

ABREVIATIONS

C.H.U	Centre Hospitalier Hassan II
M.S.T	Maladies Sexuellement Transmissibles
T.P	Treponema palladium
DAV	Dispensaires antivénériens
P.C.R	Polymerase chain reaction
V.D.R.L	Venereal Disease Research Laboratory
T.P.H.A	Treponema Palladium Hemagglutinations Assay
F.T.A	Fluorescent Treponema Assay
E.L.I.S.A	ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY
L.C.R	Liquide Céphalo-Rachidien
C.M.I.A	Dosage Immunologique Microparticulaire par
Chimiluminescence	
U.R.L	Unité Relative de Lumière

SOMMAIRE

ABREVIATIONS.....	1
Introduction.....	9
Partie I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1-Histoire de la syphilis.....	10
2-L'agent étiologique.....	10
2-1- classification.....	10
2-2- aspect.....	11
2-3- morphologie.....	11
2-3- structure antigénique de Treponema pallidum.....	12
4-Stades d'évolution de la syphilis.....	12
4-1- La syphilis primaire.....	12
4-2- La syphilis secondaire.....	13
4-3- La syphilis latente.....	14
4-4- La syphilis tertiaire	15
5-Neurosyphilis.....	16
6-Syphilis congénitale.....	16
7-Mode de transmission.....	16
7-1- contact sexuel.....	17

7-2- transmission materno-fœtal.....	17
7-3- toxicomanies.....	18
7-4- autres modes de contamination.....	18
8-Diagnostic de la syphilis.....	18
8-1- diagnostic direct.....	18
8-1-1- Examen au microscope à fond noir.....	18
8-1-2- Immunofluorescence.....	19
8-1-3- PCR.....	19
8-2- Diagnostic indirect.....	19
8-2-1 VDRL.....	19
8-2-2- TPHA.....	19
8-2-3- FTA.....	19
8-2-4- Test de Nelson	20
8-2-5- ELISA.....	20
8-2-6- Western Blot.....	20
9-profil sérologique en fonction de la syphilis.....	21
10-Interprétation des tests VDRL et TPHA.....	23
11-Traitement de la syphilis.....	23
12-Cinétique des anticorps.....	24
13- Prophylaxie.....	26

MATERIELS ET METHODES.....

1- Introduction.....	27
2- Lieu de stage.....	27
3- La population étudiée.....	27
4- Technique de diagnostic.....	27
4-1- Diagnostic de la syphilis par l'automate ARCHITECT.....	27
4-1-1- Principe.....	27
4-1-2- Réactifs.....	28
4-1-3- Fonctionnement de l'appareil.....	29
4-1-4- Procédure de dosage.....	29
4-1-5- Calibration.....	30
4-1-6- Résultats.....	30
4-7-1- Interprétation.....	30
4-2- Deux tests manuels V.D.R.L et TPHA	31
4-2-1- Test Venereal Disease Research Laboratory charbon.....	31
a- Principe	31
b- Réactifs de la VDRL.....	31
c- Matériel utilisé.....	31
d- Méthode.....	32
e- Lecture des résultats	32
4-2-2- Test Treponema Pallidum Hemagglutinations Assay	33
a- Principe.....	34

b- Matériel	34
c- Réactifs de la TPHA.....	35
d- Méthode	35
1- Méthode quantitative	35
e- Adsorption non spécifique.....	35
2- Méthode qualitative.....	36
Discussion.....	37
Conclusion	38

1 - Introduction :

Les Maladies Sexuellement Transmissibles (M.S.T.) sont des infections susceptibles de se transmettre lors des rapports sexuels, quel que soit leur mode : génital, uro-génital. Ces maladies ne sont pas seulement une cause importante de morbidité chez les adultes, mais elles peuvent provoquer des complications avec des séquelles, telles que la stérilité chez les hommes et les femmes, la grossesse ectopique, le cancer du col de l'utérus, une mortalité prématurée, des nouveau-nés infectés par transmission placentaire de la maman vers le fœtus,

un faible poids de naissance, ainsi que la prématurité ou la conjonctivite du nouveau-né. Parmi les M.S.T, on peut citer la syphilis qui est une infection bactérienne très contagieuse, seul le dépistage systématique des personnes à risque permet de diagnostiquer la maladie et de la traiter, il permet aussi d'éviter sa propagation. L'incidence de la syphilis est moins élevée, mais qui reste un sujet de préoccupation vu qu'elle présente un grand danger pour l'homme, la femme et le fœtus.

Pour les raisons invoquées ci-dessus, il nous a semblé judicieux de porter notre choix entre autre sur le thème : **le suivie sérologique de la syphilis**

2- Histoire de la syphilis :

La **syphilis** (populairement appelée **vérole**) est une infection sexuellement transmissible contagieuse, due au tréponème pâle. Elle se manifeste par un chancre initial et par des atteintes viscérales et nerveuses tardives, certaines manifestations survenant plusieurs années après la contamination. (1)

Au début des années quarante, la syphilis a été ajoutée à la liste des maladies à déclaration obligatoire mais depuis de nombreuses années, les cas étaient très peu déclarés par les médecins. C'est pourquoi en juillet 2000, une modification du code de santé publique a levé l'obligation de déclarer les maladies vénériennes (ordonnance 2000-548 du 15 juin 2000). Au cours des années quatre-vingt-dix, la syphilis était une maladie très rare dans les dispensaires antivénériens (DAV). Fin Novembre 2000, une résurgence de la syphilis a été documentée et a entraîné la mise en place d'un système de surveillance. (2)

3- l'agent pathologique :

3-1- Classification :

- Classe : Spirochètes
- Ordre : Spirochètoses
- Famille : Spirochaetaceae
- Genre : Treponema
- Espèce : le genre Treponema regroupe des espèces cultivables et d'autres non cultivables, pathogènes qui sont :

 **Treponema pallidum subspecies pallidum** ou "tréponème pâle", agent de la **syphilis vénérienne**,

 **Treponema pallidum subspecies endemicum** est l'agent de la syphilis endémique non vénérienne ou "*bejel*", limitée aux régions désertiques.

 **Treponema pallidum subspecies pertenue** est l'agent du "pian" de distribution tropicale et subtropicale.

 **Treponema carateum** est l'agent de la "pinta" ou "carate" observée épisodiquement en Amérique Centrale et du Sud. (11)

3-2- Aspect :

La bactérie apparaît sous la forme d'une spirale mobile

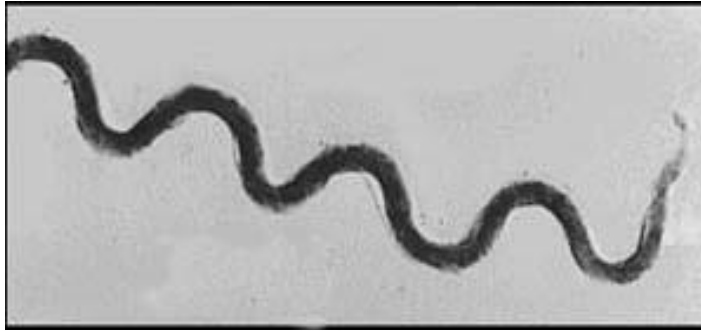


Figure 1 : Treponema observée au microscope à fond noir

3-3-Morphologie :

Spirochètes très fins ($0.15\ \mu\text{m}$ sur $6-20\ \mu\text{m}$) à extrémités effilées, spires serrées et régulières (6-14), mobiles qui se déplacent par ondulations du filament axial (composé de plusieurs flagelles) situé entre la membrane cytoplasmique et la paroi.

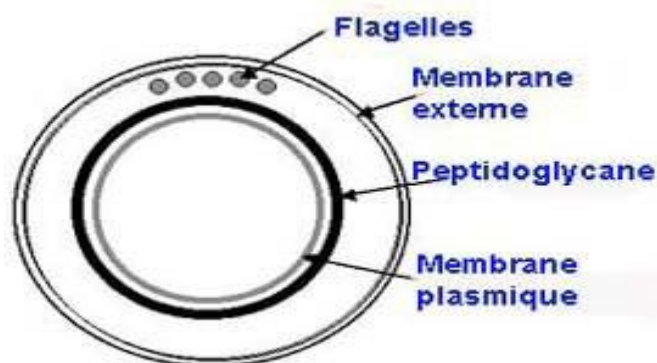


Figure 2 : structure du Treponema

3-4- Structure antigénique de Treponema pallidum :

✚ **Ag Cardiolipidique de Wassermann** (cardiolipide) : Ag non spécifique: présent chez *T. Pallidum* et dans le tissu cardiaque des mammifères.

=> Ac - **Réagines** - non spécifiques mais n'apparaissant à titre élevé qu'au cours des infections à tréponèmes pathogènes.

✚ **Ag protéiques**: communs aux tréponèmes pathogènes et non pathogènes

=> Ac spécifiques de groupes.

✚ **Ag peptidiques ou glycopeptidiques** de l'enveloppe externe, spécifiques des tréponèmes pathogènes.

=> Ac spécifiques des tréponèmes pathogènes (*Tréponème (T) pallidum*, *T. pertenue*, *T. endemicum*, *T. carateum*). (11)

4- Les stades d'évolution de la syphilis :

4-1- La syphilis primaire :

Elle est marquée, après 3 semaines environ d'incubation silencieuse, par l'apparition du chancre au point d'inoculation du tréponème et par son adénopathie satellite. Le chancre est contagieux car il fourmille de tréponèmes. Il atteint son développement maximum en une à deux semaines, puis régresse spontanément. Au début de la roséole, il a disparu ou presque complètement disparu. (6)

La syphilis primaire est caractérisée par :

- un chancre au point d'inoculation ;
- une adénopathie satellite.

Le chancre est contagieux car il fourmille de tréponèmes. Le chancre est typiquement :

- une exulcération (ou érosion) ou plus rarement une ulcération muqueuse
- de 5 à 15 mm de diamètre en moyenne ;
- unique, plus rarement multiple ;
- à fond propre, rosé (3)

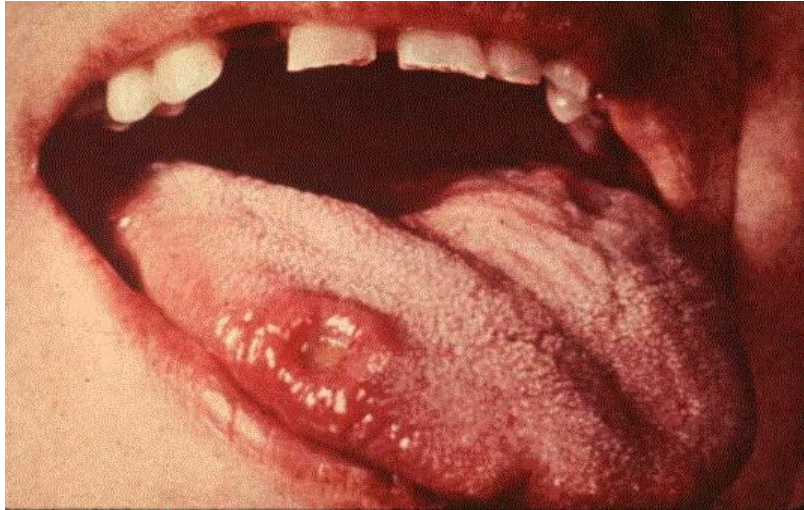


Photo 2 : chancre buccale

4-2- La syphilis secondaire :

Elle est marquée spontanément par plusieurs éruptions cutanéo-muqueuses entrecoupées de phases asymptomatiques de quelques semaines ou mois, ceci sur une durée de deux ans en moyenne. A ces « floraisons » s'associent des signes généraux et viscéraux d'intensité variable, qui témoignent de la diffusion systémique du tréponème. (6)

+ Roséole syphilitique :

La roséole syphilitique est la première floraison de la syphilis. Elle passe souvent inaperçue car elle est peu intense et transitoire (7 à 10 jours).

Elle est faite de macules érythémateuses de 5 à 15mm de diamètre, disséminées sur le tronc, sont souvent pâles et passent volontiers inaperçues. Elle peut ainsi être confondue avec une toxidermie ou une virose. (6)

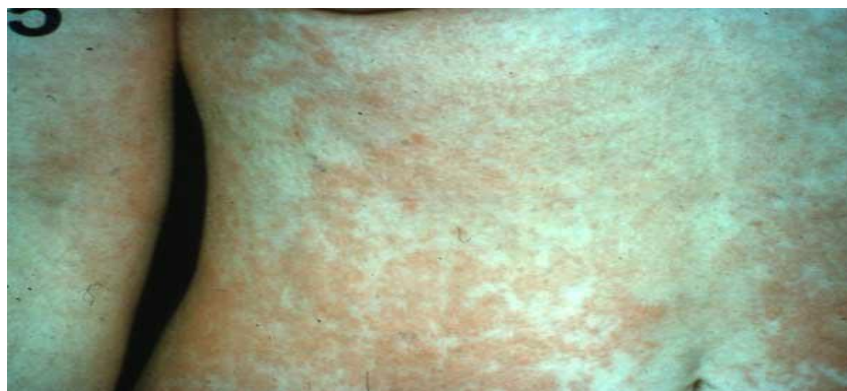


Photo 3 : roséole syphilitique(12)

+ Syphilides papuleuses :

Elles siègent aussi bien sur le visage que sur le tronc et les membres et sont au nombre de quelques unités à plus d'une centaine. Elles sont indolentes et non prurigineuses.

La lésion élémentaire est une papule volontiers de couleur cuivrée, mais elle peut être masquée par une squame, une ulcération, une croûte. Cependant les dermatoses papuleuses étant rares.



Photo : d'une syphilis secondaire

4-3- Syphilis latente

Il s'agit de la persistance du tréponème pâle dans certains sites (œil, cerveau, aorte...). C'est une période asymptomatique qui est souvent décelée à l'occasion d'un examen sérologique (prise de sang et analyse) de routine (prénuptial, prénatal, d'embauche...) et non contagieuse, suivie après 2 à 10 ans et dans 20 à 30% des cas d'une **phase tertiaire**. (7)

4-4- Syphilis tertiaire :

C'est le stade 3 de la Syphilis : la maladie s'aggrave sérieusement sans traitement par des atteintes cardiovasculaires, nerveuses (en particulier céphalées intenses et dysarthrie), articulaires. Elle touche tous les organes de manière générale, et même soignée à temps et donc non contaminante après traitement, elle peut entraîner des signes secondaires comme les brûlures gastriques du tabès. Des épisodes transitoires sont caractéristiques. (Aphasie perte de la parole, hémiplégie paralysie partielle ou totale, hémiparésie perte de la force musculaire sur une moitié droite ou gauche du corps etc.) Elle augmente également sérieusement le risque de transmission du VIH et elle se complique chez les personnes séropositives par une évolution plus rapide et des complications neurologiques plus fréquentes. (14)

Histologie : granulome, réactions d'hypersensibilité retardée = gomme syphilitique non contagieux (12).

➤ **Tableau. Les différents stades de la syphilis (2)**

Stade	Manifestations cliniques	Début des signes	Durée des signes	Remarques
-------	--------------------------	------------------	------------------	-----------

Syphilis primaire	Chancre, adénopathies	En moyenne 3 semaines après le début du chancre (10-100 jours)	Le chancre peut persister 2 à 6 semaines	Régresse spontanément en l'absence de traitement
Syphilis secondaire	Eruption cutanéomuqueuse (tronc, visage, paumes, plantes) avec parfois d'autres manifestations (fièvre, arthralgies, polyadénopathies, méningite, hépatite, uvéite...)	6 semaines à 6 mois après le début du chancre	L'éruption peut durer quelques jours ou quelques semaines. En l'absence de traitement, on peut noter la survenue de plusieurs éruptions cutanéomuqueuses entrecoupées de phases asymptomatiques, pendant une période variable (1, 2 ans...)	Régresse spontanément en l'absence de traitement
Syphilis latente précoce	Absence de signes cliniques		Syphilis de moins d'un an d'évolution	
Syphilis latente tardive			Syphilis de plus d'un an d'évolution	
Syphilis tertiaire	Atteinte cutanée (gommès), atteinte neurologique (tabès, paralysie générale...), atteinte cardiovasculaire (aortite, anévrismes...)		Plusieurs années après le comptage (10 ans ou plus)	Rare de nos jours, en particulier dans les pays industrialisés, (prise fréquente de traitements antibiotiques intercurrents)

5- La Neurosyphilis

Elle peut se voir à la forme précoce ou tardive de la maladie.

Sans traitement, de 8 % à 10 % des personnes atteintes éprouvent des troubles neurologiques importants dix à vingt ans après le début de la maladie. Un quart des patients non traités sont victimes d'une méningo-encéphalite (Syphilis cérébrospinales). Les malades peuvent aussi

présenter une ataxie locomotrice, dite tabès syphilitique par destruction progressive des racines postérieures ou une dégénérescence des cordons postérieurs de la moelle épinière qui s'accompagne de douleurs invalidantes avec dysfonctionnements et de pertes de contrôle de la vessie et des intestins. L'évolution se fait vers la paralysie générale. Par ailleurs des troubles

de la circulation ou des dommages au squelette sont fréquents. Dans les pays occidentaux ce n'est que rarement qu'on observe aujourd'hui une telle évolution, car les antibiotiques permettent une thérapie suffisante. (1)

6-La syphilis congénitale :

Touchant les enfants pendant le 2e et 3e trimestre de la grossesse, si la mère présente une syphilis primaire ou secondaire, elle peut être fulminante et entraîner la mort du nouveau-né ou se transformer en syphilis latente et entraîner des malformations acquises congénitalement et après la naissance.



Photo : syphilis congénitale

7- mode de transmission :

7-1- Transmission sexuelle :

La transmission sexuelle est la plus fréquente. Elle suppose le contact intime de deux muqueuses dont l'une est infectée. Les pratiques sexuelles expliquent qu'un chancre puisse être localisé ailleurs que sur les organes génitaux, par exemple dans la sphère bucco-orale ou dans la région anale.

La syphilis est très contagieuse pour le partenaire à certains stades de son évolution naturelle, principalement via les lésions muqueuses : au stade primaire de chancre et au stade secondaire des syphilides muqueuses érosives. (7)

7-2-Transmission materno-fœtale :

Durant la grossesse par passage transplacentaire du tréponème à partir du 4-5ème mois. Dépistage systématique par sérodiagnostic et traitement de toute syphilis active durant le premier trimestre de la grossesse. Contamination possible du nourrisson lors de l'accouchement à partir d'un chancre génital maternel. (7)

7-3-toxicomanie :

Les psychotropes, tels que l'alcool et certaines drogues, accroissent le risque de la syphilis et d'autres maladies transmissibles sexuellement et par le sang puisque leurs utilisateurs négligent souvent d'adopter des mesures préventives.

De plus, certains consommateurs ont des relations sexuelles en échange de leur drogue. Quant aux utilisateurs de drogues injectables qui échangent le matériel d'injection sans stérilisation, ils augmentent leur risque de contracter la syphilis. (7)

7-4-Contaminations accidentelle:

Professionnelle, seule envisageable (vitalité des tréponèmes très faible en dehors de l'organisme) si examen médical du sujet syphilitique " à main nue ". (7)

8- Diagnostic de la syphilis :

Tous les efforts pour cultiver *T. pallidum* sont restés vains. Le diagnostic de syphilis ne peut donc se faire que par la mise en évidence du tréponème lui-même au microscope à fond noir ou, indirectement, par la mise en évidence de la réponse spécifique anticorps.

8-1- examen direct :

Mise en évidence du micro-organisme ou de ses constituants (protéines ou acides nucléiques).

8-1-1- examen au microscope à fond noir :

Repose sur la recherche de bactéries spiralées à la mobilité caractéristique. Il est difficile de bien distinguer *T. pallidum* des tréponèmes saprophytes (*T. denticola*, *T. refringens*) risque de faux positif pour localisations buccales et anales. (7)

L'examen au microscope à fond noir du frottis est obtenu par raclage du fond du chancre d'inoculation est la seule possibilité de confirmation du diagnostic la première semaine suivant la constitution du chancre.

La recherche du tréponème par cet examen est possible sur les syphilides érosives génitales. (13)

8-1-2- Immunofluorescence :

Méthode sensible qui distingue *T. pallidum* des tréponèmes saprophytes. (7)

Les mouvements ne sont pas visualisés, sa spécificité et de : 100% (13)

8-1-3- Polymerase chain reaction (PCR) :

Cette technique est très sensible, elle repose sur la détection de l'ADN de Tréponème .*pallidum*

8-2-examen indirect:

8-2-1- Venereal Disease Research Laboratory (VDRL):

Il utilise l'antigène cardiolipidique comme cible et le VDRL n'est donc pas une réaction spécifique des tréponématoses.

La sérologie syphilitique faussement positive (VDRL positif, TPHA négatif) s'observe au cours de la grossesse, de maladies immunitaires, notamment au cours du lupus et du syndrome des anticorps anti phospholipides, ainsi que dans certaines maladies infectieuses (*Mycoplasma pneumoniae*, borrélioses).

8-2-2- Treponema Pallidum Hemagglutinations Assay (TPHA) :

Il met en évidence des anticorps dirigés contre tous les tréponèmes pathogènes. La réaction est donc spécifique des tréponématoses mais ne permet pas de différencier la syphilis, du pian, du bejel, de la pinta. Il n'existe d'ailleurs aucun test sérologique permettant de

différencier les anticorps de la syphilis de ceux des tréponématoses endémiques non vénériennes. (13)

8-2-3- Fluorescent Treponema Assay (FTA) :

Le FTA est comme le TPHA, une réaction spécifique des tréponématoses.

Son intérêt se limite :

- _ Au diagnostic sérologique chez le nouveau-né en cas de suspicion de transmission pendant la grossesse (FTA-IgM) ;
- _ Et dans la syphilis primaire au tout début du chancre si les 2 tests TPHA et VDRL sont négatifs. (3)

8-2-4- Test de Nelson :

La présence des anticorps spécifiques est mise en évidence par l'immobilisation de tréponèmes vivants, après addition de complément et en comparaison avec un tube témoin.

- Les résultats qualitatifs sont donc exprimés en pourcentage d'immobilisation spécifique.
 - ✓ 0 % à 20 % : Sérum normal.
 - ✓ 20 % à 50 % : Sérum douteux.
 - ✓ 50% à 100% : Sérum positif.
- ✓ Condition d'utilisation.

Dans la syphilis tertiaire, les réactions sont positives sauf dans 20%: c'est dans ces cas que le Nelson est employé (4)

8-2-5- ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA):

C'est un test immun enzymatique qui utilise des Antigènes tréponémiques purifiées ou recombinées. Sa place dans le sérodiagnostic de la syphilis n'est pas encore Définitivement établi. (4)

8-2-6- TEST D'IMMUNO-TRANSFERT (WESTERN-BLOT):

Les protéines de T. Pallidum, séparées par électrophorèse, sont transférées sur une membrane de nitrocellulose que l'on incube avec le sérum.

Bandes spécifiques : 15,5 ; 17 et 47 Kda

WB Pourrait être un bon test de diagnostic de la syphilis congénitale, même plus sensible et plus spécifique que FTA Abs. (4)

➤ **Tableau des avantages et des inconvénients des différents tests sérologiques :**

Test	Avantages	Inconvénients
VDRL	Simple, rapide et moins coûteuse	Lecture subjectif Non spécifique
TPHA	✓ Réalisation simple et lecture aisée. ✓ Adaptable à de grandes et des petites séries	Moins sensible que test de Nelson
FTA	✓ Sensibilité élevée (86 à 96 % selon stades) ✓ Spécificité très élevée (92 à 99 %). ✓ Test de confirmation	✓ Exige un microscope à Immunofluorescence (IF) ✓ Nécessite un personnel expérimenté ✓ Coût relativement élevé ✓ Pas très pratique pour le dépistage en grande série ✓ Faux positifs possibles (réactions croisées avec autres spirochétoses, maladies auto-immunes...)
Nelson	✓ Test de référence ✓ Spécificité de 100 %	Difficulté de l'entretien de la souche. Complexité et coût élevé du test
ELISA	✓ Réalisation simple et rapide ✓ Applicables à de grandes séries. ✓ Automatisables	Coût élevé par rapport au prix d'un dépistage sérologique de la syphilis (TPHA, VDRL)
Western Blot	✓ Pourrait remplacer le test de Nelson ✓ Applicable au diagnostic de la syphilis congénitale (recherche des IgM spécifiques).	Faux positifs (autres spirochétoses).

9-Profiles sérologiques en fonction des stades de la syphilis

🚦 Syphilis primaire :

- Les premiers anticorps à apparaître sont des IgM. Les techniques les plus sensibles à ce stade sont donc celles qui les dépistent (FTA-IgM, ELISA/IgM).

- Le VDRL est plus sensible que le TPHA, mais il est moins spécifique. Il faut par ailleurs noter des différences de sensibilité entre les réactifs TPHA commercialisés. On pourra donc observer différents profils en syphilis primaire:
- -Le VDRL et le TPHA peuvent être négatifs au tout début du chancre (5 à 7 premiers jours).
- Etant donné les différences de sensibilité observées entre les réactifs TPHA, il peut arriver que l'on ait un VDRL positif et un TPHA négatif (dans ce cas, le FTA est positif, alors qu'il est négatif quand il s'agit d'anticorps anti-cardiolipidiques).
- Le profil VDRL négatif TPHA positif est plutôt en faveur de la « cicatrice sérologique » d'une infection ancienne, mais il a pu être observé parfois chez quelques patients en phase primaire (parmi lesquels certains avaient un fond noir positif).
- Le profil le plus souvent observé est une positivité faible du VDRL, du TPHA, ainsi que du FTA.

Le contexte clinique au stade de syphilis primaire est généralement évocateur avec la notion de chancre et/ou la notion de rapport sexuel récent avec une personne ayant eu une syphilis. Le traitement devra être instauré sur la clinique sans attendre les résultats du laboratoire. L'utilisation d'un microscope à fond noir, lorsque cela est possible, permet de mettre en évidence des tréponèmes dans la lésion et de faire ainsi le diagnostic de syphilis, à un stade où les sérologies peuvent être négatives.

✚ Syphilis secondaire :

Tous les tests sérologiques, tréponémiques et non tréponémiques sont en général positifs avec des titres élevés en anticorps.

➤ Syphilis latente :

Au stade de syphilis latente précoce, la positivité des 3 tests (VDRL, TPHA, FTA) rend le diagnostic aisé. Au stade de syphilis latente tardive, les sérologies peuvent être très variables en fonction de l'ancienneté du comptage. Il a été rapporté en effet une baisse de réactivité des tests non tréponémiques dans le temps. En l'absence de signes cliniques, le diagnostic de syphilis latente repose donc 3 essentiellement sur l'interrogatoire à la recherche d'une notion de syphilis antérieure chez le (la) patient(e) ou chez son (sa) partenaire (dans l'année pour la syphilis latente précoce), de prise d'antibiotiques ou non. L'interprétation des sérologies est souvent délicate en l'absence de résultats sérologiques antérieurs. Un suivi sérologique devra être instauré après traitement de manière à mettre en évidence une diminution significative du taux des anticorps (VDRL).

✚ Syphilis tertiaire :

Elle est devenue rare dans les pays industrialisés. Le diagnostic biologique de neurosyphilis repose sur des arguments non spécifiques (hypercellularité du LCR, hyperprotéinorachie) et

sur les tests sérologiques. Un VDRL positif dans le LCR est en faveur d'une atteinte du SNC, mais un VDRL négatif n'exclut pas une neurosyphilis.

✚ Syphilis congénitale :

Il existe un risque de transmission materno-foetale au cours de la syphilis d'où l'intérêt du dépistage systématique chez la femme enceinte.

L'interprétation des sérologies de syphilis chez la femme enceinte peut être compliquée par l'existence de réactions faussement positives liées à la grossesse (elles sont dans ce cas de faible intensité et le plus souvent dissociées).

La recherche des IgM chez la femme enceinte, lorsqu'elle est positive, peut permettre de faire la distinction entre une syphilis ancienne guérie (taux d'anticorps résiduels) et une syphilis évolutive.

Dans le doute, il ne faut pas hésiter à traiter la patiente puis instaurer un suivi sérologique d'abord de la mère puis de l'enfant.

A la naissance, le nouveau-né a le même profil sérologique que sa mère du fait du passage passif des IgG maternelles à travers la barrière placentaire. Il faudra contrôler les sérologies de l'enfant afin de suivre la baisse progressive du taux des anticorps. Les anticorps transmis passivement par la mère disparaissent en 3 à 6 mois chez un enfant non infecté. Chez un enfant infecté et traité, les anticorps tréponémiques peuvent persister plus longtemps et seule la baisse significative du VDRL permet alors de suivre l'efficacité du traitement.

La recherche des IgM chez le nouveau-né, lorsqu'elle est positive, permet de faire la distinction entre passage passif d'anticorps maternels (IgG) et synthèse active d'IgM par le nouveau-né. Cependant une recherche des IgM négative à la naissance n'exclut pas le diagnostic de syphilis congénitale car la mère a pu être contaminée tardivement au cours de la grossesse. (4)

10- Interprétation des résultats TPHA et VDRL :

Interpréter un sérodiagnostic tréponémiques est facile si l'on respecte le schéma suivant. On commence par le résultat du TPHA :

❖ Un TPHA positif (+++) signifie que le patient a contracté une tréponématose (Syphilis ou tréponématose endémique non vénérienne). On s'intéresse alors au VDRL dont la positivité et le titre donnent une idée de l'évolutivité de la maladie (cf. supra

❖ Un TPHA négatif (0) signifie que le sujet n'a pas contracté de tréponématose ou qu'il en est guéri. Le VDRL est alors lui-même négatif. Si le VDRL est positif, c'est qu'il s'agit d'une fausse sérologie tréponémique, comme on le voit au cours du syndrome des anticorps anti phospholipides primaire ou secondaire (lupus) (Tableau 2) ;

La seule exception à cette démarche s'observe dans les sept premiers jours du chancre où les 2 tests (TPHA et VDRL) peuvent être négatifs (intérêt du FTA). (3)

11-traitement de la syphilis :

La maladie est accessible, jusqu'en phase latente, à des traitements simples, efficaces et correctement tolérés.

En 2007, le principal traitement reste la pénicilline G, utilisée sous une forme retard en injection par voie intramusculaire. Des alternatives thérapeutiques et des possibilités de désensibilisation existent en cas d'allergie. L'efficacité du traitement est très élevée même si des cas de rechute, non quantifiables et difficiles à distinguer d'une recontamination, sont possibles et justifient un suivi sérologique prolongé. Les recommandations récentes concernant le traitement et le suivi de la syphilis.

Quelle que soit la modalité thérapeutique choisie, le coût du traitement est très faible. (5)

❖ **Syphilis primaire :** 1 seule injection intramusculaire de benzathinepénicilline.

En cas d'allergie, macrolides ou cyclines pendant 15 jours par voie orale.

❖ **Syphilis secondaire :** 3 injections intramusculaire à une semaine d'intervalle de benzathinepénicilline.

En cas d'allergie, macrolides ou cyclines pendant 15 jours par voie orale.

❖ **Syphilis tertiaire :** pénicilline G par voie intraveineuse pendant 15 jours.

En cas d'allergie à la pénicilline chez un patient ayant une syphilis primo-secondaire, on peut (sauf chez la femme enceinte) remplacer la ou les injections de benzathine pénicilline G par une ou des cures de cyclines. Chaque cure dure deux semaines. Elle utilise soit la tétracycline, soit la doxycycline.

12-Cinétique des anticorps :

CINETIQUE DES ANTICORPS AU COURS DE LA SYPHILIS

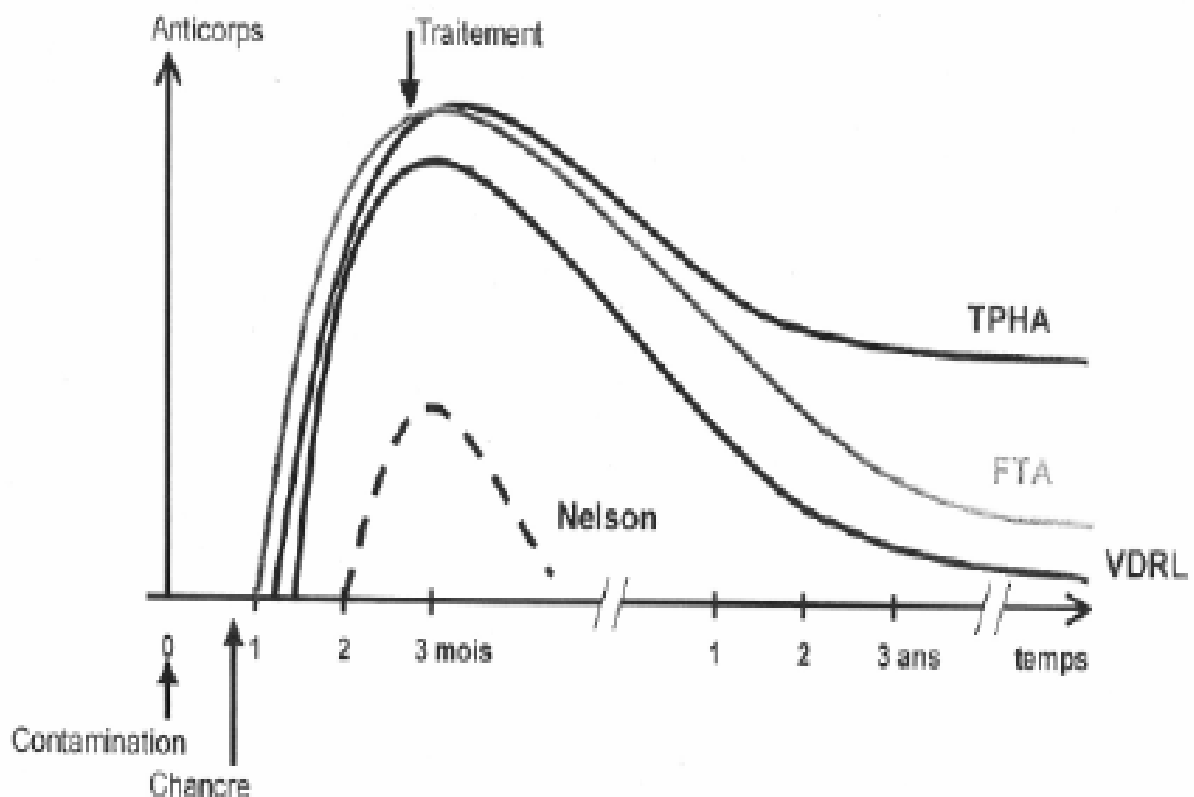


Figure : Evolution des anticorps au cour de la syphilis (13)

- Le VDRL se positive en moyenne 10 à 15 jours après l'apparition du chancre. Le titre augmente ensuite rapidement pour atteindre, durant la phase secondaire, un plateau situé entre 256 U et 1024 U.

La surveillance biologique de l'efficacité du traitement se fait sur le VDRL quantitatif. On considère que le traitement est efficace quand le titre du VDRL, 3 mois après le traitement est divisés par 4, et 6 mois après le traitement est divisés par 16. En l'absence d'une décroissance de ce type, le traitement doit être repris ; inversement, une recontamination syphilitique (la syphilis n'étant pas immunisante) est diagnostiquée sur la remontée significative du VDRL quantitatif (titre multiplié au moins par 4). (13)

Tableau : « Fausses sérologies de la syphilis » (causes non tréponémiques d'une positivité du VDRL

- Le TPHA se positive autour des 8^{ème}-10^{ème} jours du chancre. Il atteint rapidement +++ et, en l'absence du traitement, restera à +++ jusqu'à la fin de la vie. Après un

traitement bien conduit, le TPHA ne se négative, et encore inconstamment, que si celui-ci a été institué dans l'année qui suit le chancre d'inoculation. Au-delà de ce délai, le TPHA restera positif.

Le TPHA quantitatif n'est un bon marqueur ni de l'évolutivité de la maladie, ni de la réponse au traitement, seul le TPHA qualitatif (0 à ++++) est intéressant par sa positivité ou sa négativité. (13)

- FTA se positive vers le 5e jour du chancre. C'est donc le premier test à se positiver, quelques jours avant le VDRL et le TPHA.

En l'absence de traitement, le FTA reste positif à un titre élevé tout au long de la phase primo-secondaire.

13-Prophylaxie :

Application des mesures d'hygiène individuelle: éviction de situations à risque, port du préservatif).

La prophylaxie sociale repose sur le dépistage systématique (examens sérologiques prénuptiaux, prénataux, en cas de conduite à risque, etc.), le traitement précoce des sujets porteurs de lésions contagieuses et la recherche et le traitement du sujet contaminateur.

Pour éviter d'être infecté, il faut :

Avoir un préservatif lors des rapports sexuels ; s'assurer, lors de quelconques traitements, d'utiliser des objets stérilisés ; pour éviter qu'un enfant ait la maladie de sa mère, ne pas faire d'enfants si la mère est infectée.

1- Introduction :

L'objectif de ce stage est de faire une comparaison entre le diagnostic de la syphilis réalisé par un automate : ARCHITECT i System et deux tests manuels : le test VDRL et le test TPHA

2- Lieu de stage :

Mon stage a été réalisé au CHU HASSAN II dans le Laboratoire Central d'Analyses Médicales au sein de l'unité immuno-sérologie.

3- La population étudiée :

Les patients étudiés comprennent des personnes qui ont effectué des prélèvements dans le laboratoire central ou dans les différents services du CHU HASSAN II

4- Techniques de diagnostic :

Le diagnostic de la syphilis est réalisé par un automate ARCHITECT i System et par deux tests manuels qui sont : le test VDRL et le test TPHA

4-1- Diagnostic de la syphilis par automate ARCHITECT :

❖ ARCHITECT Syphilis TP:

C'est un dosage immunologique microparticulaire par chimiluminescence (CMIA) pour la détection qualitative de l'anticorps dirigé contre le *Treponema pallidum* (TP) dans le sérum et le plasma humain

4-1-1- Principe:

ARCHITECT Syphilis TP est un dosage immunologique en deux étapes pour la détection qualitative des anticorps anti- TP dans le sérum ou le plasma humain utilisant la technologie de dosage immunologique microparticulaire par chimiluminescence (CMIA) avec des protocoles de dosage flexibles, appelés Chemiflex.

Dans un premier temps, l'échantillon, les microparticules recouvertes d'antigènes TP recombinants et le diluant de dosage sont mis en présence. Les anticorps anti- TP présents dans l'échantillon se lient aux microparticules recouvertes de TP.

Après lavage, le conjugué d'anticorps anti- IgG et anti- IgM humains marqué à l'acridinium est ajouté dans un second temps.

Après un autre cycle de lavage, les solutions de pré activation et d'activation sont ajoutées au mélange réactionnel.

La réaction chimiluminescence qui en résulte est mesurée en unité relative de lumière (URL). Il existe une relation directe entre la quantité d'anticorps anti-TP présent dans l'échantillon et le nombre d'URL détecté par le système optique ARCHITECT i.

La présence ou l'absence d'anticorps anti-TP dans l'échantillon est déterminée en comparant le signal chimiluminescent dans la réaction au signal de la valeur seuil déterminé lors d'une calibration ARCHITECT Syphilis TP antérieure.

Si le signal chimiluminescent de l'échantillon est supérieur ou égal au signal de la valeur seuil, l'échantillon est considéré comme réactif pour les anticorps anti-TP.



Image de l'ARCHITECT i 2000 SR (Abbott)

4-1-2-Réactifs (commercialisés par Abbott laboratoires) :

- Microparticules : 1 flacon (6.6 ml pour le flacon 100 tests / 27.0 ml pour le flacon 500 tests) de microparticules recouvertes d'antigènes TP (E. coli, recombinants) dans du tampon MES.
- Conjugate : 1 flacon (5.9 ml pour le flacon 100 tests / 26.3 ml pour le flacon 500 tests) de conjuguée d'anticorps anti- IgG/anti- IgM humaines marquée à l'acridinium
- Assay diluant : 1 flacon (10 ml pour le flacon de 100 tests/ 52.2 ml pour le flacon de 500 tests) de diluant de dosage de syphilis TP

4-1-3- Fonctionnement de l'appareil :

- Avant d'effectuer le dosage, le fichier du dosage ARCHITECT Syphilis TP doit être installé sur l'ARCHITECT i system à partir de l'ARCHITECT i Assay CD-ROM (addition C).

4-1-4- Procédure du dosage :

- Avant de charger l'ARCHITECT Syphilis TP Reagent Kit sur l'analyseur pour la première fois, le flacon de microparticules doit être homogénéisé afin de

remettre en suspension les microparticules qui se sont déposées pendant le transport.

- Retourner le flacon de microparticules 30 fois
 - Examiner le flacon pour s'assurer que les microparticules sont remises en suspension.
 - placer un septum sur le flacon
- Charger l'ARCHITECT Syphilis TP Reagent Kit sur l'ARCHITECT i system
- Vérifier que tous les réactifs nécessaires à la réalisation du dosage sont présents
 - S'assurer que chaque flacon de réactif est muni d'un septum
 - Si nécessaire programmer une calibration
 - Programmer les analyses
 - Le volume minimum nécessaire requis dans le godet- échantillon est calculé par le système et imprimé sur le rapport liste des demandes
 - 150µl pour le premier dosage ARCHITECT Syphilis TP plus 30µl pour chaque dosage supplémentaire
 - En cas d'utilisation de tubes primaires ou aliquots, utiliser la jauge échantillon afin de s'assurer que le volume du sérum est suffisant
 - Préparer le calibrateur et les contrôles
 - Charger les échantillons
 - Appuyer sur la touche LANCER

4-1-5- Calibration :

- ❖ Pour effectuer une calibration ARCHITECT Syphilis TP, analyser le calibrateur 1 en réplique de 3. Un échantillon de chaque contrôle ARCHITECT Syphilis TP doit ensuite être analysé afin de pouvoir évaluer la calibration du dosage.
S'assurer que les valeurs des contrôles du dosage se trouvent dans les limites S/CO spécifiées dans la notice des contrôles. Le calibrateur 1 doit être chargé en position prioritaire
Lorsque la calibration du dosage ARCHITECT Syphilis est acceptée et mémorisée, tous les échantillons qui suivent peuvent être analysés sans effectuer

une nouvelle calibration, sauf si un Kit de réactifs portant un nouveau numéro de lot est utilisé, ou la valeur des contrôles se situe en dehors des limites spécifiées.

4-1-6- Résultats :

L'ARCHITECT i system calcule la valeur seuil (CO) à l'aide du signal chimiluminescent moyen (URL) de 3 répliques du calibrateur 1 et mémorise le résultat

❖ Calculs :

Le dosage ARCHITECT Syphilis TP calcule un résultat à partir de la valeur seuil déterminée par le calcul suivant :

- La valeur seuil (CO) = moyenne des URL du calibrateur 1×0.20
- $S/CO = \text{URL de l'échantillon} / \text{valeur URL seuil}$
- La valeur URL seuil est mémorisée pour chaque calibration de lot de réactifs.

4-1-7- Interprétation :

- Les échantillons dont la valeur S/CO est inférieure à 1.0 sont considérés comme non réactif par le dosage ARCHITECT syphilis TP
- Les échantillons dont la valeur S/CO est supérieure à 1.0 sont considérés comme réactif par le dosage ARCHITECT syphilis TP

4-2- Deux tests manuels V.D.R.L et TPHA

4-2-1- Test Venereal Disease Research Laboratory charbon:

Test d'agglutination rapide sur lame pour la sérologie de la syphilis

a- Principe :

Un antigène cardiolipidique est adsorbé sur des particules de charbon actif. La présence de réagines (anticorps tréponémiques) dans le sérum ou le plasma des patients atteints de la syphilis, provoque l'agglutination des particules de charbon et donne un aspect granité à la suspension étalée sur lame. L'absence de ces réagines se traduit par l'aspect gris homogène de la suspension.

Ce test est rapide, il demande 8 minutes pour être lue. Il ne nécessite pas de matériel sophistiqué pour être pratiqué, par contre la lecture de ce test est délicate et les tests nécessitent une habitude d'agglutinations.

b- Réactif de la VDRL (fournisseur : DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE S.A) :

Composition des coffrets

Antigène V.D.R.L. charbon

Témoin positif

Témoin négatif

Cartes de réactions

Bâtonnets d'agitation

c- Matériel utilisé :

- | | |
|---|---|
| ✓ | Centrifugeuse de paillasse de petite capacité |
| ✓ | Microscope optique binoculaire |
| ✓ | Micropipette réglable (5-50µl) |
| ✓ | Embouts pour micropipette |
| ✓ | Portoir des flacons |
| ✓ | Plaque en verre de type Kline |
| ✓ | Agitateur rotatif |

d- Méthode :

Il faut d'abord s'assurer avant emploi que les réactifs et les échantillons sont à la température ambiante.

1 - Qualitatif :

- Mettre une goutte (50 µl) d'échantillon à tester dans le cercle n°1 de la plaque.
- Mettre une goutte de témoin positif et négatif dans deux autres cercles de cette même plaque.
- Etaler ces gouttes sur toute la surface interne de chaque cercle de la plaque.
- Bien agiter pour homogénéiser le réactif antigène V.D.R.L. charbon.
- Pipeter 16 µl de l'antigène V.D.R.L. charbon et mettre cette goutte au centre des gouttes précédemment étalées dans la plaque.
- Agiter à l'agitateur automatique pendant 8 minutes à 100 tours/minutes.

Immédiatement après la fin des 8 minutes, observer le résultat au microscope au grossissement $\times 100$.

e- Lectures des résultats :

- Résultats positifs : agglutination bien différenciée
- Résultats faiblement positifs : petits agrégats au périphérique du cercle.
- Résultats négatifs : répartition uniforme des particules non agglutinées en nuage homogène.

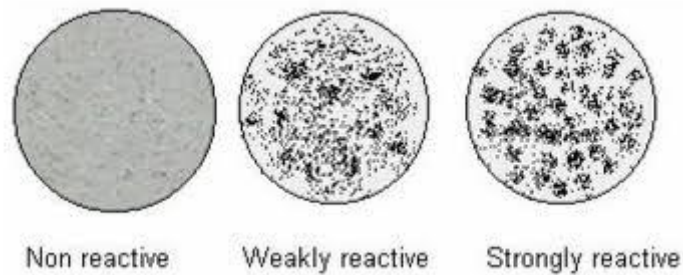


Photo des résultats obtenus

2- Quantitatif :

- Lorsque la réaction précédente est positive, on réalise le même protocole expérimental afin de déterminer le titre du prélèvement, mais cette fois avec une série de dilution (de raison 2) du sérum à tester dans du sérum physiologique (Na Cl à 0.9%).
- Les dilutions sont donc de $1/2$; $1/4$; $1/8$; $1/16$; $1/32$; $1/64$; $1/128$; $1/256$ et $1/1024$
- Mettre dans chaque cercle 50 μ l du sérum à tester.
- Dans le cercle n°1, ajouter 50 μ l du sérum à tester et homogénéiser.
- Reporter 50 μ l du sérum du cercle n°1, la mettre dans le puit n°2, et homogénéiser.
- Reporter 50 μ l du sérum du puit n°2, la mettre dans le cercle n°3, et homogénéiser.
- bien agiter pour homogénéiser le réactif charbon
- Pipeter 16 μ l de l'antigène V.D.R.L. charbon et mettre cette goutte au centre des gouttes précédemment étalées dans la plaque.

- Mettre la plaque sur l'agitateur rotatif pendant 8 minutes à 100 tours/minutes.
- Lire immédiatement le résultat au microscope au grossissement $\times 100$.



Résultats :

- Le titre est exprimé par la dilution la plus élevée donnant une réaction positive nette

4-2-2 - Test Treponema Pallidum Hemagglutinations Assay :

Test de dépistage sérologique de la syphilis par hémagglutination indirecte qualitatif et / ou quantitatif.

a-Principe du test :

Le coffret TPHA détecte les anticorps sériques humains anti- *T. pallidum* par une méthode d'Hémagglutination indirecte (HAI). Des hématies aviaires sont sensibilisées avec des composants antigéniques de *T. pallidum* (souche de Nichol). En présence d'anticorps spécifiques anti- *T. pallidum*, les hématies sensibilisées (cellules tests) s'agglutinent et présentent un aspect caractéristique (présence d'un voile) dans les puits de microtitration. Les éventuelles réactions non spécifiques sont détectées par l'utilisation de cellules de contrôle, qui sont des hématies aviaires non sensibilisées.

b- Matériel :

- ✓ Centrifugeuse de paillasse
- ✓ Micropipette réglable de (5-50 μ l)
- ✓ Micropipette réglable de (50-200 μ l)
- ✓ Les cônes pour les micropipettes
- ✓ Portoir de flacons
- ✓ Plaque de microtitration à fond en U

c- Réactifs (fournisseur : VEDLAB)

- ✓ Flacon de cellules test : hématies aviaires sensibilisées avec de l'antigène tréponémique.
- ✓ Flacon de cellules de contrôles : hématies non sensibilisées
- ✓ Flacon de Tampon de dilution
- ✓ Le kit de doit être stocké en position horizontale et conservé entre +2° C et 8° C.

d- Méthode :

Le test TPHA comporte une technique qualitative et une technique quantitative.

1-Mode opératoire du test qualitatif :

- ✓ Il faut d'abord s'assurer que les cellules test et contrôle sont parfaitement mélangées
- ✓ Dans le puit n° 1, réaliser la dilution de 1/20 pour cela :
- ✓ Déposer 190 µl du tampon de dilution
- ✓ Ajouter 10 µl de sérum et mélanger
- ✓ A l'aide de la pipette, déposer 25 µl de sérum dilué dans les puits n°2 et n°3
- ✓ Déposer 75 µl de cellules contrôle dans le puit n°2
- ✓ Déposer 75 µl de cellules test dans le puit n°3
- ✓ Agiter doucement la plaque pour bien mélanger les réactifs
- ✓ Incuber 45 à 60 minutes à température ambiante

Lecture des résultats :

- ✓ Un résultat positif se caractérise par un voile d'hémagglutination
- ✓ Un échantillon ou un contrôle négatif entraîne la sédimentation des hématies sous la forme d'un bouton
- ✓ Si ces deux conditions ne sont pas remplies le test doit être considéré comme non valide et recommence

Le contrôle cut-off doit présenter un aspect d'hémagglutination (voile) et de sédimentation. Il permet d'identifier les cas douteux (résultats indéterminés). Ces cas correspondent à un faible niveau d'anticorps, en cas de syphilis primaire précoce ou anciennement traités. Un échantillon présentant cet aspect doit être retesté qualitativement. Un prélèvement ultérieur devra être pour déterminer si le titre augmente. Il est aussi conseillé de réaliser un test de détection de Réagines et/ou un test de confirmation

Une hémagglutination dans le puit contrôle indique la présence d'agglutinines non spécifiques dans l'échantillon, le test doit être considéré comme non valide. Un sérum qui présente ce type d'image peut absorber en utilisant les cellules de contrôle (absorption non spécifique)

e- Adsorption non spécifique :

- ✓ Déposer 100 µl de sérum test dans un tube et ajouter 400 µl de cellules contrôle. Bien mélanger et laisser reposer une heure à température ambiante.
- ✓ Centrifuger à 1000 t/mn pendant 5 minutes et tester le surnageant par la technique utilisée pour le test qualitatif

2- Mode opératoire du test quantitatif :

- Chaque échantillon est testé sur 8 puits
- Déposer 25 µl de tampon de dilution dans les 8 puits
- Transférer 25 µl dilué 1/20 dans le puit n°1
- Mélanger l'échantillon et le tampon de dilution dans le puit n°1 et diluer en série jusqu'au puit n°8. Eliminer l'excédent des 25 µl du dernier puit

- S'assurer que les cellules tests sont parfaitement resuspendues. Déposer 75 µl de cellules tes dans les puits
- Agiter doucement la plaque pour mélanger parfaitement les réactifs
- Incuber 45 à 60 minutes à température ambiante

❖ **Résultats :**

- Le titre d'anticorps est exprimé par l'inverse de la plus haute dilution donnant encore une réaction positive.



Image des résultats obtenus après le test TPHA qualitatif

Discussion

Pour le test automatisé dépisté par l'automate ARCHITEC, on peut avoir des faux positifs. La proportion de ces échantillons faussement réactifs dépend de :

- La spécificité du kit de dosage, de l'intégrité des échantillons et des caractéristiques de la population locale analysée.
- Si les résultats du dosage ARCHITECT Syphilis TP ne correspondent pas à l'observation clinique, il est recommandé d'effectuer un dosage supplémentaire afin de confirmer le résultat.
- Aucune méthode de diagnostic ne peut garantir de façon absolue qu'un échantillon ne contient pas de faibles concentrations d'anticorps anti TP, telles que celles présentes au

tout début de l'infection. Par conséquent, un résultat négatif à un moment donné n'exclut pas la possibilité d'une infection par la syphilis

- Pour le test manuel TPHA qui est un test semi qualitatif :
- Les anticorps dus à la syphilis détectés par le test TPHA persistent après un traitement réussi. C'est pourquoi un test TPHA positif indique une infection passée ou présente.
- Le test TPHA ne peut pas faire une distinction entre la syphilis et d'autres infections tréponémiques pathogènes (Ex : Pian). Les signes cliniques doivent toujours être pris en considération pour l'interprétation des résultats.
- En confirmation, le test FTA-ABS doit être utilisé car il permet une différenciation entre les anticorps IgG et les IgM précoces.

Pour le test VDRL qui est un test qualitatif. Il est recommandé de l'utiliser pour le suivi du traitement.



La syphilis est une maladie infectieuse par la bactérie TP qui peut être transmise par voie congénitale ou lors de relations sexuelles. La maladie peut évoluer en phase latente au cours de laquelle la syphilis ne peut être détectée cliniquement. Les tests sérologiques (non tréponémiques et tréponémiques spécifiques) associés aux antécédents cliniques du patient constituent les principales méthodes actuellement disponibles pour le diagnostic et le traitement de la syphilis.

Chaque test à ces limites le dosage ARCHITECT syphilis TP peut fournir des résultats faussement positifs et nous donne un résultat

qualitatif alors que pour le suivi du traitement il est recommandé de réaliser un test quantitatif.