Pr)
 - Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
 - Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
 - Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH)
 - Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)
 - Madame Angélique MULARONI (MCU)
 - Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
 - Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
 - Monsieur Benoit DUMONT (AHU)
- BIOLOGIE CELLULAIRE
 - Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON
 - Monsieur Philippe LAWTON (MCU - HDR)
 - Madame Angélique MULARONI (MCU)
 - Monsieur Patrice SEBERT (MCU – HDR)
 - Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

- Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques
 - Madame Emilie BLOND
 - Madame Christelle MOUCHOUX
 - Madame Florence RANCHON

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**
 - Monsieur Eyad AL MOUAZEN 85^{ème} section
 - Monsieur Boyan GRIGOROV 87^{ème} section
 - Madame Faiza LAREDJ 85^{ème} section
 - Monsieur Waël ZEINYEH 86^{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

Madame Goudable,

Vous nous avez fait l'honneur de présider ce jury. Soyez assurée de mes remerciements et de mon profond respect.

Madame Preynat,

Je vous suis reconnaissante d'avoir dirigé ce travail de thèse. Je vous remercie sincèrement pour votre disponibilité, votre aide et vos conseils tout au long de son élaboration. Veuillez trouver l'expression de ma considération la plus sincère à votre égard et de ma reconnaissance.

Madame Roure,

Je vous remercie de m'avoir permis d'effectuer ce travail, pour votre aide et votre implication dans mon stage. Ce fut un véritable plaisir de travailler dans le laboratoire. Soyez assurée de mon estime et de ma reconnaissance.

Madame Baume,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Je vous remercie pour le temps et l'intérêt que vous y avez porté. Recevez ici le témoignage de ma gratitude.

A toute l'équipe du laboratoire de bactériologie de la Croix Rousse pour m'avoir accueillie aussi chaleureusement, d'avoir été aussi patient avec moi et de m'avoir permis de réaliser ce travail. Ce fut réellement agréable de travailler à vos côtés.

A Mathieu pour sa présence à mes côtés, tous les jours et pendant de nombreuses années encore, je l'espère ; et son soutien, même dans les moments difficiles.

A mes parents pour leur soutien, leur présence et leur aide tout au long de ces années.

A ma famille, Vincent, Fanélie, Aurélie, Samuel et Hermine, mes neveux, Lili-Rose, Clément et Alix, pour tous ces moments passés ensemble et à venir.

A mes cousines, Adeline et Léa, pour m'avoir supportée chacune pendant 2 ans, les sorties ski, les vacances ensemble et tout le reste.

A Brigitte, Marc, Thomas, Margot et Julia, merci de m'avoir accueillie et acceptée parmi vous.

A Juliette et Audrey, pour avoir partagé plus de 20 ans ensemble, des après-midi, des gouters, des repas, des soirées, des vacances, et tant de choses !

A mes amis, Réda, Rémi, Martin, Mehdi, Irène, Laurence, Alex, Auriane, Idriss, Lucile, Loïc, Patricia, Jessica et tous ceux que j'oublie, pour toutes ces soirées, sorties, week end et tous les bons moments. Pourvu qu'il y en ait beaucoup d'autres !

A Adeline, qui a su partir du Nord ! Et surtout pour toutes ces après-midi « révisions » à la tête d'or, aux voyages (Glasgow, Londres...) et aux soirées. Vivement que tu reviennes parmi nous !

Aux filles, Fanny, Soraya, Sonia, Lisa, Emilie, Agnès, Adeline, pour avoir rendu ces 5 années de cours bien plus agréables et pour toutes les soirées et repas ensemble.

Et à Fluffy.

Sommaire

LISTE DES TABLEAUX	12
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES ANNEXES	14
ABBREVIATIONS	15
INTRODUCTION	16
I. Rappels bibliographiques :	17
A. Qualité :	17
1. Le concept de la qualité, système de management de la qualité :	17
a) Qualité, définition :	17
b) Système de management de la qualité :	18
c) Documentation :	19
2. Le contexte de l'accréditation des laboratoires de biologie médicale :	21
a) La loi HPST :	21
b) La norme ISO 15189 :	22
c) Le Cofrac :	24
3. La validation de méthode qualitative :	25
a) Définition :	25
b) L'analyse de risque :	28
c) La méthode de l'analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité :	28
B. La syphilis :	29
1. Epidémiologie :	29
2. Physiopathologie :	31
a) Treponema pallidum :	31
b) Transmission :	33
c) Stades de la maladie :	33
(1) Syphilis primaire :	34
(2) Syphilis secondaire :	34
(3) Syphilis latente :	36
(4) Syphilis tertiaire :	36
d) Cas particuliers :	36
(1) Neurosyphilis :	36

(2)	Co-infection syphilis VIH :	37
(3)	Syphilis congénitale :	37
3.	Diagnostic :	38
a)	Diagnostic direct :	39
(1)	Microscopie à fond noir :	39
(2)	Immunofluorescence :	39
(3)	PCR :	40
b)	Diagnostic sérologique :	40
(1)	TPHA : Treponema pallidum Haemagglutination Assay :	40
(2)	VDRL : Venereal Disease Research Laboratory :	41
(3)	FTA : Fluorescent Treponemal Antibody test :	43
(4)	FTA IgM :	44
c)	Evolution des profils sérologiques :	45
(1)	Syphilis primaire :	45
(2)	Syphilis secondaire :	45
(3)	Syphilis tertiaire :	45
(4)	Neurosyphilis :	46
(5)	Syphilis congénitale :	46
4.	Traitement :	47
5.	Prévention :	49
II.	Matériels et méthodes :	49
A.	Le dossier de validation au centre de biologie nord :	49
1.	Vérification bibliographique :	49
a)	Données fournisseurs :	49
b)	Etude bibliographique dans la littérature :	52
2.	Comparaison de méthodes :	55
3.	Vérification expérimentale :	57
a)	Contamination inter-échantillon :	57
b)	Spécificité analytique :	58
c)	Stabilité des réactifs :	58
d)	Robustesse :	58
B.	TPHA :	59
1.	Analyse de risques :	59
a)	Phase pré-analytique :	59

(1) Résultats :	59
(2) Etude :	61
b) Phase analytique :	63
(1) Résultats :	63
(2) Etude :	65
c) Phase post analytique :	66
(1) Résultats :	66
(2) Etude :	67
2. Tests réalisés :	69
a) Contamination inter-échantillon :	69
b) Spécificité :	69
c) Stabilité des réactifs :	69
d) Robustesse :	70
C. VDRL :	70
1. Analyse de risques :	70
a) Phase pré-analytique :	70
(1) Résultats :	70
(2) Etude :	72
b) Phase analytique :	72
(1) Résultats :	72
(2) Etude :	74
c) Phase post-analytique :	75
(1) Résultats :	75
(2) Etude :	77
2. Tests réalisés :	77
a) Contamination inter-échantillon :	77
b) Spécificité :	77
c) Stabilité des réactifs :	77
d) Robustesse :	78
III. Résultats :	78
A. TPHA :	78
1. Contamination inter-échantillon :	78
2. Spécificité :	79
3. Stabilité des réactifs :	81

4. Robustesse :	81
B. VDRL :	84
1. Contamination inter-échantillon :	84
2. Spécificité :	85
3. Stabilité des réactifs :	87
4. Robustesse :	87
IV. Discussion :	90
A. Choix des vérifications expérimentales :	90
B. Cas des liquides céphalorachidiens :	90
C. Comparaison de méthodes :	91
D. Bilan :	92
CONCLUSION	93
ANNEXES	95
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : liste des paramètres à vérifier dans le cas d'une vérification de méthode qualitative

Tableau 2 : Répartition par âge et sexe des cas de syphilis récente déclarés (n, %), RésIST, Rhône Alpes, 2006 à 2011

Tableau 3 : Répartition par type de syphilis, sexe, statut VIH et orientation sexuelle des cas de syphilis récente déclarés, RésIST, Rhône Alpes, 2006 à 2011

Tableau 4 : Cas de TPHA faux positifs

Tableau 5 : Cas de VDRL faux positifs

Tableau 6 : Cas de FTA faux positifs

Tableau 7 : Exemples de profils sérologiques observés en phase primaire

Tableau 8 : Recommandations de traitement par le CDC

Tableau 9 : Sensibilité et spécificité du réactif Immutrep TPHA

Tableau 10 : Résultats de l'évaluation du réactif Immutrep RPR

Tableau 11 : Sensibilité et spécificité des tests sérologiques de la syphilis

Tableau 12 : Sensibilité et spécificité des tests syphilitiques

Tableau 13 : Caractéristiques de plusieurs tests syphilitiques et leur valeur prédictive positive

Tableau 14 : Comparaison de méthodes

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : roue de Deming

Figure 2 : pyramide documentaire

Figure 3 : Nombre de cas de syphilis récente déclarés, RésIST, Rhône Alpes, 2003 à 2011

Figure 4 : *Treponema pallidum*

Figure 5 : Chancre

Figure 6 : Syphilides papuleuses

Figure 7 : *Treponema* au microscope à fond noir

Figure 8 : TPHA

Figure 9 : RPR positif

Figure 10 : FTA positif

Figure 11 : Benzathine pénicilline G

Figure 12 : Contamination inter échantillon TPHA

Figure 13 : Spécificité TPHA

Figure 14 : Stabilité des réactifs TPHA

Figure 15 : Robustesse TPHA

Figure 16 : Contamination inter échantillon VDRL

Figure 17 : Spécificité VDRL

Figure 18 : Stabilité des réactifs VDRL

Figure 19 : Robustesse VDRL

LISTE DES ANNEXES

Annexe I : Modèle élargi d'un système de management de la qualité fondé sur les processus.

Annexe II : Cinétique des anticorps d'une syphilis non traitée et traitée.

Annexe III : Comparaison des différents outils de diagnostic.

Annexe IV : Rappel sur le cheminement d'un échantillon sanguin.

Annexe V : Notice d'utilisation du kit Immutrep TPHA OD071.

Annexe VI : Notice d'utilisation du kit Immutrep RPR OD061.

Annexe VII : Architect.

Annexe VIII : SH FORM 44 TPHA.

Annexe IX : SH FORM 44 VDRL.

Annexe X : Sommaire norme ISO 15189.

ABBREVIATIONS

AMDEC : Analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité

ANSM : Agence nationale de la sécurité du médicament et des produits de santé

CMIA : Chemiluminescent microparticle immunoassay

Cofrac : Comité français d'accréditation

DO : Déclaration obligatoire

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

FTA : Fluorescent treponemal antibody test

HPST : Hôpital patient santé territoire

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

LBM : Laboratoire de biologie médicale

LCR : Liquide céphalo-rachidien

PCR : Polymerase chain reaction

RPR : Rapid plasma reagin

TPHA : Treponema pallidum haemagglutination assay

URL : Unité relative de lumière

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VDRL : Venereal disease research laboratory

INTRODUCTION

La syphilis est une maladie sexuellement transmissible due à *Treponema pallidum*. C'est une bactérie spiralée appartenant à la famille des spirochètes. Connue depuis des siècles, l'agent de la syphilis n'a pourtant été identifié qu'en 1905 par Schaudinn et Hoffmann à Berlin¹⁷. Cette infection se caractérise par l'apparition d'un chancre puis par des manifestations systémiques et nerveuses en l'absence de traitement. Elle évolue en plusieurs phases sur plusieurs années voir des dizaines d'années. Le traitement est simple, à base de pénicilline. En effet, le tréponème reste une des rares bactéries à n'avoir développé aucune résistance à cet antibiotique. Il se traite donc facilement sans séquelle s'il est pris en charge rapidement. Depuis le début des années 2000, on assiste à un retour en force de la syphilis alors que sa prévalence n'a cessé de diminuer depuis les années 50. Ainsi, le laboratoire de bactériologie de l'hôpital de la Croix rousse reçoit une centaine de sérums par jour à analyser ce qui fait de la syphilis, sa principale sérologie.

Depuis la promulgation de la loi Hôpital Patient Santé Territoire, en 2009, les laboratoires de biologie médicale (LBM) doivent se faire accréditer d'ici 2016³. L'accréditation permet une reconnaissance de compétence¹⁰ et surtout elle permet au laboratoire d'être accrédité selon l'ISO 15189⁵, seule norme à être obligatoire. Les LBM doivent donc mettre en place un système qualité en leur sein. La validation de méthode est une étape dans le processus d'accréditation. En effet, elle permet au laboratoire de prouver que les méthodes qu'il utilise sont fiables et répétables et concourent à garantir un diagnostic sûr pour le clinicien aux bénéfices du patient.

Ainsi, nous verrons, dans un premier temps, un rappel sur la qualité et les outils méthodologiques et le dossier de validation ; puis, une description de la syphilis (caractéristiques, méthodes de diagnostic, traitement). Dans un deuxième temps, nous traiterons le dossier de validation en lui-même en détaillant le choix des tests et leurs résultats.

I. Rappels bibliographiques :

A. Qualité :

1. Le concept de la qualité, système de management de la qualité :

a) *Qualité, définition :*

La qualité correspond à l'aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences selon la définition de la norme ISO 9000/2005. En d'autres termes, la qualité est la réponse aux besoins du client. Elle implique une conformité aux exigences, une responsabilité, une amélioration continue, la mesure des non conformités et l'excellence².

La norme ISO 9001 a été établie afin de permettre aux entreprises de mettre en place un système qualité en leur sein car elle définit les exigences concernant l'organisation d'un système de gestion de la qualité. Elle permet donc de garantir la conformité d'un produit ou d'un service par rapport aux exigences pré établies. Pour cela, l'entreprise s'appuie sur des processus pour répondre aux besoins du client en mettant à disposition les ressources nécessaires et en ayant pris en compte les risques encourus ainsi que leurs moyens de résolution. L'ensemble de l'entreprise est tourné vers le client et ses demandes, grâce à une implication forte de la direction et une responsabilisation du personnel. En appliquant la norme, l'entreprise recherche l'efficacité avec une organisation ciblée sur les résultats et en mettant en place une démarche d'amélioration continue.

La gestion de la qualité et l'objectif d'amélioration continue passent par la méthode dite de « la roue de Deming » ou le « plan-do-check-act » (*fig. 1*). Cet outil s'est popularisé dans les années 50. Il consiste à repérer les étapes à mettre en œuvre pour améliorer la qualité dans une organisation. On distingue 4 phases différentes :

- Plan : planifier ce que l'on va réaliser. On identifie le problème ou le processus à améliorer. Puis, on recherche ses causes et des solutions possibles ce qui correspond à l'établissement d'un cahier des charges. Enfin, on fixe un planning.
- Do : développer et réaliser les solutions selon le cahier des charges et le planning.
- Check : contrôler si les solutions établies sont efficaces grâce, notamment, à des indicateurs de performance.
- Act : analyser et améliorer ce qui a été réalisé.



Figure 1 : roue de Deming

b) Système de management de la qualité :

Le management de la qualité correspond à l'ensemble des activités coordonnées permettant d'orienter et de contrôler un organisme en matière de qualité. Deux grands moyens sont indispensables pour y accéder : une politique qualité et des objectifs qualité². Le management de la qualité permet d'avoir une vision stratégique de l'entreprise en intégrant pour toutes les activités de l'entreprise le principe de l'amélioration continue.

Le système de management de la qualité est un système permettant d'établir la politique qualité et les objectifs qualité et d'atteindre ces objectifs. On retrouve ce concept dans la norme ISO 9004¹ : système de management de la qualité, amélioration

des performances ; qui permet une approche qualité économiquement efficace pour l'ensemble des acteurs et la satisfaction durable du client. La norme a pour objectif la performance de l'organisme et son efficacité. Elle porte donc sur tous les processus présents dans l'entreprise. Elle a une vision plus large que la norme ISO 9001 (*annexe I*).

Le système de management de la qualité repose sur une utilisation efficace des ressources, un processus décisionnel qui est le reflet des activités et une orientation vers la satisfaction du client et vers les besoins et les attentes des autres parties intéressées. Ainsi, l'organisme peut obtenir des performances durables sur le long terme et de manière équilibrée.

En supplément par rapport à la norme ISO 9001, la norme ISO 9004 prend en compte le management des ressources et surtout des ressources financières. Ainsi, la direction doit déterminer les besoins financiers de l'organisme et les mettre à disposition pour les actions en cours et futures. L'utilisation des moyens financiers doit être contrôlée et évaluée en fonction des objectifs fixés. Un processus de reporting c'est-à-dire un rapport d'activité permet de détecter des activités inefficaces ou non efficaces, et de mettre en place alors un processus d'amélioration.

Le laboratoire de biologie médicale, avant de débiter toute procédure d'accréditation, doit mettre en place un système de management de la qualité afin de rendre possible l'application de pratiques analytiques efficaces.

c) Documentation :

La documentation est un des moyens pour assurer la qualité². C'est pourquoi un système documentaire doit être mis en place en parallèle d'un système de management de la qualité. Les intérêts de la documentation sont multiples : elle facilite l'évaluation de l'efficacité du système établi par l'organisme, elle est essentielle pour la communication, elle assure la cohérence des actions menées et une traçabilité.

Il existe quatre principes pour avoir une documentation qualité :

- Prévoir c'est-à-dire écrire ce que l'on va faire,

- Pratiquer : faire ce que l'on a écrit,
- Prouver : écrire ce que l'on a fait,
- Progresser : revoir ce que l'on a fait.

Ces règles reprennent le principe de la roue de Deming.

Il est essentiel de maîtriser le système documentaire, si on veut être conforme à la norme ISO 9001. Pour cela, la documentation doit être efficace, efficiente, adaptée et revue régulièrement. Avant d'être disponible, tout document doit être approuvé.

La documentation intervient à chaque niveau d'un système de management de la qualité (*fig. 2*). En effet, elle comporte les documents se rapportant à la politique qualité et ses objectifs, un manuel qualité, les procédures et enregistrements. C'est à la fois un outil de transmission de l'information et un outil de traçabilité.

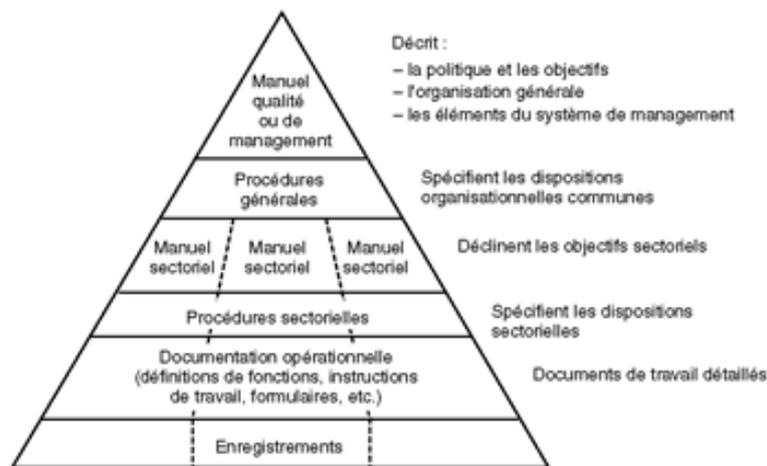


Figure 2 : pyramide documentaire

2. Le contexte de l'accréditation des laboratoires de biologie médicale :

a) *La loi HPST :*

Votée le 21 juillet 2009, la loi « Hôpital Patient Santé Territoire » bouleverse en profondeur le système de soin en France afin de mieux adapter les institutions et structures aux besoins des populations³. Ce texte se compose de 4 parties regroupant 133 articles faisant de la qualité un objectif primordial.

Plus précisément, l'article 69 de cette loi porte sur la biologie médicale dont l'une des missions est de garantir la qualité des examens de biologie médicale, notamment par une procédure d'accréditation des laboratoires⁴. Cet article est suivi d'une ordonnance, l'ordonnance du 13 janvier 2010 qui définit trois objectifs :

- S'adapter aux mutations technologiques,
- Renforcer la spécificité française de la biologie,
- Garantir la qualité de l'activité c'est-à-dire renforcer la sécurité.

Ce dernier point est particulièrement important dans la loi. En effet, le texte précise qu'un établissement public de santé ne peut compter en son sein qu'un seul laboratoire de biologie médicale (art. L. 6222-4 du CSP)⁴. Le laboratoire de biologie médicale est sous la direction d'un biologiste responsable ou biologiste médicale qui ne peut être qu'un pharmacien ou un médecin. Le terme d'examen de biologie médicale sera redéfini, passant de simple « examen biologique » à « acte médical ». Enfin, l'article L6221-1 de l'ordonnance du 13 janvier 2010 rend obligatoire l'accréditation de l'ensemble des activités des laboratoires de biologie médicale, « Un laboratoire de biologie médicale ne peut réaliser d'examen de biologie médicale sans accréditation ». Celle-ci se fera selon les normes ISO 15189 et ISO 22870 d'après l'arrêté du 5 août 2010. L'organisme chargé de d'accorder l'accréditation d'un laboratoire est le Comité Français d'accréditation (Cofrac). C'est le seul organisme habilité à cette fonction en France.

La loi prévoit également un contrôle de qualité des résultats des examens de biologie médicale qui sera exécuté par des organismes externes de la qualité qui transmettront un rapport annuel à l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et produits de santé (ANSM)³.

b) La norme ISO 15189 :

Depuis la promulgation de la loi HPST, la norme ISO 15189 est devenue la première norme obligatoire⁵. Elle n'est applicable que pour les laboratoires de biologie médicale qui doivent donc être conformes à cette norme d'ici 2016.

La norme ISO 15189 a été conçue par l'organisation internationale de normalisation qui est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation. Elle établit les exigences de compétence et de qualité propres aux laboratoires de biologie médicale en se basant sur deux normes : l'ISO 9001 et l'ISO 17025. L'ISO 9001 définit les exigences relatives au management de la qualité. L'ISO 17025 détermine les exigences générales en management qualité et la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.

Elle comporte deux grandes parties :

- une partie dédiée au management de la qualité qui est très proche de la norme ISO 9001. En effet, l'ISO 15189 reprend de nombreux points de l'ISO 9001. Cependant, les laboratoires accrédités ISO 15189 ne sont pas certifiés ISO 9001 car ces deux normes ont des différences dont notamment la planification de la conception, développement et réalisation des produits (PDCA).
- Une partie dédiée aux exigences techniques qui sont propres à cette norme.

Les exigences relatives à la validation de méthode sont définies dans la partie 4 : Exigences relatives au management, 4.3 : maîtrise des documents et 4.13 : la maîtrise des enregistrements avec également les chapitres 4.12 : amélioration continue et 4.11 : actions préventives; et dans la partie 5 : Exigences techniques, 5.5 : procédures analytiques et 5.6 : assurer la qualité des procédures analytiques.

« Le laboratoire doit utiliser des procédures [...] qui correspondent aux besoins des utilisateurs des prestations de laboratoire et qui conviennent à chaque type d'analyse. [...] Si des procédures internes sont utilisées, elles doivent être validées de manière appropriée pour l'utilisation prévue et parfaitement documentées. » Partie 4.3.1, norme ISO 15189.

« Le laboratoire doit utiliser uniquement des procédures validées [...]. Les validations doivent être aussi approfondies que nécessaire pour répondre aux besoins de l'application ou du domaine d'application concerné(e). Le laboratoire doit enregistrer les résultats obtenus et la procédure utilisée pour la validation. » Partie 5.5.2, norme ISO 15189.

« Les méthodes et les procédures sélectionnées doivent être évaluées et donner des résultats satisfaisants avant d'être utilisées pour les analyses médicales. Une revue des procédures [...] doit être réalisée [...] généralement, une fois par an. » Partie 5.5.2, norme ISO 15189.

« Le laboratoire doit concevoir des systèmes de contrôle interne de qualité permettant de vérifier que la qualité prévue des résultats est bien obtenue (...). Il convient de veiller particulièrement à éliminer les erreurs susceptibles de se produire dans le processus de traitement des échantillons, des prescriptions, des analyses, des comptes rendus, etc. » Partie 5.6.1, norme ISO 15189.

« (...) Toutes les composantes importantes de l'incertitude doivent être prises en compte. Les sources contribuant à l'incertitude peuvent inclure l'échantillonnage, la préparation des échantillons, la sélection des aliquotes d'échantillon, (...), les matériaux de référence, les grandeurs d'entrée, l'équipement utilisé, les conditions environnementales, l'état de l'échantillon et les changements de manipulateur. » Partie 5.6.2, norme ISO 15189.

La norme laisse au laboratoire le libre choix de ses méthodes de validation et de son organisation. Cependant, toutes les démarches effectuées et les résultats obtenus doivent être enregistrés. Les tests réalisés doivent être pertinents et non superflus afin de répondre aux besoins du laboratoire.

Le guide SH REF 02 constitue le recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale. Il permet de préciser les exigences organisationnelles et techniques de la norme ISO 15189 en vue de l'accréditation. C'est une aide indispensable pour les LBM.

c) Le Cofrac :

Le Cofrac ou Comité Français d'Accréditation est une association fondée en 1994, selon la loi du 1^{er} juillet 1901⁶. C'est la seule instance nationale d'accréditation. Sa mission est double : reconnaître la compétence et l'impartialité des organismes accrédités et obtenir la reconnaissance au niveau international, de leurs compétences et leurs prestations. Les principes fondamentaux du Cofrac sont l'indépendance, l'impartialité, la transparence et la confidentialité. Tous les acteurs au sein du Cofrac sont représentés de façon égale et sont impliqués dans la vie du comité. Celui-ci est constitué de quatre sections :

- Santé humaine
- Certification
- Inspection
- Laboratoire, lui-même composé de quatre pôles : biologie-biochimie, chimie-environnement, mécanique et physique-électricité. Chacun de ces pôles regroupent des responsables d'accréditation et des secrétaires.

C'est la section « santé humaine » qui est chargée d'évaluer les LBM afin de leur délivrer leur accréditation. Une équipe d'évaluateurs, composée d'experts, sera formée pour analyser le dossier déposé selon une méthodologie bien précise. En effet, ils seront rigoureux par rapport aux méthodes, procédures ou modes d'évaluation choisis mais aussi ils tiendront compte des particularités de chaque organisme candidat. Ils émettront alors un rapport d'évaluation sur lequel la commission de décision soumettra son avis. Enfin, la décision sera notifiée par le président du Cofrac et une attestation sera délivrée au LBM.

Le processus d'évaluation en vue d'obtenir l'accréditation est long et rigoureux : l'analyse préalable de la demande, la définition du programme d'évaluation, la constitution de l'équipe d'évaluation, l'évaluation, la rédaction et l'analyse du rapport et la décision et la délivrance de l'accréditation.

L'accréditation⁶ permet aux entreprises d'avoir une valeur ajoutée avec un avantage concurrentiel, une reconnaissance internationale, une confiance auprès des acteurs économiques... Elle est délivrée uniquement pour une compétence ou un domaine donné et pour une période déterminée et renouvelable (accréditation initiale délivrée pour 4 ans) pendant laquelle des audits de surveillance auront lieu (tous les ans).

3. La validation de méthode qualitative :

a) Définition :

La validation ou vérification de méthodes consiste à évaluer dans l'environnement propre au laboratoire, les performances des techniques mises en œuvre et de vérifier leur conformité aux limites d'acceptabilité fixées afin de répondre à l'utilisation prévue⁸.

Dans notre étude, le champ d'application de la vérification correspond à deux examens de biologie médicale : le TPHA et le VDRL, réalisé par le laboratoire de biologie médicale du groupement hospitalier nord (Hôpital de la Croix Rousse), sous la responsabilité du biologiste responsable c'est-à-dire du chef de service du laboratoire de bactériologie.

Ce sont deux méthodes manuelles du type qualitatif c'est-à-dire que les résultats obtenus par ces deux techniques n'apportent des informations que sur la présence ou l'absence de l'analyte.

Le dossier de validation⁹ doit alors comporter les étapes suivantes :

- La définition du besoin des prescripteurs et des patients.

- L'étude des documents bibliographiques et des données fournisseurs portant sur la performance de la méthode.
- La détermination des critères de performance pertinents à établir et le choix des limites d'acceptabilité correspondantes pour la méthode.
- La maîtrise des risques : gestion des ressources humaines, gestion des ressources matérielles, processus de réalisation.
- La réalisation des vérifications expérimentales selon la procédure établie par le laboratoire et leurs résultats.
- La conclusion sur l'avis d'aptitude de la méthode pour son utilisation au laboratoire.

Dans notre cas, la définition du besoin correspond à déterminer si le patient est atteint de syphilis ou non en effectuant des tests sur un échantillon de sérum. L'étude des documents bibliographiques se traduit par l'étude des documents qualité (norme, les guides tel que le SH GTA 04, qui aident le LBM à appliquer les exigences d'accréditation de la norme, qui permettent d'orienter le LBM dans sa démarche d'accréditation ; ...) et des informations fournies par le fournisseur concernant les réactifs ainsi que des articles ou publications se rapportant à ce sujet. Elle permet de connaître la sensibilité et la spécificité diagnostiques de ces deux tests. La détermination⁸ des critères de performance a établi la liste des vérifications suivantes (*tableau 1*):

- La contamination inter-échantillon
- La spécificité analytique
- La stabilité des réactifs après ouverture
- La robustesse

PARAMETRES A VERIFIER ET/OU A CONNAITRE	Bibliographie	Vérification sur site Portée de type A	Validation Portée de type B
<i>Spécificité analytique</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Sensibilité diagnostique</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>
<i>Stabilité des réactifs (après ouverture, embarqués)</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Robustesse</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Comparaison avec méthode de référence</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui (si existe)</i>
<i>Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire¹¹</i>	<i>Oui (si existe)</i>	<i>Oui (si possible)</i>	<i>Oui</i>
Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude¹² de la méthode ou du système analytique.			

Tableau 1 : liste des paramètres à vérifier dans le cas d'une vérification de méthode qualitative, SH FORM

Ces paramètres sont de portée flexible standard de type A c'est-à-dire qu'ils sont issus d'une méthode qui a été évaluée et vérifiée par le fournisseur et adoptée par le laboratoire. Il suffit donc de vérifier que les performances énoncées par le fournisseur soient atteintes dans le laboratoire dans les conditions de travail habituelles.

Enfin, une analyse de risques a été effectuée pour gérer la maîtrise des risques.

Le dossier de validation doit être rédigé selon le modèle établi d'après le SH FORM 44 et doit comporter :

- L'identité des opérateurs habilités qui effectuent les vérifications expérimentales.
- L'identité et la signature du biologiste responsable de la validation de la méthode qui autorise la mise en service de la méthode.
- La période d'évaluation.
- La date de mise en service.
- Les données brutes des résultats.

b) L'analyse de risque :

Le risque est défini comme la possibilité qu'un évènement fâcheux se produise c'est-à-dire dans notre étude, qu'une étape de réalisation de ces deux tests (TPHA et VDRL) ne soit pas correctement effectuée.

L'analyse de risque⁸ est une méthode qui consiste à identifier les facteurs susceptibles d'influencer les résultats, la justification de leur maîtrise par le laboratoire et l'évaluation de leur criticité. C'est un élément de vérification des performances de la méthode. L'analyse de risque est effectuée pour l'ensemble du processus de réalisation (pré analytique, analytique, post analytique) et est réalisée grâce à la méthode des 5M (main d'œuvre, méthode, matériel, matière, milieu) ce qui permet de classer les risques en cinq catégories et d'être le plus exhaustif possible.

c) La méthode de l'analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité :

Afin d'établir la criticité des risques identifiés et ainsi d'obtenir un classement des risques, la méthode de l'analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité (AMDEC) peut être utilisée, notamment pour les méthodes qualitatives⁷. Cette technique est un outil de gestion de la qualité dont le but est de hiérarchiser les actions d'amélioration et donc la maîtrise des risques, à mettre en œuvre.

Pour chaque risque identifié, il s'agit d'estimer :

- sa fréquence (1 = très peu fréquent, 3 = peu fréquent, 6 = fréquent, 10 = très fréquent),
- sa gravité (1 = pas d'impact sur le résultat, 3 = peu d'impact, 6 = résultat impossible à donner, 10 = résultat erroné),
- sa détectabilité (1 = toujours détecté, 3 = facilement détecté, 6 = détection possible non infaillible, 10 = indétectable).

Le produit de ces trois indices donne la criticité du risque :

$$\text{indice de criticité} = \text{fréquence} \times \text{gravité} \times \text{détectabilité}$$

Plus le score de criticité est élevé, plus la maîtrise des risques devra être réalisée de manière approfondie c'est-à-dire que des solutions documentées devront être mises en place rapidement. Un seuil d'acceptabilité doit également être défini, au dessus duquel toute criticité doit être réduite.

B. La syphilis :

1. Epidémiologie :

La syphilis était une maladie à déclaration obligatoire (DO) depuis les années quarante¹². Devant le faible nombre de cas déclarés, le Code de la santé publique a été modifié en juillet 2000 afin de retirer les maladies vénériennes de la liste des maladies à DO. Cependant, une recrudescence du nombre de cas de syphilis en France, est apparue depuis novembre 2000 ce qui a conduit à mettre en place un système de surveillance (RésIST)¹³. Ce dernier est basé sur une surveillance prospective dans des établissements volontaires dans les 20 plus grandes villes de France.

En 2011, 86 cas de syphilis ont été déclarés dans la région Rhône Alpes. On remarque que le nombre de nouveaux cas n'a cessé d'augmenter et a même doublé depuis 2003 (*Fig. 3*).

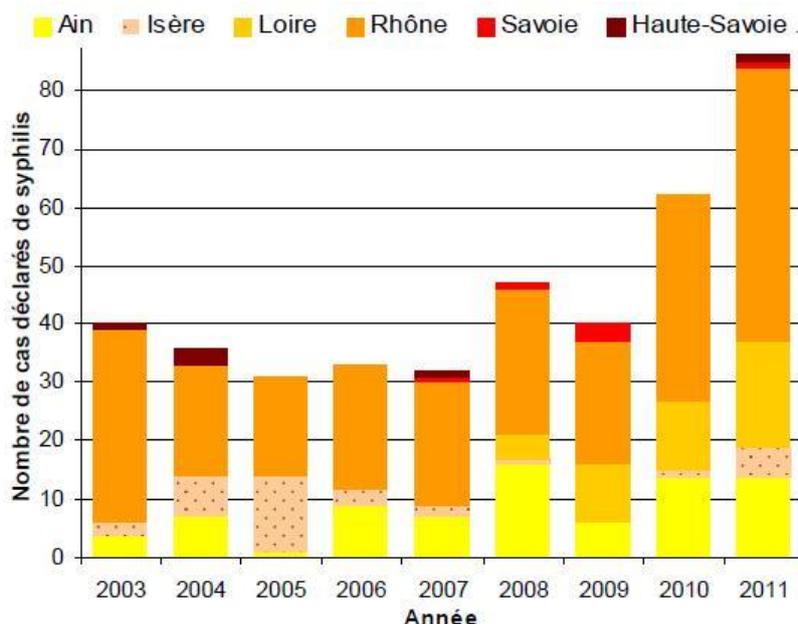


Figure 3 : Nombre de cas de syphilis récente déclarés, RésIST, Rhône Alpes, 2003 à 2011 (adapté du BVS, les données de surveillance des IST en Rhône Alpes en 2011).

Le Rhône, la Loire et l’Ain sont les principaux départements qui déclarent les nouveaux cas en raison de la présence du Centre hospitalier de Fleyriat dans l’Ain, des CIDDIST des CHU de Saint Etienne et Lyon.

Hommes					
	Age médian	Répartition par classes d'âge			Total
		15-24	25-49	50 et +	
2006-2010	35	36	134	26	196
		18%	68%	13%	100%
2011	33	21	57	4	82
		26%	70%	5%	100%
Femmes					
	Age médian	Répartition par classes d'âge			Total
		15-24	25-49	50 et +	
2006-2010	33	3	12	2	17
		18%	71%	12%	100%
2011	23,5	2	2	0	4
		50%	50%	0%	100%

Tableau 2 : Répartition par âge et sexe des cas de syphilis récente déclarés (n, %), RésIST, Rhône Alpes, 2006 à 2011

La majorité des cas de syphilis récente ont été déclarés chez des hommes entre 25 et 50 ans. Les femmes sont moins touchées mais l’âge médian des cas de syphilis est le même que celui des hommes (Tableau 2).

Caractéristiques des cas déclarés		2006-2010				2011			
		Syphilis primaire	Syphilis secondaire	Syphilis latente précoce	Total	Syphilis primaire	Syphilis secondaire	Syphilis latente précoce	Total
Sexe	Homme	51	80	66	197	24	29	29	82
	Femme	0	6	11	17	1	1	2	4
	% d'hommes				92%				95%
Statut VIH	VIH +	11	17	8	36	6	13	2	21
	VIH -	33	62	65	160	18	14	25	57
	statut inconnu	7	7	4	18	1	3	4	8
	% VIH + parmi les cas de statut VIH connu				18%				27%
Orientation sexuelle	Homme homo/bisexuel	38	71	55	164	18	26	24	68
	Homme hétérosexuel	13	8	10	31	5	3	4	12
	Femme hétérosexuelle	0	6	11	17	1	1	2	4
	Non renseigné		1	1	2	1		1	2
	% homo/bi sexuel parmi les hommes				84%				85%
Total		51 (24%)	86 (40%)	77 (36%)	214	25 (29%)	30 (35%)	31 (36%)	86

Tableau 3 : Répartition par type de syphilis, sexe, statut VIH et orientation sexuelle des cas de syphilis récente déclarés, RésIST, Rhône Alpes, 2006 à 2011

Les hommes sont majoritairement atteints de syphilis. Parmi eux, ce sont surtout des hommes homo/bisexuels (Tableau 3). Une part non négligeable de ces hommes est séropositive pour le VIH.

2. Physiopathologie :

La syphilis est une maladie sexuellement transmissible et contagieuse due au *Treponema pallidum*¹⁴. Elle peut causer des complications à long terme voire la mort si elle n'est pas correctement traitée.

a) *Treponema pallidum* :

Treponema pallidum est l'agent pathogène responsable de la syphilis. Il appartient à la famille des spirochètes et au genre *treponema*. Parmi ceux-ci, 4 espèces sont pathogènes pour l'Homme¹⁷ :

- *Treponema pallidum* responsable de la syphilis vénérienne.
- *Treponema endemicum* responsable du bégel ou syphilis endémique.
- *Treponema pertenue* responsable du pian.

- *Treponema carateum* responsable de la pinta.

Le bégel, le pian et la pinta sont des tréponématoses cutanéomuqueuses non vénériennes des régions intertropicales. Ces 4 espèces sont très proches génétiquement. En effet, leur ADN présente une homologie de plus de 95%²².

Treponema pallidum a été mis en évidence pour la première fois en 1905 par Schaudinn et Hoffmann. C'est une bactérie mobile, hélicoïdale, à spires régulières, mesurant 8 à 15 µm de long sur 0,3 µm de large (Fig. 4). Il possède 3 flagelles situés entre le peptidoglycane et la membrane externe¹⁷. C'est grâce à eux que la bactérie possède sa mobilité. Elle peut réaliser 3 types de mouvements :

- Un mouvement en pas de vis c'est-à-dire une rotation sur son axe,
- Un mouvement pendulaire,
- Un mouvement ondulatoire.

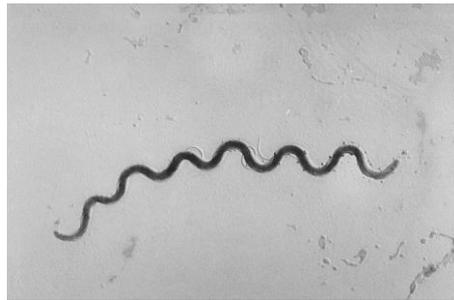


Figure 4 : *Treponema pallidum*

C'est une bactérie microaérophile très fragile qui ne survit pas en milieu extérieur, elle est strictement humaine. La culture de *Treponema pallidum* n'a jamais été possible et il n'est pas colorable au gram.

Treponema pallidum possède une structure antigénique complexe constitué de 4 groupes antigéniques :

- Le cardiolipide ou haptène lipidique de Wassermann : c'est un phosphatidyl-glycérol au niveau de la membrane cytoplasmique que l'on retrouve dans le genre *treponema*. Il se concentre particulièrement au niveau du cœur et du foie. Le cardiolipide devient un antigène lors d'un remaniement tissulaire provoqué

par l'infection syphilitique. Les réagines sont les anticorps dirigés contre cet antigène.

- Un antigène protéique spécifique de groupe : commun à tous les tréponèmes, situé sur les endoflagelles.
- Un antigène lipoprotéique d'enveloppe de 47kDa : spécifique de *Treponema pallidum*.
- Des antigènes du corps tréponémique : mal connus.

b) Transmission :

Le réservoir naturel de la maladie est l'Homme. La syphilis se transmet donc principalement par voie sexuelle. Un contact direct avec un chancre syphilitique permet la transmission de la maladie¹⁵. Le temps moyen entre l'infection et l'apparition des premiers symptômes est de 21 jours mais cela peut varier de 10 à 90 jours. Le risque contagieux dépend du stade de la maladie, il est plus fort au contact de patients atteints de syphilis primaire que de syphilis latente. Ainsi, le risque de transmission est estimé à 60% pour des personnes exposées à une syphilis précoce.

Une transmission par voie sanguine est possible, notamment par le partage de seringues entre toxicomanes ou par un accident d'exposition au sang. La transmission foeto-maternelle existe également et sera responsable de graves conséquences sur le fœtus. Celui-ci peut se contaminer lors du passage par les voies naturelles pendant l'accouchement.

c) Stades de la maladie :

La syphilis se traduit par différents stades ou formes de la maladie :

- Syphilis primaire
- Syphilis secondaire
- Syphilis tertiaire ou latente

La syphilis récente ou précoce regroupe les stades primaires, secondaires et la syphilis latente précoce (syphilis de moins de 2 ans). La syphilis tardive comprend la syphilis latente tardive (syphilis de plus de 2 ans) et la syphilis tertiaire¹⁴.

(1) Syphilis primaire :

Le diagnostic de syphilis primaire est évoqué devant l'apparition d'un chancre dur et indolore au point d'inoculation du germe (*Fig. 5*)¹⁵. La syphilis apparaît 2 à 3 semaines après l'infection. Ce stade est souvent inaperçu du fait du caractère indolore de la lésion et de sa localisation. Le chancre reste 3 à 6 semaines et guérit spontanément. Puis, survient une adénopathie 4 à 8 jours après le chancre, indolore et sans périadénite. Cependant, le patient est toujours atteint et la maladie progresse jusqu'au stade secondaire. Le risque de contamination est élevé.

Ce stade se caractérise par la pénétration du tréponème dans l'organisme. Celui-ci va alors être phagocyté par les polynucléaires sans être détruit ce qui va conduire à la formation d'adénopathies¹⁷.



Figure 5 : Chancre

(<http://www.cdc.gov/std/syphilis/STDFact-Syphilis.htm>)

(2) Syphilis secondaire :

La syphilis secondaire correspond à la phase septicémique et se traduit par :

- une éruption diffuse et maculeuse ou roséole sur toute la peau, qui est en général non prurigineuse. L'éruption apparaît sur le tronc, dure en moyenne 15

jours et régresse spontanément. Elle correspond à la première floraison. Le diagnostic est difficile car la roséole peut être prise pour une virose ou une toxidermie voire passe simplement inaperçue¹⁶.

- Une deuxième floraison ou des syphilides papuleuses apparaissent ensuite (*Fig. 6*). Ce sont des papules érythémateuses, non prurigineuses et bordées par une fine desquamation circulaire ou « collerette de Biett ». on retrouve l'éruption au niveau du tronc, des paumes et des plantes. Le diagnostic est en général effectué à partir de ce symptôme.
- des condylomes, lésions plus larges peuvent apparaître dans les zones chaudes et humides comme la bouche, le vagin ou l'anus.
- de l'alopecie.
- Des symptômes moins spécifiques : perte de poids, fièvre, maux de tête, douleurs musculaires qui correspondent à la dissémination systémique de la bactérie.

On observe l'apparition de ces symptômes 3 mois après l'infection. Ce stade se manifeste par une alternance d'éruptions cutanéomuqueuses et de périodes asymptomatiques. En l'absence de traitement, la maladie peut évoluer en syphilis latente.



Figure 6 : Syphilides papuleuses

(<http://www.cdc.gov/std/syphilis/STDFact-Syphilis.htm>)

(3) Syphilis latente :

La syphilis latente débute après la disparition des symptômes de la phase primaire et secondaire. On n'observe aucun signe clinique. Cette phase se développe 10 à 20 ans après l'infection et peut durer plusieurs années. Puis, on peut observer une réapparition des symptômes dans 20 à 30% des cas. C'est la phase tertiaire¹⁷.

On distingue deux stades en fonction de la date de la contamination : la syphilis latente précoce si l'infection date de moins d'un an et la syphilis latente tardive si l'infection remonte à plus d'un an.

(4) Syphilis tertiaire :

La syphilis tertiaire apparaît plusieurs années après la contamination¹⁶. Elle se traduit par l'atteinte généralisée du corps. On retrouve des lésions viscérales, cardiovasculaires (aortites, anévrismes), neurologiques (tabès, paralysie générale), ou cutanées (gommages syphilitiques). La mort survient souvent après une atteinte généralisée.

d) Cas particuliers :

(1) Neurosyphilis :

L'infection peut envahir le système nerveux à tous les stades de la maladie. Des anomalies cytochimiques du LCR sont présentes chez 10 à 20% des syphilis primaires et 30 à 70% des syphilis secondaires. Cependant ces troubles disparaissent habituellement à la fin du stade secondaire mais dans certains cas, la présence de la bactérie dans le système nerveux peut persister. On parle alors de neurosyphilis¹⁷.

Ses manifestations sont variées : pas de symptôme, maux de tête, altérations du comportement, mouvements évoquant la maladie de Parkinson ou de Huntington, méningite. Les troubles des fonctions supérieures sont progressifs avec un trouble de la mémoire, de la concentration, irritabilité, évoluant vers la démence en 5 à 10 ans. L'évolution est fatale dans la plupart des cas.

(2) Co-infection syphilis VIH :

La co-infection VIH-syphilis est fréquente¹⁵. De plus, la syphilis favoriserait l'acquisition et la transmission du VIH par l'ulcération génitale qu'elle provoque et donc l'altération de la barrière muqueuse.

Les patients développent des signes particuliers comme des chancres multiples. Ils ont plus de risques d'avoir une atteinte du système nerveux central et de développer une neurosyphilis rapidement avec des manifestations cliniques inhabituelles : encéphalites, artérite cérébrale, atteinte ophtalmique, uvéite...

Cette co-infection peut induire une fausse positivité du VDRL. La séropositivité pour le VIH entraînerait des cas d'échec thérapeutique et donc, de rechutes dans le traitement de syphilis précoces non compliquées.

(3) Syphilis congénitale :

Treponema pallidum peut infecter à n'importe quel moment de la grossesse¹⁶, le fœtus provoquant de graves dommages si la mère n'est pas traitée : mort fœtale in utéro, fausses couches, retard de croissance intra-utérin... Le risque de syphilis congénitale est faible avant 3 mois et augmente avec l'âge gestationnel. Il est le plus fort après 16 à 18 semaines d'aménorrhée.

Le sérodiagnostic de la syphilis est obligatoire lors d'une grossesse. Tout enfant né d'une mère positive à la syphilis doit faire l'objet d'analyses et recevoir un traitement

approprié car en l'absence de thérapeutique, le nourrisson peut développer de sérieux symptômes : manifestations cutanéomuqueuses, manifestations viscérales (hépatosplénomégalie), fièvre, lésions osseuses, anomalies dentaires, surdité, gommées cutanéomuqueuses.

3. Diagnostic :

Le diagnostic de la syphilis repose soit sur des méthodes directes (immunofluorescence, microscope à fond noir), soit sur des méthodes sérologiques¹⁸. Ces dernières regroupent les méthodes à antigènes non tréponémiques (VDRL, RPR), et les méthodes à antigènes tréponémiques (TPHA, FTA, ELISA). En routine, la sérologie est plus fréquemment utilisée que les méthodes directes car elle est plus simple d'utilisation et moins coûteuse. En France, la législation préconise d'avoir recours à une technique à antigènes non tréponémiques et une technique à antigène tréponémique¹⁷. Les méthodes de diagnostic direct permettent de mettre en évidence directement l'agent pathogène *Treponema pallidum* alors que les méthodes indirectes sont basées sur la détection d'anticorps anti tréponème (*annexe III*).

Le laboratoire de la Croix rousse reçoit les sérums et les LCR de l'ensemble des Hospices Civils de Lyon (*Annexe IV*). Un screening est alors effectué par dosage immuno-microparticulaire par chimiluminescence (CMIA) par l'automate Architect (*Annexe VII*). C'est une détection qualitative de l'anticorps dirigé contre *Treponema pallidum*. Les prélèvements positifs sont titrés par la technique du TPHA et par un RPR. Des tests complémentaires en immunofluorescence (FTA-total ou Fta IgM) ou en immunoblot peuvent être réalisés pour étayer le diagnostic.

a) *Diagnostic direct :*

(1) Microscopie à fond noir :

Le microscope à fond noir consiste à observer entre lame et lamelle un prélèvement de sérosité de lésion¹⁸. Il permet de voir les bactéries qui apparaissent blanches, spiralées, en mouvement (*Fig. 7*). Sa sensibilité est bonne (80%) et sa spécificité dépend de la localisation du prélèvement car il existe des cas de faux positifs dans les régions buccale et anale par la présence de tréponèmes saprophytes. En effet, cette technique ne permet pas de distinguer les différents types de tréponèmes.

C'est une technique simple, peu coûteuse, très utilisée en pratique courante mais elle nécessite un personnel expérimenté et un acheminement rapide du prélèvement du fait de la fragilité de la bactérie.

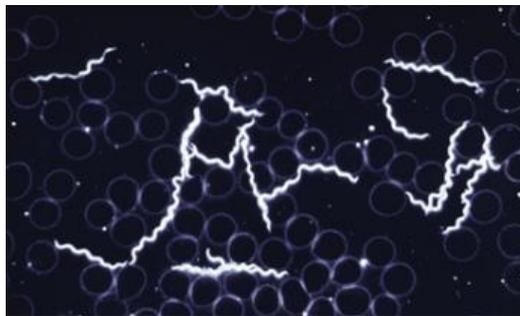


Figure 7 : Treponema au microscope à fond noir

(http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/cours_dcem1/diagnostic.htm)

(2) Immunofluorescence :

Le prélèvement est recouvert d'anticorps monoclonaux anti-*Treponema pallidum* marqués par un fluorochrome. Après un lavage, la réaction antigène-anticorps est alors révélée par une fluorescence par observation en microscopie à éclairage ultraviolet¹⁸.

L'immunofluorescence est une technique délicate qui a une excellente sensibilité (100%) mais elle ne permet pas de distinguer les mouvements de tréponèmes et elle a un coût relativement élevé. Cependant, on peut différencier *Treponema pallidum* des tréponèmes saprophytes.

(3) PCR :

La PCR est une technique très sensible, basée sur la détection de l'ADN de *Treponema pallidum*¹⁷. Cette méthode est utilisée dans le laboratoire de la Croix rouge notamment lors de dépistage des cas d'infection très précoce lorsque le chancre n'est pas encore apparu. Elle est surtout utile dans les cas de syphilis congénitale, d'atteinte neurologique ou de réinfection car l'interprétation sérologique de ces cas peut être délicate.

La plupart des PCR amplifie un gène codant pour une protéine de membrane : TpN19, TpN39, TmpA ou TpN47. C'est une technique très spécifique mais sa sensibilité varie suivant le prélèvement.

b) Diagnostic sérologique :

(1) TPHA : *Treponema pallidum* Haemagglutination

Assay :

C'est une technique à antigènes tréponémiques. Elle consiste en une hémagglutination passive entre des hématies de poulet sensibilisées par *Treponema pallidum* et les anticorps contenus dans le sérum du patient. Le titre est donné par l'inverse de la dernière dilution positive qui correspond une hémagglutination en nappe. Une réaction négative correspond à la sédimentation des hématies au fond de la cupule (Fig. 8).

C'est une technique rapide et facilement utilisable en routine¹⁸. Elle est très spécifique et très sensible. Cependant, il existe des cas de faux négatifs (*tableau 4*).

Causes de sérologie syphilis faussement positive.

Faux TPHA positifs (très rare)

- Souvent transitoire et d'origine non identifiée
- Maladies auto-immunes, grossesse, âge, etc.
- Borréliose de Lyme.

Tableau 4 : Cas de TPHA faux positifs

Le TPHA se positive entre la 3^{ème} et la 4^{ème} semaine après la contamination, juste après le FTA et reste positif longtemps, même après la guérison (*annexe II*). Seul, il ne permet donc pas de différencier une infection récente d'une syphilis ancienne. Il peut se négativer après une prise en charge très précoce d'une infection.

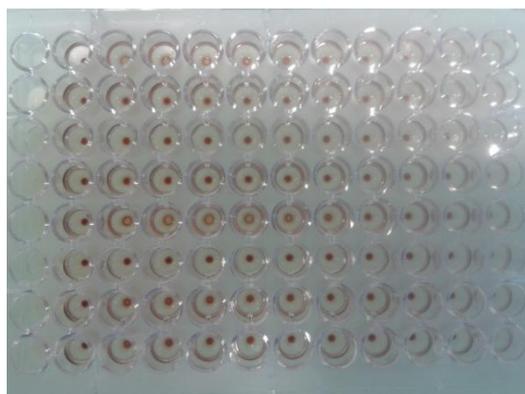


Figure 8 : TPHA

(2) VDRL : Venereal Disease Research Laboratory :

Le VDRL est une technique à antigène non tréponémique¹⁸. C'est un test d'agglutination passive qui met en évidence les réagines ou anticorps anti cardiolipides contenu dans le sérum du patient. C'est un test simple d'utilisation et rapide. Il est souvent utilisé en screening mais il peut être utilisé en quantitatif. Son titre correspond alors à la dernière dilution contenant des agglutinats.

Le VDRL est une bonne méthode de dépistage, de suivi et de surveillance. Cependant, il manque de spécificité et des cas de faux positifs sont possible lors d'infections bactériennes, virales et parasitaires, de grossesses, de maladies auto immunes... (Tableau 5).

Causes de sérologie syphilis faussement positive.

Faux VDRL positifs (fréquents)

Fausse réactions aiguës :

– Causes infectieuses

- *bactériennes* : lèpre, tuberculose, leptospirose, borréliose, etc.

- *virales* : varicelle, oreillons, mononucléose infectieuse, hépatite virale, rougeole, etc.

- *parasitaires* : paludisme, etc.

– Causes non infectieuses : grossesse, vaccinations, utilisation de drogues par voie intraveineuse, etc.

Fausse réactions positives chroniques

– Causes infectieuses : infections virales (VIH) ou parasitaires chroniques

– Causes non infectieuses :

- maladies auto-immunes : lupus, anémies auto-immunes

- gammopathie monoclonale

- hépatopathie chronique

- syndrome des antiphospholipides cancers, etc.

Tableau 5 : Cas de VDRL faux positifs

Le Rapid Plasma Reagin test (RPR) est une application simplifiée du VDRL, donc plus couramment utilisée car elle ne nécessite pas l'étape d'inactivation des sérums à 56°C. Il consiste à mettre en contact du sérum du patient avec des particules de charbon sensibilisées par l'antigène cardiolipidique sur une carte en plastique. Après agitation, on peut observer l'apparition d'agglutinats (*fig. 9*).

Le VDRL ou le RPR se positive 8 à 20 jours après l'apparition du chancre, quelques jours après le TPHA ou le FTA mais le taux d'anticorps diminue après traitement. Ce marqueur est donc utile pour le suivi du traitement. En l'absence de thérapeutique, les taux d'anticorps augmentent rapidement pendant le stade secondaire. Puis, le VDRL a tendance à diminuer et à se négativer spontanément dans un quart des syphilis tardives (*annexe II*). C'est donc un bon marqueur du suivi biologique d'un patient.

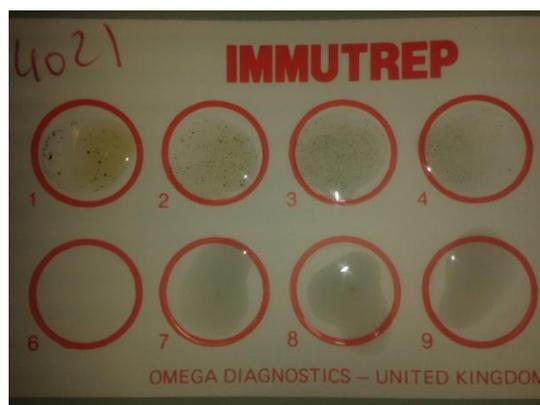


Figure 9 : RPR positif

(3) FTA : Fluorescent Treponemal Antibody test :

Le FTA est une réaction d'immunofluorescence indirecte qui met en contact le sérum du patient dilué sur une lame recouverte de tréponèmes entiers tués¹⁸. Les anticorps fixés sont révélés, après lavage, par une antiglobuline humaine marquée par un fluorochrome, la fluorescéine. La réaction est observée par microscopie à éclairage ultra-violet (*Fig. 10*). Le titre correspond à la dernière dilution positive et le seuil de positivité est fixé au 1/200^{ème}.

C'est un test sensible (86 à 96%) et spécifique (92 à 99%). Il permet de confirmer un diagnostic et de suivre l'efficacité d'un traitement. Cependant, la lecture est complexe et requiert un personnel expérimenté. De plus, des cas de faux positifs existent lors de maladies auto immunes ou d'herpès génital (*tableau 6*).

Causes de sérologie syphilis faussement positive.

Faux FTA positifs (rare)

- Facteurs rhumatoïdes, anticorps anti-ADN.
- Maladies auto-immunes, grossesse, infections virales ou bactériennes (autres spirochètes), etc.

Tableau 6 : Cas de FTA faux positifs

Le FTA se positive rapidement après l'apparition du chancre et il se négative lentement après traitement (*Annexe II*).

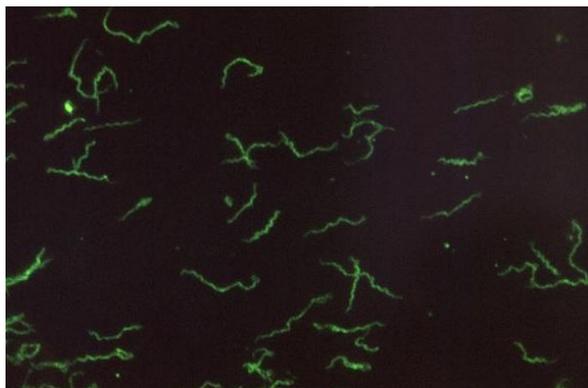


Figure 10 : FTA positif

(4) FTA IgM :

Les IgM sont les premiers anticorps à apparaître (2 semaines après la contamination) suivi par les IgG¹⁸. Après traitement, les IgM diminuent rapidement et disparaissent en quelques mois. Ils sont donc caractéristiques d'une syphilis active.

Les IgM sont recherchés par immunofluorescence indirecte (même principe que le FTA). Le révélateur utilisé est un conjugué monospécifique anti-chaine μ . Des réactions faussement positives peuvent être observées en présence de facteurs rhumatoïdes ou d'anticorps anti nucléaires. Les IgG rentrent en compétition avec les IgM et peuvent induire des faux négatifs. Cette technique est délicate à interpréter et nécessite du personnel expérimenté.

Cette technique est utile pour dépister les cas de syphilis congénitale, confirmer une infection récente ou une neurosyphilis. La persistance d'IgM après traitement peut évoquer un échec thérapeutique ou une recontamination.

c) *Evolution des profils sérologiques :*

(1) Syphilis primaire :

Le FTA est la technique la plus sensible au début de l'infection. Le TPHA devient positif une dizaine de jours après l'apparition du chancre tandis que le VDRL se positive 20 jours après l'apparition du chancre¹⁸. Après un traitement, les taux d'anticorps diminuent rapidement en quelques semaines (*tableau 7*).

Différents profils sérologiques observés au stade primaire.			
VDRL	TPHA/ELISA	FTA	Conclusion
-	-	-	Stade très précoce
+	+	+	Profil typique d'infection
±	-	+	Profil rare, le TPHA/ELISA se positive rapidement ensuite. Utilité de renouveler les tests. Contexte clinique à ce stade évocateur (chancre, rapport sexuel récent avec une personne ayant fait une syphilis)
-	+	+	Réinfection au stade précoce avec antécédent de syphilis traitée. Le patient a déjà des taux d'anticorps résiduels, reflet de sa syphilis antérieure

Tableau 7 : Exemples de profils sérologiques observés en phase primaire

(2) Syphilis secondaire :

Tous les tests sérologiques sont nettement positifs.

(3) Syphilis tertiaire :

Toutes les méthodes sont positives lors d'une syphilis tertiaire mais des cas de VDRL négatif sont possibles.

(4) Neurosyphilis :

Le diagnostic est difficile car il repose sur des signes non spécifiques : hypercellularité du LCR, hyperprotéinorachie¹⁷. Le VDRL est très spécifique dans le LCR mais peu sensible¹⁸. Par conséquent, un VDRL positif signe toujours une atteinte nerveuse mais un VDRL négatif n'exclut pas le diagnostic de neurosyphilis. De même, le FTA ou le TPHA sont très spécifiques dans le LCR mais peu sensibles. La présence d'IgM dans le LCR est en faveur d'une neurosyphilis mais cela ne prouve pas la production d'immunoglobulines dans le liquide car leur présence peut être due à un transfert passif. Pour affirmer le diagnostic, il faut associer des manifestations cliniques, des résultats sérologiques positifs et des anomalies de la numération cellulaire.

(5) Syphilis congénitale :

En raison de réactions faussement positives, les résultats des sérologies de la femme enceinte ne sont pas facilement interprétables. La recherche d'IgM chez la mère permet de différencier une syphilis évolutive d'une syphilis guérie.

Le diagnostic de syphilis congénitale repose sur¹⁸ :

- Des IgM positives,
- Un titre du VDRL 4 fois supérieur à celui de la mère,
- Un taux d'anticorps croissants entre 2 sérums successifs chez le bébé.

Les IgG transmis passivement par la mère disparaissent en 3 à 6 mois chez un enfant non atteint. En cas d'infection, les anticorps peuvent persister plus longtemps. L'efficacité du traitement est basée sur la diminution significative du VDRL.

4. Traitement :

Treponema pallidum est la seule bactérie toujours sensible aux pénicillines G. Aucun cas de résistance n'a été rapporté à ce jour¹⁸. Par conséquent, le traitement curatif de la syphilis est basé sur la benzathine pénicilline G (Extencilline®) (Fig. 11). La syphilis est facilement traitée. En revanche, les dommages qu'elle a engendrés ne sont pas réparables.

En cas de syphilis précoce, le traitement consiste en une unique injection de 2,4 M UI d'Extencilline. Pour la syphilis latente tardive, la posologie est de 2,4 M UI en intra musculaire, une injection par semaine pendant 3 semaines. Pour la syphilis tertiaire avec atteinte cutanée et cardiovasculaire, on administre de la pénicilline 600 000 U/j pendant 15 à 20 jours.

En cas d'allergie, la pénicilline est remplacée par la doxycycline 100mg, deux fois par jour pendant 14 jours ou l'azithromycine 1g per os ou la ceftriaxone 500mg en intramusculaire pendant 10 jours en cas de syphilis précoce. La pénicilline est substituée par de la doxycycline 200mg, deux fois par jour pendant 28 jours en cas de syphilis latente tardive. Enfin, en cas de syphilis tertiaire et d'allergie aux pénicillines, le traitement repose sur la doxycycline 200mg, deux fois par jour pendant 28 jours ou de la ceftriaxone 2g, en intramusculaire ou intraveineuse, pendant 10 à 14 jours (tableau 8).



Figure 11 : Benzathine pénicilline G

(<http://www.medhelp.org/tags/show/173743/penicillin-g-benzathine--proc>)

La neurosyphilis est traitée par de la pénicilline G en intraveineuse, 2 à 4 MUI, six fois par jour pendant 15 jours ou de la benzathine pénicilline G 2,4 MUI, en

intramusculaire, une fois par jour pendant 15 jours, associée au probénicide 500mg, quatre fois par jour pendant 15 jours¹⁷.

Les femmes enceintes sont traitées exclusivement par la pénicilline en intramusculaire à la dose de 2,4 MUI, renouvelée 7 jours après. Ce traitement est efficace (98% de succès) dans la prévention de transmission de la maladie de la mère à l'enfant. En cas d'allergie, les futures mères doivent se faire désensibiliser à la pénicilline avant de recevoir un traitement.

En cas de co-infection avec le VIH, le traitement est identique que chez les patients non infectés par le virus du SIDA.

Traitement de la syphilis (recommandations du CDC).	
<i>Stade</i>	<i>Traitement</i>
Syphilis précoce	
Syphilis primaire	Injection unique de 2,4 x10 ⁶ U de benzathine pénicilline G (Extencilline®) En cas d'allergie à la pénicilline : doxycycline 100 mg × 2/24 h 14 jours ou azithromycine 1 g per os ou ceftriaxone 500 mg IM 10 jours
Syphilis secondaire	
Syphilis latente précoce	
Syphilis tardive	
Syphilis latente tardive	3 injections IM de 2,4 × 10 ⁶ U de benzathine pénicilline G (Extencilline®) à 8 jours d'intervalle En cas d'allergie à la pénicilline : doxycycline 200 mg × 2/24 h 28 jours
Syphilis tertiaire	– Atteinte cutanée et cardiovasculaire : pénicilline 600 000 U par jour pendant 15 à 20 jours (prévention de la réaction d'Herxheimer +++) – Neurosyphilis : 3 à 4 × 10 ⁶ U de pénicilline G toutes les 4 h pendant 10 à 14 jours ou injection IM de pénicilline 2,4 × 10 ⁶ U + probénicéide 500 mg × 4 par jour pendant la même durée – En cas d'allergie à la pénicilline : doxycycline 200 mg × 2/24 h 28 jours ou ceftriaxone 2 g IM ou IV 10 à 14 jours
Syphilis et VIH	Stade précoce : idem que chez les sujets non infectés par le VIH Neurosyphilis : idem ci-dessus
Syphilis congénitale	
Femme enceinte	2,4 × 10 ⁶ U de benzathine pénicilline G (Extencilline®) en IM et répéter la dose une semaine plus tard Une 3 ^e dose une semaine plus tard est conseillée en cas de syphilis tardive
Enfant	Pénicilline G 50 000 UI/kg par IV en une cure en l'absence de symptômes 150 000 UI/kg/j pendant 10 à 14 jours en cas de symptômes

Tableau 8 : Recommandations de traitement par le CDC

La surveillance de la syphilis primaire et secondaire est clinique et sérologique. En effet, un contrôle du VDRL doit être effectué à 3, 6, 12 et 24 mois, son titre doit être

divisé par 4 à 3 mois et par 8 à 6 mois. La surveillance de la neurosyphilis est sérologique, le LCR est également vérifié tous les 3 mois jusqu'à normalisation.

5. Prévention :

La prévention de la syphilis est similaire aux préventions pour les maladies sexuellement transmissibles : avoir des rapports sexuels protégés, dépistage des populations à risques¹⁹.

Devant le risque de contamination fœto-maternelle, les femmes enceintes doivent subir un dépistage durant leur première visite prénatale ou lors de leur déclaration de grossesse. Des tests sérologiques (VDRL et TPHA) seront alors pratiqués. Pour les femmes à haut risque d'infection, un test au 3^{ème} trimestre et un autre test au moment de l'accouchement seront réalisés¹⁹. Un dépistage est proposé aux femmes avec des antécédents d'avortements spontanés ou d'enfants morts nés.

II. Matériels et méthodes :

A. Le dossier de validation au centre de biologie nord :

1. Vérification bibliographique :

a) Données fournisseurs :

Dans cette étude, nous avons collecté les notices des réactifs (TPHA et RPR) et leurs évaluations réalisées par la société Omega Diagnostics (*Annexe V et VI*).

La société Omega Diagnostics a évalué son réactif Immutrep TPHA lors d'une étude menée en juillet 1997 par S I Egglestone et I Ashley²⁰. Leur but était d'évaluer les

performances du réactif comparées à d'autres tests sérologiques. Ils ont donc réuni les échantillons suivants :

- Un panel de 552 sérums frais non testés provenant de cliniques anténatales, de services génito-urinaires et de dépistages effectués en routine dans divers hôpitaux. Ces échantillons ont été prélevés par ponction veineuse et ont été stockés à 4°C.
- Un panel de 206 sérums positifs qui ont tous un FTA positif. Parmi ces 206 sérums, 30 sont des cas de syphilis active (primaire et secondaire), 38 sont des cas de syphilis non traitée et 138 sont des cas de syphilis traitée. Ces échantillons ont tous été prélevés par ponction veineuse et stockés à -20°C.
- Un panel de sérums pouvant produire des réactions croisées : 50 sérums potentiellement faux positifs (10 sérums + aux facteurs rhumatoïdes, 10 sérums + à l'Epstein Barr Virus, 10 sérums post vaccination à l'hépatite B, 10 sérums + au lupus érythémateux systémique, 10 sérums + au virus de l'herpès simplex), 10 sérums positifs à la maladie de Lyme et 10 sérums positifs à la leptospirose.

Les sérums ont été répartis dans les groupes suivants :

- Anté-natal
- Service génito-urinaire
- Hôpitaux
- Sérums syphilitiques
- Faux positifs potentiels
- Maladie de Lyme
- Leptospirose

Une évaluation qualitative et quantitative a été réalisée ce qui a permis de déterminer la sensibilité et la spécificité du test (*tableau 9*).

SERA GROUPS	SENSITIVITY	SPECIFICITY (antenatals)	SPECIFICITY (antenatals & false reactors)
ALL	98.5%	100.0%	99.6%
PRIMARY/SECONDARY	93.3 %		
UNTREATED	97.4%		
TREATED	100.0%		

Tableau 9 : Sensibilité et spécificité du réactif Immutrep TPHA

En décembre 1995, S I Egglestone et I Ashley ont évalué les performances du réactif Immutrep RPR pour la société Omega Diagnostic²¹. Ils ont donc réunis 645 sérums anténataux non testés et 30 sérums réactifs. Ils ont établis les groupes suivants :

- 645 sérums anténataux
- 10 sérums connus faux positifs (réactifs seulement avec le test de cardiolipide)
- 10 sérums positifs (VDRL, TPHA, FTA +)
- 10 sérums non réactifs (VDRL -, TPHA et FTA +)

Tous les échantillons ont été testés par la méthode qualitative et les 30 sérums positifs ont été également testés avec la méthode semi-quantitative. Ils n'ont obtenu aucun résultat discordant (tableau 10). Les sérums positifs ont été détectés.

Category of Sera	Immutrep RPR		Reactive	Nonreactive
	Reactive	Non-reactive		
Antenatals	0	645	0	645
Previous BFPs* ¹	10	0	10	0
Syphilis cases* ²	10	0	10	0
Syphilis cases* ³	0	10	0	10

*¹ Previously reactive only with cardiolipin test

*² Previously VDRL, TPHA, FTA and EIA IgG reactive

*³ Previously VDRL non-reactive, TPHA, FTA and EIA IgG reactive

Tableau 10 : Résultats de l'évaluation du réactif Immutrep RPR

b) Etude bibliographique dans la littérature :

Lors de cette étude, nous avons pu déterminer la sensibilité et la spécificité de ces deux tests. En effet, ces paramètres ont déjà été testés lors de recherches précédentes. Ainsi, *Lynn et al. (2004)* ont publiés les résultats suivants (*tableau 11*)²² :

	Sensibilité (%)			Spécificité (%)
	Stade primaire	Stade secondaire	Stade tertiaire	
VDRL	80	100*	75	98
RPR	86	100*	70	98
TPHA	80	100*	95	99
FTA-abs	84	100*	96	98

D'après Lynn et al, 2004 (lancet s HIV)

* 3 cas publiés de syphilis séronégatives chez des patients co-infectés par le VIH (seronegative sec s1 et2)

Tableau 11 : Sensibilité et spécificité des tests sérologiques de la syphilis

Ce tableau nous montre que les différents tests ont une spécificité équivalente alors que leur sensibilité varie selon le stade de la maladie : lors d'une syphilis primaire, il faudra préférer le RPR ou le FTA qui ont démontré une plus grande sensibilité alors que lors d'une syphilis tertiaire, le TPHA ou le FTA ont une meilleure capacité de détection de la maladie. En revanche, le stade secondaire de la syphilis est parfaitement détecté par tous les tests.

Le TPHA et le VDRL ou RPR montrent également une excellente sensibilité et spécificité.

Seña, White et Sparling ont répertorié les différentes techniques de diagnostic de la syphilis²³. Ils ont ainsi pu présenter leur sensibilité et spécificité respectives (*tableau 12*). On remarque que tous les tests montrent une spécificité excellente, et que leur sensibilité varie selon le stade de la maladie, tout en ayant de très bonne valeur. Ils ont également comparé les techniques non tréponémiques avec les techniques tréponémiques et calculé la valeur prédictive positive de ces tests (*tableau 13*).

Test	Sensitivity during stage of infection, % (range)				Specificity, % (range)
	Primary	Secondary	Latent	Late	
Nontreponemal tests					
VDRL [14]	78 (74–87)	100	96 (88–100)	71 (37–94)	98 (96–99)
TRUST [14]	85 (77–86)	100	98 (95–100)	NA	99 (98–99)
RPR [14]	86 (77–99)	100	98 (95–100)	73	98 (93–99)
Early treponemal tests					
MHA-TP [15]	76 (69–90)	100	97 (97–100)	94	99 (98–100)
TPPA [16]	88 (86–100)	100	100	NA	96 (95–100)
TPHA [17]	86	100	100	99	96
FTA-ABS [14]	84 (70–100)	100	100	96	97 (94–100)
Enzyme immunoassays					
IgG-ELISA [18]	100	100	100	NA	100
IgM-EIA [19]	93	85	64	NA	NA
ICE [20]	77	100	100	100	99
Immunochemiluminescence assays					
CLIA [21]	98	100	100	100	99

NOTE. CLIA, chemiluminescence assay; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; EIA, enzyme immunoassay; FTA-ABS, fluorescent treponemal antibody absorption assay; ICE, immune-capture EIA; MHA-TP, microhemagglutination assay for *Treponema pallidum*; NA, not available; TPHA, *T. pallidum* hemagglutination assay; TPPA, *T. pallidum* particle agglutination; TRUST, toluidine red unheated serum test.

Tableau 12 : Sensibilité et spécificité des tests syphilitiques

Test	Manufacturer	Treponemal antigens	Treponemal antibody targets	Reference tests	Sensitivity %	Specificity %	Positive predictive value, %
Rapid tests							
Syphilis Fast [34]	Diasee	Recombinant (TpN15, TpN17, TpN47)	IgM, IgG	VDRL, TPHA, FTA-ABS	95.6	99.9	87.1-97.5
Determine Syphilis TP [31]	Abbott Laboratories	Recombinant (TpN47)	IgM, IgG, IgA	TPHA, TPPA	97.2	94.1	10.4-40.7
EpiLine TP [31]	Fujirebio	Recombinant (TpN15, TpN17, TpN47)	IgM, IgG, IgA	TPHA, TPPA	97.7	93.4	9.4-38.1
SD Bioline Syphilis 3.0 [31]	Standard Diagnostics	Recombinant (TpN15, TpN17, TpN47)	IgM, IgG, IgA	TPHA, TPPA	95.0	94.9	11.6-43.7
Enzyme immunoassays							
BioElsa Syphilis 3.0 [43]	Biokit	Wild type	IgG	TPHA, FTA-ABS	99.6	99.4	53.9-87.4
CAPITA Syphilis-G [44]	Trinity Biotech	Wild type	IgG	FTA-ABS	96.7	98.3	28.6-70.3
Eti-syphilis G [18]	Diasorin	Wild type	IgG	RPR, MHA-TR, FTA-ABS	99.4	100	58.4-89.2*
Triop-Check IgG EIA [45]	Phoenix Biotech	Recombinant (not specified)	IgG	RPR, VDRL, TPPA, FTA-ABS	85.3	96.8	12.0-44.7
Syphilis EIA II [48]							
Syphilis Total [46]	Newmarket Laboratories	Recombinant (TpN15, TpN17, TpN47)	IgM, IgG	TPHA, TPPA	99.1	100	58.3-89.2*
Enzywell Syphilis Screen Recombinant [46]	Bio-Rad	Recombinant (TpN15, TpN17, TpN47)	IgM, IgG	TPHA, TPPA	97.4	100	57.9-89.0*
Enzywell Syphilis Screen Recombinant [46]	Diasee	Recombinant (TpN15, TpN17, TpN47)	IgM, IgG	TPHA, TPPA	98.2	100	58.1-89.1*
Immunochromatoluminescence							
LIASON Chemiluminescence Assay [47]	Diasorin	Recombinant (TpN17)	IgM, IgG	RPR, TPPA	95.8	99.1	42.9-81.6
Achitect Chemiluminescence Assay [21]	Abbott	Recombinant (TpN15, TpN17, TpN47)	IgM, IgG	VDRL, TPPA	98.4	99.1	43.5-82.0

NOTE. EIA, enzyme immunoassay; FTA-ABS, fluorescent treponemal antibody absorption assay; MHA-TR, microhemagglutination assay; TPHA, Treponema pallidum hemagglutination assay; TPPA, T. pallidum particle agglutination.

* For tests with specificities of 100%, a lower estimate of 99.5% was used to calculate a range of positive predictive values considering the 95% confidence intervals around the reported specificities.

Tableau 13 : Caractéristiques de plusieurs tests syphilitiques et leur valeur prédictive positive

2. Comparaison de méthodes :

Cette étude permet de vérifier la comparabilité entre deux méthodes (VDRL et TPHA).

Selon le guide SH GTA 04 du Cofrac, pour comparer les résultats d'une méthode à tester avec ceux d'une méthode utilisée au laboratoire, il faut analyser au moins 30 échantillons de patients couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique rencontré⁸. Ces échantillons sont analysés en simple par les deux techniques, dans les conditions normales d'utilisation et dans le délai le plus court possible. Les résultats sont examinés au fur et à mesure.

Dans notre cas, 60 sérums pris aléatoirement ont été testés en TPHA, VDRL et par l'automate Architect. Il réalise un dosage immunologique micro-particulaire par chimiluminescence. Il permet une détection qualitative de l'anticorps dirigé contre *Treponema pallidum*. En pratique, les résultats, représentés par la valeur du SYPIE, supérieurs à 1 sont positifs et ceux inférieurs à 1 sont négatifs. Les résultats obtenus sont regroupés dans le *tableau 14*.

comparaison de méthodes

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

55	13022112	0,07	< 80	-	concordant
56	13022116	0,05	< 80	-	concordant
57	13022120	0,2	< 80	-	concordant
58	13022124	8,18	320	+ 1	concordant
59	13022138	0,13	< 80	-	concordant
60	13022142	0,04	< 80	-	concordant
témoin +			2560		

TPHA : n° lot : 7037769
date de péremption :
06/2014

VDRL : n° lot : 7037911
date de péremption :
01/2015

Tableau 14 : Comparaison de méthodes

3. Vérification expérimentale :

Avant d'effectuer toute vérification expérimentale, il faut s'assurer que l'opérateur en charge soit habilité à réaliser les tests.

a) Contamination inter-échantillon :

La contamination inter-échantillon est normalement étudiée pour des systèmes automatisés⁹. Il s'agit de l'effet exercé par un échantillon sur celui qui lui succède. Il faut donc s'assurer que les résultats ne sont pas surestimés si un échantillon de faible concentration ou négatif est testé après un échantillon positif. Pour éviter tout phénomène de contamination, ce paramètre a été analysé.

b) Spécificité analytique :

La spécificité correspond à l'aptitude d'un système de mesure, en utilisant une procédure de mesure spécifiée, à produire des résultats de mesure, pour un ou plusieurs mesurandes, qui ne dépendent ni les uns des autres ni de toute autre grandeur dans le système soumis au mesurage⁹. En d'autres termes, la spécificité d'un test correspond à sa capacité à ne mesurer qu'un produit identifié à l'exclusion de tout autre.

Le but de l'évaluation de ce paramètre est d'apprécier l'impact des interférences analytiques potentielles identifiées lors de l'étude bibliographique.

c) Stabilité des réactifs :

Le test de stabilité des réactifs après ouverture permet de vérifier que les performances des réactifs sont conservées tout au long de leur utilisation.

L'évaluation de la durée de stabilité des réactifs est normalement effectuée lors d'une validation de portée B⁸. Elle se réalise de la façon suivante : un étalon de niveau de concentration élevée (témoin positif des réactifs) est analysé à intervalle régulier entre J1 et Jn.

d) Robustesse :

L'évaluation de la robustesse est en portée B uniquement. Elle consiste à évaluer la capacité de la méthode à ne pas être influencée par des facteurs extérieurs⁹. Cela fournit une indication sur sa fiabilité dans les conditions normales d'utilisation.

Le choix des facteurs d'influence à tester dépend du biologiste responsable. Il dépend de l'analyse de risques de la méthode et des changements apportés par rapport aux recommandations du fournisseur.

B. TPHA :

1. Analyse de risques :

a) Phase pré-analytique :

(1) Résultats :

La phase pré analytique rassemble toutes les étapes depuis la prescription de l'examen par le prescripteur à l'obtention d'un échantillon prêt à être analysé. Pour l'analyse de risque, chaque étape a été reprise une à une en étudiant les points critiques à maîtriser, leur indice de criticité et les modalités de maîtrise mises en place ou à effectuer⁹.

ETAPE	5M	Points critiques à maîtriser	Grav	Fréq	Detec	Ind. Crit.	Modalités de maîtrise
Prélèvement	Main d'œuvre	Réalisation du prélèvement	10	1	1	10	Information des préleveurs, e-learning
	Matière	Prélèvement : sang	6	3	1	18	Manuel de prélèvement
	Milieu	Conditions de stockage	1	3	3	9	Manuel de prélèvement
	Méthode	Procédure	3	3	6	54	Catalogue des analyses, Manuel de prélèvement
	Matériel	Matériel de prélèvement (aiguille, seringue) et type de support pour le recueil (tube)	3	1	1	3	Biobook, pharmacie

ETAPE	5M	Points critiques à maîtriser	Grav	Fréq	Detec	Ind. Crit.	Modalités de maîtrise
Transport	Main d'œuvre	Transport des prélèvements (délai, température)	6	3	3	54	Formation transport échantillons biologiques
	Milieu	Conditions de transport	3	3	10	90	MO conditions de transport des prélèvements pour analyse sérologique
	Méthode	Conditions de transport	3	3	6	54	Contrat avec les transporteurs
	Matériel	Utilisation des mallettes de transport	1	1	6	6	Information, notice d'utilisation

ETAPE	5M	Points critiques à maîtriser	Grav	Fréq	Detec	Ind. Crit.	Modalités de maîtrise
Réception enregistrement	Main d'œuvre	Réception, enregistrement	6	6	1	36	Formation, habilitation Personnel du RTE
	Matière	Sérothèque et aliquotage prélèvements	6	1	6	36	SER 001, MO SER 040
	Milieu	Conservation entre 2 et 8°C pendant 48h	3	1	6	18	Suivi t° de stockage
	Méthode	Conformité des prélèvements	1	3	3	9	Critères d'acceptation des prélèvements connus
		Enregistrement et étiquetage	1	10	1	10	MO enregistrement
		Centrifugation des microtubes de pédiatrie	6	1	6	36	MO utilisation centrifugeuses, critères de centrifugation connus
		Conformité bons de demande : prescription/enregistrement	1	10	1	10	Gestion des non conformités

		Panne du SIL	3	6	1	18	Maintenance Procédures dégradées
	Matériel	Informatique : transmission du SIL RTE au SIL labo, imprimante, connexion	3	10	1	30	Tests de connexion

(2) Etude :

Grâce à l'AMDEC, nous avons pu classer les différents risques en leur donnant un ordre de priorité. Plus le risque aura un indice de criticité élevé, plus il devra être traité rapidement. Ainsi, nous avons pu étudier si leurs modalités de maîtrise étaient facilement applicables. Nous remarquons donc, que les risques avec un indice de criticité élevé ont des modalités de maîtrise facilement applicables, ils peuvent donc être évités aisément.

Cependant, le laboratoire n'intervient pas directement au niveau pré analytique. Il faudra donc faire passer des informations, des consignes au niveau des services concernés afin qu'ils gèrent leurs risques. En effet, les risques les plus importants concernent l'étape de transport des prélèvements. Il faudra donc être vigilant concernant le personnel habilité à cette fonction et sur la diffusion d'informations.

Etape	Ordre de priorité	Ind. Crit.	5 M	Risque	Modalités de maîtrise	Application
transport	1	90	milieu	Conditions de transport	MO conditions de transport des prélèvements pour analyse sérologique	facilement applicable
prélèvement	2	54	méthode	procédures	catalogue des analyses, manuel de prélèvement	facilement applicable
transport	3	54	main d'œuvre	Transport des prélèvements (délai, température)	Formation transport échantillons biologiques	facilement applicable
transport	4	54	méthode	Conditions de transport	Contrat avec les transporteurs	moyennement applicable
réception, enregistrement	5	36	méthode	Centrifugation des microtubes de pédiatrie	MO utilisation centrifugeuses, critères de centrifugation connus	facilement applicable

réception, enregistrement	6	36	main d'œuvre	Réception, enregistrement	Formation, habilitation Personnel du RTE	facilement applicable
réception, enregistrement	7	36	matière	Sérothèque et aliquotage prélèvements	SER 001, MO SER 040	facilement applicable
réception, enregistrement	8	30	matériel	Informatique : transmission du SIL RTE au SIL labo, imprimante, connexion	Tests de connexion	facilement applicable
prélèvement	9	18	matière	sang	manuel de prélèvement	facilement applicable
réception, enregistrement	10	18	milieu	Conservation entre 2 et 8°c pendant 48h	Suivi t° de stockage	moyennement applicable
réception, enregistrement	11	18	méthode	Panne du SIL	Maintenance Procédures dégradées	facilement applicable
prélèvement	12	10	main d'œuvre	réalisation du prélèvement	Information des préleveurs, e-learning	facilement applicable
réception, enregistrement	13	10	méthode	Enregistrement et étiquetage	MO enregistrement	facilement applicable
réception, enregistrement	14	10	méthode	Conformité bons de demande : prescription/enregistrement	Gestion des non conformités	moyennement applicable
prélèvement	15	9	milieu	conditions de stockage	manuel de prélèvement	facilement applicable
réception, enregistrement	16	9	méthode	Conformité des prélèvements	Critères d'acceptation des prélèvements connus	moyennement applicable
transport	17	6	matériel	Utilisation des mallettes de transport	Information, notice d'utilisation	moyennement applicable
prélèvement	18	3	matériel	Matériel de prélèvement (aiguille, seringue) et type de support pour le recueil (tube)	Biobook, pharmacie	facilement applicable

b) Phase analytique :

(1) Résultats :

Le processus analytique comprend les étapes de l'échantillon prêt à être analysé au résultat d'analyse prêt à être validé. Dans le cas présent, cela consiste en la réalisation de la méthode. De la même façon que pour la phase pré analytique, à chaque stade, des points critiques ont été mis en avant selon la méthode des 5M et des solutions ont été apportées tout en calculant leur indice de criticité.

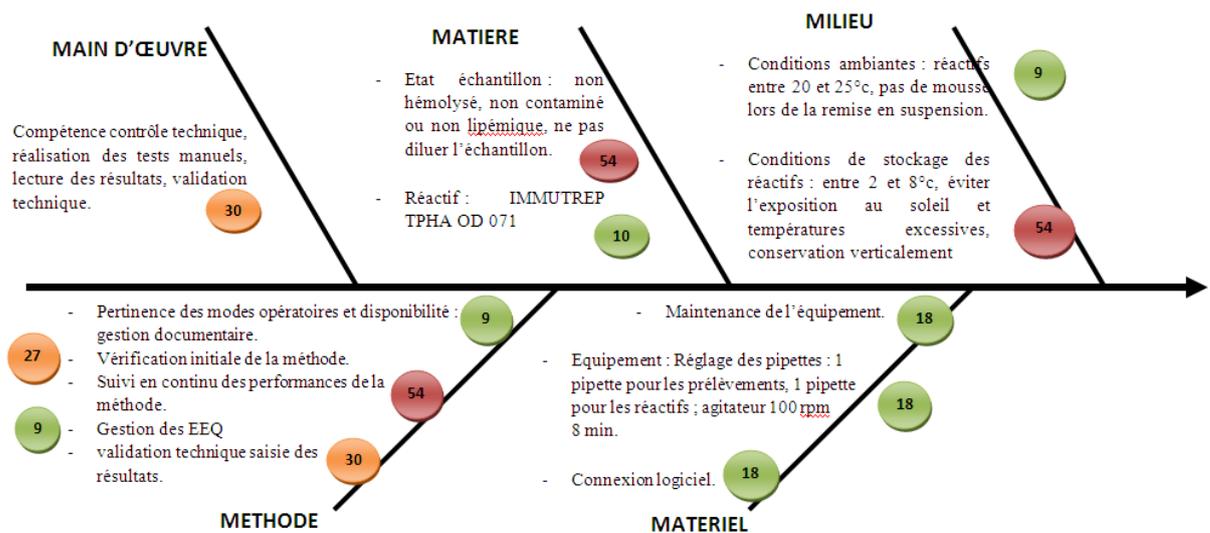
ETAPE	5M	Points critiques à maîtriser	Grav	Fréq	Detec	Ind. Crit	Modalités de maîtrise
Réalisation du test	Main d'œuvre	Compétence contrôle technique, réalisation des tests manuels, lecture des résultats, validation technique	10	3	1	30	Fiche d'habilitation, fiche de poste (FP DOC 001)
	Matière	Etat échantillon : non hémolysé, non contaminé ou non lipémique, ne pas diluer l'échantillon	6	3	3	54	MO SER 038, selon les recommandations du fabricant
		Réactif : IMMUTREP TPHA OD 071	10	1	1	10	contrôle des lots
	Milieu	Conditions ambiantes : réactifs entre 20 et 25°C, pas de mousse lors de la remise en suspension	3	3	1	9	Sonde de température
		Conditions de stockage des réactifs : entre 2 et 8°C, éviter l'exposition au	6	3	3	54	Sonde de température

		soleil et températures excessives, conservation verticalement					
	Méthode	Pertinence des modes opératoires et disponibilité : gestion documentaire	3	1	3	9	Maitrise du système documentaire, MO SER 038 Kalilab
		Vérification initiale de la méthode	3	3	3	27	Dossier de vérification de méthodes
		Suivi en continu des performances de la méthode	6	3	3	54	Rythme de passage des CQI : à chaque changement de lot ou de technicienne MO SER 038
		Gestion des EEQ	3	1	3	9	Abonnement CTCB
		validation technique saisie des résultats	10	3	1	30	Critère de validation technique
	Matériel	Maintenance de l'équipement	6	1	3	18	Fiches de vie, gestion des alarmes
		Equipement : Réglage des pipettes : 1 pipette pour les prélèvements, 1 pipette pour les réactifs ; agitateur 100 rpm 8 min	6	1	3	18	Maintenance, contrôles
		Connexion logiciel	6	3	1	18	Tests connexion PGP, SIL

(2) Etude :

Les risques les plus importants pour la phase analytique concernent l'échantillon, le stockage des réactifs et le suivi en continu des performances de la méthode. Il faut donc mettre en place des modalités de maîtrise fiables, rapidement. C'est pourquoi nous avons choisi de réaliser les tests suivants : spécificité, robustesse, stabilité après ouverture ; ce qui est un moyen de maîtriser les risques. En effet, si le TPHA est performant (par exemple, l'état de l'échantillon n'influence pas le résultat), le risque aura une probabilité plus faible de survenue.

D'autres risques sont à prendre en compte comme par exemple, les compétences du personnel ou la validation technique. Il faudra donc évaluer périodiquement les personnes exécutant ce test de diagnostic afin de s'assurer qu'elles possèdent toujours les compétences.



c) *Phase post analytique :*

(1) Résultats :

Le processus post analytique comprend les étapes d'interprétation, de validation et de rendu des résultats.

ETAPE	5M	Points critiques à maîtriser	Grav	Fréq	Detec	Ind. Crit.	Modalités de maîtrise
Validation	Main d'œuvre	Validation des résultats	10	1	3	30	Procédure de validation biologique des sérologies : PO VAL 001, PO VAL 002, formation continue
	Matière	Feuille de résultats	10	1	3	30	Vérification conformité nom/résultat
	Méthode	Logiciels : validation et transfert des résultats	6	3	3	54	Maîtrise des logiciels
	Matériel	Equipement : ordinateur, connexion logiciel	3	6	1	18	Connexion PGP, SIL, test connexion après changement de version logiciel ou créations de nouveaux tests

ETAPE	5M	Points critiques à maîtriser	Grav	Fréq	Detec	Ind. Crit.	Modalités de maîtrise
Conservation des prélèvements	Main d'œuvre	Gestion des sérothèques	1	3	1	3	Habilitation
	Matière	Prélèvements : Sérums positifs et LCR	1	1	1	1	Conditions de conservation post analytique
	Milieu	Conditions de stockage des prélèvements : tous	3	1	1	3	Suivi des t°, dates

		les prélèvements sont conservés 1 an à -20°C, prélèvements positifs 5 ans.					
	Méthode	Congélation des prélèvements positifs	1	1	1	1	MO congélation
	Matériel	Congélateur : panne du congélateur ou panne d'électricité	6	1	1	6	Maintenance, circuit électrique de secours

ETAPE	5M	Points critiques à maîtriser	Grav	Fréq	Détec	Ind. Crit.	Modalités de maîtrise
Elimination des déchets	Main d'œuvre	Personnel compétent	10	1	6	60	Formation élimination des déchets et DASRI
	Matière	Prélèvements négatifs, plaques de microtitration utilisées, embouts pipettes	6	3	3	54	MO gestion des déchets : MO DEC 001
	Méthode	Procédure	3	3	6	54	MO gestion des déchets : MO DEC 001
	Matériel	DASRI : poubelles, sacs poubelles	6	3	1	18	MO gestion des déchets : MO DEC 001

(2) Etude :

De même que pour la phase pré analytique, les risques à fort indice de criticité ont des modalités de maîtrise facilement applicables, ils pourront donc être évités simplement. On remarque que les risques les plus importants concernent surtout l'élimination des déchets. Il faudra donc être vigilant sur la formation du personnel concerné et sur la diffusion d'informations auprès d'eux.

Etape	Ordre de priorité	Ind. crit.	5 M	Risque	Modalités de maîtrise	Application
élimination des déchets	1	60	main d'œuvre	Personnel compétent	Formation élimination des déchets et DASRI	facilement applicable
validation	2	54	méthode	Logiciels : validation et transfert des résultats	Maitrise des logiciels	moyennement applicable
élimination des déchets	3	54	matière	Prélèvements négatifs, plaques de microtitration utilisées, embouts pipettes	MO gestion des déchets : MO DEC 001	facilement applicable
élimination des déchets	4	54	méthode	Procédure	MO gestion des déchets : MO DEC 001	facilement applicable
validation	5	30	main d'œuvre	Validation des résultats	Procédure de validation biologique des sérologies : PO VAL 001, PO VAL 002, formation continue	facilement applicable
validation	6	30	matière	Feuille de résultats	vérification conformité nom/résultat	facilement applicable
validation	7	18	matériel	Equipement : ordinateur, connexion logiciel	Connexion PGP, SIL, test connexion après changement de version logiciel ou créations de nouveaux tests	moyennement applicable
élimination des déchets	8	18	matériel	DASRI : poubelles, sacs poubelles	MO gestion des déchets : MO DEC 001	facilement applicable
conservation des prélèvements	9	6	matériel	Congélateur : panne du congélateur ou panne d'électricité	Maintenance, circuit électrique de secours	moyennement applicable
conservation des prélèvements	10	3	main d'œuvre	Gestion des sérothèques	Habilitation	facilement applicable
conservation des prélèvements	11	3	milieu	Conditions de stockage des prélèvements : tous les prélèvements sont conservés 1 an à -20°C, prélèvements positifs 5 ans.	Suivi des t°, dates	facilement applicable
conservation des prélèvements	12	1	matière	Prélèvements : Sérums positifs et LCR	Conditions de conservation post analytique	facilement applicable
conservation des prélèvements	13	1	méthode	Congélation des prélèvements positifs	MO congélation	facilement applicable

2. Tests réalisés :

a) Contamination inter-échantillon :

La contamination inter-échantillons a été testée en alternant 3 échantillons positifs et 3 échantillons négatifs pour la méthode évaluée. Le témoin positif du coffret Immutrep TPHA a été choisi comme échantillon positif et un sérum négatif comme échantillon négatif.

b) Spécificité :

Nous avons testé 10 sérums positifs à la maladie de Lyme et 10 sérums positifs à la leptospirose afin de vérifier si le test TPHA ne se positive pas en présence d'autres anticorps. Nous avons choisi la maladie de Lyme et la leptospirose car ces deux maladies sont dues à des bactéries appartenant au genre des spirochètes tout comme l'agent de la syphilis. Des réactions croisées sont donc possibles entre ces bactéries.

c) Stabilité des réactifs :

Nous avons simplement testé les réactifs à l'ouverture du coffret et à la fin de son utilisation. Nous avons donc comparé les valeurs que le témoin positif donnait à son ouverture et lorsque le coffret était vide. Il ne faut pas que les résultats diffèrent de plus d'une dilution pour prouver que les réactifs soient stables après ouverture.

d) Robustesse :

Nous avons évalué si le temps et la température de conservation des échantillons influençaient le TPHA. Nous avons donc testé des sérums avant et après une semaine de conservation entre 2 et 8°C, 6 semaines à -20°C, 6 mois et un an à -20°C. Puis nous avons comparé les valeurs ensemble afin de visualiser ou non des différences.

C. VDRL :

1. Analyse de risques :

a) Phase pré-analytique :

(1) Résultats :

De la même façon que pour le TPHA, une analyse de risques du VDRL a été établie en reprenant chaque phase du processus et en détaillant chaque étape.

ETAPE	5M	Points critiques à maîtriser	Grav	Fréq	Detec	Ind. Crit.	Modalités de maîtrise
Prélèvement	Main d'œuvre	Réalisation du prélèvement	10	1	1	10	Information des préleveurs, e-learning
	Matière	Prélèvement : sang	6	3	1	18	Manuel de prélèvement
	Milieu	Conditions de stockage	1	3	3	9	Manuel de prélèvement
	Méthode	Procédure	3	3	6	54	Catalogue des analyses, Manuel de prélèvement

	Matériel	Matériel de prélèvement (aiguille, seringue) et type de support pour le recueil (tube)	3	1	1	3	Biobook, pharmacie
--	----------	--	---	---	---	---	--------------------

ETAPE	5M	Points critiques à maîtriser	Grav	Fréq	Detec	Ind. Crit.	Modalités de maîtrise
Transport	Main d'œuvre	Transport des prélèvements (délai, température)	6	3	3	54	Formation transport échantillons biologiques
	Milieu	Conditions de transport	3	3	10	90	MO conditions de transport des prélèvements pour analyse sérologique
	Méthode	Conditions de transport	3	3	6	54	Contrat avec les transporteurs
	Matériel	Utilisation des mallettes de transport	1	1	6	6	Information, notice d'utilisation

ETAPE	5M	Points critiques à maîtriser	Grav	Fréq	Detec	Ind. Crit.	Modalités de maîtrise
Réception enregistrement	Main d'œuvre	Réception, enregistrement	6	6	1	36	Formation, habilitation Personnel du RTE
	Matière	Sérothèque et aliquotage prélèvements	6	1	6	36	SER 001, MO SER 040
	Milieu	Conservation entre 2 et 8°C pendant 48h	3	1	6	18	Suivi t° de stockage
	Méthode	Conformité des prélèvements	1	3	3	9	Critères d'acceptation des prélèvements connus
		Enregistrement et étiquetage	1	10	1	10	MO enregistrement
		Centrifugation des microtubes de pédiatrie	6	3	6	108	MO utilisation centrifugeuses,

							critères de centrifugation connus
		Conformité bons de demande : prescription/enregistrement	1	10	1	10	Gestion des non conformités
		Panne du SIL	3	6	1	18	Maintenance Procédures dégradées
	Matériel	Informatique : transmission du SIL RTE au SIL labo, imprimante, connexion	3	10	1	30	Tests de connexion

(2) Etude :

Voir II. Matériels et méthodes, B. TPHA, 1. Analyse de risques, a) phase pré-analytique, 2) étude.

b) Phase analytique :

(1) Résultats :

ETAPE	5M	Points critiques à maîtriser	Grav	Fréq	detec	Ind. Crit.	Modalités de maîtrise
Réalisation du test	Main d'œuvre	Compétence réalisation des tests manuels, lecture des résultats, validation technique	10	3	1	30	Fiche d'habilitation, fiche de poste (FP DOC 001)
	Matière	Etat échantillon : non hémolysé, non contaminé ou non lipémique, ne pas diluer l'échantillon	6	3	3	54	MO SER 032, selon les recommandations du fabricant

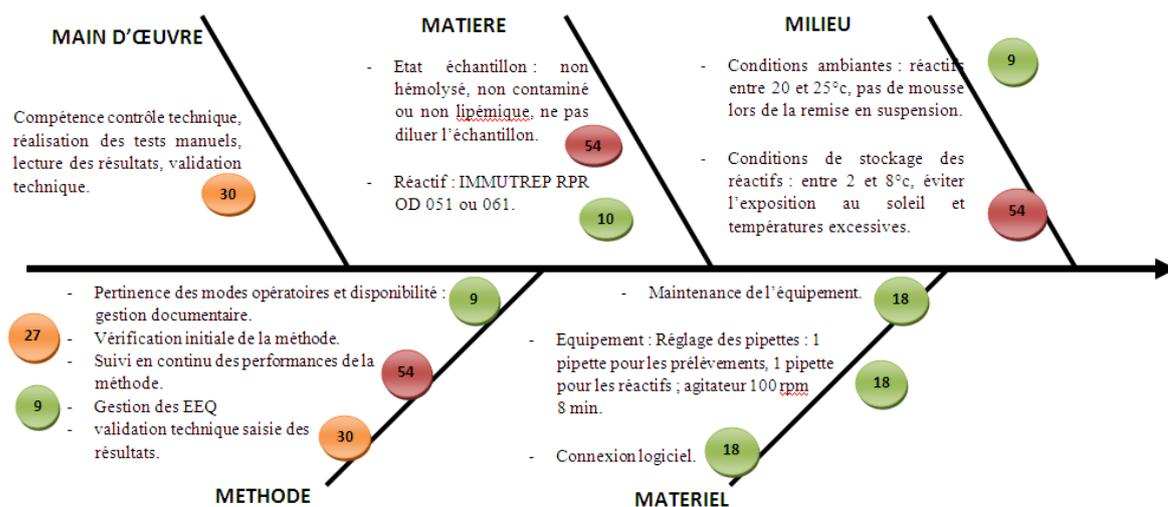
		Réactifs : IMMUTREP RPR OD061 ou OD051	10	1	1	10	contrôle des lots
	Milieu	Conditions ambiantes : réactifs entre 20 et 25°C, pas de mousse lors de la remise en suspension	3	3	1	9	Sonde de température
		Conditions de stockage des réactifs : entre 2 et 8°C, éviter l'exposition au soleil et températures excessives	6	3	3	54	Sonde de température
	Méthode	Pertinence des modes opératoires et disponibilité : gestion documentaire	3	1	3	9	Maitrise du système documentaire, MO SER 032, Kalilab
		Vérification initiale de la méthode	3	3	3	27	Dossier de vérification de méthodes
		Suivi en continu des performances de la méthode	6	3	3	54	Rythme de passage des CQI : à chaque changement de lot ou de technicienne MO SER 032
		Gestion des EEQ	3	1	3	9	Abonnement CTCB
		validation technique saisie des résultats	10	3	1	30	Critère de validation technique
		Matériel	Maintenance de l'équipement	6	1	3	18

		Equipement : Réglage des pipettes : 1 pipette pour les prélèvements, 1 pipette pour les réactifs ; agitateur 100 rpm 8 min	6	1	3	18	Maintenance, contrôles
		Connexion logiciel	6	3	1	18	Tests connexion PGP, SIL

(2) Etude :

Les risques les plus importants pour la phase analytique concernent l'échantillon, le stockage des réactifs et le suivi en continu des performances de la méthode. Il faut donc mettre en place des modalités de maîtrise fiables, rapidement. C'est pourquoi nous avons choisi de réaliser les tests suivants : spécificité, robustesse, stabilité après ouverture ; ce qui est un moyen de maîtriser les risques. En effet, si le VDRL est performant (par exemple, l'état de l'échantillon n'influence pas le résultat), le risque aura une probabilité plus faible de survenue.

D'autres risques sont à prendre en compte comme par exemple, les compétences du personnel ou la validation technique. Il faudra donc évaluer périodiquement les personnes exécutant ce test de diagnostic afin de s'assurer qu'elles possèdent toujours les compétences.



c) Phase post-analytique :

(1) Résultats :

ETAPE	5M	Points critiques à maîtriser	Grav	Fréq	Detec	Ind. Crit.	Modalités de maîtrise
Validation	Main d'œuvre	Validation des résultats	10	1	3	30	Procédure de validation biologique des sérologies : PO VAL 001, PO VAL 002, formation continue
	Matière	Feuille de résultats	10	1	3	30	
	Méthode	Logiciels : validation et transfert des résultats	6	3	3	54	Maitrise des logiciels
	Matériel	Equipement : ordinateur, connexion logiciel	3	6	1	18	Connexion PGP, SIL, test connexion après changement de version logiciel

							ou créations de nouveaux tests
--	--	--	--	--	--	--	--------------------------------

ETAPE	5M	Points critiques à maîtriser	Grav	Fréq	Detec	Ind. Crit.	Modalités de maîtrise
Conservation des prélèvements	Main d'œuvre	Gestion des sérothèques	1	3	1	3	Habilitation
	Matière	Prélèvements : Sérums positifs et LCR	1	1	1	1	Conditions de conservation post analytique
	Milieu	Conditions de stockage des prélèvements : tous les prélèvements sont conservés 1 an à -20°C, prélèvements positifs 5 ans.	3	1	1	3	Suivi des t°, dates
	Méthode	Congélation des prélèvements positifs	1	1	1	1	MO congélation
	Matériel	Congélateur : panne du congélateur ou panne d'électricité	6	1	1	6	Maintenance, circuit électrique de secours

ETAPE	5M	Points critiques à maîtriser	Grav	Fréq	Détec	Ind. Crit.	Modalités de maîtrise
Elimination des déchets	Main d'œuvre	Personnel compétent	10	1	6	60	Formation élimination des déchets et DASRI
	Matière	Prélèvements négatifs, plaques de microtitration utilisées, embouts pipettes	6	3	3	54	MO gestion des déchets : MO DEC 001
	Méthode	Procédure	3	3	6	54	MO gestion des déchets : MO DEC 001
	Matériel	DASRI : poubelles, sacs poubelles	6	3	1	18	MO gestion des déchets : MO DEC 001

(2) Etude :

Voir II. *Matériels et méthodes*, B. *TPHA*, 1. *Analyse de risques*, c) *phase post-analytique*, 2) *étude*.

2. Tests réalisés :

a) Contamination inter-échantillon :

Trois échantillons positifs et trois échantillons négatifs ont été testés successivement. Le témoin positif du coffret Immutrep RPR a été choisi comme échantillon positif et un sérum négatif comme échantillon négatif

b) Spécificité :

Nous avons testé 10 sérums positifs à la maladie de Lyme et 10 sérums positifs à la leptospirose afin de vérifier si le test ne se positive pas en présence d'autres anticorps. En effet, ces deux maladies sont dues à des agents appartenant à la même famille que *Treponema pallidum*, les spirochètes, ce qui peut provoquer des réactions croisées.

c) Stabilité des réactifs :

L'évaluation de la stabilité des réactifs pour le VDRL est semblable à celle pour le TPHA. Nous avons testé les réactifs à l'ouverture du coffret et à la fin de son utilisation en nous basant sur les valeurs données par le contrôle positif et en les comparant. Celles-ci doivent avoir moins d'une dilution d'écart.

d) Robustesse :

Nous avons évalué si le temps et la température de conservation des échantillons influençaient le VDRL. Nous avons donc comparé les résultats de sérums avant et après une semaine entre 2 et 8°C, 6 semaines, 6 mois et un an à -20°C. Si le test est robuste, les résultats ne doivent pas différer de plus d'une dilution.

III. Résultats :

A. TPHA :

1. Contamination inter-échantillon :

Les résultats sont conformes aux exigences. En effet, on ne remarque pas de contamination inter échantillon (*Fig. 12*). L'échantillon négatif reste négatif malgré la présence du témoin positif à ses côtés.

CONTAMINATION INTER ECHANTILLON

fait le 13/11/2012

par : L. BERNIAUD, C. LACOUR

échantillons :
+ : témoin +
- : sérum négatif

échantillon	TPHA
+	+
-	-
+	+
-	-
+	+
-	-
témoin +	+
n° de lot	7036001
date de péremption	janv-14

CONCLUSION : CONFORME

Figure 12 : Contamination inter échantillon TPHA

2. Spécificité :

Les 20 sérums ont tous été négatifs en TPHA. Il n'y a donc pas eu de réactions croisées. Par conséquent, ce test est spécifique (*Fig. 13*).

SPECIFICITE

fait le 13/11/2012

par : L. BERNIAUD, C. LACOUR

échantillons : sérum

LYME

n°	échantillon			TPHA
1	12415065	LYME 9	63	-
2	12422134	LYME 9	64	-
3	12403180	LYME 9	56	-
4	12411091	LYME 9	57	-
5	12393079	LYME 9	47	-
6	12372080	LYME 9	31	-
7	12344029	LYME 9	15	-
8	12231102	LYME 8	40	-
9	12215085	LYME 8	31	-
10		LYME 8	25	-
tém oin +				2560
numéro de lot				7036001
date de péremption				janv-14

CONCLUSION : CONFORME

LEPTO

n°	échantillon			TPHA
1	12055075	LEPTO 1	19	-
2	12053148	LEPTO 1	18	-
3	11413052	LEPTO 1	17	-
4	11364031	LEPTO 1	16	-
5	11251025	LEPTO 1	15	-
6	10332076	LEPTO 1	12	-
7	10323066	LEPTO 1	11	-
8	10181041	LEPTO 1	9	-
9	10031035	LEPTO 1	4	-
10	9203031	LEPTO 1	3	-
tém oin +				2560
numéro de lot				7036001
date de péremption				janv-14

CONCLUSION : CONFORME

Figure 13 : Spécificité TPHA

3. Stabilité des réactifs :

Nous avons pu constater que les valeurs du contrôle positif étaient les mêmes (titre = 2560) à l'ouverture du coffret et à la fin de son utilisation. Par conséquent, les réactifs sont stables durant toute la durée d'utilisation du coffret (*Fig. 14*).

TPHA			
Par : Laurence BERNIAUD et Béatrice CHARTON			
Lot : 7037885			
Date de péremption : 06/2014			
Date d'ouverture du coffret :	18/02/2013	Titre :	2560
Date de fin du coffret :	21/02/2013	Titre :	2560
CONCLUSION :		CONFORME	

Figure 14 : Stabilité des réactifs TPHA

4. Robustesse :

On remarque que les résultats des sérums conservés une semaine entre 2 et 8°C ne sont pas significativement différents (moins d'une dilution d'écart) de ceux trouvés à J0. De même, les résultats des sérums conservés à -20°C depuis 6 semaines, 6 mois ne sont pas significativement différents des résultats d'origine. En revanche, les résultats sont significativement différents pour les échantillons conservés pendant 1 an à -20°C. En effet, nous avons utilisé le coefficient de Pearson afin de savoir si les deux valeurs étaient corrélées ou non. En posant comme hypothèse H0 : les valeurs ne sont pas corrélées, nous obtenons une $p_{\text{value}} = 0,68$; donc supérieur au risque 0,05 et $\rho = -0,25$ avec un intervalle de confiance à 95% de $[-0,9278 ; 0,8108]$. ρ appartient à l'intervalle, nous pouvons donc accepter H0 au risque de 5%. Cependant, un nombre faible d'échantillons ($n = 5$) a été testé. Par conséquent, nous ne pouvons pas conclure, la

méthode n'est pas validée pour une conservation d'un an mais le TPHA est validé si la conservation des échantillons n'excède pas 6 mois (*Fig. 15*).

ROBUSTESSE

prélèvements après une semaine à 4°C

fait le 19/11/2012

par : L. BERNIAUD, C. LACOUR

échantillons : sérum

n°	échantillon	TPHA	
		J0	J7
1	12461063	1280	1280
2	12462019	2560	2560
3	12462079	5120	5120
4	12462082	640	320
5	12462128	640	320
témoin +			5120
numéro de lot			7036001
date de péremption			janv-14

prélèvements après 6 semaines à -20°C

fait le 22/11/2012

par : L. BERNIAUD, C. LACOUR

échantillons : sérum

n°	échantillon			TPHA	
				S0	S6
1	12401039	SYP 9	67	640	1280
2	12403015	SYP 9	68	10240	10240
3	12412042	SYP 9	69	5120	5120
4	12412155	SYP 9	70	10240	10240
5	12411094	SYP 9	71	< 80	< 80
6	12414076	SYP 9	72	5120	2560
7	12414081	SYP 9	73	1280	640
8	12415052	SYP 9	74	640	640
9	12421063	SYP 9	75	1280	640
10	12423012	SYP 9	76	1280	640
Témoin +					5120
numéro de lot					7036001
date de péremption					janv-14

prélèvements après 6 mois à -20°C

fait le 23/11/2012

par : L. BERNIAUD, C. LACOUR

échantillons : sérum

n°	échantillon			TPHA	
				M0	M6
1	12171095	SYP9		< 80	320
2	12183093	SYP9	24	> 20480	> 20480
3	12183102	SYP9	25	> 20480	10240
4	12185025	SYP9	26	1280	640
5	12191004	SYP9	27	1280	1280
6	12193120	SYP9	28	1280	1280
7	12202167	SYP9	29	1280	1280
8	12203059	SYP9	30	80	80
9	12223056	SYP9	31	160	< 80
10	12223166	SYP9	32	> 20480	ininterprétable
Témoin +					5120
numéro de lot					7036001
date de péremption					janv-14

prélèvements de 2011, 1 an à -20°C

fait le 16/11/2012

par : L. BERNIAUD, C. LACOUR

échantillons : sérum

n°	échantillon			2011	2012
				TPHA	TPHA
1	11453049	SYP 8	32	10240	5120
2	11461034	SYP 8	34	2560	5120
3	11494054	SYP 8	37	2560	ininterprétable
4	11495018	SYP 8	38	20480	5120
5	11502033	SYP 8	39	1280	2560
témoin +					2560
numéro de lot					7036001
date de péremption					janv-14

Figure 15 : Robustesse TPHA

B. VDRL :

1. Contamination inter-échantillon :

Les résultats sont conformes aux exigences, on ne remarque pas de contamination inter échantillon (Fig. 16). Les résultats de l'échantillon négatif restent négatifs et les résultats du témoin positif restent positifs.

CONTAMINATION INTER ECHANTILLON

fait le 13/11/2012

par : L. BERNIAUD, C. LACOUR

échantillons : + : témoin +
- : sérum négatif

échantillon	VDRL
+	+
-	-
+	+
-	-
+	+
-	-
témoin +	+
n° de lot	7036787
date de péremption	nov-14

CONCLUSION : CONFORME

Figure 16 : Contamination inter échantillon VDRL

2. Spécificité :

Les 20 sérums ont tous été négatifs en VDRL. On n'a observé aucune réaction croisée. Ce test est donc spécifique (*Fig. 17*).

SPECIFICITE

fait le 13/11/2012

par : L. BERNIAUD, C. LACOUR

échantillons : sérum

LYME

n°	échantillon			VDRL
1	12415065	LYME 9	63	-
2	12422134	LYME 9	64	-
3	12403180	LYME 9	56	-
4	12411091	LYME 9	57	-
5	12393079	LYME 9	47	-
6	12372080	LYME 9	31	-
7	12344029	LYME 9	15	-
8	12231102	LYME 8	40	-
9	12215085	LYME 8	31	-
10		LYME 8	25	-
témoin +				+
numéro de lot				7036787
date de péremption				nov-14

CONCLUSION : CONFORME

LEPTO

n°	échantillon			VDRL
1	12055075	LEPTO 1	19	-
2	12053148	LEPTO 1	18	-
3	11413052	LEPTO 1	17	-
4	11364031	LEPTO 1	16	-
5	11251025	LEPTO 1	15	-
6	10332076	LEPTO 1	12	-
7	10323066	LEPTO 1	11	-
8	10181041	LEPTO 1	9	-
9	10031035	LEPTO 1	4	-
10	9203031	LEPTO 1	3	-
témoin +				+
numéro de lot				7036787
date de péremption				nov-14

CONCLUSION : CONFORME

Figure 17 : Spécificité VDRL

3. Stabilité des réactifs :

Le titre du témoin positif est le même (titre = 2) à l'ouverture du coffret et à la fin de son utilisation. Les réactifs sont donc stables durant l'utilisation du coffret (Fig. 18).

VDRL			
Par :		Laurence BERNIAUD	
Lot : 7038191			
Date de péremption : 01/2015			
Date d'ouverture du coffret :	12/02/2013	Titre :	2
Date de fin du coffret :	19/02/2013	Titre :	2
CONCLUSION :		CONFORME	

Figure 18 : Stabilité des réactifs VDRL

4. Robustesse :

On remarque que les résultats des sérums conservés une semaine entre 2 et 8°C ne sont pas significativement différents (moins d'une dilution d'écart) de ceux trouvés à J0. De même, les résultats des sérums conservés à -20°C depuis 6 semaines, 6 mois ne sont pas significativement différents des résultats d'origine. En revanche, les résultats sont significativement différents pour les échantillons conservés pendant 1 an à -20°C. En effet, nous avons utilisé le coefficient de Pearson afin de savoir si les deux valeurs étaient corrélées ou non. En posant comme hypothèse H0 : pas de corrélation entre les variables, nous obtenons une $p_{\text{value}} = 0,95$; donc supérieur au risque 0,05 et $p = 0,0383$ avec un intervalle de confiance à 95% de $[-0,8735 ; 0,8905]$. p appartient à l'intervalle, nous pouvons donc accepter H0 au risque de 5%. Cependant, un nombre faible d'échantillons ($n = 5$) a été testé. Par conséquent, nous ne pouvons pas conclure, la méthode n'est pas validée pour une conservation d'un an mais le VDRL est validé si la conservation des échantillons n'excède pas 6 mois (Fig. 19).

ROBUSTESSE

prélèvements après une semaine à 4°C

fait le 19/11/2012

par : L. BERNIAUD, C. LACOUR

échantillons : sérum

n°	échantillon	VDRL	
		J0	J7
1	12461063	4	8
2	12462019	8	8
3	12462079	2	2
4	12462082	2	2
5	12462128	1	1
témoin +			2
numéro de lot			7036787
date de péremption			nov-14

prélèvements après 6 semaines à -20°C

fait le 22/11/2012

par : L. BERNIAUD, C. LACOUR

échantillons : sérum

n°	échantillon			VDRL	
				S0	S6
1	12401039	SYP 9	67	32	32
2	12403015	SYP 9	68	32	32
3	12412042	SYP 9	69	-	1
4	12412155	SYP 9	70	16	16
5	12411094	SYP 9	71	4	8
6	12414076	SYP 9	72	32	32
7	12414081	SYP 9	73	32	16
8	12415052	SYP 9	74	32	32
9	12421063	SYP 9	75	32	32
10	12423012	SYP 9	76	8	16
Témoin +					2
numéro de lot					7036787
date de péremption					nov-14

prélèvements après 6 mois à -20°C

fait le 23/11/2012

par : L. BERNIAUD, C. LACOUR

échantillons : sérum

n°	échantillon			VDRL	
				M0	M6
1	12171095	SYP9		-	-
2	12183093	SYP9	24	256	256
3	12183102	SYP9	25	16	32
4	12185025	SYP9	26	32	32
5	12191004	SYP9	27	4	8
6	12193120	SYP9	28	1	1
7	12202167	SYP9	29	4	4
8	12203059	SYP9	30	4	8
9	12223056	SYP9	31	2	2
10	12223166	SYP9	32	256	256
Témoin +					2
numéro de lot					7036787
date de péremption					nov-14

prélèvements de 2011, 1 an à -20°C

fait le 16/11/2012

par : L. BERNIAUD, C. LACOUR

échantillons : sérum

n°	échantillon			2011	2012
				VDRL	VDRL
1	11453049	SYP 8	32	32	32
2	11461034	SYP 8	34	64	64
3	11494054	SYP 8	37	16	128
4	11495018	SYP 8	38	1024	64
5	11502033	SYP 8	39	16	16
témoin +					2
numéro de lot					7036787
date de péremption					nov-14

Figure 19 : Robustesse VDRL

IV. Discussion :

A. Choix des vérifications expérimentales :

Ces vérifications expérimentales (contamination inter échantillons, spécificité analytique, stabilité des réactifs après ouverture, robustesse) ont été choisies tout d'abord par le type du dossier de validation (qualitatif) et par le type de portée⁸. En effet, en portée flexible A, seule la contamination inter échantillon est à tester, après avoir réalisé une étude bibliographique. Un test de comparaison de méthodes peut être effectué s'il existe une méthode de référence dans le laboratoire.

Nous avons choisi de tester en plus, la spécificité analytique, la stabilité des réactifs après ouverture et la robustesse. Ces tests sont facultatifs mais ils ont été réalisés en fonction des résultats de l'analyse de risques. En effet, les indices de criticité de plusieurs paramètres concernant surtout les réactifs, étaient élevés. Ils présentaient donc un risque important d'erreurs, rendant ces examens (TPHA, VDRL) moins fiables. Il était donc pertinent de réaliser des tests supplémentaires afin d'avoir un dossier le plus complet possible.

B. Cas des liquides céphalorachidiens :

Comme on l'a vu précédemment, la syphilis peut se compliquer en neurosyphilis qu'il est très important de détecter rapidement. L'agent pathogène se retrouve donc présent dans le liquide céphalo-rachidien dans cette phase de la maladie. C'est pourquoi, le laboratoire de bactériologie du centre de biologie nord de Lyon, reçoit très fréquemment des échantillons de LCR à tester. Cependant, seule l'utilisation de sérums a été évaluée par le fabricant de ces réactifs, la société Omega Diagnostic.

Il est donc nécessaire et impératif de valider ces deux méthodes pour les échantillons de LCR afin de s'assurer qu'elles soient fiables et efficaces.

Il faudra donc effectuer une validation de méthode de portée flexible B sur les échantillons de LCR. La portée flexible B porte sur une méthode que le laboratoire a adaptée selon ses besoins et qui n'a donc pas été évaluée chez le fournisseur.

C. Comparaison de méthodes :

Parmi les 60 sérums testés, 58 montrent des résultats cohérents et concordants, 2 échantillons sont discordants :

- N°23 : SYPIE = 1,21 (positif), TPHA et VDRL négatifs.
- N°44 : SYPIE = 2,97 (positif), TPHA et VDRL négatifs.

En effet, ils apparaissent positifs par la méthode réalisée par l'Architect et négatifs en TPHA et VDRL. Or, on peut remarquer que les valeurs données par l'automate sont proches de la limite de positivité (limite = 1) ce qui peut expliquer cette discordance. Il faudrait réaliser des examens approfondis (western blot) sur ces échantillons pour connaître quelle méthode a été la plus sensible.

En revanche, tous les résultats du TPHA et du VDRL sont concordants. On peut donc conclure que ces deux techniques sont comparables.

L'Architect permet de réaliser un screening car c'est un automate de meilleure sensibilité et spécificité que le TPHA et le VDRL. Les échantillons positifs sont alors testés par un test tréponémique et un test non tréponémique selon la réglementation en vigueur. Le laboratoire de bactériologie a choisi le TPHA et le VDRL car ce sont deux méthodes de diagnostic faciles d'utilisation, rapides et de faible coût. De plus, ils présentent une bonne sensibilité et une bonne spécificité.

D'autre part, on remarque que ces deux tests n'entraînent pas de risques critiques lors de leur utilisation. En effet, ils ne requièrent pas une formation très pointue du personnel ou du matériel précieux.

D. Bilan :

L'établissement du dossier de validation s'est dans l'ensemble bien déroulé dans le laboratoire. Le personnel s'est montré patient et intéressé à sa réalisation, en participant notamment à la rédaction de l'analyse de risques.

Les vérifications expérimentales se sont déroulées en parallèle de l'activité de routine du laboratoire, dans un temps relativement court. Elles ont donné des résultats conformes aux attentes ce qui permet de valider les deux techniques (TPHA, VDRL).

Malgré un coût pour le laboratoire, il est important de réaliser ces dossiers de validation, en dehors du cadre obligatoire de la norme, pour assurer une sécurité vis-à-vis du patient et une garantie de fiabilité et de qualité de diagnostic. En revanche, ces méthodes doivent être réévaluées périodiquement en actualisant les données, l'analyse de risques, en réalisant d'autres tests si nécessaires, en mettant à jour les procédures ou en réévaluant le personnel afin de garantir cette qualité de diagnostic dans le temps et d'éviter les dérives qui pourraient conduire à l'apparition d'écarts lors d'audits.

Ces validations de méthode ont mobilisé 3 personnes : un biologiste responsable, une technicienne qui me supervisait lors des manipulations ; pendant 70h (35h pour l'analyse de risque, 35h pour la réalisation des expérimentations).

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : Mlle LACOUR céleste

La syphilis est une maladie sexuellement transmissible, due au tréponème pâle, en pleine recrudescence depuis les années 2000. Par conséquent, elle représente une activité majeure pour le laboratoire avec une centaine de sérums par jour à analyser. Elle reste pourtant une infection simple à traiter et à diagnostiquer. En effet, le TPHA et le VDRL sont deux tests de diagnostic sérologique, simples à réaliser et rapides. De plus, le VDRL constitue un excellent marqueur dans le suivi du traitement et de la guérison.

Dans le cadre de l'accréditation du laboratoire, suite à la loi HPST, nous avons établi le dossier de vérification du TPHA et celui du VDRL dans le diagnostic de la syphilis, selon le SH FORM 44 (*annexes VIII et IX*) et les recommandations du SH GTA 04. Après avoir effectué une étude bibliographique en nous basant sur les données des fournisseurs et de la littérature, nous avons établi une analyse de risque reprenant les 3 phases que subit un prélèvement : pré-analytique, analytique et post-analytique. Puis, nous avons testé différents paramètres : la contamination inter échantillon, la spécificité, la stabilité des réactifs et la robustesse. Nous avons choisi ces vérifications en nous basant sur les valeurs des indices de criticité des différents items de l'analyse de risque. En conclusion, nous avons pu montrer que ces deux techniques étaient conformes aux spécifications et aux exigences.

Par ailleurs, le dossier de validation du TPHA et du VDRL n'a été réalisé que pour des échantillons de sérums. Or le laboratoire effectue ces deux tests également sur des échantillons de LCR. Nous n'avons retrouvé aucune donnée sur ce type de prélèvement dans les études effectuées par le fournisseur. Il faudra donc valider ces techniques pour les LCR. Le dossier de validation sera alors en portée B puisqu'il s'agit d'une méthode adaptée par le laboratoire.

La validation de méthode permet de s'assurer que celle-ci est fiable et reproductible. C'est un réel avantage pour le laboratoire car cela lui permet de fournir des résultats les plus justes possibles et donc, d'avoir un diagnostic exact. Par conséquence, c'est un véritable bénéfice pour le patient car il profitera d'une prise en charge plus adéquate et d'un traitement approprié.

Le Président de la thèse,
Nom : Pr Joëlle Goudable

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le **28 MAI 2013**
Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

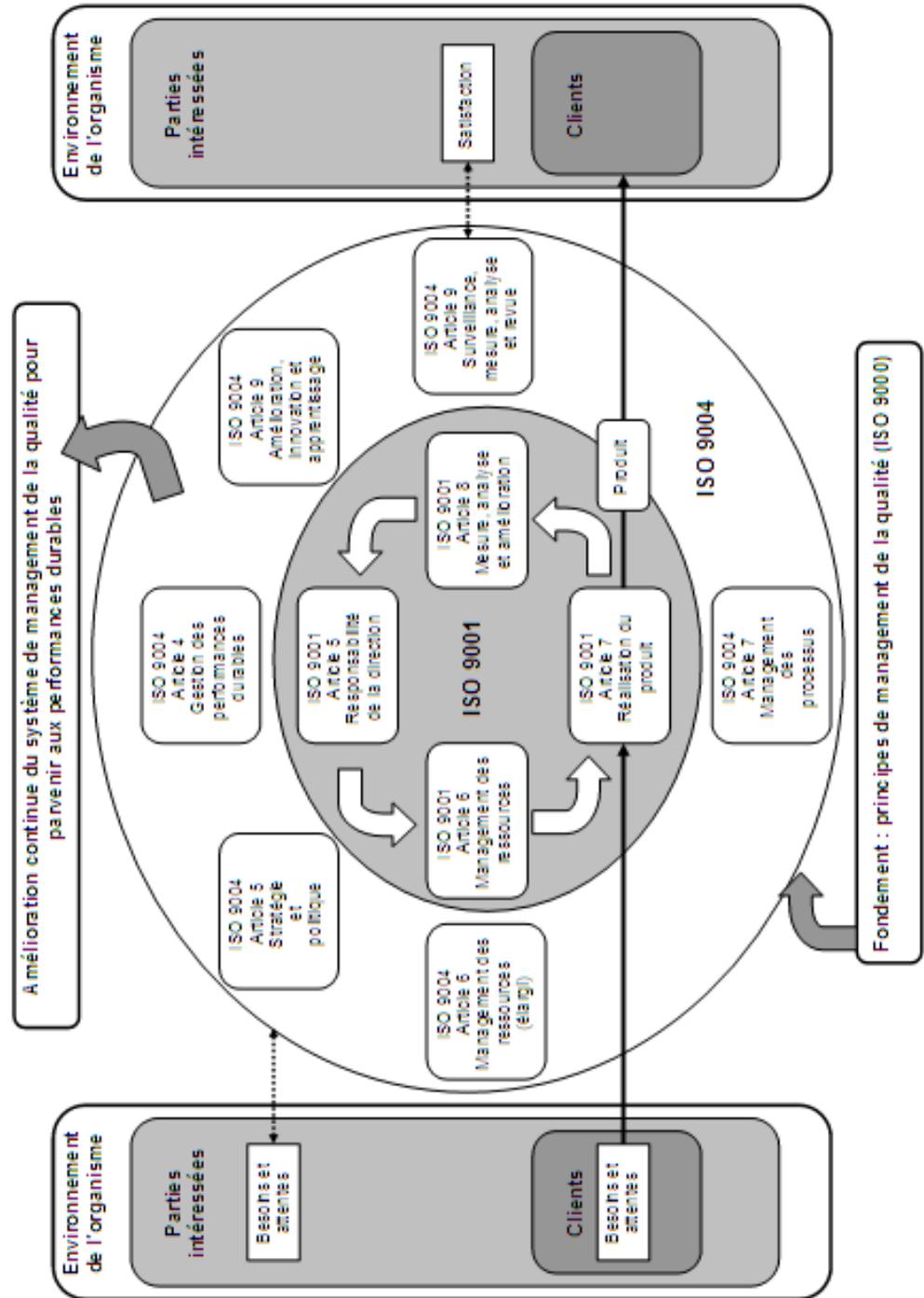
Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,



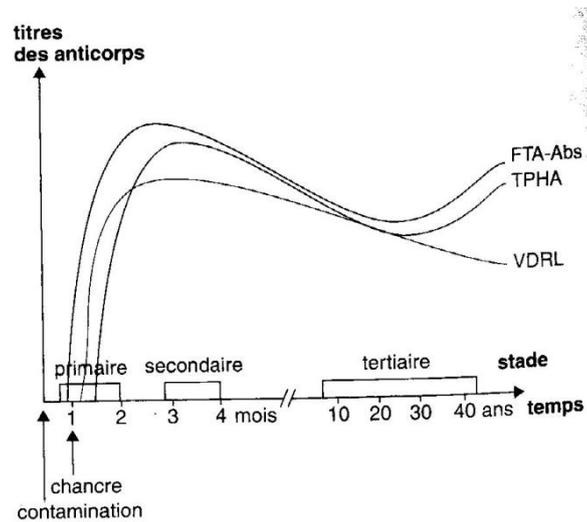
Professeure C. VINCIGUERRA

ANNEXES

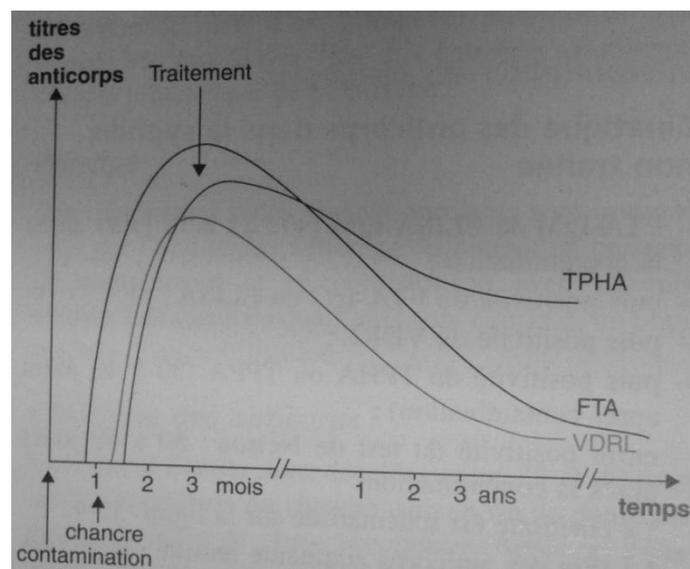
Annexe I : Modèle élargi d'un système de management de la qualité fondé sur les processus. Système de management de la qualité, lignes directrices pour l'amélioration des performances. Norme ISO 9004.



Annexe II : Cinétique des anticorps d'une syphilis non traitée et traitée.



Cinétique des anticorps d'une syphilis non traitée



Evolution des titres d'anticorps d'une syphilis traitée

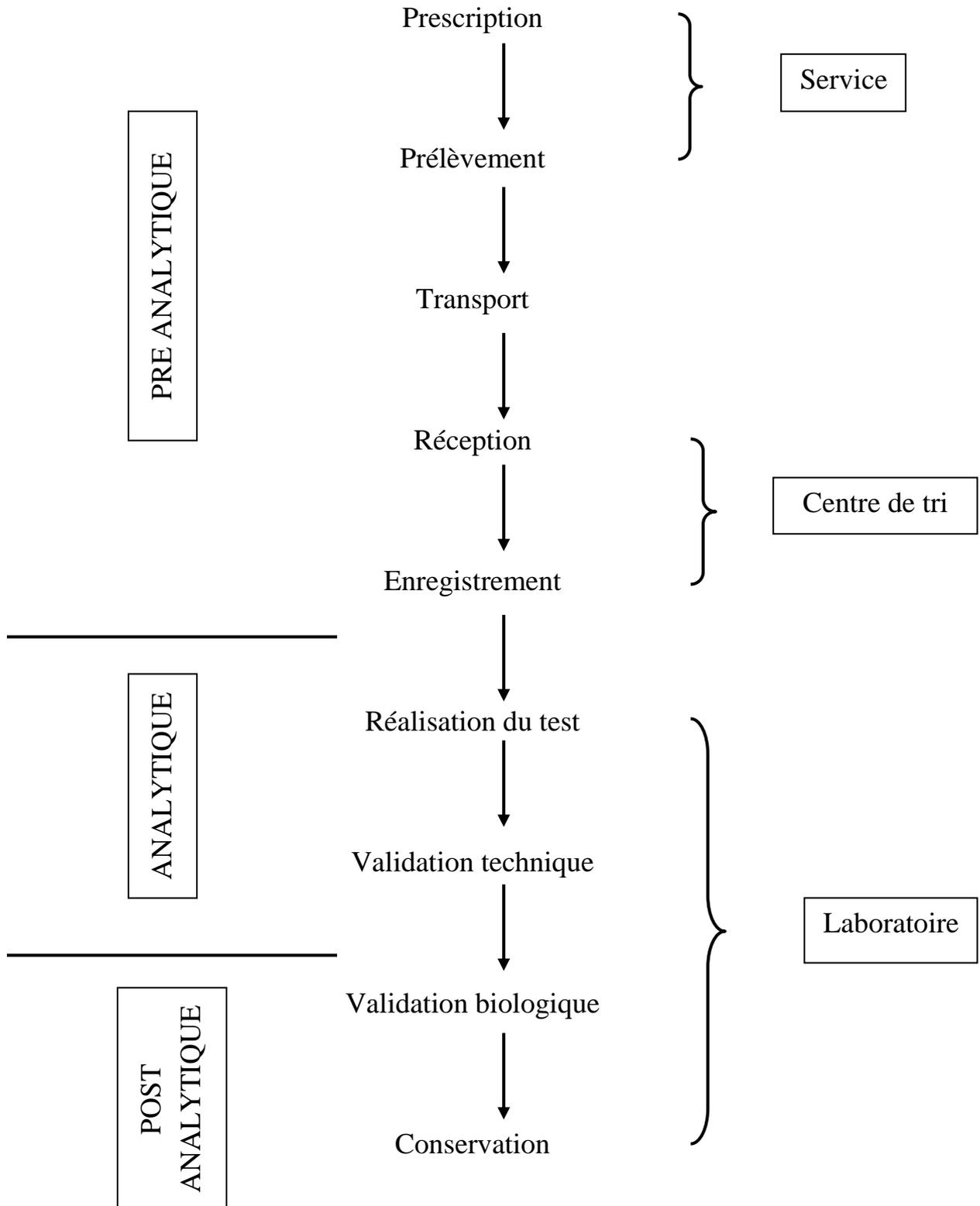
Annexe III : Comparaison des différents outils de diagnostic.

TABLEAU 37-4-1

	Tests de dépistage					Tests complémentaires			Nouveaux tests diagnostiques	
	VDRL-RPR	TPHA/TPPA	FTA-Abs	ELISA	IgM			Nelson (n'est plus pratique)	Tests « rapides »	Western-blot ou Dot-blot
					FTA-IgM	SPHA	ELISA			
Nature de l'antigène	Suspension lipidique	Hématies sensibilisées avec lysat de <i>T. pallidum</i>	<i>T. pallidum</i> entiers fixés sur une lame	Lysat de <i>T. pallidum</i> ou protéines recombinantes	<i>T. pallidum</i> entiers fixés sur une lame	Hématies sensibilisées avec lysat <i>T. pallidum</i>	Lysat de <i>T. pallidum</i> recombinantes	<i>T. pallidum</i> vivants	Protéines recombinantes (P15, P17, TmpA, P47 kDa)	Lysat de <i>T. pallidum</i> ou protéines recombinantes
Intérêts	<ul style="list-style-type: none"> Simple Rapide Peu coûteux Suivi du traitement 	<ul style="list-style-type: none"> Spécifique Simple Peu coûteux Adaptable à de grandes ou petites séries 	<ul style="list-style-type: none"> Spécifique Sensible 	<ul style="list-style-type: none"> Simple Spécifique Sensible Automatisable, applicable à de grandes séries 	<ul style="list-style-type: none"> Précoce Sensible Spécifique Marqueur syphilitique active Suivi thérapeutique Syphilis congénitale 			Spécificité 100 %	<ul style="list-style-type: none"> Test unitaire au « coup par coup » 	<ul style="list-style-type: none"> Confirmation Diagnostic syphilitique congénitale (IgM spécifiques) * Marqueur d'évolutivité ?
Limites	<ul style="list-style-type: none"> Faux positifs : infections bactériennes, virales, MAI, etc. Faux négatifs (phénomène de zone) 	<ul style="list-style-type: none"> Peu influencé par traitement Faux négatifs : phénomène de zone Faux positifs : autres tréponématoses 	<ul style="list-style-type: none"> Lecture délicate Peu influencé par traitement Faux positifs : MAI, autres tréponématoses 	<ul style="list-style-type: none"> Tests qualitatifs Coût Peu influencé par traitement Faux positifs : autres tréponématoses 	<ul style="list-style-type: none"> Lecture délicate Faux positifs : MAI 	<ul style="list-style-type: none"> Réalisation et lecture opérateur-dépendants 	Coût	<ul style="list-style-type: none"> Entretien souche vivante Standardisation Coût 	<ul style="list-style-type: none"> Tests qualitatifs Stabilité à température ambiante Performance variable 	<ul style="list-style-type: none"> Coût Faux positifs : autres tréponématoses

MAI : Maladie auto-immune.

Annexe IV : Rappel sur le cheminement d'un échantillon sanguin.



Annexe V : Notice d'utilisation du kit Immutrep TPHA OD071.

IMMUTREP® TPHA Ref OD211/OD071/OD081

Test d'hémagglutination pour la détermination d'anticorps spécifiques de *Treponema pallidum*

Conserver à +2..8°C. NE PAS CONGELER.
Pour diagnostic *in vitro* uniquement.

INTRODUCTION ET UTILISATION

La syphilis est une maladie sexuellement transmissible. L'agent pathogène, *Treponema pallidum*, ne peut pas être cultivé sur des milieux de culture courants. Le diagnostic de l'infection est généralement fait par la détection des anticorps de *T. pallidum* dans le sérum ou le LCR des patients.

Les anticorps sont détectables vers la 2^{ème} ou 4^{ème} semaine après exposition, et peuvent être détectés pendant une longue période après le traitement. Deux types d'anticorps sont présents: les anticorps réagissant avec les antigènes non treponémiques, utilisés dans les tests VDRL/Antigène Charbon et les tests RPR, et ceux réagissant avec les antigènes spécifiques de *T. pallidum*. Les anticorps spécifiques des antigènes non treponémiques sont retrouvés lors de la phase active et leur niveau s'élève après un traitement réussi. Les anticorps spécifiques persistent longtemps après un traitement réussi. Il est nécessaire de tester les deux types d'anticorps car les anticorps non treponémiques peuvent apparaître au cours d'autres infections que la syphilis.

IMMUTREP TPHA est un test d'hémagglutination passive spécifique et sensible pour la détection des anticorps spécifiques de *Treponema pallidum* dans le sérum ou le LCR.

Pour usage professionnel uniquement.

PRINCIPE DU TEST

IMMUTREP TPHA est composé d'hématies d'oiseaux formolées sensibilisées par *T. pallidum*, d'hématies formolées non sensibilisées, d'un tampon de dilution et de contrôles. Le mélange des échantillons positif dilués avec les hématies provoque une agglutination des cellules grâce aux anticorps spécifiques. Les hématies agglutinées présentent un profil caractéristique dans le fond du puits de microtitration. En absence d'anticorps, les hématies forment un culot en forme de bouton dans le puits.

Ce réactif a été calibré avec le sérum de référence de FOMS pour le sérodiagnostic des infections à treponèmes Ref 3-1930 +/- une dilution au 1/2 pour garantir une sensibilité correcte.

COMPOSITION



Test **Calis** 8.5ml 2x8.5 ml 56ml+32ml
Hématies Tests de volatiles stabilisées recouvertes d'antigène *T. Pallidum* (approx 0.38% w/v) dans un tampon. Prêt à l'emploi.

Control **Calis** 8.5ml 2x8.5ml 56ml+32ml
Hématies Contrôles de volatiles stabilisées (approx 0.38% w/v) dans un tampon. Prêt à l'emploi.

DIL 20ml 2X20ml 4 x 50ml
Tampon de dilution. Sérum de lapin (approx 0.4%) dans un tampon. Prêt à l'emploi.

Control **+** 1ml 1ml 11ml
Contrôle positif. Sérum prédilué (1:20) dans un tampon contenant des anticorps anti-*T. pallidum*. Prêt à l'emploi.

Control **-** 1ml 1ml 11ml
Contrôle négatif. Sérum prédilué (1:20) dans un tampon sans anticorps anti-*T. pallidum*. Prêt à l'emploi.

COMPTE-GOUTTES 2 2 0

NOTICE 1 1 1

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

Les plaques de microtitration Elyx M24 à fond en U ou Ureiner 950121 sont recommandées. Complé-gouttes ou micropipettes pouvant délivrer des volumes de 10, 35, 75, 100µl et 100µl.

Note: Les compte-gouttes de 75µl ne sont pas adaptés aux Accus des contrôles de 1000 tests qui n'en contiennent pas.

PRECAUTIONS

Les réactifs IMMUTREP TPHA contiennent des produits d'origine humaine et ont été testés et trouvés négatifs pour la présence d'anticorps anti-HBsAg, anti-HCV et anti-HIV 1 et 2. Cependant, comme aucune méthode ne peut garantir qu'un produit d'origine humaine ne puisse transmettre un agent infectieux, les réactifs doivent être considérés comme potentiellement infectieux, et manipulés et éliminés avec précaution. Ne pas ingérer.

Les réactifs IMMUTREP TPHA ne contiennent pas de substances dangereuses selon les règles définies par la législation anglaise UK Chemical (Hazardous Information and Packaging for Supply). Cependant, tous les réactifs doivent être testés et éliminés comme potentiellement à risque selon la législation en vigueur.

Les réactifs IMMUTREP TPHA contiennent 0.05% d'azote de sodium comme conservateur pouvant être toxique en cas d'ingestion. L'azote de sodium peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre en formant des sels facilement explosifs. Rincer avec beaucoup d'eau lors de l'élimination.

CONSERVATION

Les réactifs doivent être conservés verticalement et à +2..8°C.

Le coffret donnera les résultats attendus jusqu'à la date d'expiration déterminée au moment de la date de production et indiquée sur les réactifs et le coffret. La date d'expiration est le dernier jour du mois indiqué sur les étiquettes. Ne pas utiliser de réactifs après la date d'expiration.

Eviter l'exposition des réactifs à des températures excessives et à la lumière directe du soleil.

NE CONGELER AUCUN DES REACTIFS : cela causerait un dommage irréversible.

COLLECTE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Prélever du sang veineux et laisser le caillot se rétracter. Centrifuger et recueillir le sérum. Utiliser des échantillons de sérum frais.

Il est possible aussi de tester des échantillons de LCR.

Ne pas utiliser des échantillons hématocrités, centrifugés ou lipémiqes au risque de fausser les résultats.

Les échantillons peuvent être conservés à +2..8°C jusqu'à 48 heures avant la réalisation du test. Au-delà de ces 48 heures et jusqu'à 1 an maximum, congeler le prélèvement à -20°C. Les prélèvements décongelés doivent être mélangés avant d'être testés.

Ne pas répéter les cycles congélation-décongélation.

PREPARATION DES REACTIFS

Les réactifs doivent être ramené à température ambiante (20°C à 25°C) et remis totalement en suspension avant utilisation. Ne pas faire de mousse.

Les compte-gouttes sont à utiliser avec les suspensions d'hématies tests et d'hématies contrôles. Ces compte-gouttes distribuent des gouttes de 75µl et doivent être peccés sur leur flacon correspondant :
Compte-goutte rouge - Hématies Tests
Compte-goutte blanc - Hématies Contrôles

LIMITES D'UTILISATION

L'utilisation d'échantillons autres que le sérum ou le LCR n'a pas été validée.

Aucun test d'hémagglutination n'est capable de différencier les anticorps spécifiques d'une infection à *T. pallidum* de ceux dus à des infections par d'autres treponèmes tels que *T. parvum* et *T. carateum*.



Aucune autre interférence n'a été mise en évidence. Les résultats positifs doivent cependant être confirmés, par la technique FTA éventuellement, et contrôlés aux observatoires cliniques.

Un échantillon avec un résultat douteux ou faiblement positif doit être rétesté. Le diagnostic ne doit pas être porté sur un seul résultat et l'interprétation du test doit toujours être faite en rapport avec toutes les autres données cliniques.

Le test peut être négatif au test début d'une syphilis en phase sérique ou lors de la phase tardive d'une syphilis latente. Afin de compléter les résultats obtenus au sérotest, il est recommandé de pratiquer un test VDRL/Charbon ou un test RPR qui permet de détecter des cas de syphilis sérique.

MODE OPERATOIRE

Amener les échantillons et les réactifs à température ambiante et les remettre en suspension avant utilisation. Les échantillons ne nécessitent pas de prétraitement.

DETERMINATION QUALITATIVE (Déplétage)

Chaque test nécessite 4 puits de la microplaque.

1. Déaler dans le tampon dans la microplaque selon le schéma suivant :
 - 25µl dans les rangées 1, 3 & 4 et 100µl dans la rangée 2.
 2. Distribuer 25µl de chaque échantillon dans le puits de la rangée 1.
 - Mélanger et transférer 25µl de la rangée 1 à la rangée 2.
 - Mélanger et transférer 25µl de la rangée 2 à la rangée 3.
 - Mélanger soigneusement et éliminer 25µl de la rangée 3.
 - Transférer 25µl de la rangée 2 à la rangée 4.
 - Mélanger soigneusement et éliminer 25µl de la rangée 4.
 3. Ajouter 75µl d'hématies contrôles bien mélangées dans la rangée 3.
 4. Ajouter 75µl d'hématies tests bien mélangées dans la rangée 4. Tapoter la plaque doucement pour mélanger. La dilution finale dans les rangées 3 et 4 est 1/80.
 5. Couvrir et incuber à température ambiante pendant 45 à 60 minutes (les microplaques peuvent aussi être lissées toute la nuit).
 6. Examiner les profils d'agglutination.
- Note: Les contrôles du cofret sont pré-dilué et doivent être ajoutés directement dans les rangées 3 et 4 (sans tampon de dilution).

PROTOCOLE ALTERNATIF POUR UNE DETERMINATION QUALITATIVE SUR UN PUIT

1. Distribuer 100µl de tampon de dilution dans la rangée 1.
2. Distribuer 10µl d'échantillon dans la rangée 1 et mélanger.
3. Ajouter 15µl de la rangée 1.
4. Transférer 25µl de la rangée 1 à la rangée 2.
5. Ajouter 75µl d'hématies tests bien mélangées dans la rangée 1.
6. Ajouter 75µl d'hématies contrôles bien mélangées dans la rangée 2. Tapoter la plaque doucement pour mélanger. La dilution finale dans les rangées 1 et 2 est 1/80.
7. Couvrir et incuber à température ambiante pendant 45 à 60 minutes (les microplaques peuvent aussi être lissées toute la nuit).
8. Examiner les profils d'agglutination.

DETERMINATION QUANTITATIVE

Si les échantillons trouvés positifs sont systématiquement quantifiés, il est possible d'obtenir les hématies contrôles lors de la phase de déplétage et de préparer une seule dilution finale. La plupart des échantillons seront négatifs ou faiblement positifs, et les hématies contrôles peuvent être utilisés lors de la détermination quantitative décrite ci-dessous.

1. Préparer les dilutions dans une plaque de microtitration comme suit :
 - Pour chaque échantillon, distribuer 25µl de tampon de dilution dans chaque puits d'une colonne. Pour la dilution des contrôles, commencer la distribution à partir de la rangée 3.
 - Transférer 25µl de la rangée 2 de la plaque de déplétage dans la rangée 1 de la plaque de quantification.
 - Mélanger et éliminer 25µl.
 - Transférer 25µl de la rangée 2 de la plaque de déplétage dans la rangée 2 de la plaque de quantification.
 - Transférer 25µl en dilution sérielle de deux en deux de la rangée 2 à la rangée 3 (pas de dilutions sérielles des contrôles commençant à partir de la rangée 3).
 - Ajouter 75µl d'hématies contrôles bien mélangées dans la rangée 1.
 - Ajouter 75µl d'hématies tests bien mélangées de la rangée 2 à la rangée 3.
 2. Tapoter la plaque doucement pour mélanger. La dilution finale dans les rangées 1 et 2 est 1/80.
 3. Couvrir et incuber à température ambiante pendant 45 à 60 minutes (les microplaques peuvent aussi être lissées toute la nuit).
 4. Examiner les profils d'agglutination.
- Note: Les contrôles du cofret sont pré-dilué et 25µl doivent être ajoutés directement dans les rangées 1, 2 et 3 en commençant les dilutions sérielles à partir de la rangée 3 (sans tampon de dilution dans les rangées 1 ou 2).

RESULTATS ET INTERPRETATION

Les contrôles du cofret ou des dilutions de valeur connue doivent être testés lors de chaque essai. Le contrôle négatif du cofret doit donner un résultat négatif après 45 minutes. Le contrôle positif du cofret doit donner un résultat positif après 45 minutes. Si les contrôles ou échantillons connus ne donnent pas les résultats attendus, les résultats doivent être invalidés.

Détermination qualitative

Les hématies agglutinées forment une couche unie au fond du puits. Les hématies non agglutinées forment un culot compact en forme de bouton dans le centre du puits. Les cellules faiblement agglutinées forment un anneau caractéristique. L'agglutination des hématies tests en absence d'agglutination des hématies contrôles indique la présence d'anticorps spécifiques de *T. pallidum*. L'absence d'agglutination indique un niveau d'anticorps inférieur à la limite de détection. Ne pas utiliser le résultat des hématies contrôles comme indicatif d'une réaction négative car celles-ci forment un bouton plus compact.

L'agglutination comparée des hématies tests et des hématies contrôles indique la présence d'anticorps anti-cellules. Le test est alors invalidé et doit être recommencé. En cas d'invalidité du test, celui-ci doit être recommencé après absorption préalable du sérum. Diluer alors l'échantillon au 1/4 avec les hématies contrôles et incuber à température ambiante pendant 45-60 minutes. Après centrifugation de l'échantillon (1000rpm/5min), diluer le surnageant au 1/5 dans le tampon de dilution. Tester directement cette dilution, sans autre dilution, avec les hématies tests et les hématies contrôles. Un test de confirmation FTA est aussi recommandé.

Détermination quantitative

Identique à la détermination qualitative. Le titre représente la plus haute dilution présentant une agglutination. Le contrôle positif doit présenter un titre de 1/2560 à titre minimal. La dilution finale de la détermination quantitative est 1/80. Des titres de 1/164000 ont pu être mis en évidence par IMMUTREP TPHA sans effet de prozone (effet croché).

REMARQUES IMPORTANTES

- Les tests d'hémagglutination sont sensibles à la chaleur, à une exposition directe au soleil et aux vibrations. Maintenir à l'abri de ces différents facteurs pendant la période de discussion.
- Éviter de contaminer les échantillons ou les réactifs avec de la saive au risque sinon de produire des résultats erronés.
- Utiliser des pointes séparées pour chaque échantillon pour éviter les contaminations croisées.
- Remettre immédiatement après utilisation les bouchons sur les réactifs.
- Distribuer les réactifs au centre du puits. Amener les réactifs à température ambiante (20°C à 25°C) avant la réalisation du test. Mélanger doucement les réactifs par mouvement doux d'inversion ou de rotation.
- A utiliser par du personnel compétent et entraîné.
- Ne pas utiliser des composants du cofret endommagés ou corrompus.
- Les composants d'un cofret sont calibrés et ne sont pas interchangeables.

PERFORMANCES

Evaluation effectuée dans un centre de référence européen à partir d'échantillons provenant de services de dermatité, gynécologie, de dispensaires de MST et de laboratoires publics.

	Echantillons positifs	Echantillons négatifs	Total
Syphilis Positif	400	6	412
Syphilis Négatif	3	686	672
	403	675	1084

Cette étude a montré :

Une sensibilité de 98,5%.

Une spécificité de 99,6%.

La reproductibilité de IMMUTREP TPHA est de 100% (n° une d'essai).

BIBLIOGRAPHIE

1. Tomizawa, T. and Kazemitsu, S. Jap. J. Med. Sci. Biol. 19, 205 (1966).
2. Rablitz, T. Brit. J. Vener. Dis., 43, 151 (1967).
3. Tingul, G. Ann. Sc. Pav., 12, 311 (1970).
4. Ueda, T., Fukuzawa, S., Ogi, K. and Takaschi, Y., Brit. J. Vener. Dis., 47, 73 (1971).
5. Gasser, M.F., Badkhou, J. L. Daskalopoulos, G. and Walsh, J.L., 48, 474 (1972).
6. Johnson, N.A., Brit. J. Vener. Dis., 1972, 48, 474 (1972).
7. Sagueira, P., J.L. and Dillidge, A. E., Brit. J. Vener. Dis., 43, 242 (1973).
8. Lermontov, J., Krach, J. and Kadziewicz, E., Brit. J. Vener. Dis., 50, 33 (1974).
9. O'Neill, P., Weaver, R.W. and Nico, C.S., Brit. J. Vener. Dis., 49, 427 (1973).
10. Young, H., Haverbach, C. and Roberice, D.H.H., Brit. J. Vener. Dis., 50, 341 (1975).

BMCA/1 Issue 4A Revised June 2007 FRENCH

© Omega Diagnostics Ltd 2007.



OMEGA DIAGNOSTICS LTD.
Omega House, Millfoot Business Village
Area FK12 5DC, Scotland, United Kingdom
cd@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com

AN ISO 9001:2000 and 13485:2003 CERTIFIED COMPANY

Annexe VI : Notice d'utilisation du kit Immutrep RPR OD061.

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.

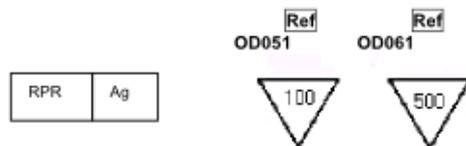
PRINCIPLE OF THE TEST

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



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	1 x 10	5 x 10
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/strirrer.
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).
6. 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
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com

AN ISO 9001:2000 AND ISO 13485: 2003 CERTIFIED COMPANY

Annexe VII : Architect.

L'Architect est un automate d'immunoanalyse commercialisé par la société Abbott.

Il utilise la technologie de chimiluminescence flexible : CHEMIFLEX. Les échantillons sont introduits dans l'automate. Ils seront alors en contact avec des microparticules recouvertes d'antigène et du diluant. Une réaction antigène-anticorps a lieu si les sérums contiennent des anticorps. Puis, il y a une étape de lavage, suivi de l'ajout du conjugué anti IgG, anti IgM marqué à l'acridinium. C'est un ester capable de se lier aux protéines ou aux acides nucléiques de façon covalente. Cette liaison produit une chimiluminescence en présence de peroxyde d'hydrogène. A nouveau, un lavage sera effectué. L'automate ajoute alors la solution de pré-activation et d'activation de l'acridinium. Enfin, on observe la réaction de chimiluminescence, mesurée en unités relatives de lumière (URL). Il existe une relation directe entre la quantité d'anticorps présente dans l'échantillon et l'URL.

Il présente une grande capacité d'analyse (entre 60 et 200 immunodosages par jour) avec une cadence moyenne comprise entre 60 et 100 t/h et un résultat en 29 mn. Il permet une traçabilité totale des résultats, messages, actions correctives avec le traitement instantané des urgences grâce au convoyeur RSH.



Annexe VIII : SH FORM 44 TPHA.

	FICHE TYPE QUALITATIF VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE	RÉFÉRENCE : SH FORM 44 INDICE DE RÉVISION : 00 DATE D'APPLICATION : 15/04/11
---	--	--

Note : le laboratoire se réfèrera au tableau du § 9.2.1 du Document Cofrac SH GTA 04 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B¹) et complètera **une fiche par examen de biologie médicale**

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE : TPHA

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande :	Anticorps spécifiques de <i>Treponema pallidum</i>
Principe de la Mesure :	Test qualitatif d'hémagglutination passive : méthode manuelle, interprétation visuelle
Méthode de mesure :	Hémagglutination par détection visuelle
Marquage CE (Oui/Non)	oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	/

MISE EN OEUVRE	
Opérateurs (Habilitation) :	Laurence BERNIAUD (technicienne), Céleste LACOUR (SAHU)
Procédure de validation :	Procédure générale de validation/vérification des méthodes MU-ANA-PG-001, procédure de validation/vérification des méthodes qualitatives MU-ANA-PG-004
Procédure de gestion de la portée flexible :	Procédure de gestion de la portée d'accréditation MU-ANA-PG-003
Période d'évaluation :	Du 13/11/12 au 26/02/13
Date de mise en service :	
Autorisation par :	S. TIGAUD

¹ Dans le cadre d'une portée B, le laboratoire aura à sa charge d'établir un protocole d'évaluation propre aux items et aux examens concernés par la portée B.

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	Sérum	MO SER 038, tubes prélevés en dehors du laboratoire. Mode opératoire : réception des échantillons, manuel de prélèvement
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	centrifugation	MO utilisation centrifugeuses, critères de centrifugation connus
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Personnel habilité à chaque poste de travail	Formation, habilitation, FP DOC 001
Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :	Locaux sous surveillance de température, conservation du coffret entre 2 et 8°C	Thermostat, sonde de température des réfrigérateurs
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	IMMUTREP TPHA OD071	Marquage CE, contrôle à réception
Matériau de références (témoins) :	Témoin +	Marquage CE, à chaque changement de lot ou de technicienne
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	<ul style="list-style-type: none"> - Pipetage - Conservation des réactifs entre 2 et 8°C - Conservation des échantillons entre 2 et 8°C jusqu'à 48h, au-delà à -20°C - Connexion logiciels 	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle pipettes par un organisme extérieur - Sonde de température - Connexion PGP, SIL

* item à renseigner si nécessaire

VERIFICATION BIBLIOGRAPHIQUE

Spécificité analytique	<p>Données fournisseur : Oméga diagnostics LTD immutrep TPHA kit : evaluation report, juillet 1997, B. MERIAUX. Place des marqueurs sérologiques dans le diagnostic et le suivi de traitement de la syphilis à propos de 69 cas de syphilis aux hospices civils de Lyon. Th. D. pharm, Lyon 1; 2006. A. C. SEÑA, B. L. WHITE, P. F. SPARLING. Novel <i>Treponema pallidum</i> serologic tests : a paradigm shift in syphilis screening for the 21th century. Clin Infect Dis 2010; 51: 700-8.</p>
Sensibilité diagnostique	<p>B. MERIAUX. Place des marqueurs sérologiques dans le diagnostic et le suivi de traitement de la syphilis à propos de 69 cas de syphilis aux hospices civils de Lyon. Th. D. pharm, Lyon 1; 2006. A. C. SEÑA, B. L. WHITE, P. F. SPARLING. Novel <i>Treponema pallidum</i> serologic tests : a paradigm shift in syphilis screening for the 21th century. Clin Infect Dis 2010; 51: 700-8.</p>
Robustesse	/
Contamination entre échantillons	/
Stabilité des réactifs	Notice d'utilisation

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES

(indispensable en portée B)

Résultats de l'étude des courbes ROC à partir d'une étude clinique :	Spécificité : 99,6% Sensibilité : 98,5%
	Spécificité : test de 10 échantillons positifs à la maladie de Lyme et 10 échantillons positifs à la leptospirose.

CONTAMINATION

Inter échantillon pour les paramètres sensibles :	Oui
Inter réactif si nécessaire :	/
Vérification bibliographique :	Oui
Vérification sur site :	Vérification en alternant un échantillon + et un échantillon – trois fois : absence de contamination inter-échantillon

COMPARAISON DE METHODES

Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :	/
Nombre de mesures :	/
Descriptif de l'échantillon étudié :	/
Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances) :	/
Résultats et interprétations des discordances :	/
Conclusions et dispositions ² :	/

ROBUSTESSE

(indispensable en portée B)

Données bibliographiques :	Oui
Résultats :	Tests des échantillons avant et après 1 semaine entre 2 et 8°C, après 6 semaines, 6 mois et 1 an à -20°C.
Conclusions et dispositions ² :	Robuste pour 1 semaine entre 2 et 8°C, et jusqu'à 6 mois à -20°C.

² Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation **transitoire et documentée** d'un facteur de correction).

STABILITE (indispensable en portée B)	
Données bibliographiques :	Oui, notice d'utilisation
Résultats :	Comparaison des titres du témoin + à l'ouverture du coffret et le jour de sa dernière utilisation.
Conclusions et dispositions² :	Les valeurs sont égales. Les réactifs sont stables et donc conformes.

Commentaires éventuels : dossier réalisé pour des échantillons de sérums uniquement.

Conclusion : l'ensemble des performances est vérifié. La méthode est déclaré apte par rapport aux besoins du laboratoire et à l'utilisation prévue des résultats.

Spécificité :

Fait le 13/11/2012, par L. Berniaud et C. Lacour

Echantillons : sérum

Lot : 7036001

Date de péremption : janvier 2014

Témoin + : 2560

n°	Echantillon		TPHA
1	12415065	lyme +	-
2	12422134	lyme +	-
3	12403180	lyme +	-
4	12411091	lyme +	-
5	12393079	lyme +	-
6	12372080	lyme +	-
7	12344029	lyme +	-
8	12231102	lyme +	-
9	12215085	lyme +	-
10	/	lyme +	-
11	12055075	leptospirose +	-
12	12053148	leptospirose +	-
13	11413052	leptospirose +	-
14	11364031	leptospirose +	-
15	11251025	leptospirose +	-
16	10332076	leptospirose +	-
17	10323066	leptospirose +	-
18	10181041	leptospirose +	-
19	10031035	leptospirose +	-
20	9203031	leptospirose +	-

Contamination inter-échantillon :

Fait le 13/11/2012, par L. Berniaud et C. Lacour

Echantillons : témoin + et sérum -

Lot : 7036001

Date de péremption : janvier 2014

échantillon	TPHA
+	+
-	-
+	+
-	-
+	+
-	-

Robustesse :

Fait le 23/11/2012, par L. Berniaud et C. Lacour

Echantillons : sérum

Lot : 7036001

Date de péremption : janvier 2014

Témoin + : 5120

n°	échantillon	conservation	TPHA	
			J0	J7
1	12461063	7j entre 2 et 8°C	1280	1280
2	12462019	7j entre 2 et 8°C	2560	2560
3	12462079	7j entre 2 et 8°C	5120	5120
4	12462082	7j entre 2 et 8°C	640	320
5	12462128	7j entre 2 et 8°C	640	320

n°	échantillon	conservation	TPHA	
			S0	S6
1	12401039	6semaines à -20°C	640	1280
2	12403015	6semaines à -20°C	10240	10240
3	12412042	6semaines à -20°C	5120	5120
4	12412155	6semaines à -20°C	10240	10240
5	12411094	6semaines à -20°C	< 80	< 80
6	12414076	6semaines à -20°C	5120	2560
7	12414081	6semaines à -20°C	1280	640
8	12415052	6semaines à -20°C	640	640
9	12421063	6semaines à -20°C	1280	640
10	12423012	6semaines à -20°C	1280	640

n°	échantillon	conservation	TPHA	
			M0	M6
1	12171095	6mois à -20°C	< 80	320
2	12183093	6mois à -20°C	> 20480	> 20480
3	12183102	6mois à -20°C	> 20480	10240
4	12185025	6mois à -20°C	1280	640
5	12191004	6mois à -20°C	1280	1280
6	12193120	6mois à -20°C	1280	1280
7	12202167	6mois à -20°C	1280	1280
8	12203059	6mois à -20°C	80	80
9	12223056	6mois à -20°C	160	< 80
10	12223166	6mois à -20°C	> 20480	ininterprétable

n°	échantillon	conservation	TPHA	
			2011	2012
1	11453049	1an à -20°C	10240	5120
2	11461034	1an à -20°C	2560	5120
3	11494054	1an à -20°C	2560	ininterprétable
4	11495018	1an à -20°C	20480	5120
5	11502033	1an à -20°C	1280	2560

Stabilité :

Par L. Berniaud, B. Charton

Echantillon : témoin +

Lot : 7037885

Date de péremption : 06/2014

Date d'ouverture du coffret :	18/02/2013	Titre :	2560
Date de fin du coffret :	21/02/2013	Titre :	2560

Annexe IX : SH FORM 44 VDRL.

	FICHE TYPE QUALITATIF VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE	RÉFÉRENCE : SH FORM 44
		INDICE DE RÉVISION : 00
		DATE D'APPLICATION : 15/04/11

Note : le laboratoire se réfèrera au tableau du § 9.2.1 du Document Cofrac SH GTA 04 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B³) et complètera **une fiche par examen de biologie médicale**

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE : VDRL

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande :	Anticorps « réaginine » anti <i>Treponema pallidum</i>
Principe de la Mesure :	Agglutination non tréponeme qualitative et semi quantitative
Méthode de mesure :	Agglutination
Marquage CE (Oui/Non)	Oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	/

MISE EN ŒUVRE	
Opérateurs (Habilitation) :	Laurence BERNIAUD (technicienne), Céleste LACOUR (SAHU)
Procédure de validation :	Procédure générale de validation/vérification des méthodes MU-ANA-PG-001, Procédure de validation/vérification des méthodes qualitatives MU-ANA-PG-004
Procédure de gestion de la portée flexible :	Procédure de gestion de la portée d'accréditation MU-ANA-PG-003
Période d'évaluation :	13/11/12 au 25/02/13
Date de mise en service :	
Autorisation par :	S. TIGAUD

³ Dans le cadre d'une portée B, le laboratoire aura à sa charge d'établir un protocole d'évaluation propre aux items et aux examens concernés par la portée B.

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	Sérum	MO SER 032, tubes prélevés en dehors du laboratoire. Mode opératoire : réception des échantillons, manuel de prélèvement
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	centrifugation	MO utilisation centrifugeuses, critères de centrifugation connus
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Personnel habilité à chaque poste de travail	Formation, habilitation, FP DOC 001
Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :	Locaux sous surveillance de température, conservation du coffret entre 2 et 8°C	Thermostat, sonde de température des réfrigérateurs
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	IMMUTREP RPR OD061 ou OD051	Marquage CE, contrôle à réception
Matériau de références (témoins) :	Témoin +	Marquage CE, à chaque changement de lot ou de technicienne
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	<ul style="list-style-type: none"> - Pipetage - Conservation des réactifs entre 2 et 8°C - Conservation des échantillons entre 2 et 8°C jusqu'à 48h, au-delà à -20°C - Connexion logiciels 	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle pipettes par un organisme extérieur - Sonde de température - Connexion PGP, SIL

* item à renseigner si nécessaire

VERIFICATION BIBLIOGRAPHIQUE

Spécificité analytique	<p>Données fournisseur : Omega diagnostic LTD immutrep RPR : evaluation report, décembre 1995</p> <p>B. MERIAUX. Place des marqueurs sérologiques dans le diagnostic et le suivi de traitement de la syphilis à propos de 69 cas de syphilis aux hospices civils de Lyon. Th. D. pharm, Lyon 1; 2006.</p> <p>A. C. SEÑA, B. L. WHITE, P. F. SPARLING. Novel <i>Treponema pallidum</i> serologic tests : a paradigm shift in syphilis screening for the 21th century. Clin Infect Dis 2010; 51: 700-8.</p>
Sensibilité diagnostique	<p>B. MERIAUX. Place des marqueurs sérologiques dans le diagnostic et le suivi de traitement de la syphilis à propos de 69 cas de syphilis aux hospices civils de Lyon. Th. D. pharm, Lyon 1; 2006.</p> <p>A. C. SEÑA, B. L. WHITE, P. F. SPARLING. Novel <i>Treponema pallidum</i> serologic tests : a paradigm shift in syphilis screening for the 21th century. Clin Infect Dis 2010; 51: 700-8.</p>
Robustesse	/
Contamination entre échantillons	/
Stabilité des réactifs	Notice d'utilisation

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES

(indispensable en portée B)

Résultats de l'étude des courbes ROC à partir d'une étude clinique :	Spécificité : 98 % Sensibilité : 80% au stade primaire, 100% au stade secondaire, 75% stade tertiaire Spécificité : test de 10 échantillons positifs à la maladie de Lyme et 10 échantillons positifs à la leptospirose.
--	--

CONTAMINATION

Inter échantillon pour les paramètres sensibles :	Oui
Inter réactif si nécessaire :	/
Vérification bibliographique :	Oui
Vérification sur site :	Vérification en alternant un échantillon + et un échantillon – trois fois : absence de contamination inter-échantillon

COMPARAISON DE METHODES

Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :	/
Nombre de mesures :	/
Descriptif de l'échantillon étudié :	/
Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances) :	/
Résultats et interprétations des discordances :	/
Conclusions et dispositions ⁴ :	/

ROBUSTESSE

(indispensable en portée B)

Données bibliographiques :	Oui
Résultats :	Tests des échantillons avant et après 1 semaine entre 2 et 8°C, après 6 semaines, 6 mois et 1 an à -20°C.
Conclusions et dispositions ² :	Robuste pour 1 semaine entre 2 et 8°C, et jusqu'à 6 mois à -20°C.

⁴ Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation **transitoire et documentée** d'un facteur de correction).

STABILITE (indispensable en portée B)	
Données bibliographiques :	Oui, notice d'utilisation
Résultats :	Comparaison des titres du témoin + à l'ouverture du coffret et le jour de sa dernière utilisation.
Conclusions et dispositions² :	Les valeurs sont égales. Les réactifs sont stables et donc conformes.

Commentaires éventuels : dossier réalisé pour des échantillons de sérums uniquement.

Conclusion : L'ensemble des performances est vérifié. La méthode est déclaré apte par rapport aux besoins du laboratoire et à l'utilisation prévue des résultats.

Spécificité :

Fait le 23/11/2012, par L. Berniaud et C. Lacour

Echantillons : sérum

Lot : 7036787

Date de péremption : novembre 2014

Témoin + : +

n°	échantillon		VDRL
1	12415065	lyme +	-
2	12422134	lyme +	-
3	12403180	lyme +	-
4	12411091	lyme +	-
5	12393079	lyme +	-
6	12372080	lyme +	-
7	12344029	lyme +	-
8	12231102	lyme +	-
9	12215085	lyme +	-
10	/	lyme +	-
11	12055075	leptospirose +	-
12	12053148	leptospirose +	-
13	11413052	leptospirose +	-
14	11364031	leptospirose +	-
15	11251025	leptospirose +	-
16	10332076	leptospirose +	-
17	10323066	leptospirose +	-
18	10181041	leptospirose +	-
19	10031035	leptospirose +	-
20	9203031	leptospirose +	-

Contamination inter-échantillon :

Fait le 23/11/2012, par L. Berniaud et C. Lacour

Echantillons : témoin + et sérum -

Lot : 7036787

Date de péremption : novembre 2014

échantillon	VDRL
+	+
-	-
+	+
-	-
+	+
-	-

Robustesse :

Fait le 23/11/2012, par L. Berniaud et C. Lacour

Echantillons : sérums

Lot : 7036787

Date de péremption : novembre 2014

Témoin : 2

n°	échantillon	conservation	VDRL	
			J0	J7
1	12461063	7j entre 2 et 8°C	4	8
2	12462019	7j entre 2 et 8°C	8	8
3	12462079	7j entre 2 et 8°C	2	2
4	12462082	7j entre 2 et 8°C	2	2
5	12462128	7j entre 2 et 8°C	1	1

n°	échantillon	conservation	VDRL	
			S0	S6
1	12401039	6semaines à -20°C	32	32
2	12403015	6semaines à -20°C	32	32
3	12412042	6semaines à -20°C	-	1
4	12412155	6semaines à -20°C	16	16
5	12411094	6semaines à -20°C	4	8
6	12414076	6semaines à -20°C	32	32
7	12414081	6semaines à -20°C	32	16
8	12415052	6semaines à -20°C	32	32
9	12421063	6semaines à -20°C	32	32
10	12423012	6semaines à -20°C	8	16

n°	échantillon	conservation	VDRL	
			M0	M6
1	12171095	6mois à -20°C	-	-
2	12183093	6mois à -20°C	256	256
3	12183102	6mois à -20°C	16	32
4	12185025	6mois à -20°C	32	32
5	12191004	6mois à -20°C	4	8
6	12193120	6mois à -20°C	1	1
7	12202167	6mois à -20°C	4	4
8	12203059	6mois à -20°C	4	8
9	12223056	6mois à -20°C	2	2
10	12223166	6mois à -20°C	256	256

n°	échantillon	conservation	VDRL	
			2011	2012
1	11453049	1an à -20°C	32	32
2	11461034	1an à -20°C	64	64
3	11494054	1an à -20°C	16	128
4	11495018	1an à -20°C	1024	64
5	11502033	1an à -20°C	16	16

Stabilité :

Par L. Berniaud

Echantillon : témoin +

Lot : 7038191

Date de péremption : 01/2015

Date d'ouverture du coffret :	12/02/2013	Titre :	2
Date de fin du coffret :	19/02/2013	Titre :	2

Annexe X : Sommaire norme ISO 15189 :

ISO 15189:2007(F)

Sommaire		Page
Avant-propos		iv
Introduction		v
1	Domaine d'application.....	1
2	Références normatives	1
3	Termes et définitions	1
4	Exigences relatives au management	4
4.1	Organisation et management	4
4.2	Système de management de la qualité	5
4.3	Maitrise des documents	7
4.4	Revue de contrats	8
4.5	Analyses transmises à des laboratoires sous-traitants	8
4.6	Services externes et approvisionnement.....	9
4.7	Prestations de conseils.....	9
4.8	Traitement des réclamations	10
4.9	Identification et maîtrise des non-conformités.....	10
4.10	Actions correctives.....	10
4.11	Actions préventives.....	11
4.12	Amélioration continue	11
4.13	Enregistrements qualité et enregistrements techniques	11
4.14	Audits internes.....	12
4.15	Revue de direction	13
5	Exigences techniques	14
5.1	Personnel.....	14
5.2	Locaux et conditions environnementales	16
5.3	Matériel de laboratoire.....	17
5.4	Procédures préanalytiques.....	19
5.5	Procédures analytiques	22
5.6	Assurer la qualité des procédures analytiques	23
5.7	Procédures postanalytiques.....	24
5.8	Compte rendu des résultats	25
Annexe A (informative) Correspondance entre l'ISO 9001:2000 et l'ISO/CEI 17025:2005		28
Annexe B (informative) Recommandations relatives à la protection des systèmes informatiques de laboratoire (SIL)		32
Annexe C (informative) Éthique et laboratoires d'analyses de biologie médicale		36
Bibliographie		40

En 2012, une nouvelle version de la norme a été publiée et qui sera obligatoire à partir de 2016. Elle reprend la même organisation que la version de 2007 mais en détaillant et en précisant certaines parties. En effet, dans la partie 4, les responsabilités en matière d'organisation et de management sont clairement définies. Les exigences en matière d'évaluations et d'audits sont précisées.

De plus, la partie 5 concernant les exigences techniques est plus approfondie que la version de 2007 car les exigences relatives aux résultats comprennent également leur diffusion, et le laboratoire doit prendre en compte la gestion de son système d'information.

Sommaire	Page
Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Exigences relatives au management	6
4.1 Responsabilité en matière d'organisation et de management	6
4.2 Système de management de la qualité	9
4.3 Maîtrise des documents	10
4.4 Contrats de prestations	11
4.5 Examens transmis à des laboratoires sous-traitants	12
4.6 Services externes et approvisionnement	12
4.7 Prestation de conseils	13
4.8 Traitement des réclamations	13
4.9 Identification et maîtrise des non-conformités	13
4.10 Actions correctives	14
4.11 Actions préventives	14
4.12 Amélioration continue	14
4.13 Maîtrise des enregistrements	15
4.14 Évaluation et audits	16
4.15 Revue de direction	18
5 Exigences techniques	19
5.1 Personnel	19
5.2 Locaux et conditions environnementales	21
5.3 Matériel de laboratoire, réactifs et consommables	23
5.4 Processus préanalytiques	26
5.5 Processus analytiques	30
5.6 Garantie de qualité des résultats	33
5.7 Processus post-analytiques	35
5.8 Compte rendu des résultats	35
5.9 Diffusion des résultats	37
5.10 Gestion des informations de laboratoire	38
Annexe A (informative) Correspondance avec l'ISO 9001:2008 et l'ISO/CEI 17025:2005	40
Annexe B (informative) Comparaison entre l'ISO 15189:2007 et l'ISO 15189:2012	45
Bibliographie	49

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Norme ISO 9004 :2009. Systèmes de management de la qualité, amélioration des performances. AFNOR. Novembre 2009.
2. P. PREYNAT. Cours qualité 5^{ème} année pharmacie. UCBL Lyon 1. Septembre 2012.
3. Ministère de la santé et des sports. La loi HPST à l'hôpital, les clés pour comprendre. Novembre 2012 : 64-9.
4. Article L6221-1 du Code de la Santé Publique.
5. Norme ISO 15189 : 2012. Laboratoires d'analyses de biologie médicale – Exigences particulières concernant la qualité et la compétence. AFNOR. Décembre 2012.
6. COFRAC. Présentation générale du Cofrac. Disponible sur <http://www.cofrac.fr/fr/cofrac>, consulté le 14 mars 2013.
7. Annexes : management, qualité, projet, exemples de méthodes. http://pedagogie.ac-toulouse.fr/biotech-sante-envir/6_annexes.pdf, consulté le 12 mars 2013.
8. SH GTA 04. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. Révision 00, avril 2011, COFRAC.
9. Hospices civiles de Lyon. Procédure de validation des méthodes qualitatives : vérification expérimentale sur site. Mise à jour septembre 2012.
10. SH REF 02. Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale. Révision 01, COFRAC.
11. SH REF 05. Règlement d'accréditation. Révision 04, COFRAC.
12. A-L. BASSE GUERINEAU. Diagnostic sérologique de la syphilis. Institut de veille sanitaire. Disponible sur http://opac.invs.sante.fr/index.php?lvl=author_see&id=8032n, consulté le 02/12/2012.
13. M. SCHMITT. Les données de surveillance des IST en Rhône-Alpes en 2011. Bulletin de Veille Sanitaire, numéro spécial/ IST en région Rhône Alpes en 2011. Cellule de l'institut de veille sanitaire en région Rhône-Alpes. 2012.

14. P. PAVESE. La syphilis. Maladies infectieuses et médecine tropicale. Université Joseph FOURIER. Janvier 2008.
15. Center for Disease Control and prevention. Sexually transmitted diseases, Syphilis – CDC Fact Sheet. Disponible sur <http://www.cdc.gov/std/syphilis/STDFact-Syphilis.htm>, consulté le 02 décembre 2012.
16. N. DUPIN. Syphilis, aspects cliniques. Service de dermatovénérologie, Hôpital Tarnier ; Paris. BEH 2001 ; 35.
17. J. L. AVRIL, H. DABERNAT, F. DENIS, H. MONTEIL. Bactériologie clinique. 3^{ème} éd. Ellipses ; 2000 : 1499-513.
18. F. DENIS, M. C. PLOY, C. MARTIN, E. BINGEN, R. QUENTIN. Bactériologie médicale : techniques usuelles. Masson ; 2007 : 492-505.
19. Dr P. MARTEL. Recommandations en santé publique : Evaluation a priori du dépistage de la syphilis en France, synthèse et perspective. HAS, Service évaluation médico-économique et santé publique. Mai 2007 : 24.
20. S. I. EGGLESTONE, I. ASHLEY. Evaluation report. Omega diagnostic LTD, Immutrep TPHA kit. Supra regional treponemal serology laboratory, public health laboratory. Bristol, juillet 1997.
21. S. I. EGGLESTONE, I. ASHLEY. Evaluation report. Omega diagnostic LTD, Immutrep RPR. Supra regional treponemal serology laboratory, public health laboratory. Bristol, décembre 1995.
22. B. MERIAUX. Place des marqueurs sérologiques dans le diagnostic et le suivi de traitement de la syphilis à propos de 69 cas de syphilis aux hospices civils de Lyon. Th. D. pharm, Lyon 1; 2006.
23. A. C. SEÑA, B. L. WHITE, P. F. SPARLING. Novel *Treponema pallidum* serologic tests : a paradigm shift in syphilis screening for the 21th century. Clin Infect Dis 2010; 51: 700-8.

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.

LACOUR Céleste

Validation de méthode du TPHA et VDRL dans le diagnostic de la syphilis au laboratoire de bactériologie de l'hôpital de la Croix Rousse.

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2013, 126 p.

RESUME

Dans le cadre de l'application de loi HPST, les laboratoires de biologie médicale doivent être accrédités d'ici 2016, selon la norme ISO 15189. L'accréditation passe notamment, par la validation des méthodes employées dans le laboratoire.

Nous avons choisi de valider 2 méthodes de diagnostic de la syphilis, le TPHA et le VDRL. En effet, la syphilis est une pathologie en pleine résurgence depuis les années 2000 et elle représente la principale sérologie du laboratoire. En outre, ces tests sont très utiles dans le suivi du traitement des patients, en plus de présenter chacun, une bonne sensibilité et spécificité.

Nous verrons, en premier lieu, un rappel sur la qualité, ses outils méthodologiques, la validation de méthode ainsi qu'une description de la syphilis (caractéristiques, méthodes de diagnostic, traitement).

Puis, nous détaillerons le dossier de validation pour chacun des tests et les résultats de leurs vérifications expérimentales. Le dossier de validation doit comporter plusieurs parties : la définition du besoin, une étude bibliographique, une analyse de risques, la détermination des critères de performances, les vérifications expérimentales et l'avis d'aptitude de la méthode. Nous avons choisi de réaliser les tests suivants : test de contamination inter-échantillons, test de spécificité, test de stabilité des réactifs après ouverture, test de robustesse.

Enfin, nous discuterons du déroulement de la validation et de son intérêt.

MOTS CLES

Norme ISO 15189
Accréditation
Syphilis
TPHA
VDRL
Validation

JURY

Mme GOUDABLE Joëlle, Professeur
Mme PREYNAT Pascale, Maître de Conférences
Mme ROURE-SOBAS Chantal, Biologiste
Mme BAUME Maud, Ingénieur

DATE DE SOUTENANCE

Vendredi 5 juillet 2013

ADRESSE DE L'AUTEUR

50 rue Saint Romain, 69008 LYON