



L'utilisation de la technique d'amplification de *Treponema pallidum* dans le diagnostic des ulcères oro-génitaux liés à la syphilis

Angèle Ageron Gayet-Ageron

► To cite this version:

Angèle Ageron Gayet-Ageron. L'utilisation de la technique d'amplification de *Treponema pallidum* dans le diagnostic des ulcères oro-génitaux liés à la syphilis. Santé publique et épidémiologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA11T005 . tel-01123736

HAL Id: tel-01123736

<https://theses.hal.science/tel-01123736>

Submitted on 5 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 420 :

SANTÉ PUBLIQUE PARIS SUD 11, PARIS DESCARTES

Laboratoire : *Service d'épidémiologie clinique, Hôpitaux Universitaires de Genève*

THÈSE DE DOCTORAT

SANTÉ PUBLIQUE - RECHERCHE CLINIQUE

par

Angèle GAYET-AGERON

**L'UTILISATION DE LA TECHNIQUE D'AMPLIFICATION
DE *TREPONEMA PALLIDUM* DANS LE DIAGNOSTIC DES
ULCÈRES ORO-GÉNITAUX LIÉS À LA SYPHILIS**

Date de soutenance : 11/02/2015

Composition du Jury:

Monsieur le Professeur Joël COSTE (Université Paris-Descartes)	Président du Jury
Monsieur le Professeur Bernard BURNAND (Université de Lausanne)	Rapporteur
Madame la Professeure Geneviève CHENE (Université de Bordeaux)	Rapporteur
Monsieur le Professeur Nicolas DUPIN (Université Paris-Descartes)	Membre du Jury
Madame la Professeure Laurence MEYER (Université Paris-Sud)	Membre du Jury
Monsieur le Professeur Philippe VANHEMS (Université de Lyon)	Membre du Jury
Monsieur le Professeur Thomas PERNEGER (Université de Genève)	Directeur de thèse

Je dédie ma thèse à mon Père...



Tom. Morgan.

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements :

A mon directeur de thèse et mentor, le Professeur **Thomas Perneger**, sans qui ce travail n'aurait pu démarrer. Merci pour ton soutien constant dans mes différents projets au sein du service d'épidémiologie clinique de Genève, pour tes précieux conseils méthodologiques, ta disponibilité et ta grande confiance.

Au Professeur **Jean Bouyer** qui a accepté mon inscription à l'école doctorale 420 et qui a ainsi pu me permettre de réaliser ce projet de thèse.

Au Professeur **Joël Coste** qui m'honore d'accepter la présidence de mon jury de thèse.

Aux deux rapporteurs de la thèse,

- Au Professeur **Bernard Burnand** pour avoir « pris le risque » de juger cette thèse en qualité de rapporteur.
- Au Professeure **Geneviève Chêne** pour avoir accepté immédiatement le rôle de rapporteur de cette thèse. Merci aussi pour votre enseignement de qualité dans le cadre du Master en Santé Publique de l'ISPED que j'ai suivi en 2002-2003. Trouvez ici le témoignage de mon grand respect.

Aux membres de mon jury de thèse,

- Au Professeur **Philippe Vanhems**, qui me fait le grand plaisir de participer à mon jury de thèse, de critiquer mon travail sur un domaine qu'il connaît bien. Merci aussi à toi Philippe d'être à l'origine de mon arrivée à Genève il y a maintenant 10 ans !
- Aux Professeurs **Laurence Meyer** et **Nicolas Dupin** qui ont immédiatement accepté de juger mon travail. Soyez assurés de ma gratitude et de ma reconnaissance.

Je tiens aussi à adresser mes plus profonds remerciements :

Aux Docteurs **Patrice Sednaoui**, **Stephan Lautenschlager**, **Tristan Ferry**, **Matthias Cavassini**, **Laurence Toutous-Trellu**, **Begoña Martinez de Tejada**, **Jacques Schrenzel**, **Stéphane Emonet**, **Frédéric Laurent** et **Hélène Salord** ainsi qu'à Mesdames **Deolinda Alves**, **Gisela Jimenez-Getaz**, et **Manuela Tangomo** qui m'ont aidée à mettre en place l'étude clinique, à recruter les patients ou à réaliser les examens PCR.

A tous les membres du service d'Epidémiologie Clinique des Hôpitaux Universitaires de Genève, notamment à **Christophe Combescure** pour ses conseils statistiques avisés et à **Sandrine Rudaz** pour ses relectures éclairées et son aide dans la finalisation du manuscrit.

Au Professeur **Bernard Hirschel** qui m'a accueillie dans son unité VIH en 2004 et qui m'a offert l'opportunité de travailler avec lui pour conduire notre première étude épidémiologique sur la syphilis en 2006. Ainsi qu'à la Docteure **Béatrice Ninet** avec laquelle j'ai travaillé dans cette étude et qui a toujours été de bons conseils dans mes différents projets de recherche.

Au Professeur **Didier Pittet** pour son soutien professionnel et sa confiance ainsi qu'au Professeur **Stephan Harbarth**.

Je remercie également chaleureusement **Audrey Bourgeois** qui est une interlocutrice précieuse et réactive de l'école doctorale 420 avec laquelle j'ai eu plaisir à échanger et qui a toujours répondu rapidement à mes nombreuses questions administratives !

A mes collègues du service de Prévention et Contrôle de l'Infection (**Caroline Landelle** pour son écoute, ses nombreux conseils et pour avoir pris le temps de relire une grande partie de ma thèse, **Rosemary Sudan** pour son immense et précieux travail d'*editing* pour mes différents papiers, ainsi qu'**Andrew**, **Anne** et **Benedetta**).

Pour finir, je tiens à adresser mes plus tendres remerciements :

A **Maman** qui est mon roc et ma précieuse conseillère.

A mes frères adorés **Albéric-Rembrandt** et **Ambroise-Edouard** ainsi qu'à Pauline, Côme et Sylvie.

A ma grand-mère **Jeanne Gayet** ainsi qu'à toute ma famille.

A mes amis : Malek pour les coups de pouce de dernières minutes, Sarra, Véronique et Dominique ; Caroline, Sylvie et Didier, Marlène et Jian-Hui, Sabine et Thierry, Laura et Anthony, Marion et Guillaume, Sylvaine, Laetitia et Alexandre, David, Zahia, Emmanuelle, Eric, Sylvain, Chaynesse et Nicolas, Fanja et Rachel.

Et finalement, je tiens surtout à remercier de tout mon cœur mes plus précieux soutiens... :

François-Xavier et **Hippolyte** : vous êtes ma grande force !

RÉSUMÉ

L'UTILISATION DE LA TECHNIQUE D'AMPLIFICATION DE *TREPONEMA PALLIDUM* DANS LE DIAGNOSTIC DES ULCÈRES ORO-GÉNITAUX LIÉS À LA SYPHILIS

CONTEXTE

La syphilis est une maladie ré-émergente depuis 2000. Son traitement est simple, mais son diagnostic est complexe. La technique d'amplification génique de *Treponema pallidum* (*Tp*-PCR) existe depuis 1990 mais le CDC l'a incluse dans sa définition de cas en janvier 2014.

OBJECTIFS

1) Evaluer la performance diagnostique de la *Tp*-PCR à différents stades cliniques et milieux biologiques. 2) Mesurer la sensibilité, spécificité et les valeurs prédictives de la *Tp*-PCR en fonction de 3 groupes de référence dans des ulcères récents. 3) Comparer les performances des 2 principales cibles de *Tp*-PCR.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Premièrement, une revue systématique et méta-analyse des études publiées depuis 1990 ont été menées. Ensuite une étude multicentrique prospective a été conduite dans 5 villes européennes pendant 2 ans chez des patients avec un ulcère oro-génital. Tous ont reçu le test de référence local et 2 *Tp*-PCRs dans l'ulcère (gène *tpp47* vs. *polA*). Les valeurs de sensibilité, spécificité et valeurs prédictives de la *Tp*-PCR ont été calculées comparativement au fond noir (FN), à la sérologie et à un *gold standard* amélioré. La concordance des 2 cibles a été évaluée par un coefficient kappa.

RÉSULTATS PRINCIPAUX

La méta-analyse conclut que la *Tp*-PCR a une meilleure performance dans les ulcères récents. L'étude clinique montre que la *Tp*-PCR décrit une meilleure performance comparativement au *gold standard* amélioré et a même une meilleure sensibilité que le FN. Les 2 cibles ont la même valeur diagnostique et une concordance quasi parfaite.

CONCLUSIONS

La *Tp*-PCR ciblant *tpp47* ou *polA* est cliniquement utile pour diagnostiquer une syphilis primaire et pourrait même remplacer le FN sous certaines conditions.

SUMMARY

CLINICAL USEFULNESS OF POLYMERASE CHAIN REACTION TARGETING *TREPONEMA PALLIDUM* IN THE DIAGNOSIS OF PRIMARY SYPHILIS ULCERS

BACKGROUND

Syphilis has re-emerged in at-risk populations since 2000. Although the treatment of syphilis is simple, its diagnosis remains challenging. *Treponema pallidum* Polymerase Chain Reaction (*Tp*-PCR) has been used in the diagnosis of syphilis since 1990 but it is included in the case definition of the CDC since January 2014.

OBJECTIVES

1) To assess the accuracy of *Tp*-PCR in various biological specimens and syphilis stages. 2) To measure its diagnostic performance (sensitivity, specificity and predictive values) in ulcers from early syphilis compared to three groups of reference. 3) To compare the accuracy of the two most currently used targets: *tpp47* and *polA* genes.

METHODS

We conducted a systematic review and meta-analysis of all studies published from 1990. We implemented a multicentre, prospective, observational study in 5 European cities between 09/2011 and 09/2013 among patients with an oral or genital ulcer suggestive of syphilis. All patients were tested with traditional reference tests plus 2 *Tp*-PCRs (*tpp47* and *polA*). We estimated the sensitivity, specificity and predictive values of *Tp*-PCR compared to darkfield microscopy (DFM), serology and an enhanced *gold standard*. We used the kappa coefficient to assess the agreement between the 2 targets.

MAIN RESULTS

Tp-PCR had the best accuracy in ulcers from early syphilis. *Tp*-PCR performed better when compared to the enhanced *gold standard* and had a higher sensitivity than DFM. The 2 *Tp*-PCRs had a similar accuracy and an almost perfect agreement.

CONCLUSIONS

Tp-PCR targeting either *tpp47* or *polA* is clinically useful to confirm an early syphilis in smears and could even replace DFM under specific conditions.

MOTS CLÉS

Syphilis; Treponema pallidum; technique d'amplification génique ; performance diagnostique ; utilité clinique ; revue systématique ; méta-analyse de tests diagnostiques ; sensibilité ; spécificité ; rapport de vraisemblance positif ; rapport de vraisemblance négatif ; valeur prédictive positive ; valeur prédictive négative ; gène tpp47; ADN polymérase I

KEY WORDS

Syphilis; Treponema pallidum; Polymerase Chain Reaction; diagnostic performance; accuracy; clinical usefulness; systematic review; meta-analysis on diagnostic test accuracy; sensitivity; specificity; positive likelihood ratio; negative likelihood ratio; positive predictive value; negative predictive value; tpp47 gene; polymerase I, DNA

LABORATOIRE D'ACCUEIL

Service d'Epidémiologie Clinique
Professeur Thomas PERNEGER
Hôpitaux Universitaires de Genève
4, Rue Gabrielle Perret-Gentil
CH-1211 Genève 14

Publications indexées dans MEDLINE

- **Gavet-Ageron A**, Ninet B, Toutous-Trellu L, Lautenschlager S, Furrer H, Piguet V, Schrenzel J, Hirschel B.
Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. *Sex Transm Inf* 2009;85(4):264-9.
- **Gavet-Ageron A**, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger T, Combescure C.
Sensitivity, specificity, and likelihood ratios of polymerase chain reaction in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Inf* 2013; 89(3):251-6.
- **Gavet-Ageron A**, Sednaoui P, Lautenschlager S, Ferry T, Toutous-Trellu L, Cavassini M, Yassir F, Martinez de Tejada B, Emonet S, Combescure C, Schrenzel J, Perneger T.
Use of *Treponema pallidum* PCR in testing of ulcers for diagnosis of primary syphilis. *Em Inf Inf* 2015;21(1): 127-129.
- **Gavet-Ageron A**, Laurent F, Schrenzel J, Charton B, Jimenez-Getaz G, Tangomo M, Ferry T, Sednaoui P, Lautenschlager S, Toutous-Trellu L, Martinez de Tejada B, Cavassini M, Emonet S, Perneger T, Salord H.
Performance of the 47kDa protein membrane versus DNA polymerase I genes for detection of *Treponema pallidum* by Polymerase Chain Reaction in ulcers *J Clin Microbiol* posted online 17 December 2014. doi: 10.1128/JCM.03444-14.
- **Gavet-Ageron A**, Combescure C, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger T.
The diagnostic performance of Polymerase Chain Reaction targeting the 47kDa protein membrane gene of *Treponema pallidum* in ulcers or the DNA polymerase I gene are identical. Results from a systematic review and meta-analysis. *En cours de préparation*.

Présentations avec comité de sélection

- **Gavet-Ageron A**, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger T, Combescure C.
Diagnostic accuracy of molecular biology in the diagnosis of syphilis: a meta-analysis. *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 7-10 May 2011; Milan, Italy [Poster]
- **Gavet-Ageron A**, Emonet S, Salord H, Getaz-Jimenez G, Tangomo M, Jan I, Schrenzel J et le groupe *Tp*-PCR.
L'utilisation de la technique d'amplification de *Treponema pallidum* par Polymerase Chain Reaction (PCR) dans le diagnostic des ulcères oro-génitaux et son rôle dans l'évaluation de la réponse thérapeutique. *6ème Journée de l'Innovation des Hôpitaux Universitaires de Genève et de l'Université de Genève, Faculté de Médecine*, 11 Octobre 2012; Genève, Suisse [Poster et présentation orale]
- **Gavet-Ageron A**, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger T, Combescure C.
Sensitivity, specificity, and likelihood ratios of Polymerase Chain Reaction in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. *6ème Journée de la Recherche Clinique du Centre de Recherche Clinique des Hôpitaux Universitaires de Genève et de l'Université de Genève, Faculté de Médecine*, 16 Mai 2013; Genève, Suisse [Poster]
- **Gavet-Ageron A**, Sednaoui P, Ferry T, Toutous-Trellu L, Lautenschlager S, Cavassini M, Alves D, Emonet S, Schrenzel J, Perneger T.
Diagnostic accuracy of polymerase chain reaction targeting *Treponema pallidum* in ulcers. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 9-13 September 2013; Denver, USA [Poster]
- **Gavet-Ageron A**, Charton B, Sednaoui P, Getaz-Jimenez G, Tangomo M, Ferry T, Lautenschlager S, Cavassini M, Perneger T, Salord H.
Detection of *Treponema pallidum* by Polymerase Chain Reaction in ulcers: what is the best target? *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10-13 May 2014, Barcelona, Spain [Poster]

Présentations orales invitées

- **Gayet-Ageron A.**

Performance diagnostique de l'amplification de *Treponema pallidum* par PCR dans le diagnostic de syphilis. Résultats d'une méta-analyse. *Colloque d'épidémiologie et de biostatistiques du service d'épidémiologie clinique* des Hôpitaux Universitaires de Genève (Genève, 2 Novembre 2010).

- **Gayet-Ageron A.**, Sednaoui P, Ferry T, Toutous-Trellu L, Martinez-de-Tejada B, Cavassini M, Lautenschlager S, Oria F, Alves D, Trigona B, Nikolic N, Wassilew N, Vu DL, Tangomo M, Getaz-Jimenez G, Candolfi B, Jan I, Salord H, Emonet S, Schrenzel J, Perneger T.

The use of *Treponema pallidum* amplification by Polymerase Chain Reaction in the diagnosis of genito-oral ulcers and the follow-up of the therapeutic response: study presentation and preliminary results. *Host-pathogen retreat* (Crans-Montana, 1 Mars 2013).

- **Gayet-Ageron A.**

Influence du choix du *gold standard* dans l'évaluation d'un nouveau test diagnostique. Exemple du diagnostic de la syphilis. *Colloque d'épidémiologie et de biostatistiques du service d'épidémiologie clinique* des Hôpitaux Universitaires de Genève (Genève, 11 Novembre 2013).

- **Gayet-Ageron A.**

Influence du choix du *gold standard* dans l'évaluation d'un nouveau test diagnostique. Exemple du diagnostic de la syphilis. *Colloque du service des Maladies Infectieuses* des Hôpitaux Universitaires de Genève (Genève, 10 Décembre 2013).

- **Gayet-Ageron A.**

La PCR-syphilis, le nouvel outil diagnostique de choix pour confirmer un ulcère de syphilis précoce ? Résultats de l'étude prospective multicentrique *Tp-PCR*. *Colloque bimensuel du service de Dermatologie* des Hôpitaux Universitaires de Genève (Genève, 2 Octobre 2014).

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	29
LISTE DES TABLEAUX	31
LISTE DES FIGURES.....	35
I INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	37
I.1 Problématique.....	37
I.2 Hypothèses de recherche.....	39
II Objectifs de la thèse.....	41
III ETAT DES LIEUX DE L'ÉPIDÉMIE DE SYPHILIS EN SUISSE ET EN FRANCE	43
III.1 Introduction	43
III.2 Sources d'information sur les données épidémiologiques	44
III.2.1 En Suisse.....	44
III.2.2 En France	45
III.3 Méthodes diagnostiques employées.....	46
III.3.1 En Suisse.....	46
III.3.2 En France	46
III.4 Etat des lieux de l'épidémie de syphilis	46
III.4.1 En Suisse.....	46
III.4.2 En France	48
III.5 Synthèse de l'état des lieux de l'épidémie de syphilis.....	53
III.5.1 En Suisse.....	53
III.5.2 En France	53
III.5.3 Limitations méthodologiques soulevées par ces sources d'information	54

IV	REVUE SYSTÉMATIQUE ET MÉTA-ANALYSE DES DONNÉES PUBLIÉES SUR LES PERFORMANCES DIAGNOSTIQUES DE LA PCR DANS LE DIAGNOSTIC DE SYPHILIS.....	55
IV.1	Résumé.....	55
IV.2	Introduction	56
IV.3	Objectifs.....	56
IV.4	Matériel et méthodes	57
IV.4.1	Design de l'étude.....	57
IV.4.2	Critères d'éligibilité des études sélectionnées	57
IV.4.3	Sources d'information et stratégie de recherche	57
<i>IV.4.3.1</i>	<i>Sources d'information.....</i>	<i>57</i>
<i>IV.4.3.2</i>	<i>Stratégie de recherche des études</i>	<i>58</i>
<i>IV.4.3.3</i>	<i>Sélection des études.....</i>	<i>58</i>
IV.4.4	Evaluation de la qualité des études sélectionnées	59
IV.4.5	Procédures d'extraction des données.....	59
IV.4.6	Analyses des données.....	60
<i>IV.4.6.1</i>	<i>Sous groupes d'analyse.....</i>	<i>60</i>
<i>IV.4.6.2</i>	<i>Estimations de la sensibilité, spécificité et rapports de vraisemblance positif et négatif poolés</i>	<i>61</i>
<i>IV.4.6.3</i>	<i>Exploration de l'hétérogénéité des résultats entre les études.....</i>	<i>62</i>
<i>IV.4.6.4</i>	<i>Exploration du biais de publication dans l'étude</i>	<i>62</i>
IV.5	Résultats	63
IV.5.1	Description des 69 études sélectionnées	64
IV.5.2	Evaluation de la qualité des études sélectionnées	77
IV.5.3	Estimations des sensibilités, spécificités et rapports de vraisemblance <i>poolés</i> de la <i>Tp</i>-PCR comparée aux tests de référence, selon le stade de syphilis et le spécimen biologique testé : résultats de la méta-analyse.....	79

IV.5.4	Utilité diagnostique de la <i>Tp</i> -PCR.....	87
IV.5.5	Etude des facteurs d'hétérogénéité	88
IV.5.6	Biais de publication	96
IV.6	Discussion	99
IV.6.1	Comparaison des résultats de l'étude avec la littérature scientifique	99
IV.6.2	Utilité clinique de la <i>Tp</i> -PCR.....	100
IV.6.3	Limitations de l'étude.....	101
IV.7	Conclusion	102
V	PERFORMANCES DIAGNOSTIQUES DE LA PCR CIBLANT <i>TREPONEMA PALLIDUM</i> DANS LE DIAGNOSTIC DES MALADIES ULCÉRATIVES SEXUELLEMENT TRANSMISES	103
V.1	Résumé.....	103
V.2	Introduction	105
V.3	Objectifs.....	107
V.4	Matériel et méthodes	107
V.4.1	Design de l'étude.....	107
V.4.2	Population d'étude et centres médicaux impliqués	107
V.4.3	Définition de la syphilis précoce	108
V.4.4	Technique d'amplification génique <i>Tp</i> -PCR et définition du critère de jugement principal	110
V.4.5	Autres variables collectées	110
V.4.6	Calcul de taille d'échantillon	111
V.4.7	Analyses statistiques.....	111
V.5	Résultats	113
V.5.1	Description de la population d'étude.....	113
V.5.2	Performance diagnostique de la <i>Tp</i> -PCR comparée au fond noir	113
V.5.3	Performance diagnostique de la <i>Tp</i> -PCR comparée à la sérologie	116

V.5.4	Comparaison des performances diagnostiques de la <i>Tp</i> -PCR et de la sérologie vis-à-vis du fond noir	117
V.5.5	Utilisation d'un <i>gold standard</i> amélioré pour évaluer la performance diagnostique de la <i>Tp</i> -PCR.....	120
V.5.6	Suivi des patients traités pour la syphilis	121
V.6	Discussion	122
V.7	Conclusion	125
VI	COMPARAISON DES PERFORMANCES DIAGNOSTIQUES DE DEUX CIBLES DE POLYMERASE CHAIN REACTION (GENES <i>TPP47</i> ET <i>POLA</i>) DANS LE DIAGNOSTIC DES MALADIES ULCÉRATIVES SEXUELLEMENT TRANSMISES	127
VI.1	Résumé.....	127
VI.2	Introduction	129
VI.3	Objectifs.....	130
VI.4	Matériel et méthodes	130
VI.4.1	Design de l'étude.....	130
VI.4.2	Critères d'éligibilité des études sélectionnées	130
VI.4.3	Sources d'information et stratégie de recherche	131
VI.4.4	Participants et variables collectées.....	131
VI.4.4.1	Dans la revue systématique et la méta-analyse	131
VI.4.4.2	Dans l'étude observationnelle diagnostique prospective multicentrique	131
VI.4.5	Définition des cas de syphilis	131
VI.4.5.1	Dans la revue systématique et la méta-analyse	131
VI.4.5.2	Dans l'étude observationnelle diagnostique prospective multicentrique	132
VI.4.6	Evaluation de la qualité méthodologique des études sélectionnées dans la revue systématique	132
VI.4.7	Analyses statistiques.....	132
VI.4.7.1	Revue systématique	132

VI.4.7.2 Méta-analyse	133
VI.4.7.3 Concordance des résultats entre la cible <i>tpp47</i> et <i>polA</i>	134
VI.5 Résultats	135
VI.5.1 Description des études sélectionnées dans la revue systématique	135
VI.5.2 Evaluation de la qualité des études sélectionnées	138
VI.5.3 Estimations des sensibilités, spécificités et rapports de vraisemblance <i>poolés</i>	140
VI.5.4 Comparaison des performances diagnostiques des deux gènes ciblés par la <i>Tp</i> -PCR	143
VI.5.5 Recherche d'un biais de publication.....	147
VI.5.6 Concordance entre les résultats de la <i>Tp</i> -PCR ciblant le gène <i>tpp47</i> et ceux de la <i>Tp</i> -PCR ciblant le gène <i>polA</i>	148
VI.6 Discussion	150
VI.7 Conclusion	152
VII DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	153
VII.1 Vers un référencement standardisé et systématique des études diagnostiques ?	153
VII.2 Vers une hiérarchisation dans la présentation des méthodes de diagnostic direct de la syphilis primaire ?.....	154
VII.3 Comparabilité à confirmer de la performance diagnostique des deux cibles de <i>Tp</i> -PCR couramment utilisées	156
VIII CONCLUSION	157
IX RÉFÉRENCES	159
X ANNEXES	169
X.1 Annexe A: Implication personnelle de la candidate dans la mise en place et la réalisation des différentes études émanant de la thèse de doctorat.....	169
X.1.1 Implications dans la revue systématique et la meta-analyse décrite au chapitre IV et complétée au chapitre VI.....	169
X.1.2 Implication dans la mise en place de l'étude clinique multicentrique.....	169
X.2 Annexe B: Papier relatif au chapitre IV.....	171

X.3	Annexe C: Papier relatif au chapitre V	222
X.4	Annexe D: Premier papier relatif au chapitre VI	232

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

C	Signes cliniques
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i>
DFAT-TP	<i>Direct Fluorescent-Antibody Tissue Test for Treponema pallidum</i>
DS	Déviatiion standard
EIA	<i>Enzyme Immuno-Assay</i>
EIQ	Ecart inter-quartile
FN	Fond noir
FTA-ABS	<i>Fluorescent Treponemal Antibody ABsorption</i>
HSH	Hommes ayant des relations Sexuelles avec d'autres Hommes
IC95%	Intervalle de confiance à 95%
InVS	Institut de Veille Sanitaire
LCR	Liquide céphalo-rachidien
M+	Malades
M-	Non malades
OFSP	Office Fédérale de la Santé Publique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PIB	Produit Intérieur Brut
QUADAS	<i>QUality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies</i>
RIT	<i>Rabbit Infectivity Test</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RPR	<i>Rapid Plasma Reagin</i>
RV+	Rapport de vraisemblance positif
RV-	Rapport de vraisemblance négatif
Se	Sensibilité
Spe	Spécificité
TNT	Tests non-Tréponémiques
TPHA	<i>Hemagglutination assay for antibodies to Treponema pallidum</i>
<i>Tp</i> -PCR	<i>Polymerase Chain Reaction ciblant Treponema pallidum</i>
TT	Tests Tréponémiques
VDRL	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

VN	Vrais négatifs
VP	Vrais positifs

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau IV.1.** Présentation des 69 études retenues dans la revue systématique par stade de syphilis.
- Tableau IV.2.** Caractéristiques de la population d'étude et résultats de la *Tp*-PCR pour les syphilis primaires (N=30 études).
- Tableau IV.3.** Caractéristiques de la population d'étude et résultats de la *Tp*-PCR pour les syphilis secondaires (N=25 études).
- Tableau IV.4.** Caractéristiques de la population d'étude et résultats de la *Tp*-PCR pour les syphilis précoces (primaire, secondaire ou latente précoce) (N=21 études).
- Tableau IV.5.** Caractéristiques de la population d'étude et résultats de la *Tp*-PCR pour les neurosyphilis (N=10 études).
- Tableau IV.6.** Caractéristiques de la population d'étude et résultats de la *Tp*-PCR pour les syphilis latentes en dehors de la syphilis latente précoce (N=12 études).
- Tableau IV.7.** Caractéristiques de la population d'étude et résultats de la *Tp*-PCR pour les syphilis congénitales (N=7 études).
- Tableau IV.8.** Estimations des sensibilités et spécificités *poolées* de la *Tp*-PCR comparée aux tests de référence, en fonction du stade de syphilis et du spécimen biologique.
- Tableau IV.9.** Estimations des rapports de vraisemblance positifs et négatifs *poolés* de la *Tp*-PCR pour le diagnostic de syphilis primaire, en fonction du spécimen biologique testé et de l'utilisation d'un test de référence approprié ou non.
- Tableau IV.10.** Estimations des rapports de vraisemblance positifs et négatifs *poolés* de la *Tp*-PCR pour le diagnostic de syphilis secondaire, en fonction du spécimen biologique testé et de l'utilisation d'un test de référence approprié ou non.
- Tableau IV.11.** Estimations des rapports de vraisemblance positifs et négatifs *poolés* de la *Tp*-PCR pour le diagnostic de syphilis précoce, en fonction du spécimen biologique testé et de l'utilisation d'un test de référence approprié ou non.

Tableau IV.12. Estimations des rapports de vraisemblance positifs et négatifs *poolés* de la *Tp*-PCR pour le diagnostic de neurosyphilis dans le liquide céphalo-rachidien (les tests de référence sont jugés appropriés).

Tableau IV.13. Estimations des rapports de vraisemblance positifs et négatifs *poolés* de la *Tp*-PCR pour le diagnostic de syphilis latente dans le liquide céphalo-rachidien (les tests de référence sont jugés appropriés).

Tableau IV.14. Estimations des rapports de vraisemblance positifs et négatifs *poolés* de la *Tp*-PCR pour le diagnostic de syphilis congénitale, en fonction du liquide biologique testé (les tests de référence sont jugés appropriés).

Tableau IV.15. Estimations de la sensibilité *poolée* de la *Tp*-PCR dans le diagnostic de syphilis primaire comparée aux tests de référence, en fonction des facteurs d'hétérogénéité testés.

Tableau IV.16. Estimations de la sensibilité *poolée* de la *Tp*-PCR dans le diagnostic de syphilis secondaire comparée aux tests de référence, en fonction des facteurs d'hétérogénéité testés.

Tableau IV.17. Estimations de la sensibilité *poolée* de la *Tp*-PCR dans le diagnostic de syphilis précoce comparée aux tests de référence, en fonction des facteurs d'hétérogénéité testés.

Tableau IV.18. Estimations de la sensibilité *poolée* de la *Tp*-PCR dans le diagnostic de syphilis latente comparée aux tests de référence, en fonction des facteurs d'hétérogénéité testés.

Tableau IV.19. Estimations des rapports de vraisemblance positif et négatif *poolés* de la *Tp*-PCR dans le diagnostic de syphilis primaire comparée aux tests de référence, en fonction de différents facteurs d'hétérogénéité.

Tableau IV.20. Estimations des rapports de vraisemblance positif et négatif *poolés* de la *Tp*-PCR dans le diagnostic de syphilis précoce comparée aux tests de référence, en fonction de différents facteurs d'hétérogénéité.

Tableau V.1. Performance diagnostique de la *Tp*-PCR comparée au fond noir.

Tableau V.2. Nombre et proportion de résultats discordants entre le fond noir (négatif) et la *Tp*-PCR (positive) entre les centres avec une pratique courante versus rare du fond noir.

Tableau V.3. Résumé des différents indices de performance diagnostique de la *Tp*-PCR comparée au fond noir, à la sérologie et au « *gold standard* amélioré ».

Tableau V.4. Répartition des combinaisons de tests sérologiques utilisées pour le diagnostic de syphilis.

Tableau V.5. Performance diagnostique de la *Tp*-PCR comparée aux tests sérologiques.

Tableau V.6. Performance diagnostique de la sérologie comparée au fond noir.

Tableau V.7. Performance diagnostique de la *Tp*-PCR comparée au fond noir dans le même sous-groupe de patients que ceux ayant aussi des résultats de sérologie.

Tableau V.8. Résumé des différents indices de performance diagnostique de la sérologie puis de la *Tp*-PCR comparée au fond noir.

Tableau V.9. Performance diagnostique de la *Tp*-PCR comparée au « *gold standard* amélioré ».

Tableau VI.1. Description des résultats des 37 études sélectionnées dans la revue systématique.

Tableau VI. 2. Sensibilités, spécificités, rapports de vraisemblance positif et négatif *poolés* de la *Tp*-PCR en fonction de l'adéquation du test de référence puis en fonction de l'utilisation ou pas du fond noir.

Tableau VI. 3. Sensibilités, spécificités, rapports de vraisemblance positif et négatif *poolés* de la *Tp*-PCR en fonction du gène ciblé par la *Tp*-PCR.

Tableau VI.4. Comparaison des résultats globaux des deux types de *Tp*-PCR dans l'étude observationnelle diagnostique prospective multicentrique.

LISTE DES FIGURES

Figure III.1. Nombre total de cas confirmés de syphilis par sexe et année de diagnostic, Suisse, 2008-2012.

Figure III.2. Nombre total de cas confirmés de syphilis par année de diagnostic et par voie de contamination chez les hommes (gauche) et chez les femmes (droite), Suisse, 2008-2012.

Figure III.3. Nombre total de cas de syphilis récente par sexe et année de diagnostic, France, 2000-2010.

Figure III.4. Evolution des motifs de consultation des cas de syphilis récente, France, 2000-2010.

Figure III.5. Distribution des syphilis récentes par classe d'âge selon le sexe, France 2010.

Figure V.6. Evolution du nombre de cas de syphilis récentes selon la région, France 2010.

Figure III.7. Evolution des ventes d'Extencilline® 2,4 M UI selon la région, France 2010.

Figure III.8. Evolution du nombre de syphilis récentes selon l'orientation sexuelle, France, 2000-2010.

Figure III.9. Proportion de découverte d'une infection à VIH au cours de l'épisode de syphilis récente, France, 2000-2010.

Figure IV.1. Diagramme de flux de la procédure de sélection des études dans la revue systématique.

Figure IV.2 Proportions des réponses aux différents items du questionnaire QUADAS (%) évaluant la représentativité de la population d'étude, l'absence de biais potentiel et la qualité des études sélectionnées.

Figure IV.3. Probabilités post-test assorties de leurs intervalles de confiance à 95% pour une *Tp*-PCR positive (en haut) et négative (en bas) dans des ulcères oro-génitaux en fonction de la prévalence de la syphilis.

Figure IV.4. « *Funnel plot* » des études évaluant le rapport de vraisemblance positif (figure du haut) et négatif (figure du bas) de la PCR dans les lésions de syphilis précoce comparativement aux tests de référence adéquats.

Figure IV.5. « *Funnel plot* » des études évaluant le rapport de vraisemblance positif (figure du haut) et négatif (figure du bas) de la PCR dans les ulcères de syphilis primaire comparativement aux tests de référence.

Figure VI.1. Diagramme de flux de la procédure de sélection des études.

Figure VI.2. Evaluation de la qualité des études sélectionnées selon le QUADAS-2.

Figure VI.3. Probabilités post-test pour différentes prévalences de syphilis dans les études utilisant le fond noir comme test de référence.

Figure VI.4. Courbe ROC résumée (*summary ROC curve*) avec les sensibilité/spécificité *poolées* et leur région de confiance pour la *Tp*-PCR ciblant le gène *tpp47* (A) et celle ciblant le gène *polA* (B) parmi les études utilisant des tests de référence adéquats.

Figure VI.5. Courbe ROC résumée (*summary ROC curve*) avec les sensibilité/spécificité *poolées* et leur région de confiance pour la *Tp*-PCR ciblant le gène *tpp47* (A) et celle ciblant le gène *polA* (B) parmi les études utilisant le fond noir comme test de référence.

Figure VI.6. « *Funnel plot* » testant l'association entre l'*odds ratio* diagnostique (*diagnostic odds ratio*) et la taille des études (*effective sample size*) parmi les études utilisant des tests de référence adéquats.

Figure VI.7. « *Funnel plot* » testant l'association entre l'*odds ratio* diagnostique (*diagnostic odds ratio*) et la taille des études (*effective sample size*) parmi les études utilisant le fond noir comme test de référence.

I INTRODUCTION GÉNÉRALE

I.1 Problématique

La syphilis reste une maladie sexuellement transmissible préoccupante avec 10,6 millions de nouveaux cas par an selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), dont 90% surviennent dans les pays en développement.¹ En 2012, l'OMS a d'ailleurs développé des stratégies pour le renforcement de la surveillance des infections sexuellement transmissibles dont la syphilis dans le but d'éliminer la syphilis congénitale.² L'agent responsable de la syphilis est une bactérie de la famille des spirochètes, *Treponema pallidum*, découverte en 1905 par Fritz Richard Schaudinn et Erich Hoffmann.³ Bien que le traitement de la syphilis soit simple, bien toléré et bon marché, son diagnostic n'en reste pas moins compliqué. La plupart des bactéries poussent dans des milieux de culture appropriés mais *Treponema pallidum* est une exception à la règle. Pour la syphilis précoce symptomatique, le *Centres for Disease Control and Prevention* (CDC) aux Etats-Unis⁴ définit un diagnostic certain reposant sur la combinaison de signes cliniques évocateurs et la détection directe de la bactérie dans les prélèvements cliniques, notamment grâce au microscope à fond noir. Depuis janvier 2014, le CDC a inclus la méthode de *Polymerase Chain Reaction* ciblant *Treponema pallidum* (*Tp*-PCR) dans la liste des tests diagnostiques donnant un diagnostic certain de syphilis.⁵ Un diagnostic probable repose sur la combinaison de signes cliniques avec la positivité des tests sérologiques : une sérologie non-tréponémique sensible mais peu spécifique (dosage de *Venereal Disease Research Laboratory* [VDRL] ou *rapid plasma reagin* [RPR]) confirmée par une sérologie tréponémique plus spécifique (*fluorescent treponemal antibody absorption* [FTA-ABS] ou *hemagglutination assay for antibodies to Treponema pallidum* [TPHA]). La distinction d'un diagnostic certain et probable provient de l'utilisation d'une part de tests de référence permettant de mettre en évidence l'agent pathogène dans les lésions (le microscope à fond noir ou depuis peu, la *Tp*-PCR) et d'autre part de tests de référence démontrant de façon indirecte (anticorps spécifiques ou aspécifiques) le contact avec l'agent pathogène (les différents tests sérologiques). Jusqu'en 2010, le CDC reconnaissait que les techniques d'amplification génique qualifiées de *home-made*, telle que la *Polymerase Chain Reaction* ciblant *Treponema pallidum* (*Tp*-PCR) étaient de plus en plus fréquemment utilisées⁶ sans formellement inclure la *Tp*-PCR dans la liste des outils diagnostiques confirmant la syphilis primaire ou secondaire.⁷ Les recommandations européennes ont de leur côté introduit la *Tp*-PCR dans l'algorithme diagnostique de syphilis précoce dès 2008⁸ en se basant sur les

résultats de 4 études cliniques publiées.⁹⁻¹² Ces recommandations européennes ont été actualisées en août 2014 et se basent sur 6 nouvelles études cliniques,¹³⁻¹⁸ dont les résultats d'une première étude réalisée à Genève¹⁵ et sur ceux de la méta-analyse présentée au chapitre IV¹⁴ pour justifier l'utilisation de la *Tp*-PCR pour confirmer le diagnostic de syphilis dans différents milieux biologiques. Depuis janvier 2014, la *Tp*-PCR fait désormais partie de la nouvelle définition de cas de la syphilis précoce du CDC.⁵

Jusqu'en janvier 2014, l'examen de référence dans le diagnostic de syphilis primaire restait le microscope à fond noir ou d'autres méthodes de détection directe telle que la fluorescence directe. Le « vrai » *gold standard* pour le diagnostic de syphilis reste le test d'inoculation intra-testiculaire de *Treponema pallidum* chez le lapin appelé *Rabbit Infectivity Test*. Mais cette méthode requiert une grande expertise et un environnement technique spécifique expliquant qu'il ne soit pas pratiqué partout. Depuis janvier 2014, les examens de référence recommandés par le CDC pour diagnostiquer une syphilis précoce symptomatique sont (au même niveau) : le fond noir, la *Tp*-PCR ou d'autres méthodes de détection directe (dont le *direct fluorescent-antibody tissue test for Treponema pallidum* ou DFAT-TP). Cependant le fond noir pose un certain nombre de difficultés pratiques : il est d'autant plus fiable que réalisé par du personnel expérimenté ; il doit être réalisé « au lit du malade » sur un prélèvement frais des lésions afin d'observer des tréponèmes vivants qui ont une présentation microscopique très spécifique.¹⁹ Ces différents critères expliquent le désintérêt progressif du microscope à fond noir en pratique courante. Le diagnostic de syphilis repose plus fréquemment sur l'utilisation des tests sérologiques en séquence²⁰ dont les tests dits rapides qui présentent l'avantage d'être automatisables, bon marché et restent des méthodes diagnostiques fiables.²¹ Cependant ces tests ne sont pas dénués de défauts : les tests dits non tréponémiques sont très souvent négatifs au début de l'infection jusqu'à 3 mois après la contamination²² perturbant ainsi le diagnostic précoce ; tandis que les tests tréponémiques restent pour la plupart positifs à vie posant la difficulté de diagnostiquer une nouvelle infection ou de différencier les sujets traités des non traités.²³

Les conséquences d'un retard ou d'une absence de traitement sont lourdes. Au niveau individuel, en l'absence de traitement la maladie évolue depuis le stade de syphilis primaire vers une syphilis secondaire. Une fois guérie cliniquement, la syphilis devient latente (elle est asymptomatique mais les tests sérologiques sont positifs) et évolue à bas bruit sans traitement durant plusieurs dizaines d'années vers la phase tertiaire caractérisée par une atteinte organique. La syphilis tertiaire se caractérise par des lésions histologiques appelées gommès

syphilitiques se développant au niveau du système nerveux central, du système cardiovasculaire ou d'autres organes et survenant chez 40% des sujets non traités.²⁴ Chez la femme enceinte non traitée, le risque d'avortement spontané attribuable et de syphilis congénitale est de 30% et reste une préoccupation de santé publique²⁵ justifiant la poursuite du dépistage de la syphilis au cours de la grossesse. A l'échelle de la population, les conséquences d'un défaut de traitement sont la propagation de cas secondaires de syphilis aux partenaires sexuels du cas index et aussi le risque accru de transmission simultanée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) présent de manière concomitante dans 45% des cas dans les populations dites « à risque ».²⁶ Ces différentes données épidémiologiques renforcent l'importance des campagnes de lutte contre les infections sexuellement transmissibles dans les populations à risque mais également dans la population générale.²⁷ De plus, le traitement de la syphilis précoce est simple et repose sur une seule injection intra-musculaire de 2,4 millions d'unités de benzathine pénicilline G ou en cas d'allergie sur un traitement de 14 jours de doxycycline (2 fois 100mg/j).²⁸ Ce traitement de référence étant bien toléré et bon marché, l'OMS a même proposé la prise en charge syndromique (*syndromic management*) dans les pays en développement ou en cas d'accès difficile aux différents tests diagnostiques.²⁹ Cette attitude de traiter sans confirmer le diagnostic permet ainsi d'éviter les conséquences néfastes d'un faux négatif aux tests diagnostiques : évolution vers un stade de syphilis plus avancé, transmission verticale de la mère à son enfant, *clusters* épidémiques ou transmission secondaire du VIH par exemple.

I.2 Hypothèses de recherche

Du fait de la plus grande disponibilité de la *Tp*-PCR dans de nombreux laboratoires microbiologiques et de son utilisation en dehors des recommandations officielles des autorités (avant janvier 2014), il semblait intéressant de faire le point sur la performance diagnostique (en termes de sensibilité et spécificité), et sur l'utilité clinique (en termes de valeurs prédictives et rapports de vraisemblance) de la *Tp*-PCR, en utilisant les données disponibles dans la littérature scientifique. Nous avons formulé l'hypothèse que les valeurs de sensibilités et spécificités *poolées* seraient très hétérogènes du fait des résultats d'études à différents stades de syphilis, dans différents milieux biologiques et de l'utilisation de plusieurs combinaisons de tests de référence justifiant ainsi de présenter des indices de performance *poolés* stratifiés sur ces différentes variables ainsi que la présentation des résultats des modèles avec effets aléatoires.

Après avoir fait une synthèse de ce qui est décrit dans la littérature, nous avons formulé l'hypothèse que la *Tp*-PCR utilisée sur des prélèvements d'ulcères récents présentait des indices de performance diagnostique (sensibilité, spécificité et valeurs prédictives) différents selon le test de référence utilisé mais surtout que la *Tp*-PCR était plus performante et plus utile cliniquement que l'actuel (avant janvier 2014) *gold standard* proposé par le CDC (i.e., le fond noir).

Notre dernière hypothèse de recherche était de montrer que les deux types de *Tp*-PCR actuellement utilisées en routine : la *Tp*-PCR ciblant le gène *tpp47* et la *Tp*-PCR ciblant le gène de la Polymerase I (*polA*), avaient des indices de performance diagnostique (sensibilité et spécificité) différents (12% de différence de sensibilité et 10% de différence de spécificité entre les deux types de *Tp*-PCR).

II OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les objectifs de la thèse sont :

1. De faire une revue systématique de la littérature afin d'identifier les études ayant évalué la performance diagnostique de la *Tp*-PCR à tous les stades de la syphilis et dans différents milieux biologiques puis de présenter des estimateurs *poolés* de la sensibilité, spécificité et des rapports de vraisemblance positif et négatif de la *Tp*-PCR en utilisant une méta-analyse de proportions (objectif développé au chapitre IV).
2. De décrire les performances diagnostiques de la *Tp*-PCR (sensibilité, spécificité, valeurs prédictives et rapports de vraisemblance) dans les ulcérations oro-génitales secondaires à une prise de risque sexuelle récente en fonction de différentes références : a) l'actuel *gold standard* (le microscope à fond noir) (avant janvier 2014), b) les tests sérologiques (VDRL/RPR et TPHA ou FTA-ABS ou tests rapides comme l'*enzyme immuno-assay* [EIA]) et c) une combinaison de signes cliniques, microscope à fond noir, tests sérologiques au moment de l'épisode et au suivi (plus tard dénommé *gold standard* amélioré) (objectif développé au chapitre V).
3. De comparer les deux types de *Tp*-PCR les plus couramment utilisés (la lipoprotéine de l'espace périplasmique ou protéine 47kDa ou gène *tpp47* versus le gène de la polymérase I ou *polA*) en les testant sur les mêmes prélèvements (données *pairees*) (objectif développé au chapitre VI).
4. De manière plus générale, l'objectif de ce travail sera de discuter la problématique du *gold standard* imparfait dans le diagnostic de syphilis et de ses conséquences sur l'évaluation de la performance diagnostique de la *Tp*-PCR dans la prise en charge de patients présentant une maladie ulcéralive orale ou génitale contractée par voie sexuelle (objectif discuté au chapitre VII).

III ETAT DES LIEUX DE L'ÉPIDÉMIE DE SYPHILIS EN SUISSE ET EN FRANCE

III.1 Introduction

Du fait de la mise en place d'une étude clinique multicentrique (présentée aux chapitres V et VI) dans 5 centres situés en France et en Suisse, il semblait justifié de dresser un état des lieux de la situation épidémiologique de l'infection à *Treponema pallidum* (syphilis) dans ces deux pays afin de donner une idée du poids de cette maladie d'un point de vue de santé publique.

La syphilis est une infection bactérienne sexuellement transmise dont l'incidence avait chuté à des taux quasi nuls dans les années 90 grâce au respect des moyens de prévention, aux changements des comportements sexuels dans les populations à risque et à la généralisation du dépistage de l'infection du virus du VIH et des autres infections sexuellement transmissibles.³⁰ Le risque de transmission de la syphilis par contact direct est de ~33% lors de rapports sexuels avec des lésions de syphilis primaire ou secondaire, qui sont très contagieuses (principalement par les chancres, lésions muqueuses, ou *condyloma lata*).³¹ Le risque de transmission est beaucoup plus faible en l'absence d'effraction cutanée. La syphilis peut aussi se transmettre en touchant ou en embrassant une personne présentant des lésions sur les lèvres, dans la cavité buccale, sur les seins ou sur les parties génitales. Des cas de transmissions au décours de relations homosexuelles orales ont même été rapportés.³² La transmission de syphilis au cours de transfusions sanguines est très rare du fait du dépistage systématique de la syphilis chez tous les donneurs mais aussi du fait d'une survie du *Treponema pallidum* limitée à 24-48 heures dans les conditions actuelles de stockage des poches de sang. Finalement *Treponema pallidum* peut se transmettre à travers le placenta. Au début des années 2000, en Europe et en Amérique du Nord, plusieurs *clusters* épidémiques de syphilis ont été rapportés en particulier chez les hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes (HSH), chez les travailleurs du sexe et chez les utilisateurs de drogues. Depuis, la syphilis est redevenue un problème majeur de santé publique³³⁻³⁶, en raison de ses conséquences dramatiques chez les femmes enceintes (morts *in utero*, avortements spontanés, morts périnatales ou insuffisances pondérales à la naissance) mais aussi du fait de l'augmentation concomitante du risque de transmission du VIH en présence de lésions ulcérées cutanéomuqueuses de syphilis précoce.³⁷

En Suisse, la syphilis avait été sortie de la liste des maladies à déclaration obligatoire en 1999 puis réintroduite en 2006 à cause de la résurgence d'épidémies localisées. L'impact de la réinscription de la syphilis dans ces listes peut donner une fausse impression d'augmentation du nombre de cas de syphilis comparativement à la période antérieure de 1999 à 2003 basée sur les données colligées dans le réseau Suisse des centres de consultations de Dermatologie (*Swiss Network of Dermatology Polyclinics*), du fait de l'enregistrement des nouveaux cas sans connaître le nombre de sujets testés pour la syphilis. En France en revanche, la syphilis ne fait pas partie de la liste des maladies à déclaration obligatoire mais elle reste une maladie dont la surveillance s'appuie sur un réseau de cliniciens volontaires (RésIST) exerçant dans différents lieux de santé (dispensaires antivénériens, consultations hospitalières de dermatologie, maladies infectieuses ou médecine interne, cabinets de médecine libérale). Ce réseau est sensé déclarer seulement les cas contagieux de syphilis précoces (syphilis primaire, secondaire et latente précoce).

Nous allons nous appuyer sur les données épidémiologiques disponibles pour faire une description de l'épidémiologie de la syphilis en Suisse et en France au cours de ces dernières années.

III.2 Sources d'information sur les données épidémiologiques

III.2.1 En Suisse

Les données épidémiologiques Suisses viennent de deux sources principales d'information :

- 1) Les formulaires de déclaration obligatoire et de déclaration complémentaire contenant des informations épidémiologiques, diagnostiques et sur le comportement à risque des patients, complétés par tous les médecins ayant diagnostiqué un nouveau cas de syphilis et les ayant envoyé aux médecins cantonaux des Offices Cantonaux de Santé Publique dans un délai d'une semaine¹;
- 2) Les laboratoires d'analyses médicales qui doivent informer les Offices Cantonaux de Santé Publique sur le nombre de tests diagnostiques effectués et aussi déclarer chaque nouveau cas de syphilis diagnostiqué au laboratoire² (tests diagnostiques positifs).

¹ http://www.bag-anw.admin.ch/infreporting/forms/f/syphilis_f.pdf

² http://www.bag-anw.admin.ch/infreporting/forms/f/labor_f.pdf

Ainsi les deux sources d'information sont confrontées par l'Office Fédéral de Santé Publique (OFSP) en utilisant un identifiant commun aux deux sources et les données sont complétées puis saisies dans la base de données des nouveaux cas de syphilis. Les formulaires des différents Offices Cantonaux de Santé Publique Suisses sont centralisés au niveau de l'OFSP à Berne. Malheureusement l'exhaustivité des déclarations complémentaires est loin d'être obtenue puisque seulement 76% des déclarations des laboratoires sont complétées par une déclaration du médecin de « premier recours » et seulement 39% de toutes les déclarations sont jugées exploitables [OFSP 2010]. Par ailleurs, il est difficile de rapporter de véritables taux d'incidence de la syphilis du fait de l'absence de données sur la population à risque ou sur le nombre de tests diagnostiques réalisés (absence de dénominateur).

L'autre source de données épidémiologiques sur les cas de syphilis en Suisse entre 1997 et 2003 est le *Swiss Network of Dermatology Polyclinics* comportant 6 cliniques publiques universitaires ou des hôpitaux cantonaux de Bâle, Berne, Genève, Lausanne et Zürich (2 cliniques).³⁸

III.2.2 En France

Les données de la France viennent du réseau RésIST sur la période 2000-2010 dont les informations sont fournies à l'Institut de Veille Sanitaire (InVS). Le réseau comptait 108 sites participants en 2011 et 91 sites en 2012, dont 69% sont des centres de dépistage et de diagnostic des infections sexuellement transmissibles et des consultations anonymes et gratuites. D'après la liste des contacts pour la surveillance des infections sexuellement transmissibles, les sources d'information proviennent du département des maladies infectieuses (unité VIH-IST-Hépatites B et C) de Saint Maurice, de 12 cellules interrégionales d'épidémiologie et de 5 centres nationaux de référence dont 4 sont situés à Paris.

Un autre indicateur peut donner une idée de l'ampleur de l'épidémie de syphilis. Il s'agit des données sur le nombre de ventes de boîtes de benzathine pénicilline injectable (Extencilline®) utilisée dans le traitement de la syphilis et délivrées par les pharmacies de ville sur ordonnances.

III.3 Méthodes diagnostiques employées

III.3.1 En Suisse

Sur les fiches de déclaration obligatoire, il est spécifié que seuls les cas avec un test VDRL/RPR positif accompagné d'un test tréponémique TPHA/TPPA/MHA-TP ou FTA-Abs positifs sont à déclarer. Les tests VDRL/RPR positifs seuls ne sont pas à déclarer. Les autres tests considérés par l'OFSP sont les IgM d'un test tréponémique, le fond noir ou la PCR. Les combinaisons des tests sérologiques à considérer ne sont pas explicitement décrites dans la feuille de déclaration obligatoire.

III.3.2 En France

Les données sont basées sur des questionnaires de surveillance complétés par les différents centres participants. Le diagnostic de syphilis peut reposer sur la combinaison des résultats qualitatifs (négatif/positif) de TPHA, VDRL et FTA ou d'autres tests sérologiques à préciser plus ou moins les titrages de ces mêmes tests. Les résultats des sérologies syphilitiques (dates et titres) réalisées avant et après l'épisode déclaré doivent également être notifiés si connus. La définition des cas de syphilis est détaillée dans le questionnaire à compléter et utilise les recommandations européennes.^{8 39} Pour la syphilis primaire, le diagnostic doit reposer sur l'existence d'un chancre et l'identification de *Treponema pallidum* dans le prélèvement de la lésion (par fond noir, immunofluorescence directe ou méthodes équivalentes ou par PCR) et/ou un VDRL/RPR positif et un TPHA positif, ou un VDRL/RPR positif et un TPHA négatif ou un VDRL/RPR négatif et un TPHA positif.

III.4 Etat des lieux de l'épidémie de Syphilis

III.4.1 En Suisse

Entre 1973 et 1994, le nombre de cas de syphilis a constamment diminué en Suisse, ainsi que les cas de blénorragies (infections sexuellement transmissibles liées à *Neisseria gonorrhoeae* et présentant les mêmes facteurs de risque épidémiologiques).^{40 41} La même tendance a été observée entre 1990 et 1996 à Genève.⁴²

Entre 1997 et 2003, le *Swiss Network of Dermatology Polyclinics* a rapporté 189 cas de syphilis (7% de tous les diagnostics de maladies sexuellement transmissibles chez les hommes), dont 72% de syphilis primaire ou secondaire, seulement chez des hommes, avec une augmentation absolue de 127% entre 1997 et 2000.⁴³ Ces cas de syphilis étaient transmis

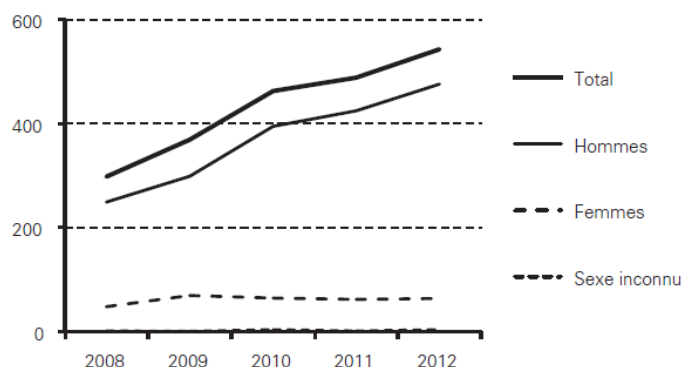
par voie hétérosexuelle pour 57% ou homosexuelle pour 41%. La proportion de cas de syphilis transmis par voie homosexuelle a augmenté entre 1997 et 2003, passant de 9% en 1997 à 48% à 2003. La co-infection par le VIH était plus fréquente chez les hommes atteints de syphilis (16%) plutôt que d'une autre maladie sexuellement transmissible (5%), suggérant une infection concomitante des deux pathogènes.

Entre 1998 et 2004, le nombre absolu de cas de syphilis déclarés a constamment augmenté en Suisse passant de 23 cas/an entre 1998 et 2000 à 63 cas/an en 2003.⁴¹ La résurgence des cas de syphilis concernait principalement le canton de Zürich avec 54% des cas totaux et Genève, avec 24% des cas totaux.⁴² Sur les 111 déclarations de 2002 et 2003, 84% concernaient des hommes et 40% étaient des cas transmis par voie homosexuelle. Les stades de syphilis étaient le stade secondaire pour 46% (51/111), primaire pour 30% (30/111) et latent pour le reste. Sur cette période de 2002 à 2003, 5% des cas (n=5) avaient une infection à VIH concomitante.

Suite à la réintroduction de la déclaration obligatoire des cas de syphilis en Suisse en 2006, une étude a rapporté les cas de syphilis notifiés entre le 1^{er} juillet 2007 et le 30 novembre 2008. Au total, 935 cas de syphilis ont été rapportés sur cette période dont 71% chez des hommes. Chez les hommes, la proportion de cas de syphilis la plus grande était dans la classe 35-44 ans (42%, 276/665) suivie des plus de 45 ans (26%, 170/665); chez les femmes, la plus grande proportion de cas était dans la classe d'âge 24-35 ans (33%, 84/254) suivie de la classe des 35-44 ans (26%, 65/254). Seulement 38% des hommes ont répondu à la question sur l'orientation sexuelle et 63% se déclaraient HSH.

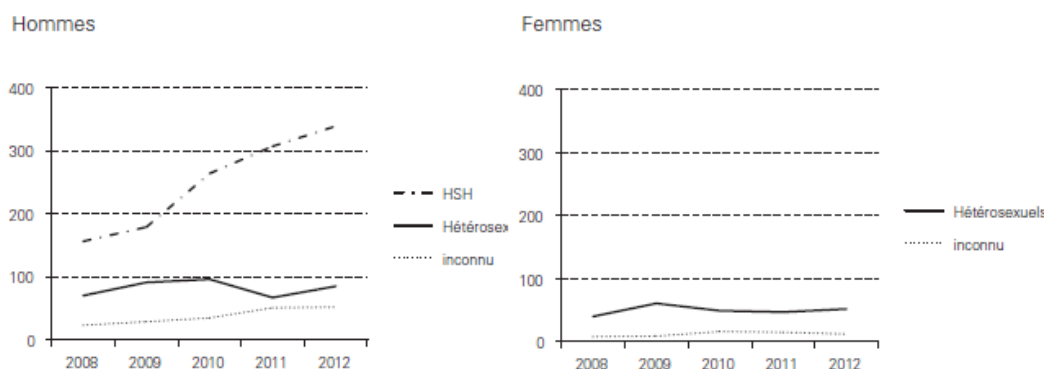
En se basant sur les données obtenues sur le site internet de l'OFSP entre 2008 et 2012, le nombre de déclarations obligatoires de cas confirmés de syphilis augmente sur les 4 années de suivi mais nous n'avons pas d'information sur le nombre de personnes testées (Figure III.1). La majorité des nouveaux cas concerne des transmissions par voie homosexuelle (62% en 2012, Figure III.2) et 15% d'entre eux concernaient des personnes infectées par le VIH. Parmi les cas confirmés transmis par voie HSH, 80% étaient âgés de 25 à 54 ans et la majorité avait entre 35 et 44 ans. En 2012, 43% des cas transmis par voie HSH étaient des stades de syphilis primaire, 40% des stades secondaires et 8% des stades latents précoces.

Figure III.1. Nombre total de cas confirmés de syphilis par sexe et année de diagnostic, Suisse, 2008-2012.



Extrait du rapport de l'OFSP (Bulletin 22, 27 mai 2013)

Figure III.2. Nombre total de cas confirmés de syphilis par année de diagnostic et par voie de contamination chez les hommes (gauche) et chez les femmes (droite), Suisse, 2008-2012.



¹ HSH: hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes

Extrait du rapport de l'OFSP (Bulletin 22, 27 mai 2013)

III.4.2 En France

Entre 2000 et 2010, le nombre de cas de syphilis a constamment augmenté passant de <100 cas en 2000 à >600 cas en 2010 (Figure III.3). Les motifs de consultation dans les centres spécialisés participant au réseau RésIST et concernant les cas de syphilis récentes ont évolué entre 2000 et 2010 avec une augmentation de la proportion des cas découverts fortuitement du fait de l'infection du partenaire sexuel mais aussi une augmentation de la proportion des cas découverts lors d'un dépistage systématique (Figure III.4). Ce constat traduit la plus grande

sensibilisation de la profession médicale et de la population sur les maladies sexuellement transmissibles et sur la nécessité de les dépister ou diagnostiquer précocement.

Figure III.3. Nombre total de cas de syphilis récente par sexe et année de diagnostic, France, 2000-2010.

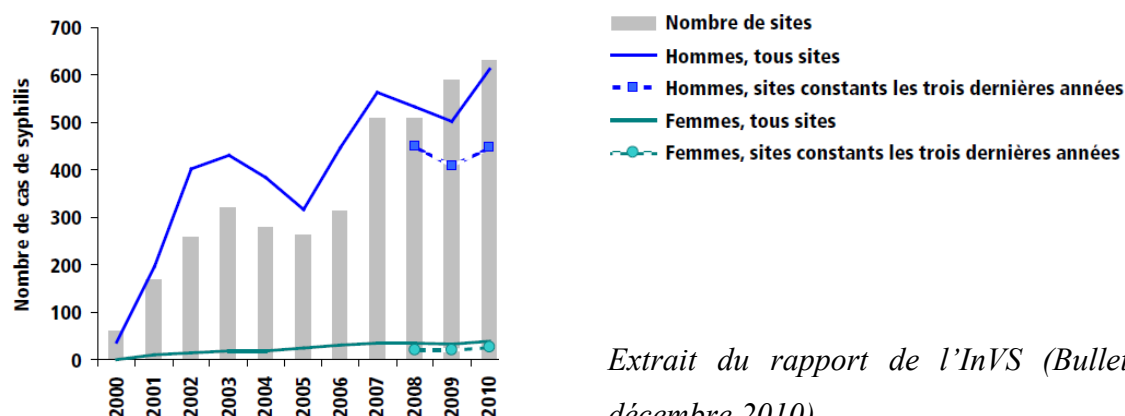
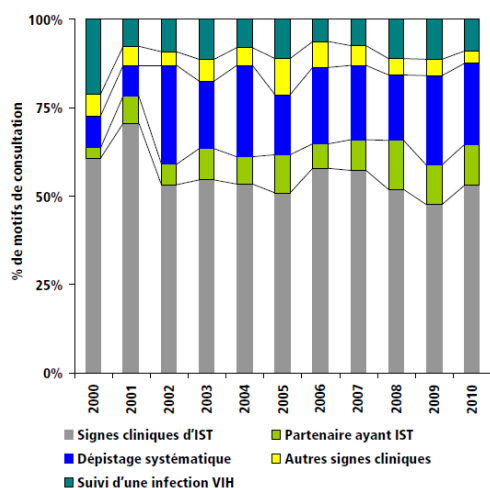


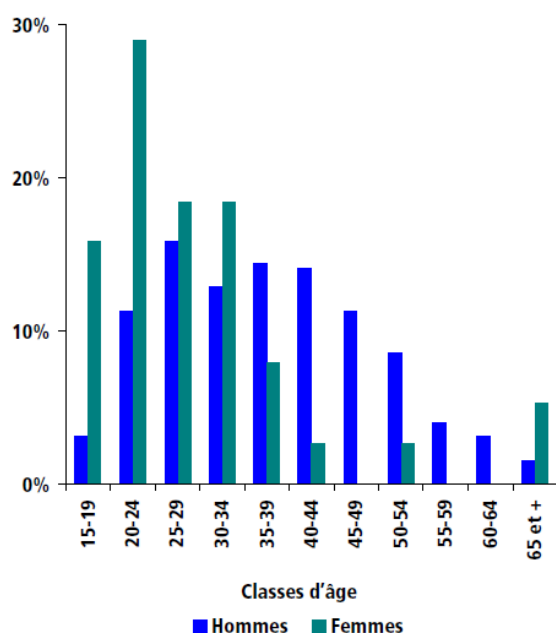
Figure III.4. Evolution des motifs de consultation des cas de syphilis récente, France, 2000-2010.



La majorité des cas déclarés était des hommes (94%, 4423/4684) puisque cette maladie concerne principalement des HSH. L'âge médian était de 35 ans entre 2000 et 2010. Les femmes infectées par la syphilis en 2010 avaient tendance à être plus jeunes que les hommes infectés (Figure III.5). La plupart des cas observés entre 2000 et 2010 étaient des cas de syphilis secondaire (41%, 1901/4684) ; les autres cas étaient des syphilis latentes (36%, 1672/4684) ou primaires (24%, 1111/4684).

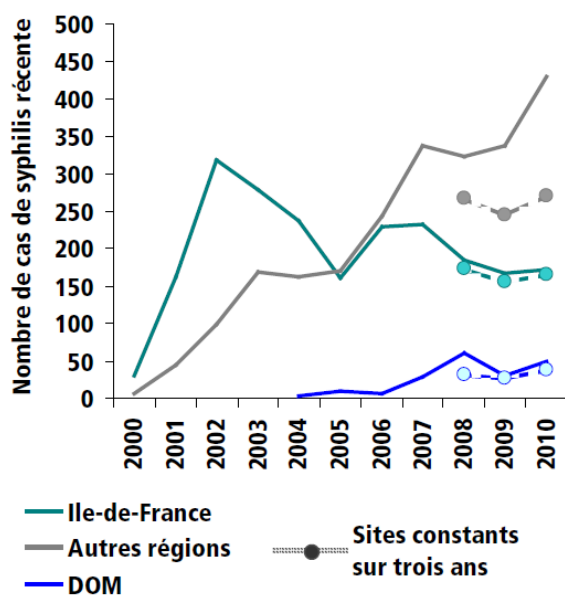
La majorité des cas déclarés entre 2000 et 2010 provenait de la région Ile-de-France (46%, 2173/4684) (Figure III.6). Plusieurs explications peuvent être proposées à ce résultat : soit il existe vraiment des *clusters* épidémiques dans cette région, mais il faudrait rapporter le nombre de nouveaux cas aux nombres de tests pratiqués. Une deuxième explication serait qu'il existe une erreur d'attribution du lieu d'acquisition de la syphilis du fait d'un diagnostic dans un centre national de référence situé à Paris. Enfin, on peut aussi suspecter que l'observance des centres participants à Paris est meilleure que dans d'autres régions. Cette augmentation des cas de syphilis récentes en Ile-de-France va de pair avec une augmentation de la prescription d'Extencilline® 2,4 MUI dans cette région (Figure III.7). La voie de transmission la plus fréquente entre 2000 et 2010 était la voie homosexuelle (82%, 3861/4684), comme dans la plupart des pays industrialisés, avec une augmentation sur 3 phases (2000-2003 ; 2005-2007 et 2008-2010) de la proportion des cas transmis par voie homosexuelle (Figure III.8).

Figure III.5. Distribution des syphilis récentes par classe d'âge selon le sexe, France 2010.



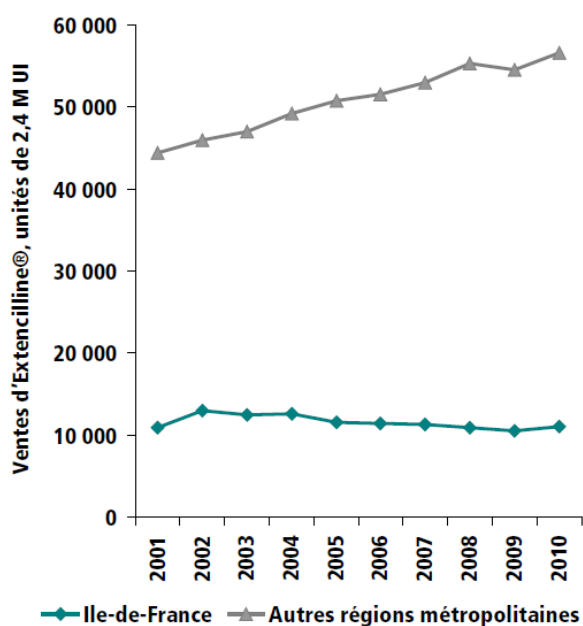
*Extrait du rapport de l'InVS (Bulletin
31 décembre 2010)*

Figure III.6. Evolution du nombre de cas de syphilis récentes selon la région, France 2010.



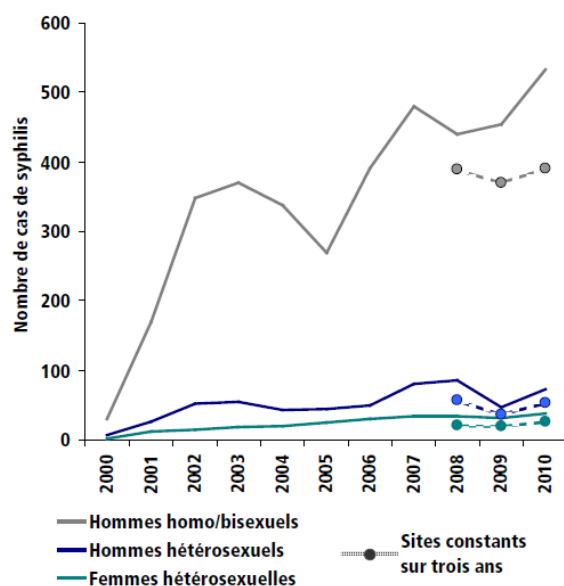
Extrait du rapport de l'InVS (Bulletin 31 décembre 2010)

Figure III.7. Evolution des ventes d'Extencilline® 2,4 M UI selon la région, France 2010.



Extrait du rapport de l'InVS (Bulletin 31 décembre 2010)

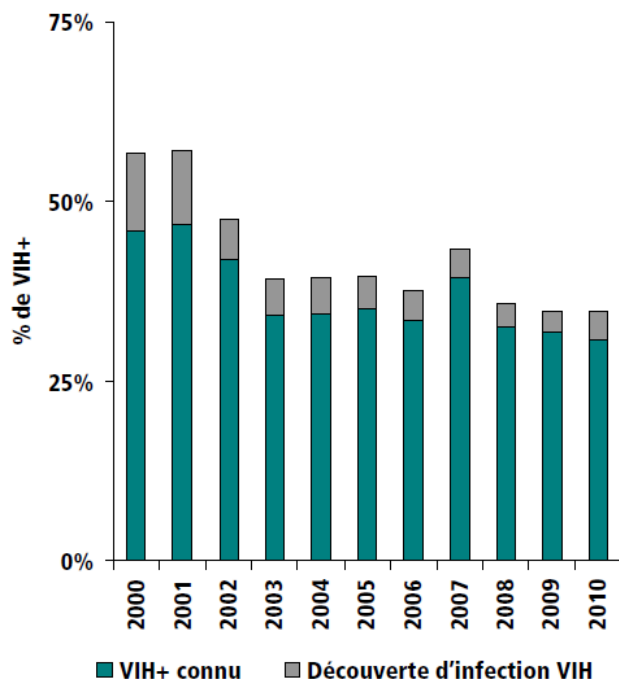
Figure III.8. Evolution du nombre de syphilis récentes selon l'orientation sexuelle, France, 2000-2010.



*Extrait du rapport de l'InVS (Bulletin
31 décembre 2010)*

En France, une infection VIH était diagnostiquée de manière concomitante à l'épisode de syphilis dans 4,5% des cas (210/4684). La découverte d'une infection à VIH concomitante a diminué entre 2000 et 2010 (Figure III.9). La proportion de cas co-infectés avec le VIH a aussi eu tendance à diminuer passant de 45% entre 2000 et 2010 à 37% en 2010. En 2010, 40% des co-infections avec le VIH concernait des HSH. Quant aux informations sur les comportements sexuels, la proportion d'hommes utilisant des préservatifs lors des rapports anaux a constamment diminué entre 2000-2007 et 2010 passant de 48% des déclarations à 37%. La proportion des hommes déclarant utiliser un préservatif lors des rapports hétérosexuels est restée globalement stable (~30%). Par contre, la proportion de femmes infectées ayant déclaré utiliser le préservatif lors des rapports hétérosexuels a fluctué au cours du temps passant de 9% entre 2000 et 2007, à 14% en 2008, à 8% en 2009 puis à 4% en 2010.

Figure III.9. Proportion de découverte d'une infection à VIH au cours de l'épisode de syphilis récente, France, 2000-2010.



Extrait du rapport de l'InVS (Bulletin 31 décembre 2010)

III.5 Synthèse de l'état des lieux de l'épidémie de syphilis

III.5.1 En Suisse

Le nombre de cas de syphilis n'a cessé d'augmenter en Suisse depuis 1997, alors qu'il avait eu tendance à diminuer entre 1973 et 1994. La proportion des cas transmis par voie homosexuelle a également augmenté entre 1997 et 2012 passant de 9% des cas à 62% en 2012. En parallèle, la co-infection concomitante avec le VIH a diminué entre 1997-2003 et 2012.

La majorité des cas de syphilis était rapportée à Zürich et Genève, ce qui a motivé la mise en place de l'étude présentée au chapitre V dans ces deux centres ainsi qu'à Lausanne où plusieurs *clusters* épidémiques de syphilis ont été rapportés à la consultation des maladies infectieuses.

III.5.2 En France

Entre 2000 et 2010, le nombre de cas de syphilis récentes n'a cessé d'augmenter, et notamment la proportion de cas découverts lors d'un dépistage systématique ou lors de la découverte d'une maladie sexuellement transmissible chez le partenaire sexuel. Cette

augmentation des cas a surtout concerné la région Ile-de-France et notamment Paris. Sur cette période, la proportion de cas de syphilis transmis par voie homosexuelle a augmenté constamment mais la proportion d'infections concomitantes avec le VIH a diminué.

Ces données ont motivé la mise en place de l'étude présentée au chapitre V dans un centre parisien concerné par la résurgence des cas de syphilis et dans la deuxième ville de France d'un point de vue économique, Lyon, également concernée par l'épidémie de syphilis.

III.5.3 Limitations méthodologiques soulevées par ces sources d'information

En Suisse, la syphilis fait partie de la liste des maladies à déclaration obligatoire. Les données mises à disposition ne permettent pas de quantifier l'importance de l'épidémie puisqu'elles reposent seulement sur le nombre absolu de nouveaux cas déclarés. Il faudrait obtenir des informations complémentaires sur le nombre de personnes à risque ou sur le nombre de personnes testées pour cette maladie afin de calculer des taux d'incidence de la syphilis.

En France, la syphilis ne fait l'objet que d'une surveillance non obligatoire régie par des réseaux de professionnels décidant volontairement de déclarer les nouveaux cas diagnostiqués de syphilis. Du fait du caractère non obligatoire de la déclaration, les chiffres à disposition soulignent le risque de sous-estimation de l'ampleur de l'épidémie de syphilis en France et de la même façon qu'en Suisse, il serait nécessaire d'obtenir des données sur le nombre de personnes testées ou sur le nombre de personnes à risque afin de calculer des taux d'incidence de la maladie.

Dans les deux cas, les données à disposition ne permettent que de dégager des tendances ou des sous-groupes de sujets à risque.

IV REVUE SYSTÉMATIQUE ET MÉTA-ANALYSE DES DONNÉES PUBLIÉES SUR LES PERFORMANCES DIAGNOSTIQUES DE LA PCR DANS LE DIAGNOSTIC DE SYPHILIS

IV.1 Résumé

Objectif : Faire une revue systématique de la littérature scientifique sur les performances diagnostiques de la *Tp*-PCR dans le diagnostic de syphilis en fonction du stade de syphilis et du matériel biologique testé. Estimer une sensibilité, spécificité et des rapports de vraisemblance positif/négatif *poolés* de la *Tp*-PCR.

Méthodes : Revue systématique des études référencées entre janvier 1990 et janvier 2012 dans 3 bases bibliographiques (*Pubmed*, *Embase* et *Web of Science*) et dans les catalogues de 5 congrès spécialisés en maladies infectieuses. Méta-analyse d'études diagnostiques en utilisant la méthode de l'inverse de la variance sur des proportions *logit* transformées avec effets aléatoires³. La présence d'hétérogénéité est appréciée au niveau des rapports de vraisemblance *poolés* par l'index I^2 . Plusieurs facteurs d'hétérogénéité prédéfinis ont été testés par la méta-régression (données continues) ou le test de Cochran (données catégorielles) dès que $I^2 > 50\%$ et le nombre d'études > 10 . La qualité des études sélectionnées a été évaluée par l'outil *QUality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies*. La présence de biais de publication a été explorée par la méthode *Trim and Fill* si > 10 études disponibles.

Résultats : Sur 1160 abstracts identifiés, 69 études ont été sélectionnées dans la revue systématique dont 46 études utilisant un test de référence adéquat pour le diagnostic de syphilis. La sensibilité de *Tp*-PCR était meilleure dans les ulcérations cutané-muqueuses de syphilis primaire et dans le sang de syphilis congénitales. La plupart des spécificités rapportées étaient $> 95\%$, sauf dans le sang. En présence d'une *Tp*-PCR positive dans un ulcère, le diagnostic de syphilis était hautement probable (rapport de vraisemblance positif > 20). Dans le sang, les rapports de vraisemblance positifs étaient < 10 .

Conclusion : La *Tp*-PCR est plus utile pour confirmer que pour infirmer le diagnostic de syphilis dans les ulcères cutané-muqueux. La *Tp*-PCR est un outil diagnostique utile dans le diagnostic d'ulcères sexuels, en particulier lorsque la sérologie est encore négative et dans les centres avec une forte prévalence de syphilis ($> 16\%$).

³ Méthode choisie avant la mise en circulation de la revue Cochrane et des commandes Stata ou R permettant la méta-analyse des données diagnostiques.

IV.2 Introduction

Au début des années 1990, l'amplification de gène ou de protéine spécifiques du *Treponema pallidum* par *Tp*-PCR a été envisagée comme une alternative intéressante aux méthodes de détection directe, telle que le fond noir et comme complément des tests sérologiques d'interprétation souvent difficile.⁴⁴⁻⁵³ Cependant les résultats des différentes études épidémiologiques publiées sont contradictoires quant à l'utilité de la *Tp*-PCR qui varie selon le stade de la syphilis et selon le milieu biologique testé. Depuis 2008, l'*International Union against Sexually Transmitted Infections* (IUSTI) a introduit la *Tp*-PCR dans la stratégie diagnostique des lésions cutanéomuqueuses évocatrices de syphilis au même rang que les autres méthodes diagnostiques directes (fond noir ou fluorescence directe).⁸ Le CDC a quant à lui seulement évoqué l'utilisation de la *Tp*-PCR par certains laboratoires de microbiologie clinique sans pour autant la considérer comme une méthode diagnostique de choix dans le diagnostic des lésions cutanéomuqueuses évocatrices de syphilis.⁶ Suite à cette controverse, il semblait intéressant de faire le point sur les performances diagnostiques de la *Tp*-PCR comparativement aux tests diagnostiques de référence, en tenant compte du stade de l'infection et du spécimen biologique testé en réalisant une revue systématique des études publiées dans la littérature scientifique complétée par une méta-analyse de ces données.

IV.3 Objectifs

Le but de ce premier travail visait à répondre aux objectifs suivants :

1. Faire une revue systématique de la littérature afin de répertorier l'ensemble des études publiées présentant des résultats sur la performance diagnostique de la *Tp*-PCR.
2. Faire une méta-analyse des données collectées afin de présenter des estimateurs *poolés* de la sensibilité, spécificité et des rapports de vraisemblance positif et négatif de la *Tp*-PCR comparée aux tests dits de référence, en fonction du stade de la maladie et du spécimen biologique testé.

IV.4 Matériel et méthodes

IV.4.1 Design de l'étude

Cette première étude est une revue systématique de la littérature sur la performance diagnostique de la *Tp*-PCR dans le diagnostic de syphilis complétée par une méta-analyse des données collectées. L'article émanant de ce travail est fourni en annexe B.

IV.4.2 Critères d'éligibilité des études sélectionnées

Les critères d'inclusion des études étaient les suivants :

- Etude clinique à visée diagnostique menée chez des humains (étude transversale, étude cas-témoins, étude de cohorte, série de cas sans recrutement temporel ou cas historiques).
- Présentation des résultats des tests diagnostiques de référence pour la syphilis (fond noir, tests sérologiques tréponémiques et non tréponémiques, immunofluorescence directe) et pour la *Tp*-PCR (positif ou négatif).
- Information sur le stade de la maladie et sur le spécimen biologique testé.

Les critères d'exclusion des études étaient les suivants :

- Cas clinique (*case report*).
- Article de revue sans résultats originaux.
- Études de laboratoire non humaines (études *in vitro* sur des souches bactériologiques ou sur des animaux).

IV.4.3 Sources d'information et stratégie de recherche

IV.4.3.1 Sources d'information

Les sources bibliographiques se sont basées sur 3 bases de données en ligne: *Medline* (*Pubmed*), *Embase* et *Web of Science* et sur les résumés des communications scientifiques de cinq congrès spécialisés dans le domaine des maladies infectieuses et/ou des infections sexuellement transmissibles. Les livres ou les sites internet des congrès suivants ont été consultés (année du congrès): *Annual Meeting of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (2000-2011), *International Society for Sexually Transmitted Diseases Research meetings* (2003-2011), *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1999-2011), *International Union against Sexually*

Transmitted Infections (2009), et *International Congress on Infectious Diseases* (2004-2009). La recherche d'études cliniques présentées à des congrès a permis de vérifier si celles-ci avaient été publiées mais servaient aussi à limiter le biais de publication en n'incluant pas seulement dans la revue systématique des études publiées.

IV.4.3.2 Stratégie de recherche des études

Avant la mise en place de l'étude, un protocole d'étude a été rédigé par la candidate et trois investigateurs ont été désignés pour rechercher les études et appliquer les critères d'éligibilité (Angèle Gayet-Ageron, Béatrice Ninet [microbiologiste] et Stephan Lautenschlager [médecin dermatologue]). Ces trois personnes avaient à disposition le protocole d'étude ainsi que la liste des critères d'éligibilité.

La recherche des études dans les différentes sources bibliographiques s'est basée sur l'utilisation et la combinaison des mots clés suivants: (« syphilis » OR « *Treponema pallidum* » OR « neurosyphilis ») AND (« polymerase chain reaction » OR « PCR » or « molecular amplification »). La liste des études trouvées dans les différentes sources de données était fournie par la candidate puis chacun des trois investigateurs décidait quelles études garder dans la première liste de tri. Une liste complémentaire des résumés des communications des congrès a été générée en parallèle.

IV.4.3.3 Sélection des études

Après consultation des différentes sources d'information, un certain nombre d'études a été trouvé et la liste comprenant le nom des auteurs, le titre de l'étude et ses références bibliographiques a été enregistrée dans une base de données *EndNote*. Les doublons ont été supprimés. A partir de cette liste, chaque résumé (*abstract*) a été consulté par les trois investigateurs et les critères d'éligibilité ont été appliqués. Lorsqu'aucun *abstract* n'était pas disponible ou lorsque les informations présentées dans l'*abstract* étaient insuffisantes, l'article complet était consulté directement. Après cette première étape, les résultats des trois investigateurs ont été confrontés et analysés par la candidate. Lors d'une réunion, chaque discordance entre les trois listes était discutée et argumentée. A l'issue de la réunion, une liste des études pour lesquelles l'article complet devait être lu a été rendue.

Dans une seconde étape, les trois investigateurs ont participé pour les 100 premiers articles complets et pour les suivants, seuls deux investigateurs (Angèle Gayet-Ageron et

Stephan Lautenschlager) ont participé. Tous les articles complets ont été analysés par les deux ou trois investigateurs et les critères d'éligibilité étaient à nouveau vérifiés. A l'issue de cette seconde étape, une deuxième liste des études à considérer était établie. Lors d'une deuxième réunion, chaque discordance a été discutée selon la même procédure que précédemment.

Toutes les raisons d'exclusions ont été renseignées dans une base Excel.

IV.4.4 Evaluation de la qualité des études sélectionnées

A partir de la liste des études retenues, deux investigateurs (Angèle Gayet-Ageron et Stephan Lautenschlager) ont rempli une fiche reprenant les 14 items du QUADAS évaluant la qualité des études sélectionnées.⁵⁴ Pour chaque item, les modalités de réponse étaient « oui », « non » ou « pas clair ». Deux études étaient rédigées en Tchèque⁵⁵ et en Russe⁵⁶ et ont été évaluées grâce à la traduction par deux personnes parlant ces langues (Thomas Perneger pour l'étude Tchèque ; Youri Popowski pour l'étude Russe).

Whiting et coll.⁵⁷ ont publié une méthode d'interprétation du QUADAS pour évaluer la qualité des études diagnostiques en regroupant les 12 premiers items selon 3 aspects : la « représentativité » de la population d'étude (item 1 du QUADAS); l'absence de « biais » (items 3 à 7, 10 à 12) ; et finalement la « qualité » de l'étude (items 2, 8 et 9). L'étude était jugée représentative de la population cible si la réponse à l'item 1 était « oui ». L'étude était jugée non biaisée si les réponses aux items 3 à 7, et 10 à 12 étaient toutes « oui ». Finalement l'étude était jugée de bonne qualité si toutes les réponses aux items 2, 8 et 9 étaient « oui ».

IV.4.5 Procédures d'extraction des données

Dans une dernière étape, seuls deux investigateurs (Angèle Gayet-Ageron et Stephan Lautenschlager) ont extrait les données des articles sélectionnés. Les données ont également été confrontées et chaque discordance a été discutée entre les deux investigateurs au cours de deux séances téléphoniques. A l'issue de cette dernière étape, la liste des études retenues était disponible.

Les données suivantes ont été extraites des articles retenus : stade de la maladie (stades primaire, secondaire, précoce, latent précoce, latent tardif, neurosyphilis, syphilis congénitale), spécimen biologique testé (ulcère, sang, liquide céphalorachidien, placenta, liquide amniotique, etc.). Le stade de syphilis précoce regroupe le stade primaire, secondaire et latent précoce survenant dans l'année suivant l'infection. Pour les résultats dans le sang, le

type de compartiment sanguin testé était également renseigné (sang total, plasma, ou sérum). Le nombre de cas de syphilis et de témoins retenus par les tests de référence, le nombre de *Tp*-PCR positives parmi les cas et le nombre de *Tp*-PCR positives parmi les témoins ont également été relevés. Si des données manquaient concernant les résultats des tests de référence et de la *Tp*-PCR seulement, le « *corresponding author* » du papier était contacté afin d'obtenir des informations supplémentaires.

En plus des variables énumérées précédemment, les variables suivantes ont été relevées par une seule personne (Angèle Gayet-Ageron) : premier auteur, journal, année de publication, pays de l'étude. Enfin, les variables suivantes ont été définies *a priori* comme potentiels facteurs d'hétérogénéité : l'année de publication de l'étude (du fait de l'évolution des techniques PCR au cours du temps), le type de *Tp*-PCR (PCR standard, PCR en temps réel, *nested*-PCR, PCR *multiplex*), la cible de la *Tp*-PCR (protéine 47kDa, gène de la polymérase A, gène *bmp*, gène *tmpC*, gène de la 16SrRNA, gène *tmpA*, combinaison de cibles), la procédure de purification de l'ADN durant le processus d'extraction, l'utilisation de contrôle d'inhibition au cours de la *Tp*-PCR, le détail des tests de référence utilisés (fond noir, VDRL/RPR, FTA-ABS, TPHA, etc.), le nombre d'hommes parmi les patients inclus, le nombre de patients infectés par le VIH parmi les patients inclus, l'âge moyen ou médian des patients. Le Produit Intérieur Brut (PIB) du pays où l'étude a été conduite, a été secondairement récolté en utilisant les bases de données de l'OMS et en tenant compte de l'année de publication de l'étude. Notre hypothèse était que le PIB pouvait être associé au niveau d'accès aux soins et donc aux différents tests diagnostiques (tests sérologiques et *Tp*-PCR) et pouvait ainsi expliquer une part de l'hétérogénéité des résultats.

IV.4.6 Analyses des données

IV.4.6.1 Sous groupes d'analyse

Afin d'obtenir des valeurs non biaisées de la performance diagnostique de la *Tp*-PCR, les études ont été divisées selon les tests de référence utilisés pour le diagnostic de syphilis : celles considérées comme utilisant des tests appropriés selon les recommandations du CDC aux Etats-Unis⁴ et celles utilisant des tests inappropriés ou non recommandés par le CDC.

IV.4.6.2 Estimations de la sensibilité, spécificité, et rapports de vraisemblance positif et négatif *poolés*

Afin de respecter la physiopathologie de la maladie, les analyses ont été faites par stade de syphilis et par spécimen biologique testé. Les estimateurs *poolés* de la sensibilité et de la spécificité de la *Tp*-PCR comparée aux tests de référence appropriés et non appropriés sont présentés accompagnés de leur intervalle de confiance à 95% (IC95%). Les estimateurs *poolés* ont été calculés selon la méthode de DerSimonian et Laird utilisant les proportions *logit*-transformées selon la méthode de l'inverse de la variance et en utilisant un effet aléatoire.⁵⁸ Les modèles à effets aléatoires ont été choisis du fait de l'hétérogénéité attendue dans les résultats. En cas de faible hétérogénéité ($I^2 < 50\%$), les estimateurs *poolés* des modèles avec effets fixes et aléatoires étaient de toutes manières assez semblables d'où notre décision de ne rapporter que les estimateurs *poolés* des modèles à effets aléatoires.

Afin de présenter la performance diagnostique globale de la *Tp*-PCR, pour les études présentant des données de sensibilité/spécificité, des rapports de vraisemblance positifs (RV+) et négatifs (RV-) ont été également estimés afin de tester l'utilité clinique de la PCR dans le diagnostic de syphilis.⁵⁹ Les rapports de vraisemblances ont été calculés de la façon suivante :

$$RV+ = \frac{\text{Sensibilité}}{1 - \text{Spécificité}} = \frac{P(T+ | \text{référence}+)}{P(T+ | \text{référence}-)}$$

Un rapport de vraisemblance positif correspond au rapport des probabilités d'avoir un test positif chez les malades comparés aux non malades (témoins). Un test diagnostique avec un rapport de vraisemblance positif supérieur à 10 est jugé intéressant d'un point de vue clinique.⁶⁰

$$RV- = \frac{1 - \text{Sensibilité}}{\text{Spécificité}} = \frac{P(T- | \text{référence}+)}{P(T- | \text{référence}-)}$$

Un rapport de vraisemblance négatif correspond au rapport des probabilités d'avoir un test négatif chez les malades comparés aux non malades (témoins). Un test diagnostique avec un rapport de vraisemblance négatif inférieur à 0,1 est jugé intéressant d'un point de vue clinique.⁶⁰

IV.4.6.3 Exploration de l'hétérogénéité des résultats entre les études

L'exploration des facteurs d'hétérogénéité définis *a priori* n'a été évaluée que lorsque la valeur de I^2 ou si le test de Cochran donnait une valeur $p < 0,10$.⁶¹ I^2 reflète la proportion de variance entre les études due à certains facteurs et non liée au hasard⁶¹ et testée selon le test de Cochran. Cette exploration des facteurs d'hétérogénéité a été évaluée pour les RV+ et RV- si les données étaient disponibles pour au moins 10 études.

La méta-régression a permis d'explorer l'hétérogénéité des résultats de RV+ et RV- en fonction des facteurs continus (valeur du PIB, l'année de publication de l'étude). Le test de Cochran a permis d'explorer l'hétérogénéité entre les strates des facteurs catégoriels (type de *Tp*-PCR, cible de la *Tp*-PCR, purification de l'ADN au cours de l'extraction, contrôle de facteurs d'inhibition dans les prélèvements, pays de réalisation de l'étude groupés selon le continent) lorsqu'au moins 10 études étaient disponibles en tout et au moins 2 études étaient disponibles dans chaque strate.

IV.4.6.4 Exploration du biais de publication dans l'étude

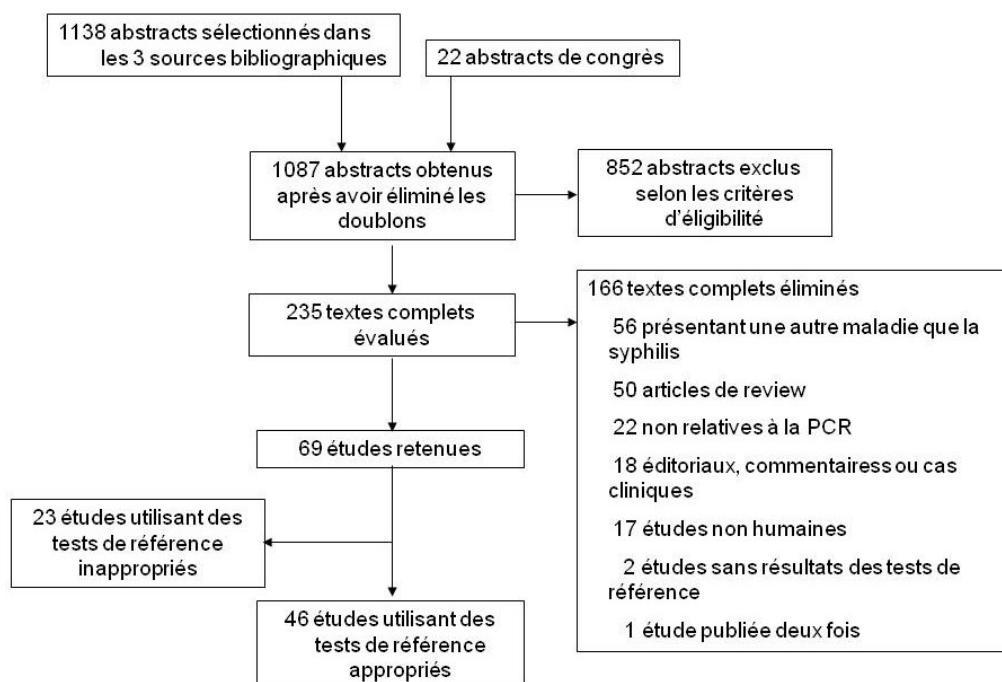
L'existence d'un biais de publication potentiel a été explorée lorsque le nombre minimum d'études était de 10. Premièrement au moyen d'un «*funnel plot*» dont le but est d'évaluer graphiquement si le choix des études incorporées dans la méta-analyse est représentatif de l'ensemble des études réalisées. Le «*funnel plot*» représente en abscisse la taille de l'effet rapporté dans l'étude (ici *logit* du RV+ ou RV-) en fonction de l'erreur standard (ou de la taille de l'étude). Si les études sélectionnées sont représentatives, le «*funnel plot*» devrait être symétrique de part et d'autre de l'effet *poolé*. Cette évaluation a été complétée par la méthode *Trim and Fill*⁶² qui fournit le nombre d'études qui manquent pour rendre le graphique symétrique. Cette méthode propose ensuite une estimation corrigée des paramètres *poolés* de la méta-analyse (RV+ et RV-) en incorporant ces études manquantes.

Toutes les analyses ont été réalisées sur le logiciel *Comprehensive Meta Analysis* Version 2 (Biostat, Englewood, NJ, USA) et le seuil de significativité considéré était 0,05.

IV.5 Résultats

Au total 1138 abstracts ont été obtenus à partir des 3 sources de données bibliographiques ainsi que 22 abstracts de congrès ou conférences spécialisées (Figure IV.1). Après avoir appliqué la procédure de sélection des études, 69 études ont été retenues dans la revue systématique. Parmi ces 69 études, deux études n'ont pas été incluses dans la méta-analyse du fait de leur singularité : la première testait la sensibilité de la *Tp*-PCR dans l'humeur aqueuse de cas de syphilis secondaire avec atteinte oculaire de type panuvéïte.⁶³ La deuxième testait la sensibilité de la *Tp*-PCR dans le sang de mères d'enfant mort-né suspect de syphilis congénitale.⁶⁴ Parmi ces 69 études, 23 n'utilisaient pas une méthode de détection directe dans les prélèvements cliniques de syphilis primaire ou récente comme recommandé par le CDC tandis que 46 études ont utilisé des tests appropriés. Il a semblé important de stratifier les résultats sur cette information : « tests de référence appropriés » versus « tests de référence non appropriés ».

Figure IV.1. Diagramme de flux de la procédure de sélection des études dans la revue systématique.



IV.5.1 Description des 69 études sélectionnées

Au total 69 études ont été retenues après vérification des critères d'éligibilité (Tableau IV.1). La plupart des études a inclus des patients atteints de syphilis précoce (primaire, secondaire ou latente précoce) donc symptomatique. La majorité des études a été conduite en Europe (25/69, 36,2%) ou en Amérique (20/69, 28,9%). Le reste des études était mené en Afrique (13/69, 18,8%), en Asie (8/69, 11,6%) ou en Australie (2, 2,9%). Au total, les données sur les performances diagnostiques de la *Tp*-PCR comparée aux tests de référence se basent sur un collectif de 9848 patients (3697 patients considérés comme atteints de syphilis, quelque soit le stade et 6151 considérés comme non atteints de syphilis) dont 38,1% ont été recrutés dans un pays Africain ou Asiatique, 33,3% dans un pays Européen, 24,9% dans un pays du continent Américain et 3,7% en Australie. La plupart des études a utilisé des PCR standards (44/69, 63,8%) et 36,2% des études ont utilisée des PCR *multiplex* ciblant en plus de la syphilis, les *herpes simplex* et *Haemophilus ducreyi*. Le gène *tpp47* de la lipoprotéine 47kDa (60,2%) était le plus souvent ciblé dans les PCRs, suivi par le gène de la polymérase I (*polA*) (22,2%). En tout, 46 des 69 études (66,7%) ont respecté les recommandations du CDC pour l'utilisation des tests diagnostiques de la syphilis. La majorité des patients inclus dans les différentes études était des hommes (75,3%) avec une médiane d'âge allant de 23 à 42 ans. Pour les patients non considérés comme atteints de syphilis et servant de témoins pour la performance de la *Tp*-PCR, les diagnostics des ulcères génitaux étaient dus à *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus ducreyi* ou au virus *Herpes*. Les autres diagnostics d'ulcération étaient des aphtes ou des ulcérations traumatiques. Seules 29 études ont fourni des informations sur le statut VIH des patients et 48,6% d'entre eux étaient co-infectés par le VIH. L'utilisation d'antibiotiques dans les semaines précédant la réalisation de la *Tp*-PCR était stipulée dans 23 études et dans 12 études (52,0%), des antibiotiques avaient été prescrits avant de faire la *Tp*-PCR.

Tableau IV.1. Présentation des 69 études retenues dans la revue systématique par stade de syphilis.

Stade de syphilis							
Variables décrites	Primaire	Secondaire	Précoce	Latente	Neurosyphilis	Congénitale	Total
Nombre d'études	30	25	21	12	10	7	69*
Continent, n (%)							
Afrique	6 (20,0)	0 (0,0)	6 (28,6)	0 (0,0)	1 (10,0)	0 (0,0)	13
Asie	2 (6,7)	1 (4,0)	5 (23,8)	1 (8,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	8
Europe de l'Est	4 (13,3)	5 (20,0)	0 (0,0)	3 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	5
Océanie	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (9,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2
Amérique du Nord	9 (30,0)	6 (24,0)	2 (9,5)	3 (25,0)	3 (30,0)	6 (85,7)	16
Amérique du Sud	0 (0,0)	2 (8,0)	3 (14,3)	0 (0,0)	1 (10,0)	1 (14,3)	4
Europe de l'Ouest	9 (30,0)	11 (44,0)	3 (14,3)	5 (41,7)	5 (50,0)	0 (0,0)	20
Spécimen biologique testé, n (%)							
Sang	10 (33,3)	13 (52,0)	2 (9,1)	10 (83,3)	1 (11,1)	6 (85,7)	42
Ulcère/lésion	27 (90,0)	18 (72,0)	20 (90,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	65
Liquide céphalo-rachidien	1 (3,3)	1 (4,0)	2 (9,1)	2 (16,7)	8 (88,8)	3 (42,9)	17
Humeur aqueuse	0 (0,0)	1 (4,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1
Placenta	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (14,3)	1
Fluide amniotique	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (28,6)	2

Tableau IV.1 (suite).

Stade de syphilis							
Variables décrites	Primaire	Secondaire	Précoce	Latente	Neurosyphilis	Congénitale	Total
Type de PCR**, n (%)							
PCR <i>multiplex</i>	9 (30,0)	1 (4,0)	15 (71,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	25
PCR standard	13 (43,3)	12 (48,0)	4 (19,0)	7 (58,3)	8 (80,0)	7 (100)	44
<i>Real-time</i> PCR	4 (13,3)	5 (20,0)	1 (4,8)	2 (16,7)	1 (10,0)	0 (0,0)	13
PCR <i>nested</i>	4 (13,3)	7 (28,0)	1 (4,8)	3 (25,0)	1 (10,0)	0 (0,0)	16
Cible de la PCR***, n (%)							
Gène <i>tpp47</i>	19 (63,3)	13 (52,0)	16 (76,2)	6 (50,0)	7 (70,0)	4 (57,1)	65
Gène <i>polA</i>	7 (23,3)	9 (36,0)	3 (14,3)	3 (25,0)	0 (0,0)	2 (28,6)	24
Gène <i>bmp</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (9,5)	1 (8,3)	1 (10,0)	0 (0,0)	4
Gène <i>tmpC</i>	1 (3,3)	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (8,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	3
Gène 16SrRNA	2 (6,6)	1 (4,0)	1 (4,8)	1 (8,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	5
Gène <i>tmpA</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (10,0)	0 (0,0)	1
Combinaison de cibles	2 (6,6)	1 (4,0)	0 (0,0)	2 (16,7)	0 (0,0)	1 (14,3)	6
Nombre de patients de l'étude							
Total	4417	1398	2885	534	397	217	9848
Malades	1516	604	762	494	205	116	3697
Non malades	2901	794	2123	40	192	101	6151

Tableau IV.1 (suite).

Stade de syphilis							
Variables décrites	Primaire	Secondaire	Précoce	Latente	Neurosyphilis	Congénitale	Total
Proportion d'hommes, %	73,4	76,5	77,8	70,2	80,5	NA	75,3
Etendue des âges médians en années	26-37	31-42	25-37	35-37	37	NA	23-42
Test de référence adéquat (%)	19 (63,3)	18 (72,0)	12 (57,1)	10 (83,3)	9 (90,0)	7 (100)	46 (66,7)*

*Une étude pouvait être utilisée plusieurs fois selon le stade considéré.

**Dans une même étude, plusieurs types de PCR pouvaient être utilisés d'où un total >69.

***Dans une même étude, plusieurs cibles pouvaient être utilisées d'où un total >69.

PCR : polymerase chain reaction. S. congénitale: syphilis congénitale.

Les études sélectionnées sont présentées par stade de syphilis (Tableaux IV.2 à IV.7). Plusieurs stades pouvaient être étudiés dans une même étude expliquant pourquoi le total des différents sous-groupes de variables étudiées peut être supérieur à 69. Les tableaux sont présentés par stade de syphilis et donnent la description des études, le pays de réalisation, l'âge moyen ou médian des sujets inclus, la proportion d'hommes, la proportion de sujets testés VIH positifs, le nombre de sujets de l'étude, la cible de la *Tp*-PCR, les critères utilisés pour classer les sujets comme malades/non malades, le ratio de *Tp*-PCR positives chez les malades et le ratio de *Tp*-PCR négatives chez les non malades. Afin d'éviter un biais de publication, les études avec de très petits effectifs, du fait notamment des sous-groupes créés, ont été conservées dans la méta-analyse.

Tableau IV.2. Caractéristiques de la population d'étude et résultats de la *Tp*-PCR pour les syphilis primaires (N=30 études).

1 ^{er} auteur (année)	Pays	Age*	Hommes, %	VIH+, %	N	Spécimen	Cible PCR (gène)	Critères diagnostiques	PCR+/malades	PCR-/non malades
Ahmed (2003)	Tanzanie	27,4	52,9	49,0	102	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	1/26	76/76
Alessi (2004)	Italie	ND	ND	ND	37	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	ND	20/22	15/15
Ballard (2007)	Afrique Sud	ND	97,0	46,7	868	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	145/447	403/421
Behets, Andriamiadana (1999)	Madagascar	26,3	70,9	ND	196	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	52/164	28/32
Beyrer (1998)	Thaïlande	ND	21,1	45,8	38	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C	0/2	35/36
Castro, Prieto (2009)	Portugal	ND	ND	ND	14	Ulcère	<i>polA</i>	C+TNT+TT	9/9	ND
					14	Plasma	<i>polA</i>	C+TNT+TT	6/14	ND
					14	Sang total	<i>polA</i>	C+TNT+TT	4/14	ND
Flasarova (2006)	Rép. Tchèque	35**	54,1	ND	10	Ulcère	<i>tmpC</i>	C+TNT+TT	2/2	ND
					10	Sérum	<i>tmpC</i>	C+TNT+TT	0/10	ND
					3	Sang total	<i>tmpC</i>	C+TNT+TT	0/3	ND
Gayet-Ageron (2009)	Suisse	41,8	87,8	40,5	26	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	8/10	7/7
						Sang total	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	5/18	7/7
						Sérum	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	6/11	7/7
Grange (2012)	France	37-47	96,0	38,0	65	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	52/65	41/43
Heroldova (2004)	Rép. Tchèque	ND	ND	ND	3	Ulcère	<i>polA</i>	C+FN+TNT+TT	0/1	2/2
					3	Sérum	<i>polA</i>	C+TNT+TT	1/3	ND
Heymans (2010)	Hollande	32**	74,1	ND	716	Ulcère	<i>polA</i>	C+FN+TNT+TT	83/114	592/602
Kouznetsov (2005)	Russie	ND	ND	ND	2	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+RIT+TNT+TT	2/2	ND
					2	Sérum	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	1/2	ND
					2	Plasma	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	0/2	ND
Marfin (2001)	USA	ND	ND	ND	11	Sang total	<i>polA</i>	C+TNT+TT	1/7	4/4
Marra (2004)	USA	37**	74,8	72,1	5	LCR	16SrRNA	C+TNT+TT	0/5	ND
Martin (2010)	Canada	37	47,0	ND	31	Ulcère	47kDa+ <i>polA</i> + <i>bmp</i>	C+FN+TNT+TT	31/31	ND

Tableau IV.2 (suite).

I ^{er} auteur (année)	Pays	Age*	Hommes, %	VIH+, %	N	Spécimen	Cible PCR (gène)	Critères diagnostiques	PCR+/malades	PCR-/non malades
Martin, Gu (2009)	Chine	37,3	75,5	2,0	49	Ulcère	47kDa+ <i>polA</i> + <i>bmp</i>	C+FN+TNT+TT	38/39	10/10
Martin, Tsang (2009)	Canada	36**	69,1	ND	30	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	9/15	16/16
	-				30	Sang total	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	0/9	14/14
Mertz ; Weiss (1998)	USA	35**	68,0	6,0	516	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT	48/75	423/441
Mertz, Trees (1998)	USA	ND	77,6	25,2	47	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	23/47	92/96
Moodley (2003)	Afrique Sud	26**	74,6	75,1	587	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	39/91	484/496
Muller (2010)	Autriche	42**	67,4	8,1	4	Biopsie	<i>polA</i>	ND	4/4	120/120
Orle (1996)	USA	ND	ND	ND	278	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	64/83	186/195
Palmer (2003)	Grande Bretagne	ND	71,7	20,0	37	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	18/19	17/17
Paz-Bailey (2010)	Afrique Sud	32**	100	100	32	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	20/32	ND
Pope (2005)	USA	31**	68,2	ND	90	Ulcère	<i>polA</i>	C+FN+TNT+TT	15/42	80/80
Riedner (2003)	Tanzanie	ND	0	89,6	216	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	12/52	164/164
Rodionova (2003)	Russie	ND	ND	ND	24	Sang total	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	22/24	ND
	-				24	Sang total	16SrRNA	C+FN+TNT+TT	24/24	ND
Scott (2010)	Ecosse	ND	ND	ND	15	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	3/6	ND
	-				15	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	13/13	ND
Sutton (2001)	USA	32,7	71,1	ND	45	Sang total	<i>polA</i>	C+TNT	1/1	ND
	-				45	Ulcère	<i>polA</i>	C+FN+TNT	29/31	ND
Tipple (2011)	Grande Bretagne	36	98,0	52,5	14	Sang total	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TT	3/14	28/28
	-				14	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TT	14/14	28/28

*Age moyen, **Age médian, C : signes cliniques, FN : fond noir, TNT : test non tréponémique (VDRL, RPR or TRUST), TT : test tréponémique (TPHA ou FTA-ABS), ND : non donné, LCR : liquide céphalo-rachidien.

Tableau IV.3. Caractéristiques de la population d'étude et résultats de la *Tp*-PCR pour les syphilis secondaires (N=25 études).

1 ^{er} auteur (année)	Pays	Age*	Hommes, %	VIH+, %	N	Spécimen	Cible PCR (gène)	Critères diagnostiques	PCR+/malades	PCR-/non malades
Alessi (2004)	Italie	ND	ND	ND	8	Peau	47kDa (<i>tpp47</i>)	ND	6/8	ND
Behets, Brathwaite (1999)	Jamaïque	30,1	82,9	22,0	20	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	11/20	264/284
Buffet (2007)	France	34,4	91,7	50,0	12	Biopsie	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	9/12	24/24
Castro, Prieto (2009)	Portugal	ND	ND	ND	7	Biopsie	<i>polA</i>	C+TNT+TT	6/7	ND
	-				7	Plasma	<i>polA</i>	C+TNT+TT	5/7	ND
	-				7	Sang total	<i>polA</i>	C+TNT+TT	4/7	ND
Cornut (2011)	France	ND	ND	ND	5	Hum. aqueuse	<i>polA</i>	C+TNT+TT	3/5	ND
Cruz (2010)	Colombie	31**	35,1	5,3	57	Biopsie	<i>polA</i>	C+TNT+TT	12/26	ND
	-				57	Sang total	<i>polA</i>	C+TNT+TT	8/12	3/3
Flasarova (2006)	Rép. Tchèque	35**	54,1	ND	8	Lésion	<i>tmpC</i>	C+TNT+TT	1/3	ND
	-				8	Sérum	<i>tmpC</i>	C+TNT+TT	0/8	ND
	-				1	Sang total	<i>tmpC</i>	C+TNT+TT	0/1	ND
Gayet-Ageron (2009)	Suisse	41,8	87,8	40,5	40	Lésion	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	1/5	5/5
	-				40	Sang total	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	11/31	5/5
	-				40	Sérum	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	7/15	5/5
	-				40	Plasma	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	2/2	5/5
Grange (2012)	France	37-47	96,0	38,0	65	Lésion	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	38/44	2/43
Heroldova (2004)	Rép. Tchèque	ND	ND	ND	17	Lésion	<i>polA</i>	C+TNT	1/1	ND
	-				17	Sérum	<i>polA</i>	C+TNT	2/17	ND
Heymans () 2010	Hollande	32**	74,1	ND	716	Lésion	<i>polA</i>	C+FN+TNT+TT	33/77	55/56
Kouznetsov (2005)	Russie	ND	ND	ND	6	Lésion	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	4/4	ND
	-				6	Sérum	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	5/6	ND
	-				6	Plasma	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	1/6	ND
Marfin (2001)	USA	ND	ND	ND	5	Sang total	<i>polA</i>	C+TNT+TT	1/1	4/4

Tableau IV.3 (suite).

1 ^{er} auteur (année)	Pays	Age*	Hommes, %	VIH+, %	N	Spécimen	Cible PCR (gène)	Critères diagnostiques	PCR+/malades	PCR-/non malades
Martin (2010)	Canada	37	47,0	ND	7	Sang total	47kDa+ <i>polA</i> + <i>bmp</i>	C+FN+TNT+TT	4/7	ND
					7	Lésion	47kDa+ <i>polA</i> + <i>bmp</i>	C+FN+TNT+TT	4/7	ND
Martin, Tsang (2009)	Canada	36**	69,1	ND	16	Sang total	47kDa (<i>tpp47</i>)	C +TNT+TT	4/8	12/12
Marra (2004)	USA	37**	74,8	72,1	59	LCR	16SrRNA	C+TNT+TT	11/59	ND
Muller (2010)	Autriche	42**	67,4	8,1	34	Biopsie	<i>polA</i>	ND	26/34	120/120
Palmer (2003)	Grande Bretagne	ND	71,7	20,0	57	Lésion	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	8/10	47/47
Pope (2005)	USA	31**	68,2	ND	44	Lésion	<i>polA</i>	C+FN+TNT+TT	9/12	80/80
Rodionova (2003)	Russie	ND	ND	ND	153	Sang total	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	107/153	ND
Sutton (2001)	USA	32,7	71,1	ND	45	Sang total	<i>polA</i>	C+TNT	1/1	ND
					45	Lésion	<i>polA</i>	C+FN+TNT	8/8	ND
Talha (2009)	Hongrie	26,7	100	5,3	113	Sérum	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	2/2	104/111
Tipple (2011)	Grande Bretagne	36	98,0	52,5	19	Sang total	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TT	11/19	ND
					5	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TT	5/5	ND
Wenhai (2004)	Chine	ND	66,7	ND	24	Biopsie	47kDa (<i>tpp47</i>)	inconnus	10/24	ND
Zoechling (1997)	Autriche	ND	ND	ND	11	Biopsie	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TT	4/6	5/5

*Age moyen, **Age médian, C : signes cliniques, FN : fond noir, TNT : test non tréponémique (VDRL, RPR or TRUST), TT : test tréponémique (TPHA ou FTA-ABS), ND : non donné, LCR : liquide céphalo-rachidien.

Tableau IV.4. Caractéristiques de la population d'étude et résultats de la *Tp*-PCR pour les syphilis précoces (primaire, secondaire ou latente précoce) (N=21 études).

1 ^{er} auteur (année)	Pays	Age*	Hommes, %	VIH+, %	N	Spécimen	Cible PCR (gène)	Critères diagnostiques	PCR+/malades	PCR-/non malades
Becker (2010)	Inde	31	49,3	29,4	280	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	8/27	249/249
Behets, Brathwaite (1999)	Jamaïque	30,1	82,9	22,0	304	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	23/64	232/240
Bruisten (2001)	Hollande	ND	59,3	ND	364	Ulcère	<i>bmp</i>	FN ou TNT+TT	12/16	348/348
Chung (1994)	Corée	ND	ND	ND	23	LCR	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	6/23	ND
Garcia (2011)	Chili	ND	66,0	ND	33	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	20/21	12/12
Hoyo (2005)	Malawi	ND	68,7	ND	12	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	4/12	124/125
Htun (1998)	Lesotho	ND	ND	ND	92	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	23/24	58/58
Kingston (2004)	Grande Bretagne	ND	94,4	50,0	72	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	20/22	ND
Kouznetsov (2005)	Russie	ND	ND	ND	4	Sérum	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	2/4	ND
					4	Plasma	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	0/4	ND
Leslie (2007)	Australie	ND	84,6	20,9	301	Ulcère	<i>polA</i>	C+FN+TNT+TT	41/51	246/250
Liu (2005)	Chine	ND	ND	ND	51	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN	7/8	40/43
Mackay (2006)	Australie	24,8**	58,2	100	64	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	18/29	35/35
Malonza (1999)	Kenya	25**	84,9	35,9	245	Ulcère	<i>polA</i>	C+TNT+TT	52/69	156/176
Morse (1997)	Lesotho	23**	66,0	36,0	105	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	21/63	33/35
O'Farrell (2008)	Afrique Sud	29,9	100	74,1	162	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	3/9***	7/10***
Pietravalle (1999)	Italie	ND	ND	ND	23	Ulcère	<i>bmp</i>	C+FN+TNT+TT	13/14	ND
					23	Sérum	<i>bmp</i>	C+TNT	9/14	ND
Risbud (1999)	Inde	25**	92,1	22,2	302	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	33/106	179/196
Sanchez (2002)	Rép. Dom.	31	100	13,6	81	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	4/6	75/75
Sanchez (2002)	Pérou	31	100	13,6	63	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	3/3	57/57

Tableau IV.4 (suite).

1 ^{er} auteur (année)	Pays	Age*	Hommes, %	VIH+, %	N	Spécimen	Cible PCR (gène)	Critères diagnostiques	PCR+/malades	PCR-/non malades
Suntoke (2009)	Ouganda	29**	50,0	43,0	94	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	5/11	83/83
Sutton (2001)	USA	32,7	71,1	ND	44	Ulcère	<i>polA</i>	C+FN+TNT	41/44	ND
					41	Sang total	<i>polA</i>	C+FN+TNT	15/41	ND
Wang (2002)	Chine	34,9	89,9	ND	227	Ulcère	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN/TNT+TT	71/96	121/131

*Age moyen, **Age médian, ***Données fournies par les auteurs, différentes des données publiées, ND : non donné, C : signes cliniques, FN : fond noir, TNT : test non tréponémique (VDRL, RPR or TRUST), TT : test tréponémique (TPHA ou FTA-ABS), LCR : liquide céphalo-rachidien.

Tableau IV.5. Caractéristiques de la population d'étude et résultats de la *Tp*-PCR pour les neurosyphilis (N=10 études).

1 ^{er} auteur (année)	Pays	Age*	Hommes, %	VIH+, %	N	Spécimen	Cible PCR (gène)	Critères diagnostiques	PCR+/malades	PCR-/non malades
Castro (2005)	Portugal	ND	ND	ND	21	LCR	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	18/21	119/122
Garcia (2011)	Chili	ND	66,0	ND	33	LCR	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	4/8	23/23
Gordon (1994)	USA	35	81,8	90,9	10	LCR	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+RIT+TNT+TT	3/10	ND
Hay (1990)	Grande Bretagne	ND	ND	48,5	33	LCR	<i>tmpA</i>	C+TNT+TT	10/19	7/14
Marra (1996)	USA	ND	ND	100	81	LCR	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	0/2	0/23
Marra (2004)	USA	37**	74,8	72,1	65	LCR	16SrRNA	C+TNT+TT	16/65	ND
Molepo (2007)	Afrique Sud	ND	64,0	ND	50	LCR	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	23/40	5/10
Moskophidis (1996)	Allemagne	ND	ND	ND	10	LCR	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	6/10	ND
Noordhoek (1991)	Hollande	ND	ND	ND	27	LCR	<i>bmp</i>	C+TNT+TT	7/27	ND
Tipple (2011)	Grande Bretagne	36	98,0	52,5	19	Sang total	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TT	0/3	ND

*Age moyen, **Age médian, ND : non donné, C : signes cliniques, TNT : test non tréponémique (VDRL, RPR or TRUST), TT : test tréponémique (TPHA ou FTA-ABS), RIT : rabbit infectivity testing, LCR : liquide céphalo-rachidien.

Tableau IV.6. Caractéristiques de la population d'étude et résultats de la *Tp*-PCR pour les syphilis latentes en dehors de la syphilis latente précoce (N=12 études).

1 ^{er} auteur (année)	Pays	Age*	Hommes, %	VIH+, %	N	Spécimen	Cible PCR (gène)	Critères diagnostiques	PCR+/malades	PCR-/non malades
Castro (2007)	Portugal	ND	ND	ND	69	Plasma	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	31/69	ND
	-				69	Sang total	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	27/69	ND
	-				69	Sérum	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	18/69	ND
	-				69	Plasma	<i>polA</i>	C+TNT+TT	25/69	ND
	-				69	Sang total	<i>polA</i>	C+TNT+TT	19/69	ND
	-				69	Sérum	<i>polA</i>	C+TNT+TT	14/69	ND
	-				69	Plasma	47kDa+ <i>polA</i>	C+TNT+TT	29/69	ND
	-				69	Sang total	47kDa+ <i>polA</i>	C+TNT+TT	26/69	ND
	-				69	Sérum	47kDa+ <i>polA</i>	C+TNT+TT	19/69	ND
Castro, Prieto (2009)	Portugal	ND	ND	ND	61	Plasma	<i>polA</i>	C+TNT+TT	21/61	ND
	-				61	Sang total	<i>polA</i>	C+TNT+TT	14/61	ND
Chung (1994)	Corée	ND	ND	ND	3	LCR	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	2/3	5/5
Flasarova (2006)	Rép. Tchèque	35**	54,1	ND	74	Sérum	<i>tmpC</i>	C+TNT+TT	0/74	ND
Gayet-Ageron (2009)	Suisse	41,8	87,8	40,5	9	Sang total	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	0/6	3/3
	-									
Kouznetsov (2005)	Russie	ND	ND	ND	3	Sérum	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	0/3	ND
	-				3	Plasma	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TNT+TT	0/3	ND
Marfin (2001)	USA	ND	ND	ND	13	Sang total	<i>polA</i>	C+TNT+TT	8/13	ND
Marra (2004)	USA	37**	74,8	72,1	194	LCR	16SrRNA	C+TNT+TT	10/194	ND
Martin, Tsang (2009)	Canada	36**	69,1	ND	20	Sang total	47kDa+ <i>polA</i> + <i>bmp</i>	C +TNT+TT	0/8	12/12
Pietravallo (1999)	Italie	ND	ND	ND	29	Sérum	<i>bmp</i>	C+TNT	6/9	20/20
Rodionova (2003)	Russie	ND	ND	ND	42	Sang total	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+FN+TNT+TT	8/42	ND
Tipple (2011)	GB	36	98,0	52,5	8	Sang total	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+TT	1/8	ND

*Age moyen, **Age médian. ND : non donné, C : signes cliniques, FN : fond noir, TNT : test non tréponémique (VDRL, RPR or TRUST), TT : test tréponémique (TPHA ou FTA-ABS), LCR : liquide céphalo-rachidien.

Tableau IV.7. Caractéristiques de la population d'étude et résultats de la *Tp*-PCR pour les syphilis congénitales (N=7 études).

1 ^{er} auteur (année)	Pays	Age*	Sujet testé	VIH+, %	N	Spécimen	Cible PCR (gène)	Critères diagnostiques	PCR+/malades	PCR-/non malades
Casal (2011)	Brésil	21,8	Mère	22,2	36	Sang total	<i>polA</i>	C+TNT+TT	24/33	ND
Genest (1996)	USA	-	Nouveau-né	-	49	Placenta	47kDa (<i>tpp47</i>)	TNT+TT	6/38	11/11
Grimpel (1991)	USA	-	Nouveau-né	-	20	Sérum	47kDa (<i>tpp47</i>)	RIT	8/9	10/11
	-	ND	Mère	ND	12	Fluide amniotique	47kDa (<i>tpp47</i>)	FN+RIT	8/8	3/4
Hollier (2001)	USA	22,3	Mère	ND	20	Fluide amniotique	<i>polA</i>	C+FN+RIT	9/12	8/8
Martin, Tsang (2009)	Canada	-	Nouveau-né	-	3	Sang cordon	47kDa+ <i>polA</i> + <i>bmp</i>	C +TNT+TT	1/3	ND
Michelow (2002)	USA	-	Nouveau-né	-	76	Sang cordon	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+RIT+TNT+TT	16/17	53/59
	-				76	LCR	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+RIT+TNT+TT	11/17	57/59
Sanchez (1993)	USA	-	Nouveau-né	-	19	Sérum	47kDa (<i>tpp47</i>)	C+RIT+TNT	6/7	10/12

*Age moyen, ND : non donné, C : signes cliniques, FN : fond noir, TNT : test non tréponémique (VDRL, RPR or TRUST), TT : test tréponémique (TPHA ou FTA-ABS),

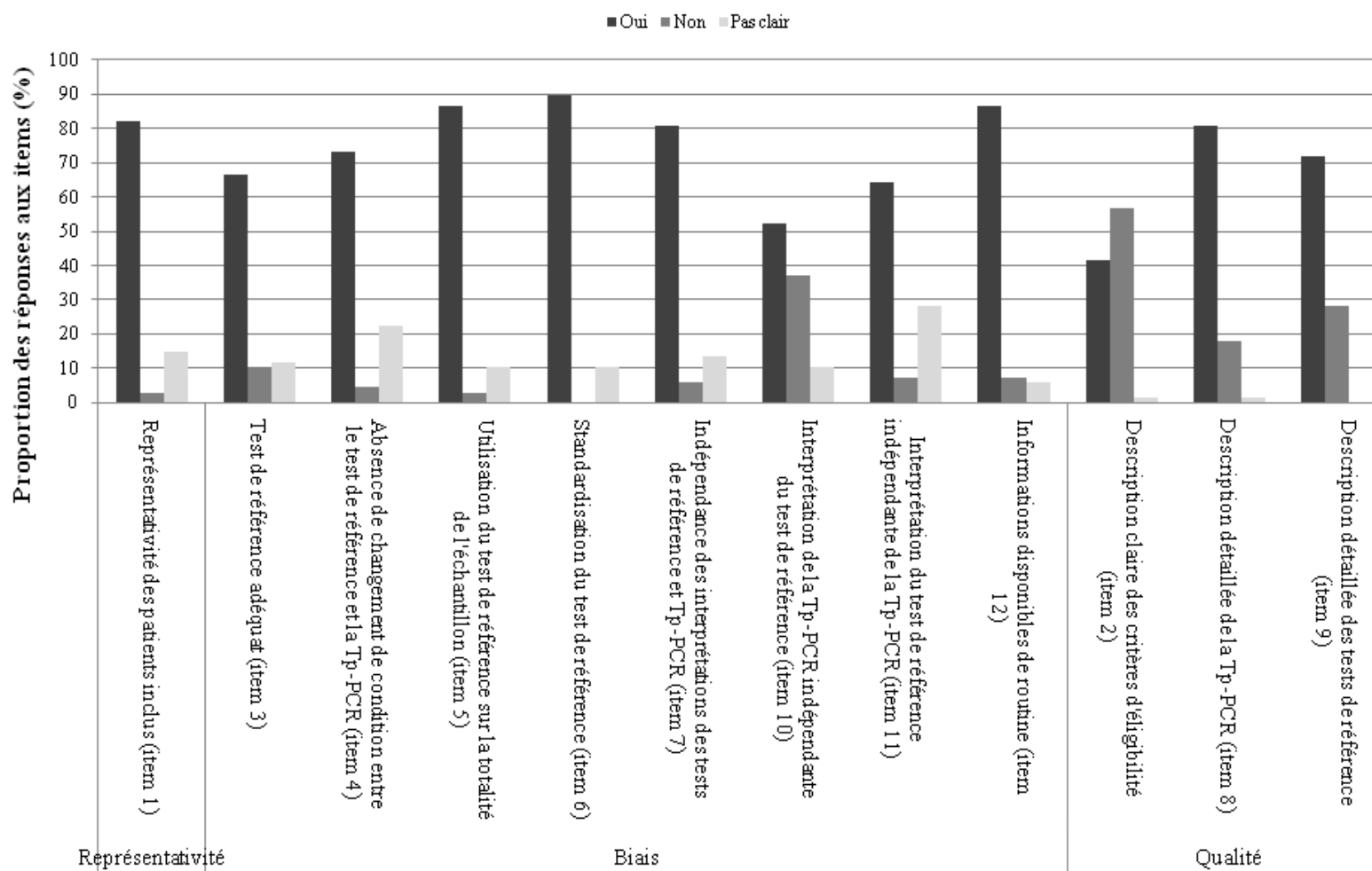
RIT : *rabbit infectivity testing*, LCR : liquide céphalo-rachidien.

IV.5.2 Evaluation de la qualité des études sélectionnées

L'outil QUADAS a été utilisé pour toutes les études sélectionnées, sauf sur deux études tirées d'abstracts présentés à un congrès pour lesquelles la partie méthodologie était insuffisamment complète pour utiliser cet outil [Heroldova et al. 2004 ; Castro et al. 2005]. En regroupant les items relatifs à l'existence de biais, 52,2% à 89,6% des études pouvaient être considérés comme non biaisés (valeurs extrêmes des proportions d'études non biaisées selon l'item considéré). Les populations d'étude utilisées étaient considérées comme représentatives à 82,0% des patients qui recevraient les tests en pratique. Finalement la majorité des études était jugée comme étant de bonne qualité dans 41,8% à 80,6% des cas, selon les items considérés. La Figure IV.2 présente les proportions de réponse aux différents items regroupés selon le critère jugé. A part pour l'item 2 mettant en évidence que les critères de sélection de la population d'étude étaient clairement établis dans 41,8% des études sélectionnées, tous les autres items rapportaient une proportion de « Oui » supérieure à 50%. Les résultats de la PCR étaient interprétés de manière aveugle par rapport aux tests de référence dans seulement 52,2% des études sélectionnées (item 10).

Toutes les études ont pu être évaluées concernant le choix du test de référence de la syphilis. L'item 3 du QUADAS rapportait spécifiquement l'information sur l'utilisation d'un test de référence adéquat pour le diagnostic de syphilis et ceci concernait 46 des 69 études sélectionnées (66,7%). Parmi les 42 études ayant évalué la *Tp*-PCR chez des patients porteurs d'ulcères pour lesquels la réalisation d'un examen direct (microscope à fond noir ou une autre technique) est recommandée, la moitié l'a utilisé et l'autre moitié s'est basée seulement sur des tests sérologiques. Les 10 études rapportant des cas de neurosyphilis ont employé des tests adéquats selon le CDC ainsi que les 7 études rapportant des cas de syphilis congénitales.

Figure IV.2 Proportions des réponses aux différents items du questionnaire QUADAS (%) évaluant la représentativité de la population d'étude, l'absence de biais potentiel et la qualité des études sélectionnées.



IV.5.3 Estimations des sensibilités, spécificités et rapports de vraisemblance poolés de la *Tp*-PCR comparée aux tests de référence, selon le stade de syphilis et le spécimen biologique testé : résultats de la méta-analyse

Afin de limiter le biais dans l'estimation de la performance diagnostique de la *Tp*-PCR, la méta-analyse des données publiées a été stratifiée sur le type d'examen de référence utilisé : les examens de référence étaient jugés adéquats s'ils suivaient les recommandations du CDC, dans le cas contraire ils étaient jugés inadéquats. L'utilisation des tests jugés inadéquats comme tests de référence diminuait significativement la sensibilité *poolée* de la *Tp*-PCR, sauf dans le sang des syphilis précoces où la sensibilité *poolée* est plus basse dans le groupe des études avec test de référence approprié (41,6% ; IC95% : 28,5-56,0) que dans celui du groupe des études avec test de référence non approprié (83,3% ; IC95% : 19,4-99,0). Cependant la sensibilité *poolée* du groupe approprié n'est basée que sur une seule étude et les intervalles de confiance autour des deux sensibilités *poolées* se recoupent suggérant une absence de différence statistique.

Le tableau IV.8 rapporte les sensibilités *poolées* de la *Tp*-PCR en fonction du stade de syphilis, du spécimen biologique testé et de l'adéquation du test de référence. Le tableau IV.8 rapporte aussi les spécificités *poolées* de la *Tp*-PCR en fonction du stade de syphilis, du spécimen biologique testé et de l'adéquation du test de référence. Dans les deux tableaux, les estimateurs *poolés* de la sensibilité et spécificité sont basés sur des effets aléatoires.

D'une manière générale, la sensibilité *poolée* était plus basse dans le sang que dans les ulcères et dans le liquide céphalo-rachidien, sauf pour les syphilis congénitales où la sensibilité *poolée* était de 83,0% (IC95% : 55,0-95,2) mais ne se basait que sur 4 études. Dans le sang, les résultats stratifiés sur les compartiments sanguins montraient des sensibilités plus hautes dans le sérum ou le plasma comparées au sang total mais les différences n'étaient pas statistiquement significatives. Contrairement au sang, les sensibilités dans les ulcères ou dans les lésions cutanées étaient toutes supérieures à 70% contrairement aux sensibilités dans le sang qui sont plus basses et inférieures à 56%. Concernant la neurosyphilis, les sensibilités dans le liquide céphalo-rachidien étaient proches de 50%. Les indices d'hétérogénéité I^2 étaient souvent supérieurs à 50% dans la plupart des stades de syphilis et des spécimens testés, à part dans le sang des syphilis congénitales et ceci justifiait la présentation des résultats du modèle avec effets aléatoires.

Globalement les spécificités *poolées* étaient bonnes autour de 90% (tableau IV.8). Les spécificités étaient meilleures dans les lésions cutanées des témoins (~95%) tandis que dans le

sang ou dans le liquide céphalo-rachidien, elles atteignaient jusqu'à 72%. Dans le sang, les différents compartiments testés ne montraient pas de grande différence en termes de spécificités. Le faible nombre d'études sélectionnées évaluant la performance de la *Tp*-PCR chez des témoins explique les largeurs des intervalles de confiance à 95% autour des valeurs centrales de spécificité. Les indices d'hétérogénéité I^2 étaient tous inférieurs à 50%, à part dans le liquide céphalo-rachidien des contrôles de neurosyphilis et dans le sang des contrôles de syphilis latentes.

Tableau IV.8. Estimations des sensibilités et spécificités *poolées* de la *Tp*-PCR comparée aux tests de référence, en fonction du stade de syphilis et du spécimen biologique.

<i>Stade de syphilis / Spécimen biologique</i>	<i>n</i>	Sensibilité (IC95%)	<i>I</i> ²	<i>n</i>	Spécificité (IC95%)	<i>I</i> ²
<i>Syphilis primaire</i>						
Sang						
Tests de référence appropriés	8	37,7 (18,0-62,4)	66,9%	4	95,7 (84,3-98,9)	0,0%
Sang total	6	36,1 (24,2-50,0)		4	95,7 (84,3-98,9)	
Sérum	3	50,2 (27,2-73,2)		1	93,7 (46,1-99,6)	
Plasma	2	39,4 (19,3-63,8)		-	-	
Tests de référence inappropriés	1	5,6 (0,3-50,5)	-	-	-	-
Ulcère						
Tests de référence appropriés	15	78,4 (68,2-86,0)	75,4%	11	96,6 (95,5-97,5)	0,0%
Tests de référence inappropriés	11	42,2 (31,8-53,3)	79,6%	20	96,7 (94,3-98,1)	50,1%
<i>Syphilis secondaire</i>						
Sang						
Tests de référence appropriés	9	52,2 (37,3-66,7)	71,1%	4	83,3 (51,1-96,0)	49,3%
Sang total	7	54,2 (41,0-66,8)		3	93,2 (72,2-98,6)	
Sérum	3	42,4 (11,4-80,8)		2	93,6 (87,4-96,8)	
Plasma	3	55,3 (16,2-88,9)		1	91,7 (37,8-99,5)	
Tests de référence inappropriés	2	34,4 (0,7-97,6)	77,1%	1	93,7 (87,4-97,0)	-
Lésion cutanée ou muqueuse						
Tests de référence appropriés	13	72,0 (57,1-83,2)	64,7%	9	96,3 (92,1-98,3)	0,0%
Tests de référence inappropriés	4	66,2 (49,5-79,6)	28,0%	2	97,6 (71,6-99,8)	75,6%

Tableau IV.8 (suite).

<i>Stade de syphilis / Spécimen biologique</i>	<i>n</i>	<i>Sensibilité (IC95%)</i>	<i>I²</i>	<i>n</i>	<i>Spécificité (IC95%)</i>	<i>I²</i>
<i>Syphilis précoce</i>						
Sang						
Tests de référence appropriés	19	41,6 (28,5-56,0)	79,9%	7	94,8 (86,0-98,2)	0,0%
Sang total	13	41,2 (26,5-57,6)		7	94,8 (86,0-98,2)	
Sérum	9	42,6 (24,8-62,5)		2	92,8 (62,7-99,0)	
Plasma	6	41,1 (20,2-65,7)		1	91,7 (37,8-99,5)	
Tests de référence inappropriés	1	83,3 (19,4-99,0)	-	1	93,7 (87,4-97,0)	-
Lésion ou ulcération cutanée ou muqueuse						
Tests de référence appropriés	36	75,9 (68,5-82,0)	79,0%	26	96,5 (95,0-97,6)	43,7%
Tests de référence inappropriés	18	50,3 (40,5-60,1)	85,6%	16	95,5 (92,9-97,2)	70,6%
<i>Neurosyphilis</i>						
Liquide céphalo-rachidien	8	47,4 (31,7-63,7)	75,5%	4	85,0 (39,9-98,0)	89,9%
<i>Syphilis latente</i>						
Sang	13	31,2 (22,4-41,5)	66,8%	4	83,5 (22,7-98,9)	78,5%
Sang total	6	20,2 (9,3-38,4)		3	72,1 (8,6-98,6)	
Sérum	3	20,9 (1,6-81,2)		1	97,6 (71,3-99,9)	
Plasma	5	39,4 (33,8-45,4)		-		
Liquide céphalo-rachidien	3	6,0 (3,6-10,0)	0,0%	1	87,5 (26,6-99,3)	0,0%
<i>Syphilis congénitale</i>						
Sang	4	83,0 (55,0-95,2)	40,3%	3	88,8 (79,9-94,1)	0,0%
Liquide céphalo-rachidien	3	62,2 (42,2-78,8)	6,2%	3	96,4 (89,5-98,8)	0,0%

Les tableaux IV.9 à IV.14 rapportent les rapports de vraisemblance positifs et négatifs de la *Tp*-PCR en fonction des différents stades de syphilis, du matériel biologique testé et de l'adéquation des tests de référence (pour la syphilis primaire, secondaire et précoce, Tableaux IV.9, IV.10 et IV.11). La présence d'une *Tp*-PCR positive est utile pour confirmer le diagnostic de syphilis primaire, secondaire ou précoce dans les ulcères : la probabilité d'avoir une *Tp*-PCR positive dans ces situations est 10 fois plus grande chez les malades que chez les non malades. Par exemple, dans les ulcères de syphilis primaire, la probabilité d'avoir une *Tp*-PCR positive est 21 fois plus grande chez les patients atteints de syphilis que chez ceux non atteints de syphilis. La *Tp*-PCR montre également une certaine utilité dans le liquide céphalo-rachidien des nouveau-nés atteints de syphilis congénitale avec une probabilité d'avoir une *Tp*-PCR positive 17,5 fois supérieure chez les enfants atteints de syphilis congénitale que chez ceux non atteints de syphilis congénitale. Dans le sang, la probabilité d'avoir une *Tp*-PCR positive n'est pas plus grande chez les malades comparés aux non malades et la *Tp*-PCR n'est pas d'une grande utilité clinique dans le sang.

Une *Tp*-PCR négative est surtout informative dans le sang des enfants non atteints de syphilis congénitale où la probabilité d'avoir une *Tp*-PCR négative est environ 9 fois supérieure que chez les enfants atteints de syphilis congénitale. Une *Tp*-PCR négative est moins utile pour éliminer avec une forte probabilité le diagnostic de syphilis.

Tableau IV.9. Estimations des rapports de vraisemblance positifs et négatifs *poolés* de la *Tp*-PCR pour le diagnostic de syphilis primaire, en fonction du spécimen biologique testé et de l'utilisation d'un test de référence approprié ou non.

Spécimen biologique	Rapport de vraisemblance positif (RV+)			Rapport de vraisemblance négatif (RV-)		
	<i>n</i> *	RV+ (IC95%)	<i>I</i> ² , %	<i>n</i> *	RV- (IC95%)	<i>I</i> ² , %
Sang						
Tests de référence appropriés	3	5,4 (1,0-28,5)	0,0	3	0,78 (0,63-0,96)	0,0
Tests de référence inappropriés	-	-	-	-	-	-
Ulcère						
Tests de référence appropriés	10	21,0 (15,5-28,4)	0,0	10	0,27 (0,18-0,40)	82,7
Tests de référence inappropriés	9	11,1 (5,6-21,9)	61,0	9	0,70 (0,60-0,82)	85,1

*Nombre d'études considérées pour faire les estimations.

Tableau IV.10. Estimations des rapports de vraisemblance positifs et négatifs *poolés* de la *Tp*-PCR pour le diagnostic de syphilis secondaire, en fonction du spécimen biologique testé et de l'utilisation d'un test de référence approprié ou non.

Spécimen biologique	Rapport de vraisemblance positif (RV+)			Rapport de vraisemblance négatif (RV-)		
	<i>n</i> *	RV+ (IC95%)	<i>I</i> ² , %	<i>n</i> *	RV- (IC95%)	<i>I</i> ² , %
Sang						
Tests de référence appropriés	4	2,6 (0,9-7,6)	25,2	4	0,66 (0,50-0,87)	0,0
Tests de référence inappropriés	1	12,4 (5,3-29,3)	-	1	0,18 (0,01-2,24)	-
Lésion cutanée ou muqueuse						
Tests de référence appropriés	9	17,3 (8,1-37,0)	0,0	9	0,36 (0,24-0,55)	66,7
Tests de référence inappropriés	2	27,9 (1,3-58,8)	79,0	2	0,35 (0,18-0,69)	68,0

*Nombre d'études considérées pour faire les estimations.

Tableau IV.11. Estimations des rapports de vraisemblance positifs et négatifs *poolés* de la *Tp*-PCR pour le diagnostic de syphilis précoce, en fonction du spécimen biologique testé et de l'utilisation d'un test de référence approprié ou non.

Spécimen biologique	Rapport de vraisemblance positif (RV+)			Rapport de vraisemblance négatif (RV-)		
	<i>n</i> *	RV+ (IC95%)	<i>I</i> ² , %	<i>n</i> *	RV- (IC95%)	<i>I</i> ² , %
Sang						
Tests de référence appropriés	6	6,4 (2,0-20,0)	0,0	6	0,73 (0,61-0,87)	0,0
Tests de référence inappropriés	1	12,4 (5,3-29,3)	-	1	0,18 (0,01-2,24)	-
Lésion ou ulcère cutané- muqueux						
Tests de référence appropriés	25	21,1 (13,2-33,5)	62,9	25	0,32 (0,25-0,41)	84,3
Tests de référence inappropriés	16	9,2 (6,0-14,2)	60,6	16	0,58 (0,50-0,68)	86,7

*Nombre d'études considérées pour faire les estimations.

Tableau IV.12. Estimations des rapports de vraisemblance positifs et négatifs *poolés* de la *Tp*-PCR pour le diagnostic de neurosyphilis dans le liquide céphalo-rachidien (les tests de référence sont jugés appropriés).

Spécimen biologique	Rapport de vraisemblance positif (RV+)			Rapport de vraisemblance négatif (RV-)		
	<i>n</i> *	RV+ (IC95%)	<i>I</i> ² , %	<i>n</i> *	RV- (IC95%)	<i>I</i> ² , %
Liquide céphalo-rachidien	4	4,5 (0,9-23,6)	91,1	4	0,54 (0,27-1,07)	69,1

*Nombre d'études considérées pour faire les estimations.

Tableau IV.13. Estimations des rapports de vraisemblance positifs et négatifs *poolés* de la *Tp*-PCR pour le diagnostic de syphilis latente dans le liquide céphalo-rachidien (les tests de référence sont jugés appropriés).

Spécimen biologique	Rapport de vraisemblance positif (RV+)			Rapport de vraisemblance négatif (RV-)		
	<i>n</i> *	RV+ (IC95%)	<i>I</i> ² , %	<i>n</i> *	RV- (IC95%)	<i>I</i> ² , %
Sang	2	1,8 (0,0-304,3)	89,5	2	1,41 (0,08-25,64)	87,8

*Nombre d'études considérées pour faire les estimations.

Tableau IV.14. Estimations des rapports de vraisemblance positifs et négatifs *poolés* de la *Tp*-PCR pour le diagnostic de syphilis congénitale, en fonction du liquide biologique testé (les tests de référence sont jugés appropriés).

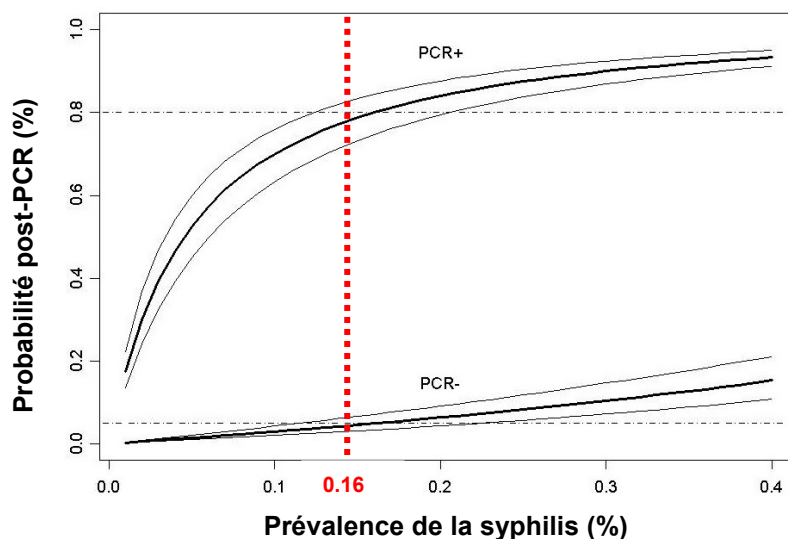
Spécimen biologique	Rapport de vraisemblance positif (RV+)			Rapport de vraisemblance négatif (RV-)		
	<i>n</i> *	RV+ (IC95%)	<i>I</i> ² , %	<i>n</i> *	RV- (IC95%)	<i>I</i> ² , %
Sang	3	8,1 (4,4-15,2)	0,0	3	0,11 (0,04-0,33)	0,0
Liquide céphalo-rachidien	3	17,5 (5,6-55,0)	0,0	3	0,44 (0,28-0,67)	0,1

*Nombre d'études considérées pour faire les estimations.

IV.5.4 Utilité diagnostique de la *Tp*-PCR

L'interprétation de l'utilité diagnostique de la *Tp*-PCR doit également inclure la valeur de la prévalence de la syphilis ou probabilité pré-test. En utilisant les valeurs des rapports de vraisemblance positif et négatif de la *Tp*-PCR obtenus par la méta-analyse des données dans les ulcères de syphilis primaire, on peut représenter graphiquement la probabilité post-test comme une fonction de la probabilité pré-test (ou prévalence) (Figure IV.3). En choisissant le seuil de 16% correspondant à la prévalence minimale attendue dans la plupart des centres prenant en charge des infections sexuellement transmissibles⁴³, on voit que les chances de considérer le diagnostic de syphilis comme plausible face à une *Tp*-PCR positive dans un ulcère est de 80% (ligne rouge pointillée sur la figure IV.3), alors qu'à ce seuil, elle n'atteint que 5% lorsque la *Tp*-PCR est négative. Le choix des seuils de valeur prédictive positive de 80% et 5% est basé sur la publication de Jaeschke.⁶⁰ Au-delà de 16% de prévalence de la syphilis, la probabilité post-test d'une PCR positive dans un ulcère est supérieure à 80% tandis qu'une *Tp*-PCR négative ne devient intéressante pour rejeter le diagnostic de syphilis qu'en-dessous d'un seuil de prévalence de 16%.

Figure IV.3. Probabilités post-test assorties de leurs intervalles de confiance à 95% pour une *Tp*-PCR positive (en haut) et négative (en bas) dans des ulcères oro-génitaux et en fonction de la prévalence de la syphilis.



Légende: La ligne horizontale en pointillé représente le niveau désiré de la probabilité post-test de la *Tp*-PCR pour éliminer (0,05) ou pour considérer le diagnostic de syphilis comme plausible (0,80).

IV.5.5 Etude des facteurs d'hétérogénéité

Les facteurs d'hétérogénéité ont été explorés pour les sensibilités *poolées* dans le sang des groupes de syphilis primaire, précoce et latente, ainsi que dans les ulcères de syphilis primaire, secondaire et précoce. Pour les ulcères de syphilis primaire, aucun des facteurs testés n'a permis de l'expliquer cette hétérogénéité (Tableau IV.15). Pour les lésions de syphilis secondaire, le seul facteur d'hétérogénéité identifié était le type de *Tp*-PCR: la sensibilité *poolée* était significativement plus grande avec les *Tp*-PCR *nested* puis avec les *Tp*-PCR standards comparativement aux *real-time* *Tp*-PCR (Tableau IV.16). Dans le sang des syphilis précoces, les sensibilités *poolées* des *Tp*-PCR ciblant le gène de la polymérase I tendaient à être plus basses qu'avec les *Tp*-PCR ciblant le gène de la protéine 47kDa ($P=0,057$, Tableau IV.17). Finalement dans le sang des syphilis latentes, la sensibilité *poolée* augmentait de manière significative avec la valeur du PIB du pays ayant conduit l'étude, suggérant dans ce sous-groupe une meilleure sensibilité de la *Tp*-PCR dans les centres avec un PIB plus haut et donc indirectement selon notre hypothèse, une augmentation de la sensibilité de la *Tp*-PCR avec l'offre d'accès aux soins et aux tests diagnostiques (Tableau IV.18). Les résultats de spécificités *poolés* étaient soit jugés homogènes, soit le nombre d'études considérées était insuffisant pour permettre l'exploration des facteurs d'hétérogénéité.

Les résultats des rapports de vraisemblance négatifs étaient hétérogènes dans les ulcères de syphilis primaires mais aucun des facteurs explorés n'expliquait significativement cette hétérogénéité (Tableau IV.19). Les résultats des rapports de vraisemblance positifs étaient hétérogènes dans les ulcères de syphilis précoce (Tableau IV.20). La cible de *Tp*-PCR expliquait significativement cette hétérogénéité : les rapports de vraisemblance positifs étaient significativement plus hauts avec la *Tp*-PCR ciblant le gène de la polymérase I comparée à celle ciblant le gène de la protéine 47kDa ($P=0,036$; Tableau IV.20). L'utilisation d'un contrôle d'inhibition était également associée avec la valeur du rapport de vraisemblance positif dans les lésions de syphilis précoce : les rapports de vraisemblance positifs étaient significativement plus bas dans les études rapportant avoir contrôlé pour la présence de substances d'inhibition ($P=0,023$; Tableau IV.20). Aucun des facteurs d'hétérogénéité testés dans les lésions de syphilis précoce n'était significativement associé avec la valeur des rapports de vraisemblance négatifs.

Tableau IV.15. Estimations de la sensibilité *poolée* de la *Tp*-PCR dans le diagnostic de syphilis primaire comparée aux tests de référence, en fonction de différents facteurs d'hétérogénéité.

<i>Spécimen biologique</i>	n	Sensibilité (IC95%)	P
Facteurs d’hétérogénéité			
<i>Ulcères</i>			
Cible de la <i>Tp</i>-PCR			
Gène de la protéine 47kDa	8	76,2 (66,2-84,0)	0,99
Gène de la polymérase A	4	76,3 (45,5-92,5)	
Type de <i>Tp</i>-PCR			
<i>Tp</i> -PCR multiplex	2	70,8 (56,5-81,9)	0,423
<i>Tp</i> -PCR standard	7	88,9 (63,7-97,3)	
<i>Tp</i> -PCR nested	2	80,1 (69,0-88,0)	
<i>Real-time Tp</i> -PCR	4	74,0 (56,9-86,0)	
Contrôle d’inhibition de la <i>Tp</i>-PCR			
Oui	9	82,9 (70,5-90,8)	0,598
Non	4	76,3 (45,5-92,5)	
Année de publication de l’étude (variable continue)	15	+0,047 (-0,116-+0,209)	0,575
PIB du pays participant (variable continue)	15	-0,035 (-0,291-+0,220)	0,786

Tableau IV.16. Estimations de la sensibilité *poolée* de la *Tp*-PCR dans le diagnostic de syphilis secondaire comparée aux tests de référence, en fonction de différents facteurs d'hétérogénéité.

<i>Spécimen biologique</i>	n	Sensibilité (IC95%)	P
Facteurs d'hétérogénéité			
<i>Lésions cutanées ou muqueuses</i>			
Cible de la <i>Tp</i>-PCR			
Gène de la protéine 47kDa	7	77,1 (61,2-87,7)	0,532
Gène de la polymérase A	5	69,2 (45,1-86,0)	
Type de <i>Tp</i>-PCR			
<i>Tp</i> -PCR standard	7	74,0 (61,7-83,5)	<0,001
<i>Real-time Tp</i> -PCR	3	43,3 (33,0-54,2)	
<i>Tp</i> -PCR <i>nested</i>	3	83,9 (71,2-91,6)	
Contrôle d'inhibition de la <i>Tp</i>-PCR			
Oui	7	71,2 (46,9-87,4)	0,742
Non	5	76,1 (71,2-91,6)	
Année de publication de l'étude (variable continue)	13	-0,038 (-0,174-+0,098)	0,588
PIB du pays participant (variable continue)	13	0,062 (-0,170-+0,294)	0,602

Tableau IV.17. Estimations de la sensibilité *poolée* de la *Tp*-PCR dans le diagnostic de syphilis précoce comparée aux tests de référence, en fonction de différents facteurs d'hétérogénéité.

<i>Spécimen biologique</i> Facteurs d'hétérogénéité	n	Sensibilité (IC95%)	P
Sang			
Cible de la <i>Tp</i>-PCR			
Gène de la protéine 47kDa	11	58,2 (39,3-75,0)	0,057
Gène de la polymérase A	7	30,8 (15,5-52,0)	
Type de <i>Tp</i>-PCR			
<i>Tp</i> -PCR standard	15	42,7 (26,2-61,0)	0,681
<i>Real-time Tp</i> -PCR	4	37,9 (25,4-52,3)	
Contrôle d'inhibition de la <i>Tp</i>-PCR			
Oui	17	46,8 (31,8-62,5)	0,905
Non	4	49,0 (20,3-78,4)	
Année de publication de l'étude (variable continue)	19	+0,063 (-0,084-+0,209)	0,401
PIB du pays participant (variable continue)	19	+0,024 (-0,223-+0,272)	0,848

Tableau IV.17 (suite).

<i>Spécimen biologique</i>	n	Sensibilité (IC95%)	<i>P</i>
Facteurs d’hétérogénéité			
<i>Lésions ou ulcérations cutanées ou muqueuses</i>			
Cible de la <i>Tp</i>-PCR			
Gène de la protéine 47kDa	21	74,3 (63,9-82,6)	0,920
Gène de la polymérase A	10	73,5 (57,7-84,9)	
Type de <i>Tp</i>-PCR			
<i>Tp</i> -PCR standard	18	82,8 (73,7-89,3)	0,121
<i>Tp</i> -PCR multiplex	10	68,7 (52,7-81,3)	
<i>Real-time Tp</i> -PCR	8	68,7 (49,9-82,9)	
Contrôle d’inhibition de la <i>Tp</i>-PCR			
Oui			
Non	16	76,0 (61,8-86,0)	0,884
Année de publication de l’étude (variable continue)	13	74,7 (61,0-84,8)	
PIB du pays participant (variable continue)	36	+0,020 (-0,068-+0,108)	0,653
	36	+0,019 (-0,122-+0,159)	0,794

Tableau IV.18. Estimations de la sensibilité *poolée* de la *Tp*-PCR dans le diagnostic de syphilis latente comparée aux tests de référence, en fonction de différents facteurs d'hétérogénéité.

<i>Spécimen biologique</i>	n	Sensibilité (IC95%)	<i>P</i>
Facteurs d'hétérogénéité			
<i>Sang</i>			
Cible de la <i>Tp</i> -PCR			
Gène de la protéine 47kDa	6	20,9 (10,0-38,5)	0,162
Gène de la polymérase A	4	36,7 (22,6-53,5)	
Type de <i>Tp</i> -PCR			
<i>Tp</i> -PCR standard	11	33,1 (23,8-43,8)	0,104
<i>Real-time Tp</i> -PCR	2	10,3 (2,10-38,5)	
Contrôle d'inhibition de la <i>Tp</i> -PCR			
Oui			
Non			
Année de publication de l'étude (variable continue)	13	-0,085 (-0,246-+0,075)	0,298
PIB du pays participant (variable continue)	13	+0,267 (+0,145-+0,389)	<0,001

Tableau IV.19. Estimations des rapports de vraisemblance positif et négatif *poolés* de la *Tp*-PCR dans le diagnostic de syphilis primaire comparée aux tests de référence, en fonction de différents facteurs d'hétérogénéité.

<i>Spécimen biologique</i>	n	RV+ (IC95%)	P	n	RV- (IC95%)	P
Facteurs d'hétérogénéité						
<i>Ulcères</i>						
Cible de la <i>Tp</i>-PCR				10		0,489
Gène de la protéine 47kDa				6	0,23 (0,11-0,52)	
Gène de la polymérase A (polA)				2	0,43 (0,19-0,98)	
Combinaison de gènes polA et <i>bmp</i>				2	0,14 (0,01-1,45)	
Type de <i>Tp</i>-PCR		Facteurs d'hétérogénéité non évalués ($I^2 < 50\%$ ou nombre d'études inférieur à 10)		10		0,511
<i>Tp</i> -PCR <i>multiplex</i>				2	0,44 (0,14-1,36)	
<i>Tp</i> -PCR standard				7	0,24 (0,13-0,45)	
<i>Tp</i> -PCR <i>nested</i>				1	0,21 (0,13-0,34)	
Contrôle d'inhibition de la <i>Tp</i>-PCR				9		0,249
Oui				7	0,22 (0,10-0,47)	
Non				2	0,43 (0,19-0,98)	
Année de publication de l'étude (variable continue)				10	-0,03 (-0,13-0,06)	0,481
PIB du pays participant (variable continue)				10	0,06 (-0,09-0,21)	0,449

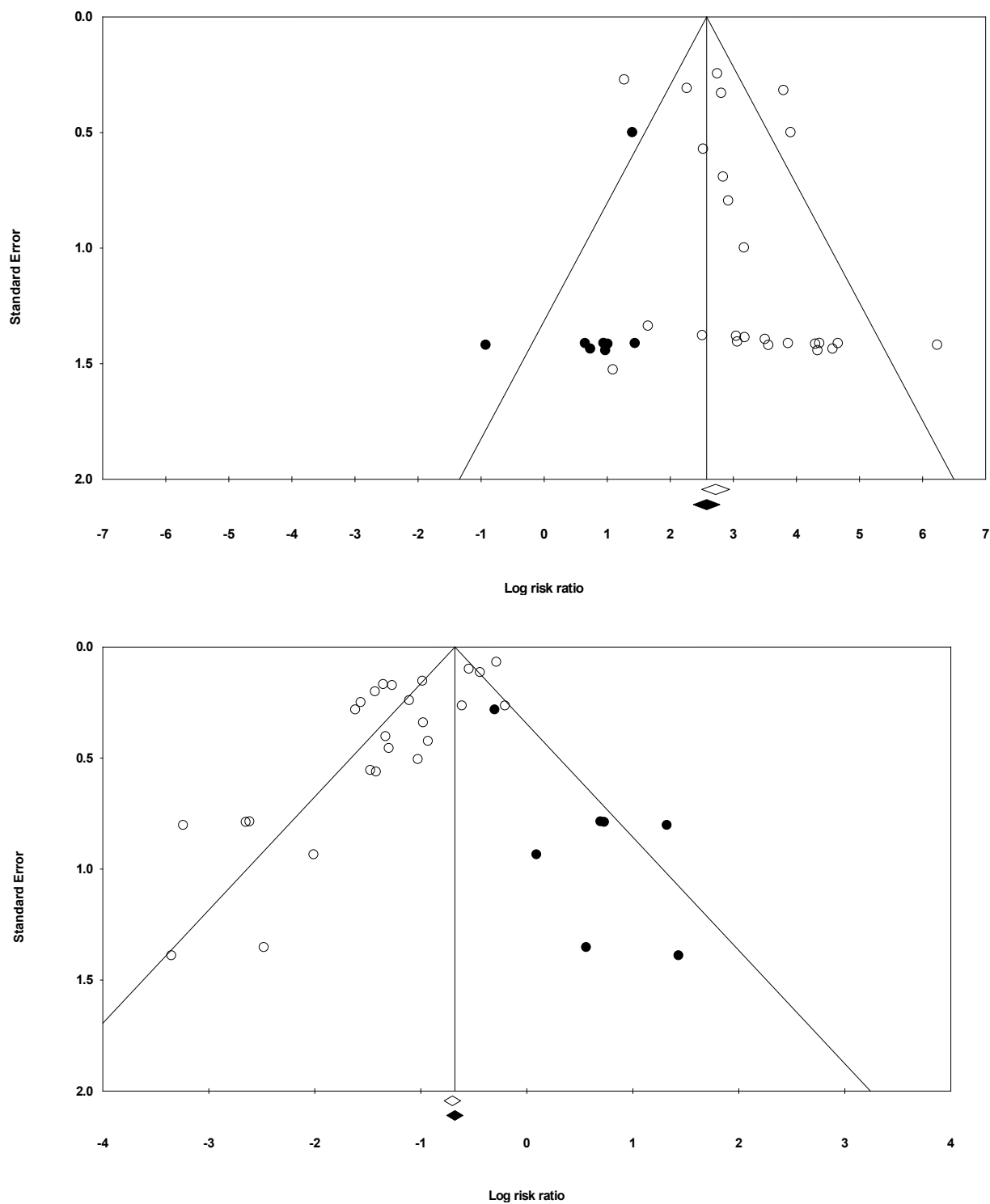
Tableau IV.20. Estimations des rapports de vraisemblance positif et négatif *poolés* de la *Tp*-PCR dans le diagnostic de syphilis précoce comparée aux tests de référence, en fonction de différents facteurs d'hétérogénéité.

<i>Spécimen biologique</i>	n	RV+ (IC95%)	P	n	RV- (IC95%)	P
Facteurs d'hétérogénéité						
<i>Lésions ou ulcérations cutanées ou muqueuses</i>						
Cible de la <i>Tp</i>-PCR	20		0,036	20		0,876
Gène de la protéine 47kDa	14	17,38 (9,15-33,03)		14	0,36 (0,26-0,51)	
Gène de la polymérase A	6	41,04 (25,29-66,61)		6	0,38 (0,25-0,57)	
Type de <i>Tp</i>-PCR	20		0,578	23		0,224
<i>Tp</i> -PCR multiplex	6	25,83 (10,23-65,18)		9	0,41 (0,29-0,59)	
<i>Tp</i> -PCR standard	14	34,47 (22,58-52,62)		14	0,30 (0,21-0,43)	
Contrôle d'inhibition de la <i>Tp</i>-PCR	20		0,023	20		0,867
Oui	13	16,75 (7,74-36,27)		13	0,37 (0,26-0,52)	
Non	7	48,21 (29,88-77,78)		7	0,38 (0,27-0,55)	
Année de publication de l'étude (variable continue)	24	0,03 (-0,06-0,12)	0,516	24	-0,015 (-0,07-0,04)	0,579
PIB du pays participant (variable continue)	24	0,03 (-0,14-0,20)	0,689	24	0,009 (-0,07-0,09)	0,827

IV.5.6 Biais de publication

La recherche d'un biais de publication s'est faite pour les rapports de vraisemblance positif et négatif dans les ulcères de syphilis primaire et dans les lésions de syphilis précoce. L'exploration des « *funnel plots* » montre la présence d'une asymétrie de la répartition des rapports de vraisemblance positif et négatif en fonction de la taille des études pour les lésions de syphilis précoce (Figure IV.4). La méthode *Trim & Fill* estime que respectivement 8 et 7 études supplémentaires seraient nécessaires pour rendre les « *funnel plots* » symétriques. L'ajout de 8 études supplémentaires diminuerait l'estimation du rapport de vraisemblance positive à 14,4 (IC95% : 9,3-22,4) ce qui modifie modérément l'utilité clinique de la *Tp*-PCR. L'ajout de 7 études supplémentaires augmenterait le rapport de vraisemblance négatif à 0,38 (IC95% : 0,30-0,48). Pour les ulcères de syphilis primaire, le « *funnel plot* » des rapports de vraisemblance positifs n'est pas significativement asymétrique (Figure IV.5) et la méthode *Trim & Fill* ne propose pas d'ajouter d'études supplémentaires. Le « *funnel plot* » des rapports de vraisemblance négatifs est significativement asymétrique (Figure IV.5) et la méthode *Trim & Fill* propose d'ajouter 3 études supplémentaires. Cet ajout augmenterait l'estimation du rapport de vraisemblance négatif à 0,33 (IC95% : 0,22-0,49).

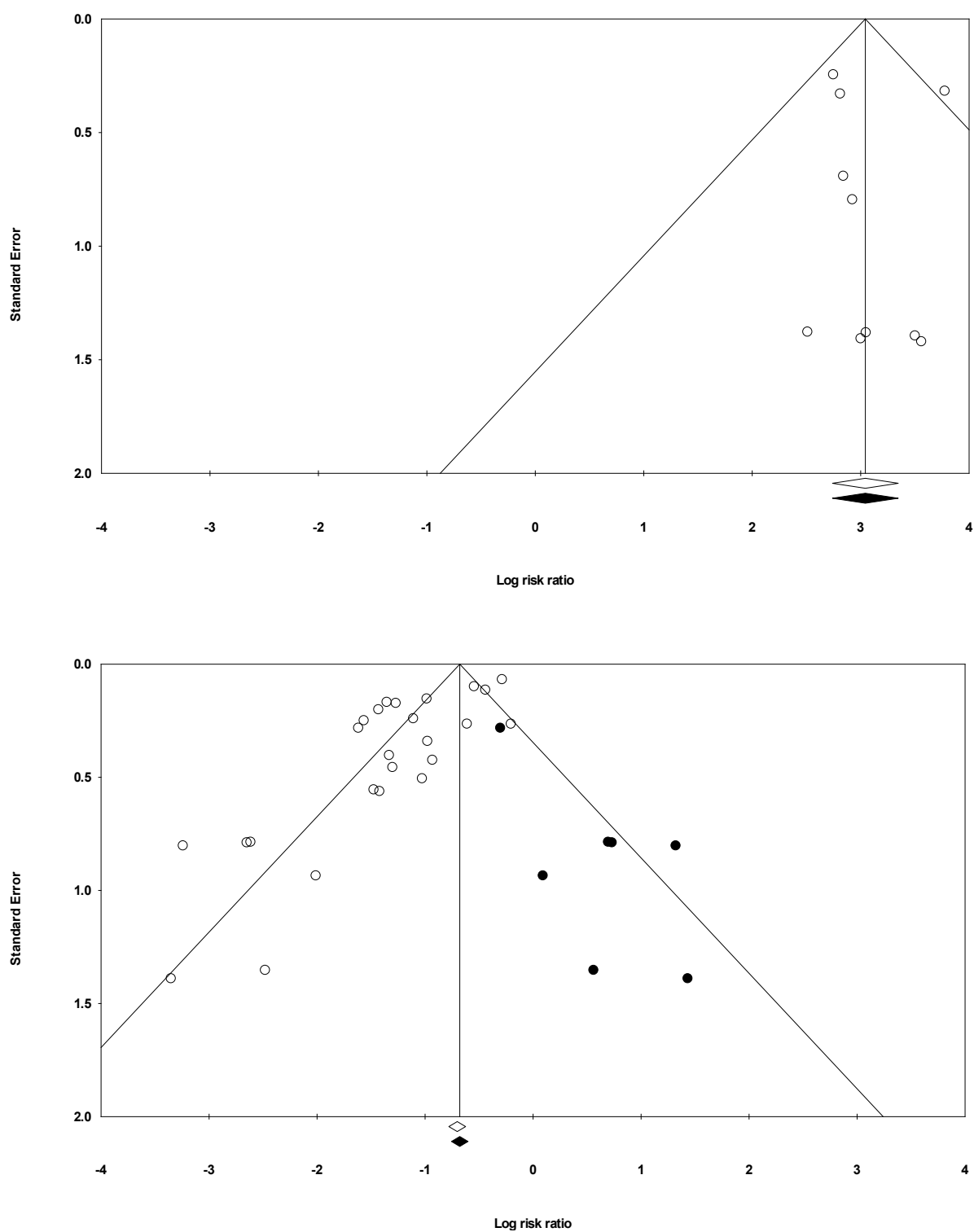
Figure IV.4. « *Funnel plot* » des études évaluant le rapport de vraisemblance positif (figure du haut) et négatif (figure du bas) de la PCR dans les lésions de syphilis précoce comparativement aux tests de référence adéquats.



Légende : ○ Études utilisées dans la méta-analyse

● Études à ajouter pour rendre le funnel plot symétrique.

Figure IV.5. « *Funnel plot* » des études évaluant le rapport de vraisemblance positif (figure du haut) et négatif (figure du bas) de la PCR dans les ulcères de syphilis primaire comparativement aux tests de référence.



Légende : ○ Études utilisées dans la méta-analyse

● Études à ajouter pour rendre le funnel plot symétrique.

IV.6 Discussion

Les résultats de la méta-analyse suggèrent que lorsque les tests de référence sont adéquats, la sensibilité de la *Tp*-PCR est meilleure que lorsque le test de référence est inapproprié mais elle reste modérée alors que sa spécificité est très bonne. Les résultats montrent aussi que l'estimation de la performance diagnostique de la *Tp*-PCR, en particulier sa sensibilité, varie en fonction du milieu biologique testé : la sensibilité de la *Tp*-PCR est la meilleure dans les ulcères de syphilis primaire. De manière plus générale, la sensibilité de la *Tp*-PCR est meilleure dans les lésions symptomatiques que dans le sang ou le liquide céphalo-rachidien mais cette sensibilité reste assez médiocre. Par contre, du fait de la très bonne spécificité de la *Tp*-PCR dans les ulcères de syphilis primaire, elle se montre très informative avec un rapport de vraisemblance très largement au-dessus du seuil de 10.⁶⁰ Dans le sang, les sensibilités variaient en fonction des compartiments sanguins avec des valeurs plus hautes dans le plasma ou dans le sérum que dans le sang total. Concernant la technique de *Tp*-PCR employée, les résultats variaient également avec de meilleures sensibilités avec la *Tp*-PCR standard ou *nested* qu'avec la *Tp*-PCR *multiplex* ou la *real-time* *Tp*-PCR et ceci quelque soit le stade de syphilis ou le milieu biologique testé. Les tests de référence utilisés ont également un effet sur l'estimation de la sensibilité de la *Tp*-PCR avec des valeurs plus basses lorsque les tests de comparaison utilisés dans les études étaient jugés inadéquats selon les recommandations du CDC.⁴ Dans le groupe des études utilisant des tests de référence adéquats, les estimations *poolées* des rapports de vraisemblance positifs et négatifs étaient significativement associées avec le type de *Tp*-PCR utilisé et la cible de *Tp*-PCR.

IV.6.1 Comparaison des résultats de l'étude avec la littérature scientifique

Quelques études publiées ont également montré que le milieu biologique testé influençait de manière significative l'estimation de la performance diagnostique de la *Tp*-PCR avec de meilleurs résultats diagnostiques dans les lésions d'ulcères ou les chancres^{55 65-70} que dans le sang. Les explications potentielles sur la diminution de la sensibilité dans le sang sont la moindre charge bactérienne dans ce milieu comparé aux lésions ulcérées dans lesquelles la concentration en tréponèmes est très nettement supérieure^{67 68 71} et aussi la présence de substances inhibitrices dans le sang total pouvant interférer sur la détection de *Treponema pallidum* par *Tp*-PCR.⁷² Ces résultats soulignent donc l'intérêt de la *Tp*-PCR dans les stades de syphilis précoce symptomatique. Dans les stades de syphilis asymptomatique, même si une étude a montré une très bonne sensibilité de *Tp*-PCR dans les cellules du lobe de l'oreille, le

sang reste un milieu biologique plus facile à utiliser. Quelques études antérieures ont aussi montré la variabilité de la sensibilité de la *Tp*-PCR dans les différents compartiments sanguins testés^{65 73} et notre étude confirme ce résultat en utilisant un plus grand nombre de sujets testés ce qui augmente la puissance statistique.

Concernant les autres facteurs pouvant expliquer l'hétérogénéité de la performance diagnostique de la *Tp*-PCR, certains auteurs suggèrent l'influence de la méthode utilisée lors de l'extraction de l'ADN avec un contrôle pour la présence de substances inhibitrices dans le sang total.⁴⁶ Dans la phase d'amplification, le gène ciblé par la *Tp*-PCR a aussi montré un effet sur les valeurs de sensibilité de la *Tp*-PCR. Dans leur étude, Castro et coll.⁷³ ont comparé les performances de la *Tp*-PCR ciblant le gène de la polymérase I avec celle ciblant le gène de la protéine membranaire 47kDa (*tpp47*) et celle combinant les deux cibles dans le sang de cas de syphilis latente. Ils ont montré que la *Tp*-PCR ciblant *tpp47* avait des sensibilités plus hautes que les autres cibles. Nos résultats comparant les deux cibles de *Tp*-PCR n'étaient pas consistants dans les différents sous-groupes évalués. Notre étude a aussi testé l'hypothèse d'un effet de la technique employée sur la performance diagnostique de la *Tp*-PCR et a montré que la *Tp*-PCR *multiplex* ciblant plusieurs pathogènes en plus de la syphilis donnait des sensibilités plus basses que la *Tp*-PCR standard ou la *Tp*-PCR *nested*. Aucune autre étude n'a testé cette hypothèse et c'est un avantage de la méta-analyse qui combine les résultats de différentes études. Les raisons de la variabilité de la performance diagnostique de la *Tp*-PCR peuvent s'expliquer pour la *Tp*-PCR *nested* par l'utilisation d'une deuxième cible dans le premier cycle d'amplification.⁶⁷

IV.6.2 Utilité clinique de la *Tp*-PCR

Nos résultats suggèrent une utilité clinique de la *Tp*-PCR dans l'évaluation des ulcères ou des lésions cutanéomuqueuses de syphilis précoce avec des valeurs de rapports de vraisemblance positifs supérieures au seuil de 10 proposé par Jaeschke et coll.⁶⁰ et considéré comme la plus petite valeur cliniquement utile pour confirmer le diagnostic de syphilis. La *Tp*-PCR dans les ulcères ou lésions de syphilis précoce donne des rapports de vraisemblance négatifs inférieurs au seuil de 0,10 considéré comme la plus grande valeur cliniquement utile pour rejeter le diagnostic de syphilis. Ces rapports de vraisemblance doivent s'interpréter en considérant la prévalence de la syphilis dans la population testée (ou de probabilité pré-test chez un individu donné).⁶⁰ Au-dessus de 16% de prévalence ou probabilité prétest, devant une *Tp*-PCR positive, la probabilité du diagnostic de syphilis est supérieure à 80%. En-dessous de 16% de

prévalence, devant une *Tp*-PCR négative, la probabilité du diagnostic de syphilis est inférieure à 5% et permet de rejeter confortablement ce diagnostic.

IV.6.3 Limitations de l'étude

Nos résultats montrent dans l'ensemble une grande hétérogénéité des indices de performance diagnostique de la *Tp*-PCR mais l'exploration des facteurs d'hétérogénéité n'a pas pu se faire dans tous les sous-groupes présentant un indice $I^2 > 50\%$ du fait du trop faible nombre d'études concernées. De plus, certains facteurs, tels que la présence d'une coinfection VIH, sont connus pour donner des faux positifs des tests sérologiques de la syphilis⁷⁴ ce qui pourrait modifier l'évaluation de la performance diagnostique de la *Tp*-PCR mais nous n'avions pas à disposition de données sur les résultats en fonction de la présence ou pas d'infection VIH. L'information sur les différences techniques de réalisation de la *Tp*-PCR (méthode d'extraction et de purification de l'ADN⁵¹, test de la présence de substances inhibitrices⁵², triple réalisation de l'amplification⁷⁵) n'était pas disponible dans l'ensemble des études incluses dans la méta-analyse et ces facteurs n'ont donc pas pu être évalués dans l'exploration de l'hétérogénéité entre les études. Finalement le *gold standard* du diagnostic de syphilis est le test d'infection du lapin (*rabbit infectivity testing* ou RIT)¹⁹ mais il n'est pas pratiqué en routine du fait de sa complexité. Dans les études sélectionnées, les auteurs ont soit utilisé le microscope à fond noir, considéré comme le test de référence donnant un diagnostic certain selon le CDC⁴ soit utilisé une combinaison de tests sérologiques donnant un diagnostic probable de syphilis. Nous avons donc distingué deux groupes de tests de référence : adéquats versus inadéquats et nous avons montré que la performance diagnostique de la *Tp*-PCR variait en fonction du groupe de référence utilisé. La *Tp*-PCR n'a jamais été comparée au vrai *gold standard* ce qui soulève le risque d'un biais dans les résultats des estimations *poolées* présentées dans notre étude.⁷⁶ Finalement, le dessin d'étude utilisé (revue systématique puis méta-analyse) présente comme limitation majeure l'absence de contrôle et de standardisation des tests de référence employés dans les différentes études, du choix des populations étudiées, des définitions de cas pour la syphilis. Tous ces aspects mettent en exergue la limitation de notre dessin d'étude et la nécessité de proposer une nouvelle étude clinique contrôlant ces différents points afin de mieux décrire la performance diagnostique et l'utilité clinique de la *Tp*-PCR.

IV.7 Conclusion

En conclusion, la méta-analyse rapporte des indices de performance diagnostique utiles avec la *Tp*-PCR, notamment dans les lésions ulcérées des stades précoces de syphilis. La *Tp*-PCR semble moins utile dans le sang ou dans d'autres milieux biologiques.

Cependant la grande variabilité des indices de performance diagnostique de la *Tp*-PCR en fonction du test de référence utilisé soulève le double problème épidémiologique mais aussi éthique de l'évaluation d'un nouveau test diagnostique en l'absence d'un *gold standard* ou en présence de tests de référence imparfaits. En effet, l'utilisation d'un mauvais test de référence donne des informations biaisées sur le vrai statut malade ou non malade du patient perturbant ainsi l'évaluation du nouveau test diagnostique à l'étude. L'existence de tests de référence imparfaits donne une certaine proportion de faux négatifs et de faux positifs provoquant dans la première situation un risque de propagation de l'infection syphilitique dans la population et un risque d'évolution pour le cas index vers des stades plus avancés et plus graves de l'infection. Dans la deuxième situation (faux positifs), les conséquences sont moins néfastes (traitement « pour rien » des patients) du fait de la bonne tolérance et du faible coût du traitement, mais représente malgré tout des surcoûts médicaux inutiles.

Ce constat a motivé la mise en place d'une étude diagnostique prospective présentée au chapitre V, évaluant la performance de la *Tp*-PCR dans les ulcères récents en fonction de différents tests de référence : 1) le *gold standard* actuel selon le CDC, le fond noir (avant janvier 2014), 2) les tests sérologiques et 3) une combinaison du *gold standard*, des tests sérologiques et d'informations cliniques pertinentes. Cette étude aura aussi pour objectif de discuter l'influence du choix du test de référence dans l'évaluation d'un « nouveau » test diagnostique et de montrer dans l'exemple présent que le nouveau test *Tp*-PCR peut même surpasser le « *gold standard* » et être proposé en remplacement. La description de l'implication personnelle de la candidate dans la mise en place et la réalisation de la dite étude est présentée en annexe A de la thèse. Les résultats de cette étude sont présentés aux chapitres suivants V et VI.

V PERFORMANCES DIAGNOSTIQUES DE LA PCR CIBLANT *TREPONEMA PALLIDUM* DANS LE DIAGNOSTIC DES MALADIES ULCÉRATIVES SEXUELLEMENT TRANSMISES

V.1 Résumé

Objectif : Evaluer la performance diagnostique et l'utilité clinique de la *Tp*-PCR dans les lésions oro-génito-anales suspectes de syphilis primaire.

Méthodes : Etude diagnostique prospective multicentrique menée entre septembre 2011 et septembre 2013 dans 5 centres européens (Genève, Lausanne, Zürich, Paris et Lyon) chez des patients présentant une lésion oro-génitale ou anale secondaire à une prise de risque sexuelle et suspecte de syphilis primaire. Tous les patients inclus ont reçu les tests de référence utilisés en routine dans les centres participants (fond noir et/ou tests non-tréponémiques plus tréponémiques) plus un écouvillon de la lésion afin de réaliser la *Tp*-PCR dans un seul laboratoire. Les résultats de la *Tp*-PCR ont été comparés au fond noir, à la sérologie et à un « *gold standard* amélioré ». La définition du « *gold standard* amélioré » reposait sur une clinique évocatrice, le fond noir, une sérologie positive et une évolution favorable sous traitement.

Résultats : Au total, 273 patients ont été inclus dans l'étude. La sensibilité et spécificité de la *Tp*-PCR comparée au fond noir était de 93,8% (IC95% : 79,2-99,2%) et 90,6% (IC95% : 84,4-94,9%) (n=170). La concordance entre la *Tp*-PCR et le fond noir était substantielle (kappa 0,77 ; IC95% : 0,62-0,87). Seize patients avec un fond noir négatif ont été considérés comme atteints de syphilis avec le « *gold standard* amélioré ». Comparé au « *gold standard* amélioré » (n=170), les sensibilité-spécificité étaient de 87,5% (IC95% : 74,8-95,3%) et 99,2% (IC95% : 95,5-100,0%) et les rapports de vraisemblance positif-négatif de respectivement 106,75 (IC95% : 15,11-753,95) et 0,13 (IC95% : 0,06-0,27). La concordance entre la *Tp*-PCR et le « *gold standard* amélioré » était quasiment parfaite (coefficient kappa 0,90 ; IC95% : 0,82-0,97).

Conclusion : Notre recherche confirme la grande utilité clinique de la *Tp*-PCR dans le diagnostic des ulcères de syphilis primaire. La performance diagnostique de la *Tp*-PCR est cependant très influencée par le choix du test de référence. Le fond noir n'est pas aussi

sensible qu'espéré et suggère que la *Tp*-PCR pourrait même le remplacer pour le diagnostic de certitude de la syphilis primaire dans les ulcères sexuels.

V.2 Introduction

La méta-analyse présentée au chapitre IV conclut à l'utilité diagnostique de la *Tp*-PCR dans les lésions cutané-muqueuses de syphilis précoce, surtout lorsque la prévalence de syphilis est supérieure à 16%.¹⁴ La *Tp*-PCR est moins utile au diagnostic de syphilis dans le sang ou dans d'autres milieux biologiques et en cas de syphilis asymptomatique (syphilis latente). Les résultats de la méta-analyse montrent également comment l'utilisation d'un test de référence inadéquat peut biaiser l'évaluation de la performance diagnostique de la *Tp*-PCR.

En pratique on distingue actuellement deux groupes de tests pour diagnostiquer la syphilis : 1) les méthodes dites directes qui mettent en évidence la présence de tréponèmes dans les prélèvements cliniques (ulcérations ou lésions cutanées, liquide céphalo-rachidien, placenta, tissu) et qui ne s'appliquent qu'aux stades de syphilis symptomatiques (primaire, secondaire, neurosyphilis, syphilis congénitale, syphilis tertiaire). Les méthodes utilisées en pratique sont le fond noir qui consiste à visualiser à l'aide d'un microscope le déplacement caractéristique des tréponèmes dans un prélèvement frais de lésion cutanée ou muqueuse; la technique d'immunofluorescence directe est l'autre méthode directe de référence utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques qui produisent une lumière fluorescente en présence d'antigène spécifique de *Treponema pallidum*. La technique *Tp*-PCR fait partie de ce groupe de méthodes directes ; 2) les méthodes indirectes représentent le deuxième groupe de tests diagnostiques. Elles utilisent soit des antigènes non spécifiques de la syphilis afin de mettre en évidence la présence d'anticorps non spécifiques anticardiolipides (tests non tréponémiques tels que le VDRL ou le RPR), soit des antigènes spécifiques qui montrent la présence d'anticorps spécifiques de *Treponema pallidum* (tests tréponémiques tels que TPHA, FTA-ABS, ou EIA, etc.).

Dès 2008, l'IUSTI a inclus la *Tp*-PCR dans la liste des méthodes de détection directe de la syphilis au même niveau que le fond noir ou la technique de fluorescence directe.⁸ Le CDC de son côté reconnaît l'utilisation épisodique de la technique *Tp*-PCR par certains laboratoires cliniques mais il ne l'avait pas intégrée de manière formelle dans les recommandations de stratégie diagnostique de la syphilis au moment de la mise en place de notre étude.⁶ La définition d'une syphilis certaine se basait toujours sur la détection directe de *Treponema pallidum* dans les prélèvements de lésions par le fond noir ou la technique d'immunofluorescence directe associée à une présentation clinique et anamnestique suggestive de syphilis.⁴ En pratique courante, pour des raisons techniques, l'immunofluorescence directe est rarement utilisée dans la plupart des centres cliniques

prenant en charge des patients porteurs d'infections sexuellement transmissibles. Le fond noir est toujours réalisé en routine dans les centres spécialisés dans la prise en charge des infections sexuellement transmissibles dans ~20% des cas selon une enquête de l'*American Emerging Infections Network*.⁷⁷ Nous n'avons pas de données concernant la pratique du fond noir en Suisse ou en France. Cette méthode de diagnostic direct nécessite du personnel qualifié et expérimenté dans la réalisation d'un prélèvement de qualité et aussi dans la lecture au microscope à fond noir.¹⁹ Le fond noir peut même donner une proportion de faux négatif allant jusqu'à 20%^{78 79} ce qui le fait considérer comme un mauvais « *gold standard* ». ⁸⁰ En présence d'une ulcération transmise sexuellement et d'une anamnèse évocatrice, un fond noir positif signe le diagnostic de syphilis ; par contre dans cette même situation, un fond noir négatif peut en fait être un faux négatif, surtout s'il n'est pas réalisé dans des conditions optimales, par exemple après l'utilisation d'antibiotique topique, ou encore lorsqu'il est réalisé par des techniciens peu expérimentés.

Nous avons conduit une étude observationnelle prospective multicentrique dans deux centres Français et trois centres Suisses chez des patients présentant une ulcération génitale, anale ou buccale après une prise de risque sexuelle récente. Tous les patients inclus ont reçu un fond noir sur le prélèvement de leur ulcération ou si non disponible du fait du contexte pragmatique de l'étude, des tests sérologiques de routine plus un examen par *Tp*-PCR sur le prélèvement des lésions ulcéraires. Notre objectif était d'évaluer la valeur diagnostique de la *Tp*-PCR tout en sachant que les tests de référence existants sont imparfaits. Nous avons notamment fait l'hypothèse qu'un fond noir négatif en présence d'une *Tp*-PCR positive est à considérer comme un faux négatif du fond noir et non comme un faux positif de la *Tp*-PCR. Du fait de la documentation des défauts et des avantages en miroir du fond noir (le *gold standard* selon le CDC) et des tests sérologiques, nous allons tester la définition d'un troisième groupe de référence, le « *gold standard* amélioré » qui combine des critères cliniques, anamnestiques et évolutifs suggestifs de syphilis avec les résultats du fond noir et des tests sérologiques. En particulier, chez les patients présentant un fond noir négatif mais des tests sérologiques et une anamnèse en faveur d'une syphilis, le diagnostic de syphilis était finalement retenu. La performance diagnostique de la *Tp*-PCR (sensibilité et spécificité) et son utilité clinique (valeurs prédictives) seront évaluées par rapport à trois groupes de référence : 1) le fond noir, 2) les tests sérologiques et 3) le « *gold standard* amélioré ».

V.3 Objectifs

L'objectif de cette étude prospective multicentrique observationnelle est :

1. D'évaluer la performance diagnostique de la *Tp*-PCR en fonction de trois groupes de référence différents : 1) le fond noir, 2) les tests sérologiques et 3) une combinaison du fond noir, des tests sérologiques et des informations cliniques.

V.4 Matériel et méthodes

V.4.1 Design de l'étude

Etude observationnelle diagnostique prospective multicentrique menée entre le 1^{er} septembre 2011 et le 1^{er} septembre 2013 dans 5 centres médicaux Suisses et Français auprès de patients présentant une ulcération génitale, anale ou buccale évocatrice de syphilis suite à une prise de risque sexuelle. L'article émanant de ce travail est fourni en annexe C.

V.4.2 Population d'étude et centres médicaux impliqués

Tout patient présentant une ulcération génitale, anale ou buccale évocatrice de syphilis suite à une prise de risque sexuelle était invité à participer à l'étude diagnostique en acceptant de recevoir un prélèvement supplémentaire de son ulcération à des fins diagnostiques. Les patients recevaient une note informative décrivant le but de l'étude, son déroulement et les coordonnées de la personne responsable du projet. Chaque patient devait donner son accord pour participer en signant une feuille de consentement.

Les centres médicaux sollicités étaient en Suisse : 1) les services de consultations ambulatoires des maladies sexuellement transmissibles, de dermatologie-vénéréologie et de gynécologie des Hôpitaux Universitaires de Genève ; 2) les services de consultations ambulatoires de dermatologie-vénéréologie et des maladies infectieuses du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois de Lausanne ; 3) le service de consultations ambulatoires en dermatologie-vénéréologie de l'Hôpital Triemli de Zürich. En France, les centres médicaux sollicités étaient : 4) le service de dépistage anonyme et gratuit des infections sexuellement transmissibles de l'Hôpital de la Croix Rousse de Lyon et 5) le service de consultations ambulatoires des infections sexuellement transmissibles de l'Institut Alfred Fournier de Paris.

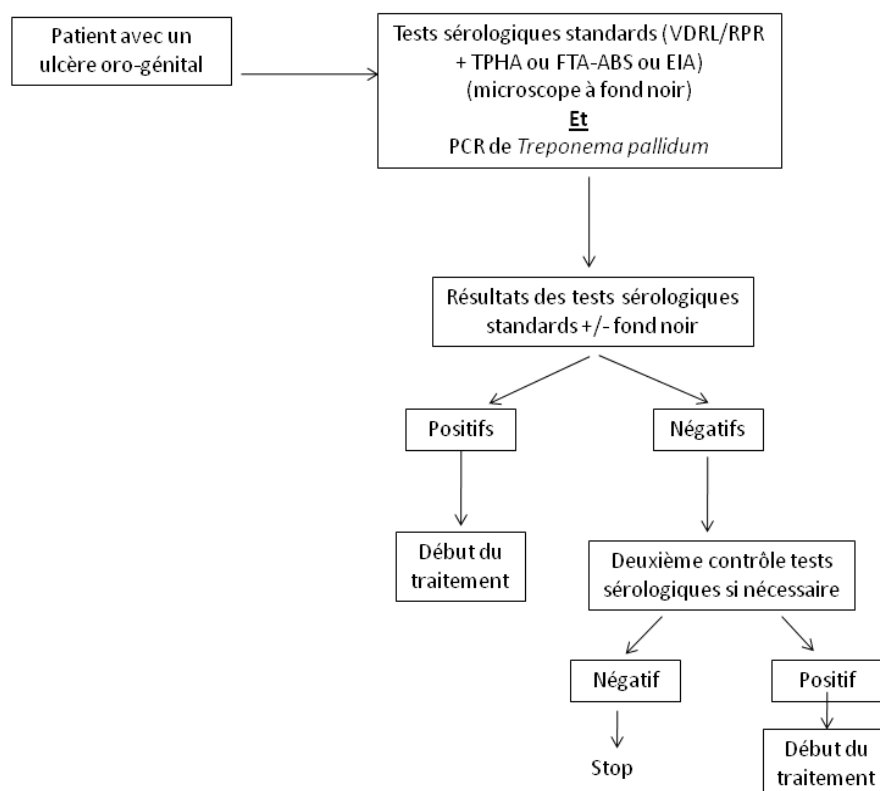
V.4.3 Définition de la syphilis précoce

Le diagnostic de syphilis précoce se basait sur la définition du CDC en vigueur au moment de la mise en place de l'étude⁴ chez les patients présentant une ulcération génitale, anale ou buccale évocatrice de syphilis suite à une prise de risque sexuelle datant de moins de 3 mois. Le fond noir était pratiqué en routine dans 2 centres médicaux (Paris et Zürich) et de manière plus épisodique dans 2 autres centres médicaux (Genève et Lausanne) sur les 5 centres inclus dans l'étude. Le fond noir n'était jamais pratiqué dans le centre situé à Lyon. Un fond noir positif signait un diagnostic de syphilis.

La séquence des tests sérologiques était réalisée selon la pratique de routine du centre et pouvait se baser sur la réalisation en première ou seconde intention d'un test non tréponémique (VDRL ou RPR selon le centre) seul ou combiné à un ou plusieurs tests tréponémiques (TPHA, FTA-ABS ou EIA). Le diagnostic de syphilis était retenu en présence de signes cliniques évocateurs, d'une anamnèse parlante et d'un test non tréponémique réactif (titres de VDRL ou RPR $\geq$ 2) associé avec un test tréponémique positif. Un test rapide EIA positif (titre $\geq$ 2,50) signait un diagnostic de syphilis s'il était accompagné d'un test non tréponémique réactif plus un autre test tréponémique positif (TPHA $\geq$ 360 ou FTA-ABS $\geq$ 80). L'interprétation des résultats des tests sérologiques était réalisée par deux investigateurs indépendants (Patrice Sednaoui et Stephan Lautenschlager) et toutes les discordances étaient discutées afin d'obtenir un consensus. Les résultats des tests pouvaient conclure à la présence de syphilis (tests jugés positifs), l'absence de syphilis (tests jugés négatifs) ou à un statut indéterminé. La séquence des tests de référence employée est représentée dans la Figure V.1 ci-après.

Finalement nous avons défini un « *gold standard* amélioré » combinant les résultats du fond noir, des tests sérologiques et des critères cliniques. Le diagnostic de syphilis était retenu chez les patients avec un fond noir négatif associé à la présence de signes cliniques évocateurs, d'une anamnèse parlante, d'une évolution vers la guérison clinique et sérologique²² sous un traitement adéquat de la syphilis et en présence de tests sérologiques positifs. De même, le diagnostic de syphilis était retenu chez les patients présentant un fond noir positif et les critères cliniques et évolutifs précédemment énumérés. Dans les autres situations, le diagnostic de syphilis était rejeté.

Figure V.1. Performance diagnostique de *Tp*-PCR comparée au *gold standard*, le fond noir.



Le diagnostic de syphilis était écarté en présence d'un fond noir négatif et d'une anamnèse et présentation clinique non évocatrices de syphilis et/ou de tests sérologiques négatifs.

Les critères de mise en route du traitement étaient appliqués par les médecins en charge du patient selon les recommandations en vigueur⁸¹ et les résultats de l'étude n'ont en aucun cas influencé la décision de traiter ou de ne pas traiter un patient.

En dehors du diagnostic de syphilis, d'autres tests diagnostiques pouvaient être réalisés par les médecins en charge des patients et leur prescription était libre et non contrôlée. Les autres tests réalisés pouvaient être : examen direct après coloration de Gram ou bleu de méthylène des prélèvements d'ulcération à la recherche de *Neisseria gonorrhoeae* suivi de la culture sur gélose chocolat ou détection des acides nucléiques spécifiques de *Neisseria gonorrhoeae* par PCR ; détection des acides nucléiques spécifiques de *Chlamydia trachomatis* par PCR ; isolement du virus Herpes simplex par culture cellulaire, identification du virus par immunofluorescence directe à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques ou détection de l'ADN viral par PCR ; culture spécifique d'*Haemophilus ducreyi*.

V.4.4 Technique d'amplification génique *Tp*-PCR et définition du critère de jugement principal

La réalisation du prélèvement d'ulcération était effectuée de manière standardisée après avoir nettoyé délicatement la zone avec une gaze stérile et recueilli l'exsudat clair à l'aide d'un écouvillon *e-swab* fourni à tous les centres par le centre de coordination de l'étude. Le prélèvement était ensuite envoyé directement pour les centres suisses au laboratoire central de Bactériologie afin de réaliser la *Tp*-PCR. Pour les 2 centres français, les prélèvements étaient stockés à -20°C avant d'être transportés par lots dans de la *carboglance* au laboratoire central de Bactériologie. L'extraction de l'ADN de *Treponema pallidum* était réalisée selon un protocole standard utilisant le *MagNa Pure® compact system* (Roche Diagnostics) puis les extraits d'ADN étaient amplifiés par un appareil Taqman 7500 *real-time* PCR (Applied Biosystems, Rotkreuz, Switzerland) ciblant le gène spécifique de la protéine membranaire 47kDa.¹⁵ Chaque extrait d'ADN était amplifié trois fois ainsi que 3 contrôles positifs et 3 contrôles négatifs. Le nombre total de cycles (C_T) par *run* était de 45. La limite de détection de l'*assay* était de 0,05 pg d'ADN total (ADN mixte provenant de tissus de lapins et d'ADN de souche Nichols de *Treponema pallidum*) correspondant à une valeur C_T de 40 correspondant au cycle maximal de détection de fluorescence de la cible.

Le résultat de la *Tp*-PCR était qualitatif : positif ou négatif pour chacune des 3 amplifications et accompagné d'une valeur de C_T renseignant sur l'intensité du signal perçu par la *Tp*-PCR : une valeur proche de 40 était considérée comme un signal faible (équivalent à une faible concentration de *Treponema pallidum*) tandis qu'une valeur C_T basse était considérée comme un signal fort de détection (équivalent à une forte concentration de *Treponema pallidum*).

V.4.5 Autres variables collectées

Des données socio-démographiques (sexe, âge) et cliniques (présentation clinique de la lésion, date d'apparition, mode de contamination, statut vis-à-vis de la sérologie du VIH, traitement spécifique, état d'immunosuppression connu, autres comorbidités, autres diagnostics retenus pour la lésion, type de traitement prescrit) étaient collectées à l'aide d'un questionnaire standard complété de manière anonyme par le clinicien en charge du patient ou par la coordinatrice de l'étude (Angèle Gayet-Ageron).

Dans 2 centres (Genève et Lyon), un deuxième prélèvement du reste de l'ulcération était proposé dans les 7 à 14 jours d'un traitement de la syphilis afin de vérifier si le résultat de *Tp*-PCR était devenu négatif.

Dans 4 centres (Genève, Zürich, Lausanne et Lyon), les résultats des tests sérologiques de suivi étaient transmis 3, 6 et/ou 12 mois après le traitement de la syphilis. Le patient était considéré comme guéri en présence d'une diminution par 4 des titres du test non tréponémique (VDRL ou RPR).⁸¹

V.4.6 Calcul de taille d'échantillon

En prenant les résultats de la méta-analyse, 80% des patients porteurs de syphilis primaire ont une *Tp*-PCR positive.¹⁴ Ainsi 61 cas de syphilis étaient estimés nécessaires pour observer une sensibilité de la *Tp*-PCR de 80% avec une précision de $\pm 10\%$ ⁸². Nous anticipons une prévalence de la syphilis de 25% parmi les patients recrutés dans les 5 centres et présentant une ulcération^{41 83 84}, soit la nécessité de recruter 260 patients au total, en anticipant une proportion de 5% de perdus de vue ou données inexploitable. Avec ~200 témoins définis précédemment au point VI.4.3, nous étions capables de décrire une spécificité de 90% de la *Tp*-PCR avec une précision de $\pm 8\%$.

V.4.7 Analyses statistiques

Les variables continues dans la population d'étude sont décrites par leur moyenne $\pm$ déviation standard (DS) ou leur médiane $\pm$ écart interquartile (EIQ) ; les variables catégorielles sont décrites sous forme de fréquences et proportions relatives de chaque catégorie sur l'ensemble. La comparaison des valeurs C_T des *Tp*-PCR positives en fonction du résultat du fond noir (positive/négative) est faite selon le test non-paramétrique de Mann-Whitney. La comparaison des proportions de résultats discordants entre le fond noir (négatif) et la *Tp*-PCR (positive) entre les centres avec une longue expérience du fond noir et ceux avec une faible expérience est faite grâce au test du Chi-2.

La performance diagnostique de la *Tp*-PCR est comparée au fond noir et évaluée sur les valeurs de sensibilité, spécificité, probabilités post-test du diagnostic de syphilis (valeur prédictive positive et $[1 - \text{valeur prédictive négative}]$) et rapports de vraisemblance positif et négatif accompagnés de leur IC95% grâce à la méthode de Clopper-Pearson.⁸⁵ L'interprétation des rapports de vraisemblance positif et négatif se base sur les seuils proposés

par Jaeschke et coll.⁶⁰. La concordance entre la *Tp*-PCR et le fond noir est évaluée par le coefficient kappa avec son IC95% exact interprété selon l'échelle de Landis et Koch.⁸⁶

Ensuite la performance diagnostique de la *Tp*-PCR est comparée aux tests sérologiques et la concordance des résultats de la *Tp*-PCR et de la sérologie est également mesurée. La performance diagnostique de la sérologie a été comparée au fond noir ainsi que la concordance des 2 types d'examens. Les concordances entre *Tp*-PCR et fond noir puis sérologie et fond noir exprimées sur le coefficient kappa ont été comparées en utilisant une méthode de *bootstrap* tenant compte de la corrélation des kappas.⁸⁷ La comparaison des différents indices de performance diagnostique (sensibilités, spécificités, rapports de vraisemblance positifs et négatifs, valeurs prédictives positives et négatives) de la *Tp*-PCR puis de la sérologie par rapport au fond noir sont comparées grâce au test exact de McNemar.

Finalement la performance diagnostique de la *Tp*-PCR est comparée au « *gold standard* amélioré ».

Toutes les analyses ont été réalisées avec le logiciel Stata 13.0 (STATA Corp., College Station, Texas, USA) et le seuil de significativité considéré était 0,05.

V.5 Résultats

V.5.1 Description de la population d'étude

Au total 273 patients ont été recrutés dans les 5 centres médicaux (Paris n= 140, 51,3%; Lyon n=59, 21,6%; Genève n=40, 14,7%; Lausanne n=17, 6,2% and Zürich n=17, 6,2%). La plupart des patients était des hommes (n=252, 92,3%). La moyenne d'âge était de 39,0 ans ($\pm 12,2$). Le délai moyen entre la date d'apparition de l'ulcération et la consultation était de 20,4 jours ($\pm 33,9$, n=132). Le mode de contamination le plus fréquent était la prise de risque homosexuelle (n=185, 71,4%). La localisation de l'ulcération était génitale (n=148, 54,2%), ano-rectale (n=98, 35,9%) ou buccale (n=27, 9,9%). Le statut VIH était connu pour la plupart des patients (n=226, 82,8%) : 53 patients étaient connus comme séropositifs vis-à-vis du VIH et 36 recevaient un traitement antirétroviral. Neuf patients ont été diagnostiqués porteurs du VIH au moment de l'épisode d'ulcération.

V.5.2 Performance diagnostique de la *Tp*-PCR comparée au fond noir

Le fond noir a été réalisé chez 170 patients (62,3%) : 32 résultats étaient considérés comme positifs et 138 négatifs (Tableau V.1). La plupart des fonds noirs venait des 2 centres considérés comme expérimentés (n=155, 91,2%). Au total, 43 prélèvements avaient un résultat positif de *Tp*-PCR avec une valeur médiane de C_T à 33,3 (EIQ : 29-37,7), dont 13 résultats avec un fond noir négatif.

Tableau V.1. Performance diagnostique de la *Tp*-PCR comparée au fond noir.

<i>Tp</i> -PCR	Fond noir		Total
	Positif	Négatif	
Positive	30	13	43
Négative	2	125	127
Total	32	138	170

Parmi les *Tp*-PCR positives, les valeurs de C_T ne sont pas significativement différentes entre les sujets avec un fond noir négatif et ceux avec un fond noir positif (médianes de C_T respectives 33,3 versus 33,0, P=0,89).

La proportion de résultats discordants entre la *Tp*-PCR (positive) et le fond noir (négatif) est significativement plus grande dans les centres ne pratiquant pas le fond noir de façon régulière comparés à ceux considérés comme ayant une grande expérience du fond noir ($P<0,001$, Tableau V.2).

Tableau V.2. Nombre de résultats discordants (%) entre le fond noir (négatif) et la *Tp*-PCR (positive) entre les centres avec une pratique courante versus rare du fond noir.

	Expérience du fond noir		Total
	Grande	Rare	
Nombre de résultats discordants (%)	7 (4,5)	6 (40,0)	13 (7,6)
Nombre total d'examens faits dans l'étude	155	15	170

Les résultats des indices permettant d'évaluer la performance diagnostique de la *Tp*-PCR comparée au fond noir sont rapportés dans le Tableau V.3. La concordance entre *Tp*-PCR et le fond noir est substantielle. Le rapport de vraisemblance positif est élevé proche de 10 et le rapport de vraisemblance négatif est en-dessous du seuil de 0,1 suggérant que la *Tp*-PCR a une grande utilité diagnostique: la chance de présenter une *Tp*-PCR positive est 10 fois plus grande chez les patients avec une syphilis que chez ceux porteurs d'une ulcération non due à la syphilis. La chance de présenter une *Tp*-PCR négative est 14-fois ($0,07^{-1}$) plus grande chez les patients porteurs d'une ulcération non due à la syphilis que chez ceux atteints de syphilis. La probabilité d'avoir une ulcération due à la syphilis est de 69,7% en présence d'une *Tp*-PCR positive et elle est de 1,6% en présence d'une *Tp*-PCR négative.

Parmi les 32 patients avec un fond noir positif, 6 étaient co-infectés (18,8%) par un autre pathogène (*Chlamydia trachomatis*, n=2; virus Herpes simplex de type 2, n=1; *Neisseria gonorrhoeae*, n=1; *Haemophilus parainfluenza*, n=1 ou *Streptococcus* du group C, n=1). Parmi les 138 patients avec un fond noir négatif, 12 ont été malgré tout considérés comme des cas de syphilis et ont reçu un traitement spécifique (8,7%). Les autres diagnostics évoqués étaient: des infections à virus Herpes simplex de type 1 ou 2 (n=21, 15,2%), infections à *Chlamydia trachomatis* (n= 13, 9,4%) ou *Neisseria gonorrhoeae* (n=7, 5,1%) et des ulcérations à plusieurs germes (n=10, 7,2%).

Tableau V.3. Résumé des différents indices de performance diagnostique de la *Tp*-PCR comparée au fond noir, à la sérologie et au « *gold standard* amélioré ».

Test de référence (n)	Sensibilité (IC95%)	Spécificité (IC95%)	Rapport de vraisemblance positif (IC95%)	Rapport de vraisemblance négatif (IC95%)	Coefficient Kappa (IC95%)	Probabilité post- test si <i>Tp</i> -PCR est positive* (IC95%)	Probabilité post-test si <i>Tp</i> -PCR est négative** (IC95%)
Fond noir (n=170)	93,8% (79,2-99,2)	90,6% (84,4-94,9)	9,95 (5,89-16,82)	0,07 (0,02-0,26)	0,77 (0,62-0,87)	69,8% (53,9-82,8)	1,6% (0,2-5,6)
Sérologie (n=239)	78,5% (68,4-86,5)	93,4% (88,2-96,8)	11,84 (6,44-21,77)	0,23 (0,16-0,35)	0,73 (0,64-0,82)	87,3% (78,0-93,8)	11,9% (7,3-17,9)
“ <i>Gold standard</i> amélioré” (n=170)	87,5% (74,8-95,3)	99,2% (95,5-100,0)	106,75 (15,11-753,95)	0,13 (0,06-0,27)	0,90 (0,82-0,97)	97,7% (87,7-99,9)	4,7% (1,8-10,0)

* Correspond à la valeur prédictive positive. ** Correspond à (1 – valeur prédictive négative).

V.5.3 Performance diagnostique de la *Tp*-PCR comparée à la sérologie

Parmi les 273 patients, 255 ont reçu des tests sérologiques. Les combinaisons les plus fréquemment utilisées figurent dans le Tableau V.4. La concordance des interprétations entre les 2 investigateurs était quasiment parfaite (kappa 0,88 ; IC95% : 0,83-0,93).

Tableau V.4. Répartition des combinaisons de tests sérologiques utilisées pour le diagnostic de syphilis.

Combinaisons des tests sérologiques	N	%
VDRL or RPR plus TPHA	137	53,7%
VDRL ou RPR plus TPHA et/ou FTA-ABS	46	18,0%
EIA confirmé par VDRL ou RPR plus TPHA ou FTA-ABS	45	17,6%
Autres combinaisons	27	10,6

Selon les tests de référence, 88 patients étaient considérés comme porteurs de syphilis et 16 avaient un statut indéterminé du fait de l'absence d'un deuxième test sérologique (VDRL/RPR) de contrôle (Tableau V.5).

Tableau V.5. Performance diagnostique de la *Tp*-PCR comparée aux tests sérologiques.

<i>Tp</i> -PCR	Interprétation de tests sérologiques			Total
	Positifs	Négatifs	Indéterminés	
Positive	69	10	1	80
Négative	19	141	15	175
Total	88	151	16	255

Les résultats des indices permettant d'évaluer la performance diagnostique de la *Tp*-PCR comparée aux tests sérologiques sont rapportés dans le Tableau V.3. La concordance

entre *Tp*-PCR et la sérologie est substantielle mais plus basse que celle entre la *Tp*-PCR et le fond noir. Le rapport de vraisemblance positif est élevé au-delà de 10 mais le rapport de vraisemblance négatif est au-dessus du seuil de 0,1 suggérant que comparé à la sérologie, la *Tp*-PCR a une utilité diagnostique modérée: la chance de présenter une *Tp*-PCR positive est ~12 fois plus grande chez les patients avec une syphilis que chez ceux porteurs d'une ulcération non due à la syphilis mais la chance de présenter une *Tp*-PCR négative est seulement 4-fois ($0,23^{-1}$) plus grande chez les patients porteurs d'une ulcération non due à la syphilis que chez ceux atteints de syphilis. La probabilité d'avoir une ulcération due à la syphilis est de 87,3% en présence d'une *Tp*-PCR positive mais elle est de 11,9% en présence d'une *Tp*-PCR négative.

Parmi les 151 patients avec une sérologie négative, 10 (6,6%) ont été quand même considérés comme atteints de syphilis et ont reçu un traitement spécifique.

Parmi les 88 cas avec une sérologie positive, 10 (11,4%) étaient co-infectés avec un autre pathogène. Parmi les 151 cas avec une sérologie négative, les diagnostics retenus étaient: infection à virus Herpes simplex de type 1 ou 2 ($n=25$, 16,5%), infection à *Chlamydia trachomatis* ($n=9$, 6,0%) ou *Neisseria gonorrhoeae* ($n=8$, 5,3%) et infections à plusieurs pathogènes ($n=5$, 3,3%).

V.5.4 Comparaison des performances diagnostiques de la *Tp*-PCR et de la sérologie vis-à-vis du fond noir

Au total, 151 patients ont reçu un examen au fond noir et des tests sérologiques (55,7%) et 141 avaient des tests sérologiques informatifs (après exclusion des sérologies de statut indéterminé) (Tableau V.6). Dans ce sous-groupe de 141 patients, la concordance entre la sérologie et le fond noir était modérée et significativement plus basse qu'entre la *Tp*-PCR et le fond noir ($P=0,003$, Tableau V.7). La sensibilité de la sérologie comparée au fond noir était plus basse mais non significativement différente de celle de la *Tp*-PCR comparée au fond noir ($P=0,22$, Tableau V.8). La spécificité de la sérologie comparée au fond noir n'était pas significativement différente de la spécificité de la *Tp*-PCR comparée au fond noir ($P=0,13$, Tableau V.8).

Tableau V.6. Performance diagnostique de la sérologie comparée au fond noir.

Sérologie	Fond noir		Total
	Positif	Négatif	
Positive	26	16	42
Négative	6	93	99
Total	32	109	141

Coefficient Kappa obtenu: 0,60; IC95%: 0,45-0,75

Tableau V.7. Performance diagnostique de la *Tp*-PCR comparée au fond noir dans le même sous-groupe de patients que ceux ayant aussi des résultats de sérologie.

<i>Tp</i>-PCR	Fond noir		Total
	Positif	Négatif	
Positive	30	12	42
Négative	2	97	99
Total	32	109	141

Coefficient Kappa obtenu: 0,75; IC95%: 0,62-0,87

Tableau V.8. Résumé des différents indices de performance diagnostique de la sérologie puis de la *Tp*-PCR comparée au fond noir.

Méthode évaluée (n)	Sensibilité (IC95%)	Spécificité (IC95%)	Rapport de vraisemblance positif (IC95%)	Rapport de vraisemblance négatif (IC95%)	Coefficient Kappa (IC95%)	Probabilité post-test si <i>Tp</i> -PCR est positive* (IC95%)	Probabilité post- test si <i>Tp</i> -PCR est négative** (IC95%)
Sérologie (n=141)	81,3% (63,6-92,8)	85,3% (77,3-91,4)	5,54 (3,42-8,97)	0,22 (0,11-0,45)	0,60 (0,45-0,75)	61,9% (46,8-75,0)	6,1% (2,8-12,6)
<i>Tp</i> -PCR (n=141)	93,8% (79,2-99,2)	89,0% (81,6-94,2)	8,52 (4,96-14,63)	0,07 (0,02-0,27)	0,75 (0,62-0,87)	71,4% (56,4-82,8)	2,0% (0,6-7,1)

* Correspond à la valeur prédictive positive. ** Correspond à (1 – valeur prédictive négative).

V.5.5 Utilisation d'un *gold standard* amélioré pour évaluer la performance diagnostique de la *Tp*-PCR

Parmi les 138 patients avec une lecture négative du fond noir (Tableau V.1), 16 sont considérés comme des cas de syphilis en utilisant la définition du « *gold standard* amélioré » (Tableau V.9). Parmi les 16 cas « rattrapés » par la définition du « *gold standard* amélioré », 12 patients avaient un fond noir négatif, une *Tp*-PCR positive, une présentation clinique et une anamnèse suggestive de syphilis et des tests sérologiques considérés comme positifs par les deux investigateurs. Les 4 autres patients avaient un fond noir négatif, une *Tp*-PCR négative, une présentation clinique et une anamnèse suggestive de syphilis et des tests sérologiques considérés comme positifs.

Tableau V.9. Performance diagnostique de la *Tp*-PCR comparée au «*gold standard* amélioré».

<i>Tp</i> -PCR	<i>Gold standard</i> amélioré			Total
	Syphilis		Pas de syphilis	
	Fond noir positif	Fond noir négatif	Fond noir négatif	
Positive	30	12	1	43
Négative	2	4	121	127
Total	32	16	122	170

Les résultats des indices permettant d'évaluer la performance diagnostique de la *Tp*-PCR comparée «*gold standard* amélioré » sont rapportés dans le Tableau V.3. La concordance entre *Tp*-PCR et le «*gold standard* amélioré » est quasiment parfaite. Les rapports de vraisemblance suggèrent une très bonne utilité diagnostique de la *Tp*-PCR: la chance de présenter une *Tp*-PCR positive est ~107-fois plus grande chez les patients avec une syphilis que chez ceux porteurs d'une ulcération non due à la syphilis et la chance de présenter une *Tp*-PCR négative est 7,7-fois ($0,13^{-1}$) plus grande chez les patients porteurs d'une ulcération non due à la syphilis que chez ceux atteints de syphilis. La probabilité

d'avoir une ulcération due à la syphilis est de 97,7% en présence d'une *Tp*-PCR positive et elle est de 4,7% en présence d'une *Tp*-PCR négative.

Parmi les 16 considérés comme ayant la syphilis en utilisant la définition du « *gold standard* amélioré », 6 présentaient une ulcération génitale, 8 des lésions ano-rectales et 2 avaient une ulcération buccale.

V.5.6 Suivi des patients traités pour la syphilis

Au total, 78 patients ont été considérés par les cliniciens comme porteurs d'une ulcération liée à la syphilis, soit sur un fond noir positif, soit sur des tests sérologiques positifs et ont été traités pour la majorité par des injections de benzathin-pénicilline (n=77, 98,7%). Parmi ces 78 patients, 62 avaient une *Tp*-PCR positive (79,5%) et 15 furent testés par une deuxième *Tp*-PCR dans les 14 premiers jours suivant le traitement avec une *Tp*-PCR négative pour 14 d'entre eux (94,7%). Pour un patient, la *Tp*-PCR de contrôle était encore positive 8 jours après le traitement (C_T médian 39,9). Parmi les 78 patients traités, 40 ont eu des résultats de suivi sérologique (51,3%) et 87,5% (n=35) d'entre eux sont considérés comme répondeurs au traitement.

Parmi les 13 patients avec un fond noir négatif et une *Tp*-PCR positive, 7 ont reçu une injection intra-musculaire de benzathin-pénicilline (53,8%) du fait d'une grande présomption clinique vis-à-vis de la syphilis. Parmi ces 7 patients, 5 sont considérés comme répondeurs au traitement du fait d'une diminution d'un facteur 4 de leur titre de VDRL ou RPR (71,4%).

V.6 Discussion

Les résultats de l'étude prospective multicentrique observationnelle ont montré que la *Tp*-PCR présentait une bonne performance diagnostique mais que son utilité clinique variait en fonction du test de référence utilisé, du fait notamment de l'existence d'erreurs de classifications du fond noir, que l'on pourrait qualifier de « faux faux négatifs ». Lorsque le fond noir est positif, on est convaincu que le patient a la syphilis, tandis qu'en cas de fond noir négatif, se pose la question d'erreurs liées à la mauvaise réalisation du prélèvement (prélèvement ou conditions de stockage, lecture inattentive) ou au manque d'expérience de l'opérateur. Par définition, le test de référence ne doit pas commettre d'erreurs et toutes les valeurs discordantes entre le test évalué et le test de référence sont interprétées comme des erreurs de la *Tp*-PCR. Cependant le test de référence se distingue du *gold standard* par le fait qu'il peut commettre certaines erreurs et pour le fond noir ces erreurs sont associées avec le niveau d'expérience de l'opérateur ou plus généralement avec celui du centre participant. Dans une analyse complémentaire, nous avons reconsidéré tous les résultats négatifs du fond noir avec une anamnèse positive et des tests sérologiques positifs (un test non-tréponémique et un test tréponémique positifs) comme étant des « faux négatifs » du fond noir. Tous les cas positifs au fond noir étaient considérés comme des cas de syphilis. En utilisant ces nouveaux critères définissant le « *gold standard* amélioré » et utilisant toutes les informations disponibles pour chaque patient, la performance diagnostique de la *Tp*-PCR était meilleure, ainsi que son utilité clinique pour confirmer ou infirmer le diagnostic de syphilis. La fiabilité du « *gold standard* amélioré » a été confortée par l'évolution favorable sous le traitement standard de la syphilis (benzathine pénicilline) chez 7 patients avec une forte présomption clinique en faveur de la syphilis malgré un fond noir négatif (et une *Tp*-PCR positive).

La force de cette étude est liée à son *design* prospectif et multicentrique ainsi qu'à la réalisation de la *Tp*-PCR dans un seul laboratoire, rendant ainsi des résultats standardisés. La population d'étude était également représentative des patients qui devraient bénéficier de ce test dans le futur. Par contre, cette étude présente comme limitation majeure l'absence de standardisation du test de référence pour le diagnostic de syphilis, du fait du contexte pragmatique de cette étude. En effet, il aurait été difficile en pratique de standardiser la réalisation des tests de référence du fait notamment de l'inclusion de patients dans des centres médicaux avec une forte activité et une mission prioritaire de soins et non de recherche. Une solution aurait été de prendre en plus de l'écouvillon de la lésion, des prélèvements sanguins afin de réaliser dans un second temps et dans un même laboratoire d'analyses, les mêmes tests

sérologiques à tous les patients. Ceci ne s'est pas fait pour des raisons de faisabilité et aussi de financement. Nous avons cependant tenté de minimiser cette variabilité inter-centres des tests de référence en réinterprétant les résultats de tous les tests sérologiques par deux experts aveugles des résultats initiaux et de ceux de la *Tp*-PCR. Si nous avions dû appliquer la grille d'évaluation de la qualité de notre étude diagnostique⁸⁸, nous aurions obtenu un total de 12 sur 14 ce qui reflète une bonne qualité de l'étude.

Les résultats de l'étude sont concordants avec ceux de deux études diagnostiques récentes rapportant la bonne performance diagnostique de la *Tp*-PCR.^{16 89} Grange et coll. ont rapporté une concordance modérée entre le fond noir et la *Tp*-PCR avec un coefficient kappa de 0,53.¹⁶ Ils ont aussi montré que les sensibilité/spécificité de la *Tp*-PCR étaient supérieures au fond noir comparativement au groupe de référence « suspicion clinique ». De la même façon, Heymans et coll. ont réalisé la *Tp*-PCR et le fond noir chez 716 cas suspects de syphilis primaire et ils ont montré que la *Tp*-PCR avait une sensibilité de 87,0% et une spécificité de 93,1% comparée au fond noir.⁸⁹ La concordance rapportée entre la *Tp*-PCR et le fond noir était également modérée avec un coefficient kappa de 0,60. Dans l'étude de Heymans et coll., les discordances étaient principalement dans le sens de fonds noirs négatifs et *Tp*-PCR positives (6,4%). Les autres discordances (fonds noirs positifs et *Tp*-PCR négatives) étaient moins fréquentes (1,0%), ce qui coïncide avec nos propres résultats.

Lorsque le fond noir n'est pas disponible, ce qui est fréquent dans la plupart des centres de dépistages des maladies sexuellement transmissibles⁷⁷, les cliniciens basent leur diagnostic sur les tests sérologiques avant de décider de traiter ou pas leurs patients contre la syphilis primaire. Dans une enquête réalisée auprès de médecins infectiologues américains, 56% d'entre eux déclaraient réaliser un test RPR avant de débiter un traitement présomptif de la syphilis et seulement 2% traitait directement leurs patients sans considérer les résultats des tests sérologiques. Ces chiffres mettent en avant le manque de consensus dans la stratégie diagnostique mise en place par des experts et soulignent quelques difficultés dans l'application des recommandations officielles en pratique clinique. De plus, même si la sérologie est utile pour documenter les stigmates d'une syphilis passée et ainsi donner des repères pour l'interprétation de résultats sérologiques futurs, et notamment l'évaluation de la réponse au traitement, ces tests sont très souvent non informatifs, en particulier dans la phase précoce de l'infection où certains décrivent jusqu'à 30% de tests sérologiques faussement négatifs.⁹⁰

Les résultats de l'étude confirment que l'adoption de la *Tp*-PCR comme test de référence prioritaire dans la nouvelle liste proposée par le CDC⁵ serait raisonnable comme l'avaient également rapporté les auteurs des deux récentes études sur le sujet.^{16 89} Plusieurs arguments sont en faveur de cette stratégie prioritaire. Premièrement, nous avons montré que la *Tp*-PCR était supérieure au fond noir en termes de performances diagnostiques lorsque nous avons utilisé le « *gold standard* amélioré » comme référence. Deuxièmement, il est difficile de se fier aux résultats du fond noir, lorsque le fond noir est négatif mais la présomption clinique est grande.¹⁹ Dans ce cas, la présomption clinique l'emporte en pratique et le patient est généralement traité avec le traitement standard. En cas de manque d'expérience avec le fond noir, la proportion de fonds noirs négatifs augmente drastiquement. Finalement du fait du caractère en partie automatisé de la *Tp*-PCR, ses résultats sont plus reproductibles que ceux du fond noir et la *Tp*-PCR pourrait être moins coûteuse si elle était de plus en plus pratiquée en routine.

En conséquence, la *Tp*-PCR devient *de facto* le *gold standard* du diagnostic de syphilis précoce symptomatique. Les recommandations européennes se sont basées sur les résultats de plusieurs études^{14 16 52 89} et avaient déjà inclus en 2008⁸ la *Tp*-PCR dans leur algorithme diagnostique, au même niveau que le fond noir ou DFAT-TP, notamment en cas de lésions orales ou ano-rectales où le risque de contamination par des tréponèmes commensaux est plus grand. Ces recommandations européennes ont été actualisées en août 2014 et se basent sur 6 nouvelles études cliniques,¹³⁻¹⁸ dont les résultats d'une première étude réalisée à Genève¹⁵ et sur ceux de la méta-analyse présentée au chapitre IV.¹⁴ Plus récemment, le CDC a finalement aussi inclus la *Tp*-PCR dans les outils diagnostiques pour confirmer une syphilis primaire ou secondaire mais au même niveau que le fond noir ou le DFAT-TP.⁵

V.7 Conclusion

En conclusion, les résultats de l'étude prospective multicentrique observationnelle démontrent que la *Tp*-PCR est cliniquement utile et devrait être utilisée de façon plus large dans la stratégie diagnostique des infections sexuellement transmissibles et qu'elle pourrait même figurer en tête des outils diagnostiques de confirmation, devant le fond noir. Une question demeure cependant: quelle est la meilleure cible de *Treponema pallidum* à amplifier parmi les deux plus fréquemment utilisées, le gène *tpp47* ou le gène *polA* ? Nous tenterons de répondre à cette question au chapitre VI.

La sérologie reste indispensable dans la stratégie diagnostique, notamment pour évaluer la réponse au traitement et permettre d'interpréter les futurs tests sérologiques.

Cependant les tests sérologiques ne devraient plus être utilisés pour l'évaluation des performances diagnostiques de nouveaux tests du fait de leur capacité imparfaite à définir le statut de syphilis.

VI COMPARAISON DES PERFORMANCES DIAGNOSTIQUES DE DEUX CIBLES DE POLYMERASE CHAIN REACTION (GENES *TPP47* ET *POLA*) DANS LE DIAGNOSTIC DES MALADIES ULCÉRATIVES SEXUELLEMENT TRANSMISES

VI.1 Résumé

Objectif : Comparer les performances diagnostiques des deux *Tp*-PCR les plus fréquemment utilisées : celle ciblant le gène *tpp47* versus le gène *polA* dans les ulcères de syphilis précoce.

Méthodes : Revue systématique des études référencées entre janvier 1990 et mars 2014 dans 3 bases bibliographiques (*Pubmed*, *Embase* et *Web of Science*) et dans les catalogues de 5 congrès spécialisés en maladies infectieuses ayant eu lieu entre 1999 et 2011. Méta-analyse d'études diagnostiques en utilisant le modèle bivarié de Reitsma proposant des sensibilité, spécificité, rapports de vraisemblance positif et négatif *poolés* avec leurs IC95%. Ces différents indicateurs ont été estimés parmi les études utilisant un test de référence adéquat (groupe 1) puis parmi les études utilisant le fond noir comme test de référence (groupe 2). Les indicateurs ont été comparés entre les deux types de *Tp*-PCR (*tpp47* versus *polA*) par la méta-régression bivariée utilisant l'approche de Doebler sur un minimum de 10 études, dans le groupe 1 puis 2. La qualité de chacune des études sélectionnées a été évaluée par l'outil QUADAS-2. La présence d'un biais de publication a été explorée par la méthode de Deeks pour un nombre minimum de 10 études. La concordance entre les deux types de *Tp*-PCR a été appréciée par le coefficient kappa calculé sur les données *pairées* de l'étude présentée au chapitre V.

Résultats : Au total, 37 études ont été sélectionnées dans la revue systématique. La majorité suit les recommandations du CDC pour le diagnostic de syphilis (75,7%, n=28) et 15 études ont utilisé spécifiquement le fond noir (40,5%). Parmi les études du groupe 2, les indicateurs de performance diagnostique n'étaient pas significativement différents entre les deux types de *Tp*-PCR. Dans notre étude prospective multicentrique observationnelle, la concordance entre les deux types de *Tp*-PCR sur les spécimens *pairés* était quasiment parfaite (kappa 0,96 ; IC95% : 0,93-0,99).

Conclusion : La *Tp*-PCR ciblant le gène *tpp47* a une performance diagnostique comparable à celle ciblant le gène *polA* et leurs résultats sont parfaitement concordants suggérant qu'elles peuvent être utilisées de manière univoque.

VI.2 Introduction

Les résultats de l'étude prospective multicentrique observationnelle (présentés au chapitre V) ont montré l'utilité clinique de la technique *Tp*-PCR justifiant son inclusion dans les nouvelles définitions de cas proposées par le CDC en janvier 2014.⁷ Ces résultats ont également mis en avant les avantages supplémentaires de la *Tp*-PCR sur le fond noir puisqu'une proportion non négligeable de patients (7.1%, 12/170) présentant une ulcération oro-génitale et des signes cliniques évocateurs de syphilis avait une lecture négative du fond noir et une *Tp*-PCR positive. Ces sujets auraient du être considérés comme non atteints de syphilis, or parmi ceux-ci, 7 d'entre eux ont quand même reçu un traitement contre la syphilis sur des considérations cliniques et parmi ceux ayant eu un suivi post-thérapeutique, tous étaient considérés comme ayant répondu au traitement et donc guéris.

Cependant, malgré l'utilité désormais admise de la *Tp*-PCR, aucune étude n'a montré laquelle des deux cibles de *Treponema pallidum* parmi celles les plus fréquemment utilisées était la meilleure. Dans les études publiées, les deux cibles utilisées sont les gènes *tpp47* et *polA*.¹⁴ Le gène *tpp47* encode la protéine cytoplasmique membranaire de la bactérie et induit l'activation de la réponse immune et inflammatoire médiée par les polynucléaires^{91 92} ; pour d'autres auteurs, ce gène n'a pas de fonction bien identifiée⁹³ et ceci nécessite une phase d'hybridation de l'ADN afin de confirmer sa spécificité.⁹⁴ De plus, ce gène n'est pas spécifique de l'agent responsable de la syphilis (*Treponema pallidum* subsp. *pallidum*) mais se trouve également dans le génome des autres sous espèces de *Treponema pallidum*, tel que *Treponema pallidum* subsp. *pertenue* responsable du pian.⁹⁵⁻⁹⁷ La séquence du gène *polA* est mieux connue et elle reste conservée, notamment sur son domaine fonctionnel.⁹⁴ Le gène *polA* encode la polymérase I impliquée dans le processus de réparation et de réplication de nombreuses bactéries avec un certain nombre de régions propres à *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*.⁹⁸ Les deux gènes ont finalement des fonctions très différentes mais restent les deux cibles les plus souvent utilisées pour amplifier *Treponema pallidum* par *Tp*-PCR et aucune étude antérieure n'a permis de trancher sur laquelle des deux utiliser en pratique.

VI.3 Objectifs

Ainsi les objectifs de cette étude sont :

1. De faire une revue systématique de la littérature scientifique et de décrire les performances diagnostiques de la *Tp*-PCR ciblant le gène *tpp47* et de celle ciblant le gène *polA* dans les ulcères ou les lésions cutanées de syphilis précoce.
2. De calculer les sensibilités, spécificités et rapports de vraisemblance *poolés* pour chacune des deux cibles de *Tp*-PCR.
3. Finalement nous allons utiliser les résultats de notre étude présentée au chapitre V pour décrire la concordance des résultats entre les deux cibles de *Tp*-PCR.

VI.4 Matériel et méthodes

VI.4.1 Design de l'étude

Cette troisième étude est une revue systématique suivie d'une méta-analyse des données publiées dans la littérature et présentées à des congrès spécialisées dans les maladies infectieuses sur les performances diagnostiques de la *Tp*-PCR dans les ulcérations sexuelles et en fonction du gène de *Treponema pallidum* ciblé.

Nous avons également utilisé les résultats plus spécifiques de la deuxième étude observationnelle diagnostique prospective multicentrique décrite au chapitre V sur données *païrées*. L'article présentant les résultats spécifiques à cette partie est présenté en annexe D.

VI.4.2 Critères d'éligibilité des études sélectionnées

Nous avons suivi les mêmes critères que pour la première revue systématique décrite au point IV.4.2. Nous avons utilisé pour cette étude des critères supplémentaires d'inclusion :

- Patients présentant une ulcération oro-génitale suite à une prise de risque sexuelle évoquant une syphilis précoce.
- Réalisation de la *Tp*-PCR dans des prélèvements d'ulcères ou de lésions cutanées.
- *Tp*-PCR ciblant les gènes *tpp47* ou *polA* (et donc exclusion des études rapportant les résultats de la *Tp*-PCR ciblant d'autres gènes).
- Diagnostic de référence de la syphilis suivant les recommandations des CDC.⁷

VI.4.3 Sources d'information et stratégie de recherche

Nous avons utilisé les résultats de la recherche décrite au point IV.4.3 et nous avons complété la liste des études par une mise à jour des études publiées ou présentées à des congrès entre le 1^{er} janvier 2012 et le 31 mars 2014.

VI.4.4 Participants et variables collectées

VI.4.4.1 Dans la revue systématique et la méta-analyse

A partir des études éligibles en appliquant les critères précédemment décrits, les informations suivantes ont été collectées: le nom de l'auteur, le journal et l'année de publication, le pays de réalisation de l'étude, le stade de syphilis (primaire, secondaire ou précoce), le type de *Tp*-PCR (*multiplex*, *standard*, *Tp*-PCR *real-time* ou *nested Tp*-PCR), le gène ciblé (*tpp47* ou *polA*), les tests de référence utilisés pour définir la maladie syphilis (fond noir, tests sérologiques tréponémiques et non tréponémiques), le nombre de positifs avec la *Tp*-PCR parmi les cas de syphilis et le nombre de négatifs parmi les témoins.

VI.4.4.2 Dans l'étude observationnelle diagnostique prospective multicentrique

La description figure aux points V.4.2., V.4.3., V.4.4. et V.4.5. Plus spécifiquement pour cette troisième étude, tous les prélèvements ont été traités et manipulés en premier lieu au laboratoire de bactériologie de Genève où des aliquots d'extraits d'ADN ont été d'abord amplifiés en ciblant le gène *tpp47* puis le reste a été secondairement conservé à -20°C. Dans un second temps, tous les restes d'extraits d'ADN ont été transportés dans des conditions optimales (*carboglance* et boîte hermétique) au laboratoire de bactériologie de Lyon où la *Tp*-PCR ciblant le gène *polA* a été réalisée.

VI.4.5 Définition des cas de syphilis

VI.4.5.1 Dans la revue systématique et la méta-analyse

Nous avons utilisé les définitions de cas rapportés par les auteurs dans leur article et nous avons distingué les cas certains des cas probables suivant la définition du CDC.⁷ Si le diagnostic de syphilis n'utilisait pas ces critères, nous avons considéré l'étude comme utilisant des « tests de référence inadéquats ». Nous avons également distingué ceux utilisant des tests

de détection directe comme le fond noir de ceux utilisant seulement la sérologie pour faire le diagnostic de syphilis.

VI.4.5.2 Dans l'étude observationnelle diagnostique prospective multicentrique

Tous les tests ont été réalisés dans chaque centre participant et l'interprétation des tests sérologiques a été validée par deux investigateurs indépendants (Patrice Sednaoui et Stephan Lautenschlager). L'interprétation de ces tests de référence était indépendante des résultats de *Tp*-PCR. Nous avons utilisé la définition du « *gold standard* amélioré » décrite au point V.4.3 combinant les résultats du fond noir et ceux des tests sérologiques.

VI.4.6 Evaluation de la qualité méthodologique des études sélectionnées dans la revue systématique

Nous avons suivi les recommandations récentes de la revue Cochrane sur les études diagnostiques.⁹⁹ L'évaluation du risque de biais et de l'applicabilité de l'étude a été faite en utilisant la deuxième version du QUADAS publiée après la réalisation de la première méta-analyse décrite au chapitre IV.⁸⁸ Deux investigateurs (Angèle Gayet-Ageron et Stephan Lautenschlager) ont évalué la qualité des études à l'aide de l'outil QUADAS. Nous représentons dans un graphique de type histogramme empilé horizontal la proportion des études considérées comme de qualité haute, basse ou pour lesquelles c'est impossible de trancher (« Pas clair ») concernant le risque de biais et l'applicabilité pour chacun des 11 items listés.

VI.4.7 Analyses statistiques

VI.4.7.1 Revue systématique

Dans la partie décrivant les études sélectionnées dans la revue systématique, nous avons comparé si les proportions des types de *Tp*-PCR étaient différentes selon l'année de publication de l'étude (avant versus après 2000) par un test du Chi-2 ou un test exact de Fischer, selon les conditions d'application. Nous avons aussi comparé par un test du Chi-2 ou un test exact de Fischer si le type de *Tp*-PCR utilisé était différent selon les régions de recrutement (ou selon les continents) et finalement nous avons comparé les proportions d'études utilisant la *Tp*-PCR ciblant le gène *tpp47* versus *polA* en fonction des études utilisant

un test de référence adéquat versus inadéquat et selon les études utilisant un test de détection directe versus pas.

VI.4.7.2 Méta-analyse

Pour la méta-analyse, nous avons dans cette troisième étude suivi les recommandations récentes de la Collaboration Cochrane⁹⁹ (non disponibles au moment de la mise en place de la première étude) qui utilise un modèle basé sur le modèle hiérarchique de courbes ROC résumées (*summary ROC*) de Rutter et Gatsonis.¹⁰⁰ Ce modèle bivarié de Reitsma¹⁰¹ tient compte d'une possible corrélation entre la sensibilité et la spécificité entre les études pour estimer les sensibilités et spécificités *poolées*. Ainsi seules les études présentant des résultats de sensibilité et spécificité conjointes ont été considérées. De la même façon, grâce à ces méthodes, nous rapportons des résultats sur l'utilité clinique de la *Tp*-PCR via les rapports de vraisemblance positif et négatif. Les paramètres du modèle bivarié de Reitsma (sensibilité, spécificité et rapports de vraisemblance *poolés*) sont estimés par REML (*REstricted maximum likelihood*) et sont rapportés avec leurs IC95%.¹⁰¹

Dans un second temps, nous avons testé si le type de tests de référence (adéquats versus inadéquats puis utilisant le fond noir versus pas) expliquaient l'hétérogénéité dans les résultats globaux puis nous avons testé si la cible de la *Tp*-PCR (gène *tpp47* versus *polA*) expliquait l'hétérogénéité des résultats parmi les études utilisant un test de référence adéquat puis chez celles utilisant spécifiquement le fond noir. Les facteurs d'hétérogénéité définis *a priori* ont été testés par la méta-régression bivariée utilisant l'approche de Doebler.¹⁰² Les facteurs suivants ont été testés comme expliquant potentiellement l'hétérogénéité : le type de *Tp*-PCR (*multiplex*, *standard*, *Tp*-PCR *real-time* ou *nested Tp*-PCR) et le continent de recrutement des patients.

Les paramètres estimés dans le modèle bivarié de Reitsma permettent de représenter le lien entre la sensibilité et la spécificité (courbes ROC).¹⁰³ Les intervalles de prédiction à 95% centrés sur le point des coordonnées de (1-spécificité) *poolée* et sensibilité *poolée* sont calculés à partir des erreurs standards des estimations et de la corrélation inter-études. La région de prédiction à 95% représente la zone dans laquelle la véritable performance diagnostique de 95% des études devrait se trouver.

Finalement nous avons recherché l'existence d'un biais de publication parmi les études utilisant un test de référence adéquat puis parmi celles utilisant spécifiquement le fond noir en réalisant une régression des diagnostic *log odds ratios* en fonction de $1/\sqrt{\text{taille de l'étude}}$.¹⁰⁴ Une valeur P du coefficient de régression $<0,10$ était considérée comme signant une asymétrie du « *funnel plot* ».

VI.4.7.3 Concordance des résultats entre la cible tpp47 et polA

Dans notre étude multicentrique et prospective, nous avons étudié la concordance globale des deux types de *Tp*-PCR grâce au coefficient kappa accompagné de son IC95% exact et nous l'avons interprété selon l'échelle de Landis et Koch.⁸⁶

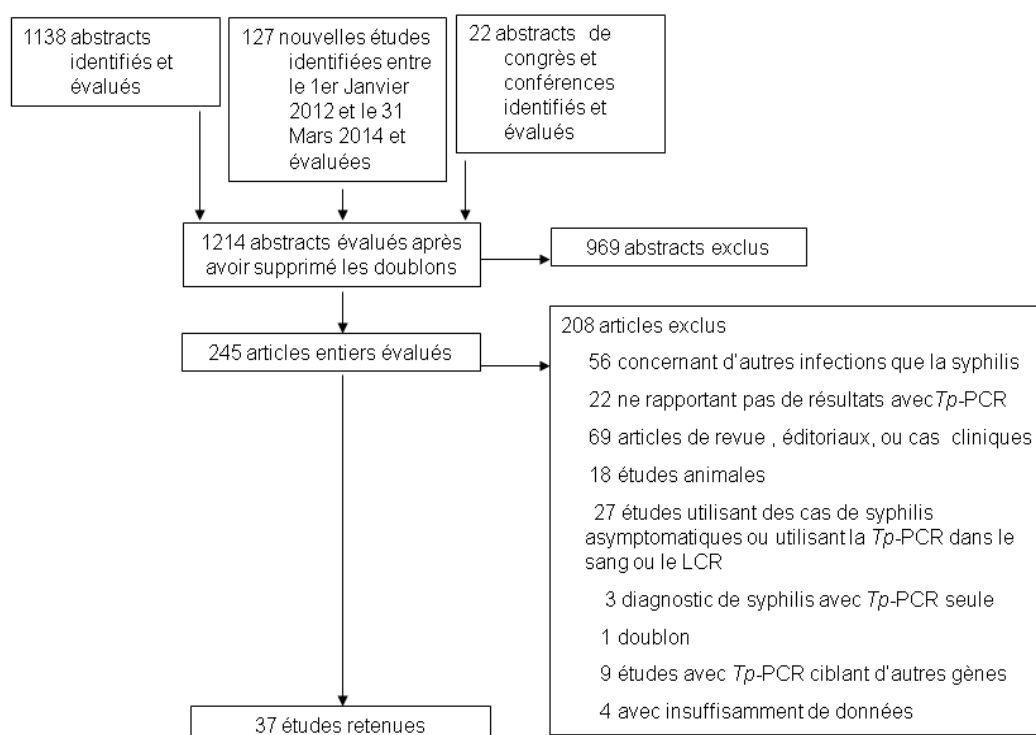
Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Stata 13.0 (STATA Corp., College Station, Texas, USA) ainsi que le package *midas* pour évaluer l'existence d'un biais de publication. Pour la méta-analyse, nous avons utilisé le package *mada* du logiciel R version 3.1.0 (*R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria ; www.R-project.org). Le seuil de significativité utilisé était fixé à 5% (test bilatéral).

VI.5 Résultats

VI.5.1 Description des études sélectionnées dans la revue systématique

Au total, 37 études ont été retenues dans la revue systématique et 32 rapportaient des résultats conjoints de sensibilité et spécificité (Figure VI.1).

Figure VI.1. Diagramme de flux de la procédure de sélection des études.



La description des 37 études sélectionnées est présentée dans le Tableau VI.1.

Tableau VI.1. Description des résultats des 37 études sélectionnées dans la revue systématique.

1 ^{er} auteur (année)	Pays	Type de <i>Tp</i> -PCR	Cible (gène)	Tests de référence utilisés	VP/M+	VN/M-
Orle (1996)	Etats-Unis	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+FN	67/87	184/191
Morse (1997)	Lesotho	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+RPR+FTA-ABS	21/63	33/35
Beyrer (1998)	Thaïlande	M-PCR	<i>tpp47</i>	C	0/2	35/36
Htun (1998)	Lesotho	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+RPR+FTA-ABS	5/6	68/86
Mertz (1998)	Etats-Unis	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+RPR	48/75	423/441
Mertz (1998)	Etats-Unis	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+RPR	23/47	92/96
Behets (1999)	Madagascar	M-PCR	<i>tpp47</i>	C	52/164	28/32
Behets (1999)	Jamaïque	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+TRUST+TPHA	23/64	232/240
Malonza (1999)	Kenya	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+RPR+TPHA	52/69	156/176
Sanchez (2001)	Rep. Dom.	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+VDRL/RPR+FTA-ABS	10/11	133/133
Sutton (2001)	USA	PCR standard	<i>polA</i>	C+RPR/FN	29/31 (I) 8/8 (II)	- -
Wang (2002)	Chine	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+ FN /RPR+TPPA	71/96	121/131
Moodley (2002)	Afrique du sud	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+EIA+RPR+FTA-ABS+TPHA	39/91	484/496
Palmer (2003)	Grande Bretagne (GB)	PCR standard	<i>tpp47</i>	C+ FN +RPR+FTA-ABS	18/19 (I) 8/10 (II)	17/17 47/48
Ahmed (2003)	Tanzanie	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+RPR+TPPA	1/7	-
Riedner (2003)	Tanzanie	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+RPR+TPPA	12/52	260/260
Alessi (2004)	Italie	PCR standard	<i>tpp47</i>	Inconnu	20/22	15/15
Kingston (2004)	GB	PCR standard	<i>tpp47</i>	C+RPR+TPHA	20/22	-
Kouznetsov (2005)	Russie	PCR standard	<i>tpp47</i>	C+VDRL+TPHA	2/2 (I) 4/4 (II)	- -
Liu (2005)	Chine	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+FN	7/8	40/43

Tableau VI.1 (suite).

1 ^{er} auteur (année)	Pays	Type de <i>Tp</i> -PCR	Cible (gène)	Tests de référence utilisés	VP/M+	VN/M-
Pope (2005)	USA	Nested PCR	<i>polA</i>	C+FN /DTA-TP+RPR	13/22	105/113
Ballard (2007)	Afrique du sud	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+RPR+FTA-ABS	145/447	404/421
Leslie (2007)	Australie	RT-PCR	<i>polA</i>	C+EIA+RPR+TPPA	41/51	246/250
Suntoke (2008)	Ouganda	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+TRUST±TPPA	5/11	83/83
Castro (2009)	Portugal	PCR standard	<i>polA</i>	C+sérologie	9/9	-
Gayet-Ageron (2009)	Suisse	RT-PCR	<i>tpp47</i>	C+FN/VDRL+TPHA+FTA-ABS	8/10	7/7
Heymans (2009)	Pays Bas	RT-PCR	<i>polA</i>	C+FN	47/54 (I)	616/662
					33/77 (II)	55/56
Garcia (2011)	Chili	PCR standard	<i>tpp47</i>	C+VDRL/RPR±DFM	20/21	12/12
Tippie (2011)	GB	RT-PCR	<i>tpp47</i>	C+EIA+RPR+TPPA	14/14 (I)	28/29
					5/5 (II)	-
Grange (2012)	France	Nested PCR	<i>tpp47</i>	C+FN	90/109	41/43
Prabhakar (2012)	Inde	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+RPR±TPHA	13/33	130/161
Shields (2012)	Australie	PCR standard	<i>tpp47</i>	C+EIA+RPR+TPPA+FTA-ABS	49/55 (I)	200/202
					11/22 (II)	9/9
Lewis (2012)	Afrique du sud	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+RPR±TPPA	30/46	565/565
Gomes Naveca (2013)	Brésil	M-PCR	<i>tpp47</i>	C+VDRL+FTA-ABS	10/25	383/409
Phiri (2013)	Malawi	M-PCR+RT-PCR	<i>polA</i>	C+RPR+TPHA	11/21	390/401
Chen (2013)	Chine	PCR standard	<i>polA</i>	C+FN	95/155	-
Gayet-Ageron (2014)	France et	RT-PCR	<i>tpp47</i>	C+FN+/-RPR/TPHA/FTA-ABS	42/48	121/122
	Suisse	RT-PCR	<i>polA</i>	C+FN+/-RPR/TPHA/FTA-ABS	41/47	121/122

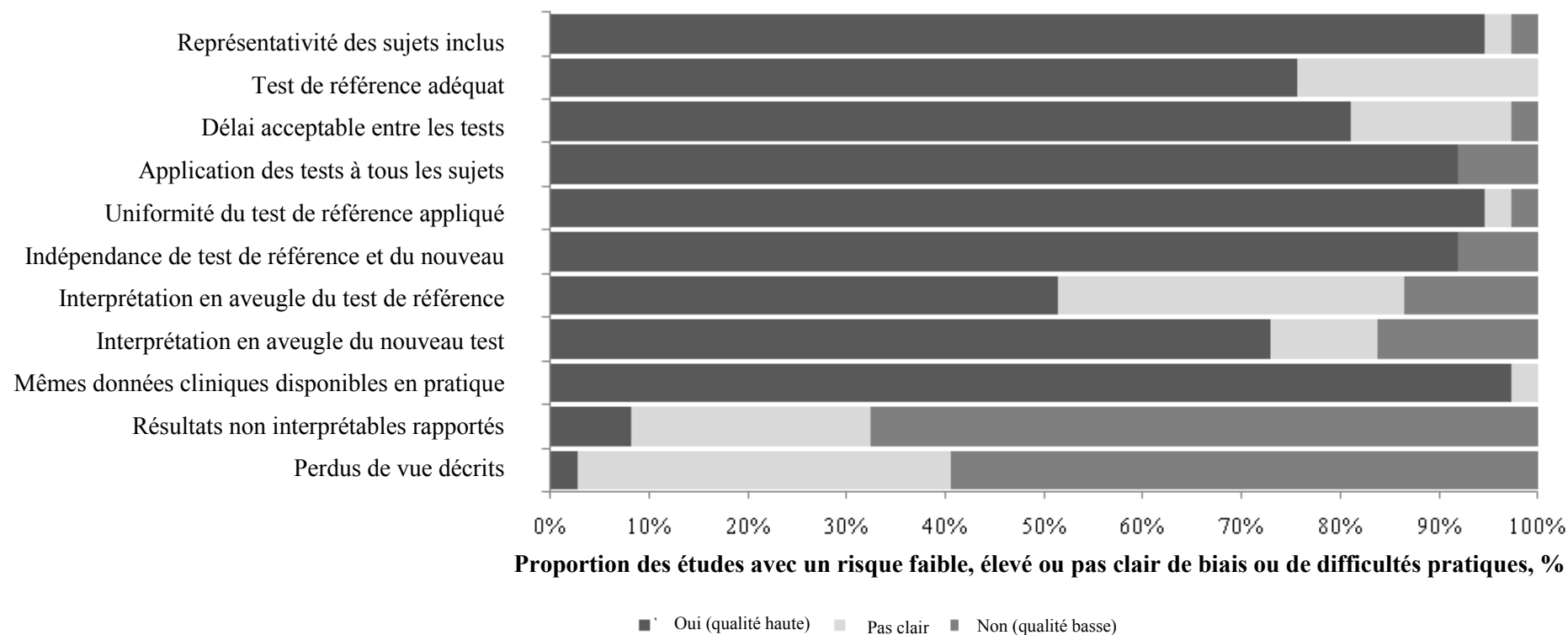
Légende : VP : vrais positifs ; M+ : malades ; VN : vrais négatifs ; M- : non malades ; GB : Grande Bretagne ; M-PCR : *Tp*-PCR multiplex ; RT-PCR : *Tp*-PCR real-time ; C : signes cliniques ; FN : fond noir

La plupart des études ont été publiées après 2000 (75,7%, n=28) dans des journaux spécialisés en maladies infectieuses (54,1%, n=20) ou en maladies sexuellement transmissibles (32,4%, n=12). Les patients étaient recrutés en Afrique (32,4%, n=12), en Europe (27,0%, n=10), sur le continent Américain (21,6%, n=8), en Asie (13,5%, n=5) ou en Australie (5,4%, n=2). Le diagnostic de syphilis reposait sur des méthodes de détection directe dans seulement 15 études (40,5%). Parmi ces études, le gène le plus fréquemment ciblé était *tpp47* (83,8%, n=31). La plupart des études utilisait la *Tp*-PCR *multiplex* (56,8%, n=21) ciblant les pathogènes *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi* et le virus Herpes simplex puis la *Tp*-PCR standard (21,6%, n=8), la *Tp*-PCR *real-time* (16,2%, n=6) ou la *Tp*-PCR *nested* (5,4%, n=2). Toutes les études publiées avant 2000 utilisaient la *Tp*-PCR *multiplex* (n=9) contre 42,9% des études publiées après 2000 (n=12, P=0,003). La *Tp*-PCR *multiplex* était significativement plus souvent utilisée dans les études conduites en Afrique, en Amérique ou en Asie que dans celles conduites en Europe ou en Australie (P=0,005).

VI.5.2 Evaluation de la qualité des études sélectionnées

La Figure VI.2 présente la proportion d'études jugées de haute ou basse qualité ou de qualité indéterminée (« pas clair » dans la Figure VI.2) concernant les 11 items du QUADAS-2 parmi les 37 études sélectionnées. Globalement plus de la moitié des études était considérée comme de haute qualité pour les 9 premiers items du QUADAS-2 jugeant le risque de biais et l'applicabilité des résultats. Plus de la moitié des études ne rapportait pas les données manquantes (59,5%, n=22) ou des résultats ininterprétables (67,6%, n=25). Le test de référence était jugé adéquat dans 28 études (75,7%).

Figure VI.2. Evaluation de la qualité des études sélectionnées selon le QUADAS-2.



VI.5.3 Estimations des sensibilités, spécificités et rapports de vraisemblance *poolés*

Le Tableau VI.2 présente les estimations *poolées* des indices de performance diagnostique (sensibilité, spécificité et rapports de vraisemblance) de la *Tp*-PCR de manière globale, puis en fonction du test de référence utilisé (adéquat versus inadéquat puis fond noir versus pas de fond noir).

Les sensibilités et spécificités *poolées* étaient significativement plus basses dans les études utilisant des tests de référence inadéquats comparées à celles n'utilisant pas les définitions du CDC ($P=0,033$, Tableau VI.2). Les sensibilités *poolées* dans les études utilisant le fond noir étaient significativement meilleures que dans celles ne l'utilisant pas ($P<0,001$, Tableau VI.2) mais les spécificités *poolées* n'étaient pas significativement différentes ($P=0,663$, Tableau VI.2). Les rapports de vraisemblance parmi les études utilisant des tests de référence adéquats ou celles utilisant le fond noir montrent que la *Tp*-PCR est très utile pour confirmer le diagnostic de syphilis mais pas pour l'exclure.

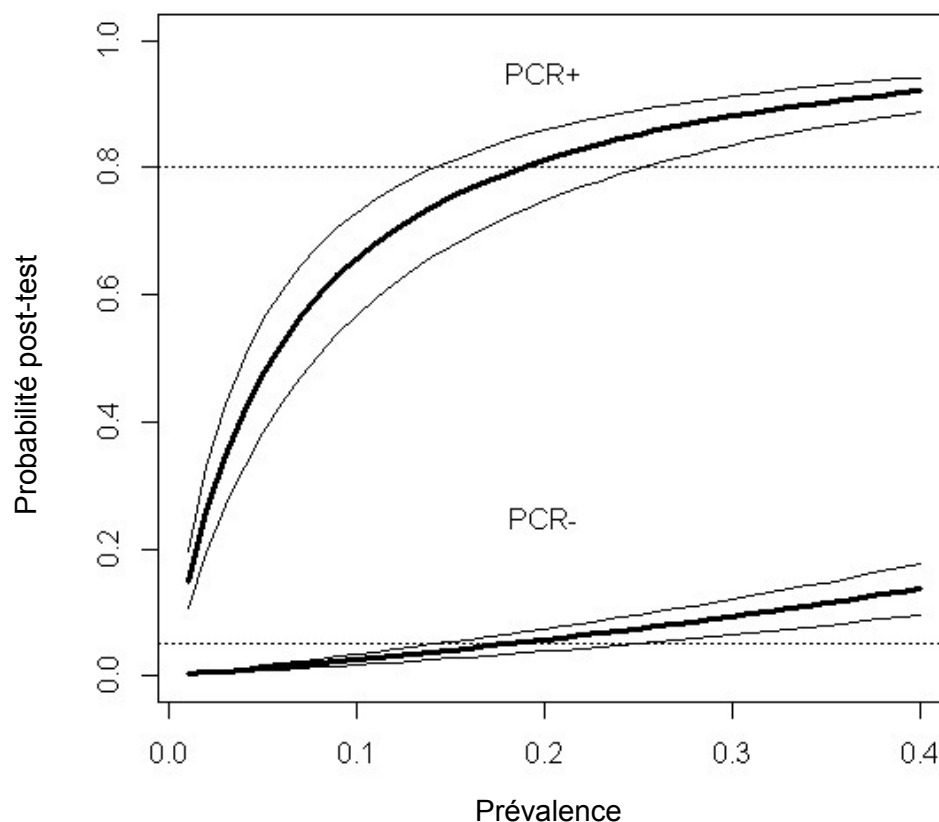
Tableau VI. 2. Sensibilités, spécificités, rapports de vraisemblance positif et négatif *poolés* de la *Tp*-PCR en fonction de l'adéquation du test de référence puis en fonction de l'utilisation ou pas du fond noir.

	Sensibilité			Spécificité		RV+	RV-
	n	(IC95%)	P*	(IC95%)	P*	(IC95%)	(IC95%)
Toutes les études	35	64,9 (56,3-72,6)	-	95,5 (93,9-96,7)	-	14,7 (10,1-20,6)	0,37 (0,29-0,46)
En fonction du test de référence			0,033		0,05		
Tests de référence adéquats	28	68,7 (60,1-76,1)		96,2 (94,6-97,3)		18,2 (12,2-26,1)	0,33 (0,25-0,42)
Tests de référence inadéquats	7	47,0 (27,4-67,6)		91,6 (85,5-95,2)		5,6 (3,6-8,4)	0,58 (0,37-0,77)
En fonction de l'utilisation du fond noir			<0,001		0,663		
Fond noir utilisé	16	77,8 (69,3-84,4)		95,4 (93,7-96,7)		17,2 (11,8-24,2)	0,24 (0,16-0,32)
Fond noir non utilisé	19	51,1 (41,1-61,0)		95,7 (92,7-97,4)		12,2 (6,6-20,9)	0,51 (0,41-0,62)

*Valeur P évaluant l'effet de certaines variables (utilisation de tests de référence adéquats ou inadéquats, utilisation du fond noir versus pas de fond noir) sur les sensibilités, spécificités, rapports de vraisemblance positifs (RV+) et négatifs (RV-) ou exploration de l'hétérogénéité entre les études.

La Figure VI.3 présente les probabilités post-test (ou valeurs prédictives) de la *Tp*-PCR parmi les études utilisant le fond noir comme test de référence en fonction de différentes valeurs de probabilités pré-test (ou prévalences). Ces probabilités post-tests ont été extrapolées à partir des résultats de sensibilité et spécificité décrits dans le Tableau VI.2 parmi les études utilisant le fond noir comme test de référence. Au-dessus de 20% de prévalence de la syphilis, la probabilité de syphilis est supérieure à 80% en cas de *Tp*-PCR positive. En-dessous de 20% de prévalence, la probabilité de syphilis est inférieure à 5% en cas de *Tp*-PCR négative.

Figure VI.3. Probabilités post-test pour différentes prévalences de syphilis dans les études utilisant le fond noir comme test de référence.



VI.5.4 Comparaison des performances diagnostiques des deux gènes ciblés par la *Tp*-PCR

La proportion des études utilisant la cible *tpp47* était la même entre les études utilisant des tests de référence adéquats et celles utilisant des tests inadéquats (77,8% versus 87,5%, $P=0,99$). Parmi les études utilisant des tests de référence adéquats, les sensibilités et spécificités *poolées* n'étaient pas significativement différentes entre les deux cibles de la *Tp*-PCR (Tableau VI.3). La Figure VI.4 représente les valeurs *poolées* de sensibilité et spécificité de la *Tp*-PCR en fonction du gène ciblé (Figure VI.4.A pour le gène *tpp47* et Figure VI.4.B pour le gène *polA*) et parmi les études utilisant des tests de référence adéquats. La région de confiance autour de l'estimation *poolée* était plus large sur la Figure VI.4.A, du fait du plus petit nombre d'études incluses ($n=5$).

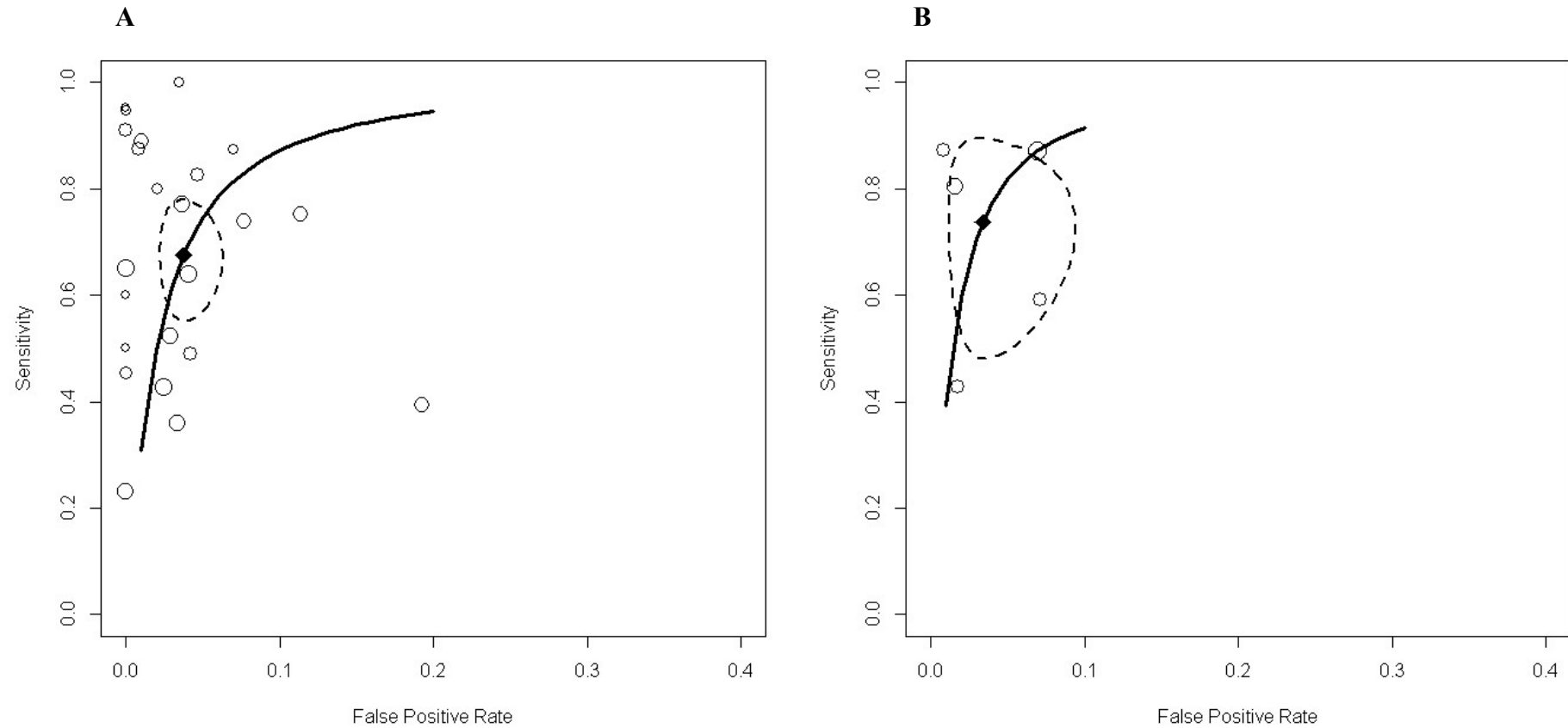
La proportion d'études utilisant le gène *polA* comme cible de la *Tp*-PCR était significativement plus grande dans les études utilisant le fond noir comme test de référence que celles ne l'ayant pas utilisé (33,3% versus 8,7%, $P=0,043$). Parmi les études ayant inclus le fond noir comme test de référence, les valeurs *poolées* de sensibilité et spécificité de la *Tp*-PCR étaient non significativement différentes en fonction des 2 gènes ciblés (Figure VI.5.A pour le gène *tpp47* et Figure VI.5.B pour le gène *polA*).

Tableau VI. 3. Sensibilités, spécificités, rapports de vraisemblance positif et négatif *poolés* de la *Tp*-PCR en fonction du gène ciblé.

	Sensibilité			Spécificité		RV+	RV-
	n	(IC95%)	P*	(IC95%)	P*	(IC95%)	(IC95%)
Selon la cible de <i>Tp</i> -PCR (chez les adéquats)			0,587		0,967		
<i>tpp47</i> gene	23	67,6 (57,8-76,1)		96,2 (94,3-97,5)		23,5 (8,8-51,5)	0,28 (0,13-0,48)
<i>polA</i> gene	5	73,7 (53,6-87,2)		96,6 (92,2-98,5)		18,3 (11,4-27,7)	0,34 (0,25-0,44)
Selon la cible de <i>Tp</i> -PCR (fond noir)			0,296		0,307		
<i>tpp47</i> gene	12	79,4 (71,5-85,5)		96,0 (94,1-97,3)		20,4 (12,9-30,6)	0,22 (0,15-0,30)
<i>polA</i> gene	4	72,1 (46,1-88,6)		93,9 (91,9-95,4)		11,7 (7,8-15,8)	0,31 (0,12-0,57)

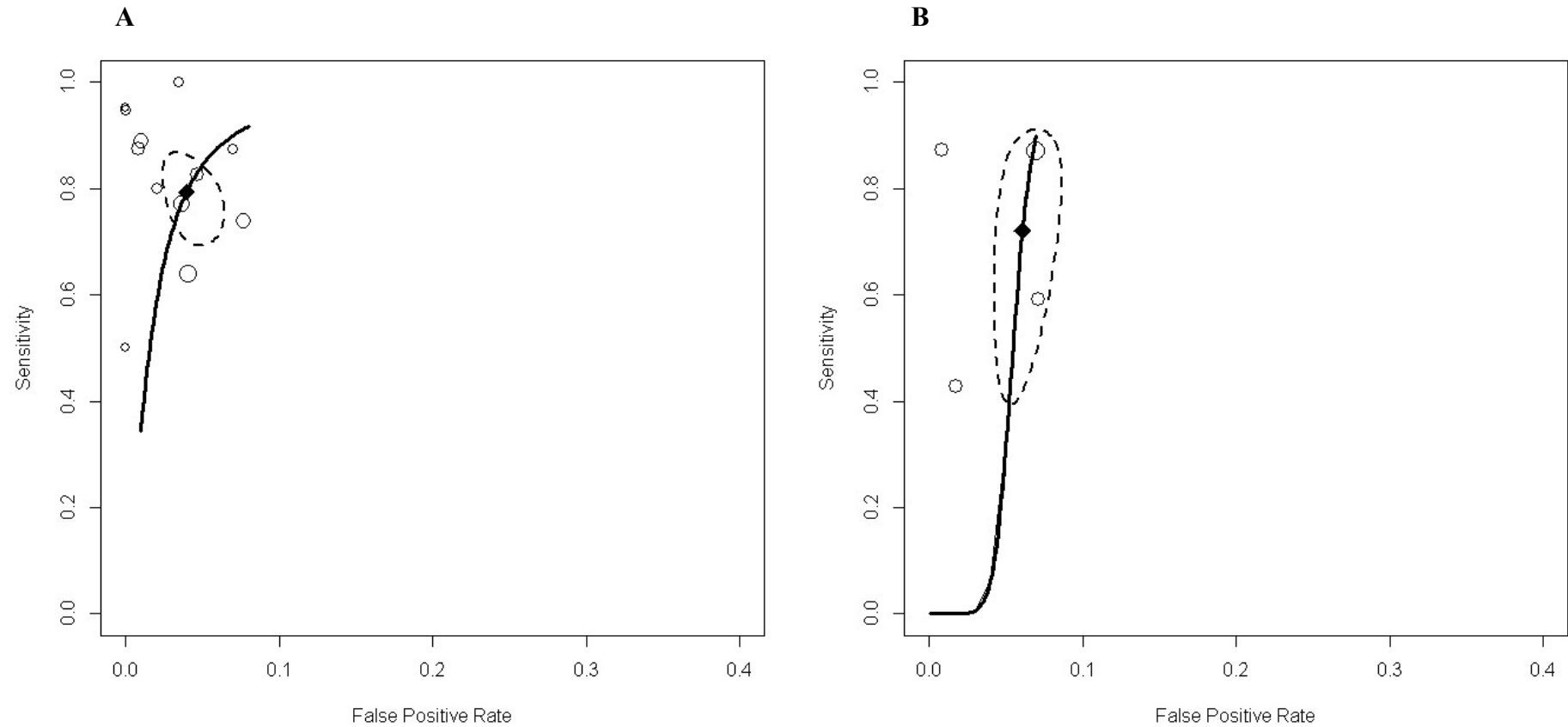
*Valeur P évaluant l'effet de certaines variables (selon le gène ciblé par la *Tp*-PCR) sur les sensibilités, spécificités, rapports de vraisemblance positifs (RV+) et négatifs (RV-) ou exploration de l'hétérogénéité entre les études.

Figure VI.4. Courbe ROC résumée (*summary ROC curve*) avec les sensibilité/spécificité *poolées* et leur région de confiance pour la *Tp*-PCR ciblant le gène *tpp47* (A) et celle ciblant le gène *polA* (B) parmi les études utilisant des tests de référence adéquats.



Légende : « Sensitivity » : sensibilité ; « False positive rate » correspond à (1-spécificité)

Figure VI.5. Courbe ROC résumée (*summary ROC curve*) avec les sensibilité/spécificité *poolées* et leur région de confiance pour la *Tp*-PCR ciblant le gène *tpp47* (A) et celle ciblant le gène *polA* (B) parmi les études utilisant le fond noir comme test de référence.

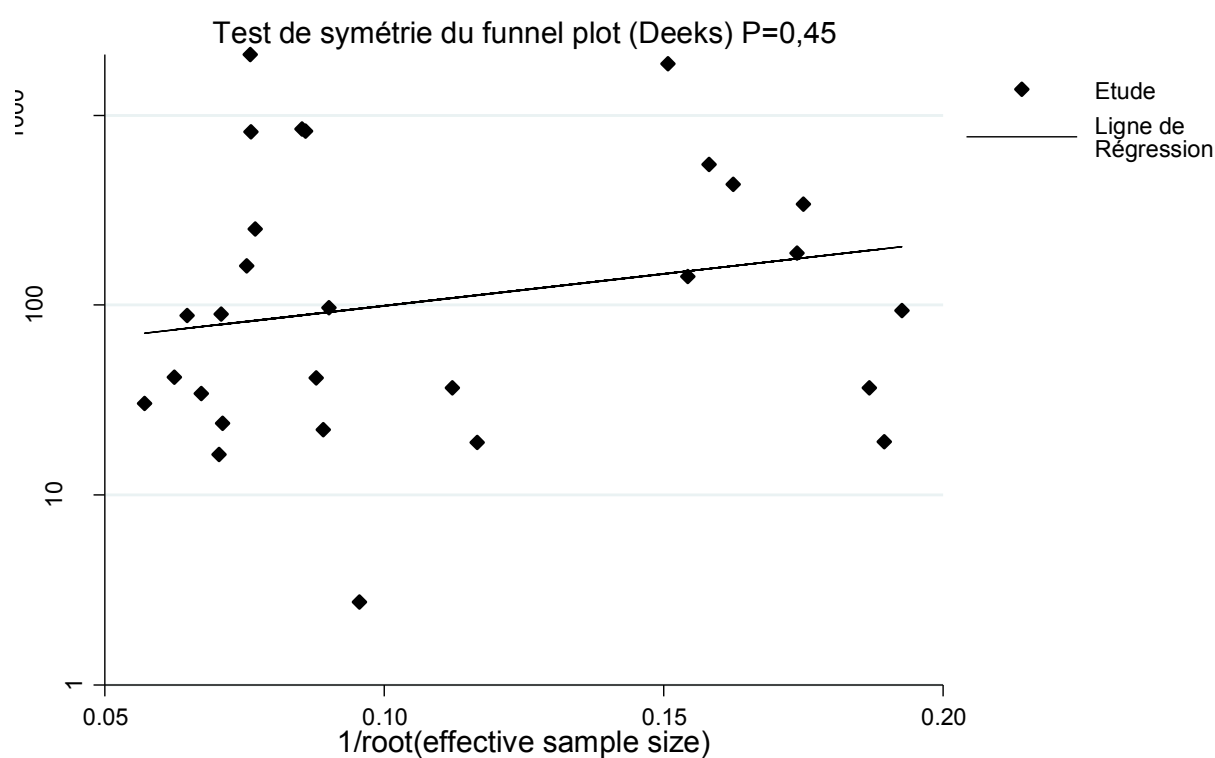


Légende : « *Sensitivity* » : sensibilité ; « *False positive rate* » correspond à (1-spécificité)

VI.5.5 Recherche d'un biais de publication

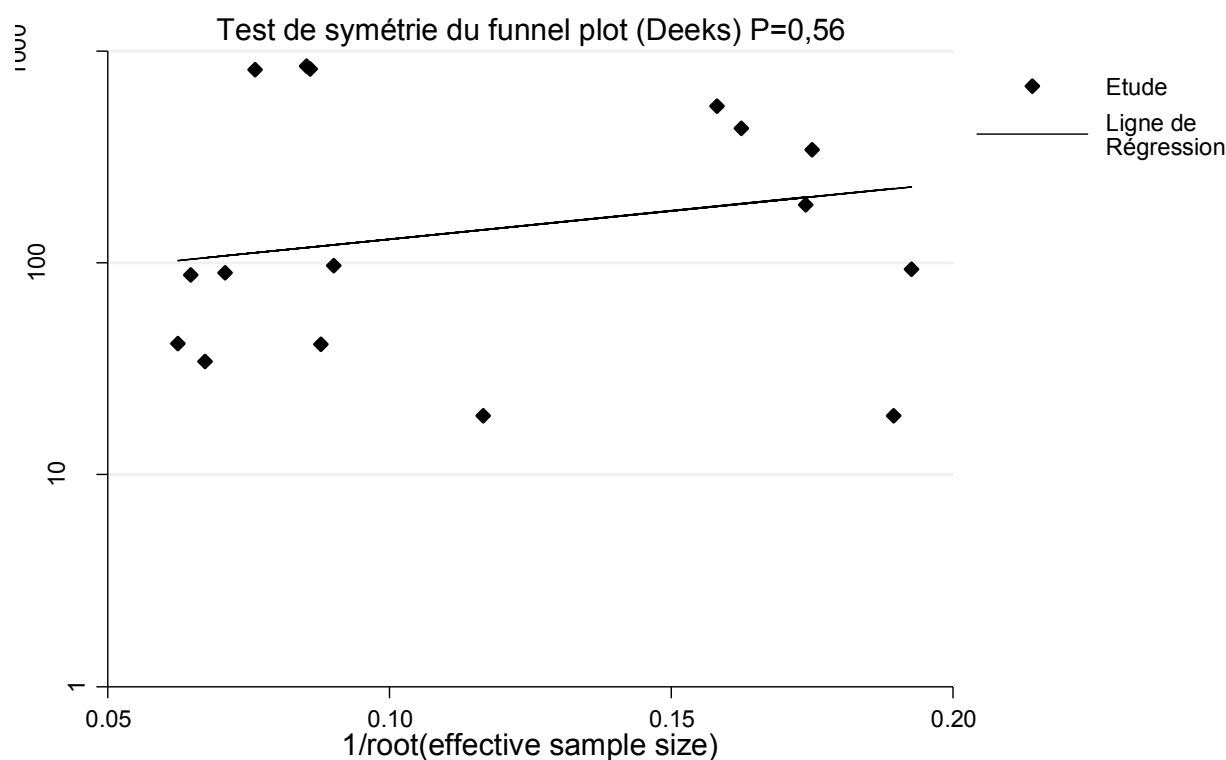
Parmi les études utilisant des tests de référence adéquats, la valeur de l'*odds ratio* diagnostique n'était pas significativement associée avec la taille de l'étude et le coefficient de la pente n'était pas significativement différent de zéro ($P=0,45$), suggérant que le « *funnel plot* » était symétrique et permettant de rejeter l'hypothèse d'un biais de publication (Figure VI.6).

Figure VI.6. « *Funnel plot* » testant l'association entre l'*odds ratio* diagnostique (*diagnostic odds ratio*) et la taille des études (*effective sample size*) parmi les études utilisant des tests de référence adéquats.



De la même façon, parmi les études ayant utilisé le fond noir comme test de référence, la valeur de l'*odds ratio* diagnostique n'était pas significativement associée avec la taille de l'étude et le coefficient de la pente n'était pas significativement différent de zéro ($P=0,56$), suggérant que le « *funnel plot* » était symétrique et permettant aussi de rejeter l'hypothèse d'un biais de publication dans ce sous-groupe d'études (Figure VI.7).

Figure VI.7. « *Funnel plot* » testant l'association entre l'*odds ratio* diagnostique (*diagnostic odds ratio*) et la taille des études (*effective sample size*) parmi les études utilisant le fond noir comme test de référence.



VI.5.6 Concordance entre les résultats de la *Tp*-PCR ciblant le gène *tpp47* et ceux de la *Tp*-PCR ciblant le gène *polA*

Dans l'étude observationnelle diagnostique prospective multicentrique (décrite au chapitre V), nous avons observé 77 *Tp*-PCR positives avec les deux méthodes, 191 *Tp*-PCR négatives, 2 *Tp*-PCR négatives avec la *Tp*-PCR ciblant *polA* et positives avec celle ciblant *tpp47* et

finalement 2 positives avec la *Tp*-PCR ciblant *polA* et négatives avec celle ciblant *tpp47*, donnant un coefficient kappa global de 0,96 (IC95% : 0,93-0,99) (Tableau VI.4).

Tableau VI.4. Comparaison des résultats globaux des deux types de *Tp*-PCR dans l'étude observationnelle diagnostique prospective multicentrique.

<i>Tp</i> -PCR ciblant le gène <i>polA</i>	<i>Tp</i> -PCR ciblant le gène <i>tpp47</i>		Total
	Positive	Négative	
Positive	77	2	79
Négative	2	191	193
Total	79	193	272

VI.6 Discussion

Les résultats de la méta-analyse suggèrent que les performances diagnostiques des deux cibles de *Tp*-PCR les plus couramment utilisées en pratique (les gènes *tpp47* et *polA*) pour le diagnostic des ulcérations oro-génitales ne sont pas différentes. Lorsque la *Tp*-PCR est comparée au fond noir, les indices de performance diagnostique des deux types de *Tp*-PCR ne sont pas significativement différents et les résultats rapportés confirment la grande utilité clinique d'une *Tp*-PCR positive, surtout en cas de probabilité pré-test de syphilis supérieure à 20%. Par contre, dans cette étude, nous confirmons qu'une *Tp*-PCR négative est moins utile sauf en cas de probabilité pré-test de la syphilis basse (<20%). Finalement, nous avons montré que les deux cibles de la *Tp*-PCR avaient une concordance quasi parfaite avec un coefficient kappa supérieur à 0,81.⁸⁶

A notre connaissance, une seule étude antérieure avait comparé les résultats des deux cibles de *Tp*-PCR dans des prélèvements d'ulcérations génitales et sur des données *pairées*⁹⁴. Dans leur étude, Liu et coll. avaient rapporté 107 résultats concordants entre la *Tp*-PCR ciblant le gène *tpp47* et celle ciblant le gène *polA*, et 5 résultats discordants donnant un kappa calculé rétrospectivement de 0,87 (IC95% : 0,76-0,98) jugé quasi parfait. Les auteurs avaient finalement conclu à la comparabilité des deux méthodes. Cependant dans leur papier, Liu et coll. recommandaient d'utiliser de manière préférentielle la *Tp*-PCR ciblant le gène *polA* car la *Tp*-PCR *multiplex* utilisée et ciblant le gène *tpp47* n'était pas commercialisée au moment de la réalisation de cette étude. Plus récemment, Castro et coll.⁷³ ont comparé trois types de *Tp*-PCR dans le sang de syphilis latente : la première ciblait le gène *tpp47*, la seconde le gène *polA* et la dernière ciblait les deux gènes en même temps. Les auteurs n'ont pas trouvé de différence entre les sensibilités des 3 types de *Tp*-PCR mais nous avons aussi décrit dans notre méta-analyse que dans le sang de syphilis latente, la *Tp*-PCR était moins sensible que dans d'autres milieux biologiques ou qu'au stade de syphilis symptomatique.¹⁴ Nous n'avons pas trouvé d'autres études comparant les deux méthodes dans la littérature.

La valeur ajoutée de notre étude est la présentation d'indices de performance diagnostique *poolés* pour chacun des deux types de *Tp*-PCR et aussi la comparaison de leurs sensibilités/spécificités sur un plus large échantillon que dans une seule étude. Cependant notre étude a certaines limites du fait de l'impossibilité de contrôler ni de standardiser les tests de référence utilisés pour définir le statut atteint/non atteint de syphilis. Par conséquent, nous ne pouvons pas exclure une certaine variabilité dans la définition des deux groupes de référence (cas et témoins). Cependant ces erreurs de mesure potentielles sont probablement

indépendantes du gène ciblé par la *Tp*-PCR. Cette limite pourrait cependant biaiser la concordance vers le bas (biais de classement) et donc sous-estimer la vraie concordance entre les deux types de *Tp*-PCR. De plus, l'absence de différence entre les sensibilités ou spécificités de chacune des deux cibles de la *Tp*-PCR va de paire avec la concordance quasi parfaite rapportée dans notre étude utilisant des données *pairées*. Finalement dans notre étude observationnelle prospective et multicentrique présentée au chapitre VI, nous avons diminué les autres sources potentielles de biais en faisant l'extraction de l'ADN en une seule fois et en réalisant la *Tp*-PCR ciblant le gène *polA* sur les mêmes extraits d'ADN que ceux utilisés pour la *Tp*-PCR ciblant le gène *tpp47*.

Nos résultats confirment la grande utilité clinique de la *Tp*-PCR pour le diagnostic des ulcérations génitales, anales ou buccales évocatrices de syphilis suite à une prise de risque sexuelle datant de moins de 3 mois. Nous avons aussi montré que les deux gènes les plus couramment utilisés en pratique pour amplifier *Treponema pallidum* ont les mêmes performances diagnostiques en termes de sensibilité, spécificité mais aussi en termes de rapports de vraisemblance positif et négatif et la concordance quasi parfaite entre leurs résultats conforte l'hypothèse d'une absence de différence vraie. L'obtention de données à partir de plusieurs études a permis de rapporter des indices de performance diagnostique avec suffisamment de précision pour chacune des deux cibles de la *Tp*-PCR. L'existence d'une hétérogénéité des résultats entre les études sélectionnées a été prise en considération par l'utilisation d'un modèle avec effets aléatoires. Nous avons évalué l'effet de certains facteurs définis *a priori* comme facteurs potentiels d'hétérogénéité mais nous ne pouvons exclure l'existence d'autres facteurs non explorés ici. Ce problème est inhérent aux études observationnelles où les biais d'information et de sélection sont plus fréquents que dans les essais randomisés et contrôlés.

Du fait de l'absence de différence statistiquement significative des sensibilités ou des spécificités entre les deux types de *Tp*-PCR, nous ne pouvons conclure de façon stricte à la comparabilité des sensibilités ou des spécificités de ces deux types de *Tp*-PCR bien que l'importance de la concordance soit irréfutable et apporte un argument de poids. Le seul moyen de vérifier de manière empirique cette hypothèse serait de mener une étude de bénéfice et de non-infériorité comparant la proportion de guérison entre les deux groupes de randomisation (un premier groupe prenant en charge les patients en intégrant la *Tp*-PCR ciblant le gène *tpp47* et l'autre groupe utilisant la *Tp*-PCR ciblant *polA*). Si nous observons que la réponse au traitement, alloué selon les résultats de la *Tp*-PCR attribuée, ne différerait pas

dans une certaine marge de non infériorité définie *a priori* sur des considérations cliniques, alors nous pourrions seulement conclure de manière fiable que les deux cibles de *Tp*-PCR ont strictement la même utilité clinique.

VI.7 Conclusion

La *Tp*-PCR est un outil utile et informatif dans le diagnostic des ulcérations génitales, anales ou buccales évocatrices de syphilis suite à une prise de risque sexuelle datant de moins de 3 mois, notamment dans les centres de soins recevant une population où la prévalence de la syphilis est haute.

Les résultats de la *Tp*-PCR sont identiques pour les deux gènes ciblés pour amplifier *Treponema pallidum* suggérant que les gènes *tpp47* et *polA* pourraient être utilisés de manière univoque en routine dans les laboratoires de Bactériologie sous réserve de la confirmation des résultats par une étude de bénéfice et de non-infériorité comparant les deux types de *Tp*-PCR.

VII DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

VII.1 Vers un référencement standardisé et systématique des études diagnostiques ?

Le travail de cette thèse a permis de démontrer l'intérêt diagnostique et l'utilité clinique de la *Tp*-PCR dans le diagnostic des ulcérations de syphilis précoce. Ce travail débute par une synthèse des données disponibles dans la littérature sur les performances diagnostiques de cet outil en résumant les valeurs de sensibilité, spécificité et les rapports de vraisemblance positif et négatif de la *Tp*-PCR en fonction du matériel biologique testé et du stade de syphilis. Ce premier travail de synthèse, malgré ses limitations méthodologiques liées notamment aux défauts des études observationnelles sélectionnées dans la revue systématique, a permis de quantifier la valeur de la *Tp*-PCR et de désigner le matériel biologique et le stade de la maladie ayant les meilleures valeurs diagnostiques et la plus grande utilité clinique. L'intérêt de combiner plusieurs études est d'augmenter la précision des estimations des indices de performance et d'obtenir des données élargies dans plusieurs milieux biologiques et à différents stades de la maladie. Ce type de *design* d'étude ne permet cependant pas de corriger les défauts méthodologiques des études incluses et ceci peut biaiser les estimations des indices de performance diagnostique.⁷⁶ De plus, il nécessite l'absence de biais de publication^{105 106} qui dans le cadre de notre étude a été mis en évidence par l'évaluation des « *funnel plots* » dans certains sous-groupes, sans pour autant que l'interprétation de nos résultats soit modifiée. Ce biais de publication peut s'expliquer par les difficultés qu'ont les chercheurs à mener jusqu'au bout des études épidémiologiques ou à diffuser les résultats de leur recherche dans des journaux scientifiques surtout si ceux-ci sont négatifs.¹⁰⁷ Ce constat souligne la nécessité de référencer la mise en place des études cliniques, et plus particulièrement des études diagnostiques dans notre contexte, depuis la rédaction d'un protocole de recherche, le recrutement des sujets de recherche, jusqu'au suivi de l'étude et de ses résultats. Il pourrait être également intéressant, en garantissant certaines mesures de protection de l'utilisation des données, de rendre celles-ci disponibles à tout chercheur motivant sa demande auprès du responsable de l'étude diagnostique. Ceci permettrait une utilisation facilitée des données dans le cadre des méta-analyses sur données individuelles et permettrait aussi de répondre aux demandes de précisions des chercheurs qui réalisent des méta-analyses. Cette base de référencement étendue aux études diagnostiques ou consacrée seulement à ce type d'études

pourrait prendre comme modèle le site *web Clinicaltrials.gov* créé en 1997 par la *Food and Drug Administration* aux Etats-Unis et qui vise à enregistrer tous les protocoles d'études cliniques interventionnelles ou observationnelles concernant des médicaments. *Clinicaltrials.gov* est d'ailleurs reconnu par la plupart des journaux scientifiques qui exigent un numéro d'enregistrement des essais cliniques dans cette base ou dans d'autres, au moment de la soumission d'un article scientifique original pour publication. Malgré tous ces points d'amélioration, le *design* de la revue systématique et de la méta-analyse présente le grand avantage de faire une synthèse rapide de l'existant afin d'orienter les besoins complémentaires en matière de recherche clinique sans se confronter à la lourdeur et à la complexité de monter une nouvelle étude clinique. Notre première étude a ainsi permis de montrer l'influence du type de tests de référence utilisés et a désigné les prélèvements d'ulcérations des syphilis primaire ou secondaire comme donnant les meilleures performances diagnostiques. Ces résultats ont ensuite permis d'orienter la mise en place de la seconde étude observationnelle prospective et multicentrique chez des patients porteurs d'une ulcération orale, génitale ou anale suspecte d'être due à une syphilis précoce.

VII.2 Vers une hiérarchisation dans la présentation des méthodes de diagnostic direct de la syphilis primaire ?

La deuxième étude cherchait à évaluer la performance diagnostique de la *Tp*-PCR dans les ulcères de syphilis précoce comparativement au test de référence recommandé par le CDC, i.e., le fond noir.⁴ Les recommandations européennes avaient déjà inclus la *Tp*-PCR dans la liste des outils diagnostiques sans distinguer clairement une définition de cas certains et probables comme dans la définition de cas du CDC.⁸ Un objectif secondaire de cette deuxième étude était de démontrer que l'évaluation des performances diagnostiques de la *Tp*-PCR pouvait être biaisée selon le test de référence utilisé et qu'elle était même plus utile que le test de référence traditionnel, le fond noir. Dans toutes les études diagnostiques évaluant un nouveau test, les résultats de ce dernier sont comparés à un *gold standard* devant définir parfaitement le statut malade/non malade des sujets évalués. Ainsi toutes les erreurs observées sont automatiquement interprétées comme des erreurs du nouveau test, les faux négatifs et faux positifs. Malheureusement en pratique, il est rare d'avoir un *gold standard* pour définir chaque maladie. C'est d'ailleurs le cas de la syphilis pour laquelle aucun des tests diagnostiques actuellement disponibles ne permet de donner un diagnostic certain, même si le

CDC utilise cette dénomination.⁴ Le test d'inoculation du pathogène chez l'animal, le *rabbit infectivity test*, reste le seul « vrai » *gold standard* mais il n'est pas pratiqué en routine dans les laboratoires d'analyses médicales.¹⁹ Les autres outils diagnostiques sont plus considérés comme des tests de référence que comme des *gold standard* même si le CDC distingue des cas certains de syphilis, et des cas probables.⁴ En particulier, le fond noir utilisé dans la définition des cas certains a une excellente valeur prédictive positive (comparativement au *gold standard* tel que le *rabbit infectivity test*) mais sa valeur prédictive négative est très dépendante de l'expérience du technicien et aussi des conditions de réalisation de l'examen.¹⁹ Quant à la sérologie, et notamment les tests tréponémiques, elle aurait plutôt une meilleure valeur prédictive négative et une moins bonne valeur prédictive positive, du fait d'une positivité quasiment irréversible (à vie) même après traitement.⁹⁰ Cette deuxième étude observationnelle utilise des tests de référence imparfaits, le fond noir et/ou différentes combinaisons de tests sérologiques tréponémiques et non tréponémiques. Cette étude reste pragmatique et non expérimentale avec toutes les limitations connues de ce type d'études.¹⁰⁸ En ayant conscience des défauts de ce type d'étude clinique, plusieurs « garde-fous » ont été utilisés. Premièrement, nous avons distingué les centres selon leur expérience de réalisation du fond noir (centres avec « une grande expérience » versus centres avec une « expérience rare ») afin de contrôler autant que faire se peut la sensibilité du test de référence imparfait. Deuxièmement les résultats des tests sérologiques ont été interprétés selon un consensus de deux experts indépendants et dans l'insu des résultats des autres tests réalisés (fond noir et *Tp*-PCR). De plus, un groupe « *gold standard* amélioré » a été défini afin de combiner les avantages de chacun des deux tests de référence (fond noir et sérologie) avec des paramètres plus « durs », tels que les signes cliniques de la maladie, l'évolution sous traitement et la suspicion clinique des médecins en charge des patients. Finalement, afin de contrôler au maximum les erreurs techniques possibles dans la réalisation du test évaluée (la *Tp*-PCR), celui-ci a été réalisé en suivant un protocole strict dans un seul laboratoire de Bactériologie (Genève pour la *Tp*-PCR ciblant *tpp47* et Lyon pour celle ciblant *polA*). Les deux différentes *Tp*-PCR ont été réalisées sur les mêmes extraits d'ADN (une seule procédure d'extraction réalisée à Genève). Bien qu'il existe différentes méthodes statistiques pour corriger les erreurs liées à l'utilisation d'un *gold standard* ou test de référence imparfait, notamment les modèles à classes latentes, aucune n'est parfaite.¹⁰⁹ C'est la raison pour laquelle une approche plus pragmatique et clinique a été préférée dans cette deuxième étude. Au final, les résultats de l'étude clinique présentée au chapitre V de la thèse montrent que la *Tp*-PCR est d'une grande utilité clinique lorsqu'elle est comparée au « *gold standard* amélioré » avec notamment une

excellente valeur prédictive positive proche de 98% et une bonne valeur prédictive négative proche de 5%. Nous démontrons également que la *Tp*-PCR donne même de meilleurs résultats que le fond noir, actuellement toujours recommandé comme le test de référence pour confirmer de manière certaine une syphilis par le CDC⁵ ou par l'IUSTI.⁸ Il semblerait donc intéressant de proposer de hiérarchiser les méthodes de détection directe dans les prélèvements de lésions cliniques pour le diagnostic certain de syphilis primaire (ou secondaire). Par exemple dans les futures recommandations ou définitions de cas de la syphilis primaire (ou secondaire) des autorités de référence telles que le CDC ou l'IUSTI, la *Tp*-PCR pourrait être proposée, si disponible, en première intention. Ensuite en cas de non disponibilité, le fond noir pourrait être proposé comme une méthode de détection directe alternative.

VII.3 Comparabilité à confirmer de la performance diagnostique des deux cibles de *Tp*-PCR couramment utilisées

La troisième partie de la thèse présente les résultats de deux études différentes. La première est une revue systématique et méta-analyse des données publiées présentant les valeurs diagnostiques et l'utilité clinique de la *Tp*-PCR ciblant le gène *tpp47* ou le gène *polA* en fonction de tests de référence jugés adéquats ou non adéquats, selon les recommandations du CDC.^{4 5} Le but de cette étude était de comparer les valeurs de sensibilité et spécificité des deux types de *Tp*-PCR. La seconde est une étude ancillaire à l'étude prospective multicentrique présentée au chapitre V visant à mesurer la concordance des résultats des deux types de *Tp*-PCR sur les mêmes échantillons cliniques (données *pairees*). Cette troisième partie de la thèse montre que les deux types de *Tp*-PCR les plus utilisés en routine clinique donnent des sensibilités et spécificités très proches, voire identiques. Ces résultats négatifs ne permettent pas d'exclure formellement une erreur de type 2, néanmoins la précision de la concordance obtenue entre les deux types *Tp*-PCR est très bonne et permettrait de contredire cette hypothèse. Cependant le seul moyen de conclure formellement à l'interchangeabilité des deux cibles de *Tp*-PCR serait de mener une étude de bénéfice comparant la non-infériorité ou l'équivalence des deux types de *Tp*-PCR comme évoqué précédemment au chapitre VI.

VIII CONCLUSION

A l'issue de ce travail de recherche, la *Tp*-PCR peut être proposée comme un outil de référence pour diagnostiquer des lésions ulcérées orales, génitales ou anales de syphilis primaire. Dans certaines circonstances, notamment en cas d'absence de matériel permettant de réaliser un fond noir ou d'un manque d'expérience de l'équipe médicale ou du laboratoire vis-à-vis de cette technique, la *Tp*-PCR, si elle est disponible dans le laboratoire de bactériologie, peut même remplacer le fond noir en pratique courante. Sous réserve de confirmation de nos résultats par une étude de non-infériorité ou d'équivalence comparant les deux types de *Tp*-PCR (*tpp47* et *polA*) sur la proportion de guérison, celles-ci pourraient être également utilisées au sein du laboratoire de bactériologie.

L'enjeu actuel est le coût de l'examen *Tp*-PCR qui dépasse largement le coût des tests de référence en Suisse, le fond noir ou les tests sérologiques et qui fait partie, en France, des examens hors nomenclature, i.e. non remboursés par la sécurité sociale. Le seul moyen de vérifier que malgré son coût actuel, la *Tp*-PCR reste un examen suffisamment coût-efficace pour être utilisée en routine comparativement aux examens diagnostiques utilisés actuellement serait de réaliser une étude médico-économique répondant à cet objectif de recherche. Il est cependant prévisible qu'au prix actuel de la *Tp*-PCR (en Suisse, la *Tp*-PCR est facturée 185.-CHF, soit ~150€), l'étude médico-économique risque de ne pas démontrer un rapport coût-bénéfice suffisamment intéressant en faveur de la *Tp*-PCR. Le seul moyen de favoriser l'utilisation de la *Tp*-PCR en pratique courante serait de baisser son coût de facturation mais ceci repose sur une décision locale (plus de demandes d'examens aboutissant à un moindre coût de réalisation de l'examen), associée à la nécessité d'améliorer certains aspects techniques, tel que le développement de machines automatisables par exemple. L'utilisation de la *Tp*-PCR de routine a donc une grande chance d'exister dans un pays développé avec un système de santé privé. Par contre, son utilisation élargie risque d'être plus longue et compliquée dans des pays où l'accès aux soins est plus limité et ceci malgré le fait que ces pays soient les plus concernés par la progression épidémique de cette maladie.

IX RÉFÉRENCES

1. World Health Organization (WHO). Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections: Overview and Estimates. Geneva, 2001.
2. World Health Organization (WHO). Strategies and laboratory methods for strengthening surveillance of sexually transmitted infection 2012. Geneva: WHO, 2013.
3. Schaudinn F, Hoffmann P. [Vorläufiger Bericht über das Vorkommen von Spirochäten in syphilitischen Krankheitprodukten und bei Papillomen]. *Arb. Gesundheitsamt (Berlin)* 1904-1905;22:527-534.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *Morb Mortal Wkly Rep* 1997;46(RR-10):1-55.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). STD Surveillance Case Definitions. . Atlanta: Centers for disease control and prevention, 2014.
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Diseases characterized by genital, anal, or perianal ulcers. 2010 STD treatment guidelines. *Sex Transm Dis*. Atlanta, 2010.
7. Council of State and Territorial Epidemiologists (CSTE). Update to Public Health Reporting and National Notification for Syphilis: Council of State and Territorial Epidemiologists, 2014.
8. French P, Gomberg M, Janier M, Schmidt B, van Voorst Vader P, Young H. IUSTI: 2008 European Guidelines on the Management of Syphilis. *Int J STD AIDS* 2009;20(5):300-9.
9. Koek AG, Bruisten SM, Dierdorp M, van Dam AP, Templeton K. Specific and sensitive diagnosis of syphilis using a real-time PCR for *Treponema pallidum*. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(12):1233-1236.
10. Palmer HM, Higgins SP, Herring AJ, Kingston MA. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sex Transm Infect* 2003;79(6):479-483.
11. Saloojee H, Velaphi S, Goga Y, Afadapa N, Steen R, Lincetto O. The prevention and management of congenital syphilis: an overview and recommendations. *Bull World Health Organ* 2004;82(6):424-30.
12. Zoehling N, Schluepen EM, Soyer HP, Kerl H, Volkenandt M. Molecular detection of *Treponema pallidum* in secondary and tertiary syphilis. *Br J Dermatol* 1997;136(5):683-686.

13. Buffet M, Grange PA, Gerhardt P, Carlotti A, Calvez V, Bianchi A, et al. Diagnosing *Treponema pallidum* in secondary syphilis by PCR and immunohistochemistry. *J Invest Dermatol* 2007;127(10):2345-2350.
14. Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger TV, Combescure C. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect* 2013;89(3):251-6.
15. Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trellu L, Lautenschlager S, Furrer H, Piguet V, et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. *Sex Transm Infect* 2009;85(4):264-269.
16. Grange PA, Gressier L, Dion PL, Farhi D, Benhaddou N, Gerhardt P, et al. Evaluation of a PCR test for the detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. *J Clin Microbiol* 2012;50(3):546-52.
17. Muller H, Eisendle K, Brauninger W, Kutzner H, Cerroni L, Zelger B. Comparative analysis of immunohistochemistry, polymerase chain reaction and focus-floating microscopy for the detection of *Treponema pallidum* in mucocutaneous lesions of primary, secondary and tertiary syphilis. *Br J Dermatol* 2010;165(1):50-60.
18. Shields M, Guy RJ, Jeoffreys NJ, Finlayson RJ, Donovan B. A longitudinal evaluation of *Treponema pallidum* PCR testing in early syphilis. *BMC Infect Dis* 2013;12:353.
19. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev* 1995;8(1):1-21.
20. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Syphilis testing algorithms using treponemal tests for initial screening--four laboratories, New York City, 2005-2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2008/08/15 ed, 2008:872-5.
21. Bosshard PP. Usefulness of IgM-specific enzyme immunoassays for serodiagnosis of syphilis: comparative evaluation of three different assays. *J Infect* 2013;67(1):35-42.
22. French P. Syphilis. *BMJ* 2007;334(7585):143-7.
23. Schroeter AL, Lucas JB, Price EV, Falcone VH. Treatment for early syphilis and reactivity of serologic tests. *JAMA* 1972;221(5):471-6.
24. Clark EG, Danbolt N. The Oslo study of the natural history of untreated syphilis; an epidemiologic investigation based on a restudy of the Boeck-Bruusgaard material; a review and appraisal. *J Chronic Dis* 1955;2(3):311-44.
25. Michelow IC, Wendel GD, Jr., Norgard MV, Zeray F, Leos NK, Alsaadi R, et al. Central nervous system infection in congenital syphilis. *N Engl J Med* 2002;346(23):1792-1798.

26. Buchacz K, Klausner JD, Kerndt PR, Shouse RL, Onorato I, McElroy PD, et al. HIV incidence among men diagnosed with early syphilis in Atlanta, San Francisco, and Los Angeles, 2004 to 2005. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008;47(2):234-40.
27. Zetola NM, Bernstein KT, Wong E, Louie B, Klausner JD. Exploring the relationship between sexually transmitted diseases and HIV acquisition by using different study designs. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009;50(5):546-51.
28. Workowski KA, Berman SM. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. *MMWR Recomm. Rep.* 2006;55(RR-11):1-94.
29. World Health Organization (WHO). Syndromic management. *Guidelines for the management of sexually transmitted infections*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2003:3-32.
30. Fenton KA, Breban R, Vardavas R, Okano JT, Martin T, Aral S, et al. Infectious syphilis in high-income settings in the 21st century. *Lancet Infect Dis* 2008;8(4):244-53.
31. Hook EW, 3rd, Marra CM. Acquired syphilis in adults. *N Engl J Med* 1992;326(16):1060-9.
32. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Transmission of primary and secondary syphilis by oral sex--Chicago, Illinois, 1998-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004;53(41):966-8.
33. Couturier E, Michel A, Janier M, Dupin N, Semaille C. Syphilis surveillance in France, 2000-2003. *Euro Surveill* 2004;9(12):8-10.
34. Heffelfinger JD, Swint EB, Berman SM, Weinstock HS. Trends in primary and secondary syphilis among men who have sex with men in the United States. *Am J Public Health* 2007;97(6):1076-83.
35. Savage EJ, Hughes G, Ison C, Lowndes CM. Syphilis and gonorrhoea in men who have sex with men: a European overview. *Euro Surveill* 2009;14(47).
36. Su JR, Beltrami JF, Zaidi AA, Weinstock HS. Primary and secondary syphilis among black and Hispanic men who have sex with men: case report data from 27 States. *Ann Intern Med* 2011;155(3):145-51.
37. Jarzebowski W, Caumes E, Dupin N, Farhi D, Lascaux AS, Piketty C, et al. Effect of early syphilis infection on plasma viral load and CD4 cell count in human immunodeficiency virus-infected men: results from the FHDH-ANRS CO4 cohort. *Arch Intern Med* 2012;172(16):1237-43.

38. Paget WJ, Batter V, Zwahlen M. The Swiss Network of Dermatology Policlinics HIV prevalence study: rationale, characteristics and results (1990-1996). *Soz Präventivmed* 1999;44(1):1-7.
39. Janier M, Hegyi V, Dupin N, Unemo M, Tiplica GS, Potocnik M, et al. 2014 European guideline on the management of syphilis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014.
40. Paget WJ, Zimmermann HP. Surveillance of sexually transmitted diseases in Switzerland, 1973-1994: evidence of declining trends in gonorrhoea and syphilis. *Soz Präventivmed* 1997;42(1):30-36.
41. Lautenschlager S. Sexually transmitted infections in Switzerland: return of the classics. *Dermatology* 2005;210(2):134-142.
42. Abraham S, Toutous-Trellu L, Pechere M, Hugonnet S, Liassine N, Yerly S, et al. Increased incidence of sexually transmitted infections in Geneva, Switzerland. *Dermatology* 2006;212(1):41-46.
43. Zwahlen M, Spoerri A, Gebhardt M, Mausezahl M, Boubaker K, Low N. Surveillance systems for sexually transmitted diseases in Switzerland. *Sex Transm Dis* 2007;34(2):76-80.
44. Behets FM, Brathwaite AR, Hylton-Kong T, Chen CY, Hoffman I, Weiss JB, et al. Genital ulcers: etiology, clinical diagnosis, and associated human immunodeficiency virus infection in Kingston, Jamaica. *Clin Infect Dis* 1999;28(5):1086-90.
45. Genest DR, ChoiHong SR, Tate JE, Qureshi F, Jacques SM, Crum C. Diagnosis of congenital syphilis from placental examination: Comparison of histopathology, Steiner stain, and polymerase chain reaction for *Treponema pallidum* DNA. *Hum Pathol* 1996;27(4):366-372.
46. Grimpel E, Sanchez PJ, Wendel GD, Burstain JM, McCracken GH, Jr., Radolf JD, et al. Use of polymerase chain reaction and rabbit infectivity testing to detect *Treponema pallidum* in amniotic fluid, fetal and neonatal sera, and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1991;29(8):1711-1718.
47. Hay PE, Clarke JR, Taylor-Robinson D, Goldmeier D. Detection of treponemal DNA in the CSF of patients with syphilis and HIV infection using the polymerase chain reaction. *Genitourin Med* 1990;66(6):428-432.
48. Mertz KJ, Trees D, Levine WC, Lewis JS, Litchfield B, Pettus KS, et al. Etiology of genital ulcers and prevalence of human immunodeficiency virus coinfection in 10 US cities. The Genital Ulcer Disease Surveillance Group. *J Infect Dis* 1998;178(6):1795-8.

49. Mertz KJ, Weiss JB, Webb RM, Levine WC, Lewis JS, Orle KA, et al. An investigation of genital ulcers in Jackson, Mississippi, with use of a multiplex polymerase chain reaction assay: High prevalence of chancroid and human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1998;178(4):1060-1066.
50. Morse SA, Trees DL, Htun Y, Radebe F, Orle KA, Dangor Y, et al. Comparison of clinical diagnosis and standard laboratory and molecular methods for the diagnosis of genital ulcer disease in Lesotho: Association with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1997;175(3):583-589.
51. Noordhoek GT, Wolters EC, de Jonge ME, van Embden JD. Detection by polymerase chain reaction of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid from neurosyphilis patients before and after antibiotic treatment. *J Clin Microbiol* 1991;29(9):1976-1984.
52. Orle KA, Gates CA, Martin DH, Body BA, Weiss JB. Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. *J Clin Microbiol* 1996;34(1):49-54.
53. Sanchez PJ, Wendel GD, Jr., Grimprel E, Goldberg M, Hall M, Arencibia-Mireles O, et al. Evaluation of molecular methodologies and rabbit infectivity testing for the diagnosis of congenital syphilis and neonatal central nervous system invasion by *Treponema pallidum*. *J Infect Dis* 1993;167(1):148-57.
54. Whiting P, Rutjes AW, Reitsma JB, Bossuyt PM, Kleijnen J. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. *BMC Med Res Methodol* 2003;3:25.
55. Flasarova M, Smajs D, Matejkova P, Woznicova V, Heroldova Dvorakova M, Votava M. Molecular detection and subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in clinical specimens. *Epidemiol Mikrobiol Immunol* 2006;55(3):105-111.
56. Rodionova EN, Gushchin AE, Shipulin GA, Khludova NA, Toporovskii LM, Nikolenko IA, et al. Detection of *Treponema pallidum* DNA and RNA in clinical material from patients with syphilis at different stages. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2003(3):43-50.
57. Whiting P, Harbord R, Kleijnen J. No role for quality scores in systematic reviews of diagnostic accuracy studies. *BMC Med Res Methodol* 2005;5:19.
58. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 1986;7(3):177-88.
59. Stengel D, Bauwens K, Sehouli J, Ekkernkamp A, Porzsolt F. A likelihood ratio approach to meta-analysis of diagnostic studies. *J Med Screen* 2003;10(1):47-51.

60. Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA* 1994;271(9):703-7.
61. Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 2003;327(7414):557-60.
62. Duval S, Tweedie R. Trim and fill: A simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics* 2000;56(2):455-63.
63. Cornut PL, Sobas CR, Perard L, De Bats F, Salord H, Manificat HJ, et al. Detection of *Treponema pallidum* in aqueous humor by real-time polymerase chain reaction. *Ocul Immunol Inflamm* 2011;19(2):127-8.
64. Casal CA, Silva MO, Costa IB, Araujo Eda C, Corvelo TC. Molecular detection of *Treponema pallidum* sp. *pallidum* in blood samples of VDRL-seroreactive women with lethal pregnancy outcomes: a retrospective observational study in northern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011;44(4):451-6.
65. Castro R, Prieto E, Aguas MJ, Manata MJ, Botas J, Pereira FM. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Lisbon, Portugal. *J Clin Microbiol* 2009;47(8):2510-2.
66. Kouznetsov AV, Weisenseel P, Trommler P, Multhaupt S, Prinz JC. Detection of the 47-kilodalton membrane immunogen gene of *Treponema pallidum* in various tissue sources of patients with syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;51(2):143-145.
67. Martin IE, Tsang RS, Sutherland K, Tilley P, Read R, Anderson B, et al. Molecular characterization of syphilis in patients in Canada: azithromycin resistance and detection of *Treponema pallidum* DNA in whole-blood samples versus ulcerative swabs. *J Clin Microbiol* 2009;47(6):1668-73.
68. Peng RR, Wang AL, Li J, Tucker JD, Yin YP, Chen XS. Molecular typing of *Treponema pallidum*: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5(11):e1273.
69. Sutton MY, Liu H, Steiner B, Pillay A, Mickey T, Finelli L, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in an Arizona County with increasing syphilis morbidity: Use of specimens from ulcers and blood. *J Infect Dis* 2001;183(11):1601-1606.
70. Tipple C, Hanna MO, Hill S, Daniel J, Goldmeier D, McClure MO, et al. Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection. *Sex Transm Infect* 2011;87(6):479-85.

71. Salazar JC, Rathi A, Michael NL, Radolf JD, Jagodzinski LL. Assessment of the kinetics of *Treponema pallidum* dissemination into blood and tissues in experimental syphilis by real-time quantitative PCR. *Infect.Immun.* 2007;75(6):2954-2958.
72. Al-Soud WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001;39(2):485-93.
73. Castro R, Prieto E, Aguas MJ, Manata MJ, Botas J, Santo I, et al. Detection of *Treponema pallidum* sp *pallidum* DNA in latent syphilis. *Int J STD AIDS* 2007;18(12):842-845.
74. Augenbraun MH, DeHovitz JA, Feldman J, Clarke L, Landesman S, Minkoff HM. Biological false-positive syphilis test results for women infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1994;19(6):1040-1044.
75. Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PLoS ONE* 2009;4(9):e7093.
76. Valenstein PN. Evaluating diagnostic tests with imperfect standards. *Am J Clin Pathol* 1990;93(2):252-8.
77. Dowell D, Polgreen PM, Beekmann SE, Workowski KA, Berman SM, Peterman TA. Dilemmas in the management of syphilis: a survey of infectious diseases experts. *Clin Infect Dis* 2009;49(10):1526-9.
78. Daniels KC, Ferneyhough HS. Specific direct fluorescent antibody detection of *Treponema pallidum*. *Health Lab Sci* 1977;14(3):164-71.
79. Romanowski B, Forsey E, Prasad E, Lukehart S, Tam M, Hook EW, 3rd. Detection of *Treponema pallidum* by a fluorescent monoclonal antibody test. *Sex Transm Dis* 1987;14(3):156-9.
80. Wacholder S, Armstrong B, Hartge P. Validation studies using an alloyed gold standard. *Am J Epidemiol* 1993;137(11):1251-8.
81. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually Transmitted Diseases. Treatment Guidelines, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010;59:1-116.
82. Hulley S, Cummings S, Browner W, Grady D, Newman T. Estimating sample size and power: applications and examples. In: Wilkins LW, editor. *Designing Clinical Research*. 3rd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2007:65-96.
83. Farhi D, Zizi N, Grange P, Benhaddou N, Gerhardt P, Avril MF, et al. The epidemiological and clinical presentation of syphilis in a venereal disease centre in Paris, France. A cohort study of 284 consecutive cases over the period 2000-2007. *Eur J Dermatol* 2009;19(5):484-9.

84. Hope-Rapp E, Anyfantakis V, Fouere S, Bonhomme P, Louison JB, de Marsac TT, et al. Etiology of Genital Ulcer Disease. A Prospective Study of 278 Cases Seen in an STD Clinic in Paris. *Sex Transm Dis* 2010;37(3):153-8.
85. Clopper C, Pearson E. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika* 1934;26:404-413.
86. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33(1):159-74.
87. McKenzie DP, Mackinnon AJ, Peladeau N, Onghena P, Bruce PC, Clarke DM, et al. Comparing correlated kappas by resampling: is one level of agreement significantly different from another? *J Psychiatr Res* 1996;30(6):483-92.
88. Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med* 2011;155(8):529-36.
89. Heymans R, van der Helm JJ, de Vries HJ, Fennema HS, Coutinho RA, Bruisten SM. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol* 2010;48(2):497-502.
90. Hart G. Syphilis tests in diagnostic and therapeutic decision making. *Ann.Intern.Med.* 1986;104(3):368-376.
91. Dallas WS, Ray PH, Leong J, Benedict CD, Stamm LV, Bassford PJ, Jr. Identification and purification of a recombinant *Treponema pallidum* basic membrane protein antigen expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1987;55(5):1106-15.
92. Ho EL, Lukehart SA. Syphilis: using modern approaches to understand an old disease. *J Clin Invest* 2011;121(12):4584-92.
93. Weigel LM, Radolf JD, Norgard MV. The 47-kDa major lipoprotein immunogen of *Treponema pallidum* is a penicillin-binding protein with carboxypeptidase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(24):11611-5.
94. Liu H, Rodes B, Chen CY, Steiner B. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. *J Clin Microbiol* 2001;39(5):1941-1946.
95. Centurion-Lara A, Castro C, Shaffer JM, Van Voorhis WC, Marra CM, Lukehart SA. Detection of *Treponema pallidum* by a sensitive reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1348-1352.

96. Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* 1998;281(5375):375-88.
97. Miao RM, Fieldsteel AH. Genetic relationship between *Treponema pallidum* and *Treponema pertenue*, two noncultivable human pathogens. *J Bacteriol* 1980;141(1):427-9.
98. Rodes B, Liu H, Johnson S, George R, Steiner B. Molecular cloning of a gene (*poIA*) coding for an unusual DNA polymerase I from *Treponema pallidum*. *J Med Microbiol* 2000;49(7):657-67.
99. Leeflang MM, Deeks JJ, Takwoingi Y, Macaskill P. Cochrane diagnostic test accuracy reviews. *Syst Rev* 2013;2:82.
100. Rutter CM, Gatsonis CA. A hierarchical regression approach to meta-analysis of diagnostic test accuracy evaluations. *Stat Med* 2001;20(19):2865-84.
101. Reitsma JB, Glas AS, Rutjes AW, Scholten RJ, Bossuyt PM, Zwinderman AH. Bivariate analysis of sensitivity and specificity produces informative summary measures in diagnostic reviews. *J Clin Epidemiol* 2005;58(10):982-90.
102. Doebler P, Holling H, Bohning D. A mixed model approach to meta-analysis of diagnostic studies with binary test outcome. *Psychol Methods* 2012;17(3):418-36.
103. Harbord R, Whiting P. metandi: Meta-analysis of diagnostic accuracy using hierarchical logistic regression. *Stata Journal* 2009;9(2):211-229.
104. Deeks JJ, Macaskill P, Irwig L. The performance of tests of publication bias and other sample size effects in systematic reviews of diagnostic test accuracy was assessed. *J Clin Epidemiol* 2005;58(9):882-93.
105. Begg CB, Berlin JA. Publication bias and dissemination of clinical research. *J Natl Cancer Inst* 1989;81(2):107-15.
106. Easterbrook PJ, Berlin JA, Gopalan R, Matthews DR. Publication bias in clinical research. *Lancet* 1991;337(8746):867-72.
107. Emerson GB, Warne WJ, Wolf FM, Heckman JD, Brand RA, Leopold SS. Testing for the presence of positive-outcome bias in peer review: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2010;170(21):1934-9.
108. Ridde V, Haddad S. [Pragmatism and realism for public health intervention evaluation]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2013;61 Suppl 2:S95-106.
109. Zhang B, Chen Z, Albert PS. Estimating diagnostic accuracy of raters without a gold standard by exploiting a group of experts. *Biometrics* 2012;68(4):1294-302.

X ANNEXES

X.1 Annexe A: Implication personnelle de la candidate dans la mise en place et la réalisation des différentes études émanant de la thèse de Doctorat

X.1.1 Implications dans la revue systématique et la méta-analyse décrite au chapitre IV et complétée au chapitre VI

La candidate a rédigé un protocole d'étude détaillant la méthodologie d'une revue systématique dont l'objectif était de décrire la performance diagnostique en termes de sensibilité et spécificité mais aussi l'utilité clinique de la *Tp*-PCR dans le diagnostic de la syphilis. La candidate a ensuite contacté deux personnes (Stephan Lautenschlager [dermatologue] et Béatrice Ninet [microbiologiste]) qui avaient participé à une précédente étude diagnostique sur la *Tp*-PCR afin de mettre en place la revue systématique.

Aucun financement n'a été nécessaire pour réaliser cette étude.

Les analyses statistiques (méta-analyse) ont été supervisées par Christophe Combescure (statisticien PhD dans le service d'épidémiologie clinique) au démarrage de l'étude et finalisées par la candidate.

L'organisation détaillée de la revue systématique est présentée au chapitre IV. Celle de la deuxième méta-analyse est présentée au chapitre VI.

X.1.2 Implication dans la mise en place de l'étude clinique multicentrique

Le protocole de cette étude clinique décrite aux chapitres V et VI a été rédigé par la candidate au cours de l'été 2011. Le calcul de la taille d'échantillon décrit dans le protocole (détaillé au point V.4.6) justifiait la mise en place d'une étude clinique multicentrique. Cinq centres ont été définis sur la base du réseau professionnel de la candidate. Les responsables des différentes unités spécialisées en maladies infectieuses, dermatologie ou des centres de dépistage des maladies sexuellement transmissibles ont été invités à participer au décours des différentes séances de présentation de l'étude organisées par la candidate.

Le protocole a été soumis à la commission d'éthique de la recherche de Genève en août 2011 et a reçu un avis positif le 7 septembre 2011. Le protocole d'étude a été également

soumis aux commissions d'éthique de la recherche du Centre Hospitalier Vaudois à Lausanne et des Hôpitaux Universitaires de Zürich et reçu un avis favorable le 29 novembre 2011. Finalement, le protocole a été soumis pour avis au comité de protection des personnes de Lyon Sud-Est IV le 10 novembre 2011 qui a jugé l'étude non interventionnelle et ne nécessitant pas l'avis d'un comité de protection des personnes pour être conduite en France.

En parallèle, la candidate a recherché une source de financement pour la mise en place de l'étude et a obtenu un fond de recherche alloué par la direction médicale des Hôpitaux Universitaires de Genève en octobre 2011. Un contrat a été signé dans les suites avec le responsable du laboratoire de bactériologie des Hôpitaux Universitaires de Genève pour réaliser tous les examens *Tp*-PCR de l'étude. Dans un second temps, un deuxième contrat a été établi le 18 mars 2013 entre les Hospices Civils de Lyon, le laboratoire de bactériologie de l'Hôpital de la Croix Rousse à Lyon (France) et les Hôpitaux Universitaires de Genève, représentés par la candidate, pour la réalisation du deuxième examen *Tp*-PCR dont les résultats sont présentés au chapitre VI.

Le recrutement des patients a été géré par chaque centre participant localement en suivant le protocole de l'étude et en utilisant les kits mis à disposition par la candidate. Chaque investigateur local a complété les questionnaires de l'étude, excepté le centre de Paris où les questionnaires ont été complétés *a posteriori* par la candidate lors de ses passages quadrimestriels. La candidate s'est finalement chargée du transport des prélèvements cutanéomuqueux faits en France (Lyon et Paris) au laboratoire de bactériologie des Hôpitaux Universitaires de Genève. Dans la dernière phase de l'étude, la candidate s'est également chargée du transport de tous les échantillons au laboratoire de bactériologie de l'Hôpital de la Croix Rousse à Lyon (France) afin de réaliser une deuxième *Tp*-PCR.

Pour chaque patient inclus, un questionnaire était complété et les données ont été saisies de manière anonyme dans une base *Epidata* créée par la candidate. Les codes ont été créés par la candidate, codes dont elle seule conserve la clé dans des classeurs rangés dans une armoire protégée. La base de données a été complétée au fur et à mesure par la candidate avec les résultats des examens *Tp*-PCR.

L'analyse des données de la base et la rédaction des différents rapports et publications scientifiques ont été réalisées par la candidate au cours de la période 2012-2015.

X.2 Annexe B : Papier relatif au chapitre IV

Sensitivity, specificity, and likelihood ratios of polymerase chain reaction in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis.

Gayet-Ageron A., Lautenschlager S., Ninet B., Perneger T., Combescure C.

Sex Transm Inf 2013; 89(3):251-6.

Sensitivity, specificity, and likelihood ratios of polymerase chain reaction in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis

Angèle Gayet-Ageron, MD¹, Stephan Lautenschlager, MD², Béatrice Ninet, PhD³, Thomas Perneger, MD-PhD¹, Christophe Combescure, PhD¹

¹ Division of Clinical Epidemiology, University Hospitals of Geneva and Faculty of Medicine, 6 Rue Gabrielle Perret-Gentil, 1211 Geneva 14, Switzerland

² Outpatient Clinic for Dermatology and Venereology, Triemli Hospital, Herman Greulichstrasse 70, 8004 Zürich, Switzerland

³ Laboratory of Bacteriology, University Hospitals of Geneva and Faculty of Medicine, 24 Rue Gabrielle Perret-Gentil, 1211 Geneva 14, Switzerland

Submitted to: *Sexually Transmitted Infections*

Corresponding author:

Angèle Gayet-Ageron, MD, MPH

Division of Clinical Epidemiology

University Hospitals of Geneva

6 Rue Gabrielle Perret-Gentil

1211 Geneva 14, Switzerland

Tel.: +41 22 372 9027; Fax: +41 22 372 9035; E-mail: angele.gayet-ageron@hcuge.ch

The authors declare no conflict of interest.

Source of funding: none.

Abstract

Objective: To systematically review and estimate pooled sensitivity and specificity of the polymerase chain reaction (PCR) technique compared to recommended reference tests in the diagnosis of suspected syphilis at various stages and in various biological materials.

Design: Systematic review and meta-analysis.

Data sources: Search of three electronic bibliographic databases from January 1990 to January 2012 and the abstract books of five congresses specialized in the infectious diseases' field (1999-2011). Search key terms included syphilis, *Treponema pallidum* or neurosyphilis and molecular amplification, polymerase chain reaction or PCR.

Review methods: We included studies that used both reference tests to diagnose syphilis plus PCR and we presented pooled estimates of PCR sensitivity, specificity, and positive and negative likelihood ratios (LR) per syphilis stages and biological materials.

Results: Of 1160 identified abstracts, 69 were selected and 46 studies used adequate reference tests to diagnose syphilis. Sensitivity was highest in the swabs from primary genital or anal chancres (78.4%; 95% CI: 68.2-86.0) and in blood from neonates with congenital syphilis (83.0%; 55.0-95.2). Most pooled specificities were ~95%, except those in blood. A positive PCR is highly informative with a positive LR around 20 in ulcers or skin lesions. In the blood, the positive LR was <10.

Conclusion: The pooled values of LR showed that *T. pallidum* PCR was more efficient to confirm than to exclude syphilis diagnosis in lesions. PCR is a useful diagnostic tool in ulcers, especially when serology is still negative and in medical settings with a high prevalence of syphilis.

Key words

Treponema pallidum; Syphilis; Polymerase Chain Reaction; Meta-Analysis; Syphilis Serodiagnosis

Key messages

- In this meta-analysis, we summarized the published diagnostic values of *Treponema pallidum* PCR (TpPCR) by clinical stage and biological specimen.
- Sensitivities were 31.2% in blood from latent syphilis, 75.6% in ulcers from early syphilis, and specificities were 83.5% and 96.5%, respectively.
- The pooled values of likelihood ratios showed that TpPCR was more efficient to confirm than to exclude syphilis diagnosis in lesions.

Introduction

Syphilis is a sexually-transmitted infection of concern worldwide. The World Health Organization estimated that 12 million new cases occurred in 1999,¹ of which 92% affect individuals in low-income countries. In most Western countries, syphilis is a cause of epidemics, particularly among men having sex with men.² When syphilitic chancres are present, there is also a higher risk of human immunodeficiency virus (HIV) transmission and acquisition³.

While the treatment of syphilis is simple, low cost, and effective, its diagnosis remains challenging, particularly among asymptomatic cases (mainly latent forms), pregnant women and newborns, or in the early phase of the disease. The case definition of the United States Centres for Disease Control and Prevention (CDC)⁴ combines the presence of clinical signs or history with direct detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens (primary, secondary, and late syphilis) and/or reactive non-treponemal or treponemal tests. For chancres, a gold standard is the rabbit infectivity test (RIT), which is not routinely performed because it is time-consuming and expensive.^{5,6} When lesions are present, dark-field microscopy (DFM) or direct fluorescent-antibody (DFA) are the most specific methods to detect directly *T. pallidum*, but both require skilled laboratory staff and are also not widely available.⁵ When direct detection techniques are unavailable, serology testing combining a non-treponemal and a treponemal test is recommended. These provide a sensitivity ranging from 76% to 100% and specificity from 97% to 99%, depending on the syphilis stage, compared with direct detection of *T. pallidum* in clinical specimens.⁵

Today, there is an urgent need of a reliable, easy, and cheap diagnostic test that would benefit patients in countries with limited resources. In the 1980s, the amplification of *T. pallidum* DNA by polymerase chain reaction (PCR) has been proposed as an interesting, but costly, alternative.⁷⁻¹¹ To be more powered to assess the diagnostic performance of PCR and

to conclude on the best media to use, we reviewed all published studies using *T. pallidum* PCR in the diagnosis of syphilis and provided pooled estimates for sensitivity and specificity at various syphilis stages and in different biological specimens. We aimed also to identify factors that would explain any observed variability in the PCR diagnostic accuracy.

Materials and Methods

Search strategy and selection criteria

Two independent reviewers (AGA and SL) searched three databases (Pubmed, Embase and Web of Science) and the abstract books from specialized conferences to identify published studies between January 1990 and January 2012. Details of the literature search and selection criteria are described in appendix 1.

Quality assessment

We assessed the methodological quality of each selected study by using the quality assessment tool for diagnostic accuracy studies (QUADAS).^{12,13} Two independent assessments were made for studies published in English or French (by AGA and SL), and one for reports in Czech¹⁴ and Russian.¹⁵ Details on the use of the QUADAS items are described in appendix 1.

Data extraction

Three reviewers (AGA, SL, BN) screened abstracts of potentially relevant studies and applied the inclusion criteria. Reasons for exclusion were recorded and discrepancies were solved by consensus. Data extraction from the selected studies was done independently by two reviewers (AGA, SL) and two-by-two tables (PCR by reference test) were constructed for

each study by syphilis stage and biological specimen tested. Data were verified for consistency and accuracy.

We collected the following data: author; journal; year of publication; study country; design; population characteristics; syphilis stage; PCR target; type of PCR; reference tests used to diagnose syphilis; purification of *T. pallidum* DNA during extraction; use of inhibitory controls; number of positive PCR among cases and number of negative PCR among controls (if available); number of cases and controls tested; and definitions of the reference test used for syphilis diagnosis. For blood specimens, we considered whole blood, serum or plasma as “blood” and we collected separate data for each blood compartment. Early syphilis was defined as the stages of syphilis (primary, secondary, and early latent syphilis) that occur within the first year after acquisition of infection. If data were missing or unclear, the corresponding author was contacted by email.

Data analysis

Due to the pathophysiology of the disease, we performed the analysis by syphilis stage and biological specimen. We calculated pooled estimates of the PCR sensitivity and specificity for all studies and, in a second step, only for studies using adequate reference tests by using the inverse variance method with random effects¹⁶ on the logit-transformed proportions. For studies providing both sensitivity and specificity, we estimated the pooled positive and negative likelihood ratios (LR+ and LR-, respectively) to assess the usefulness of PCR in the syphilis diagnosis. Heterogeneity was measured with the indicator I^2 which reflects the proportion of variance between studies that is due to factors other than chance.¹⁷ If I^2 was greater than 50% and the number of study was ≥ 10 , we explored potential heterogeneity factors defined *a priori* for the LR+ and LR-. We used meta-regression or Cochran tests to explore the between-strata heterogeneity only when at least two studies were available in each

stratum. The impact of a potential publication bias was explored by using the Trim and Fill method when the number of studies was greater than 10. This method detects missing studies for the funnel plot to be symmetric and assesses the pooled result including the missing studies.¹⁸

All analyses were performed using Comprehensive Meta Analysis Version 2 (Biostat, Englewood, NJ, USA) with the significance level set at 0.05.

Results

Sixty-nine studies were retrieved by the systematic review. Two studies were not used in the meta-analysis: one that used aqueous humor from secondary syphilis with panuveitis to test for PCR, and one on syphilitic stillbirth that assessed the mothers' blood. The study flow chart is presented in appendix 2.

Studies' description

A summary of the 69 study characteristics by syphilis stage is presented in table 1 (see also supplemental file, appendix 3). In less than half of all studies, the primary objective was the evaluation of the diagnostic performance of PCR. In the others, the primary objective was to describe the aetiology of genital ulcer diseases (GUD) by using PCR (56.5%). In all studies amplification was performed on native DNA and only two studies performed amplification on an initial RNA sample.^{15,19} The controls used to assess PCR specificity were mostly patients with genital ulcers caused by *Chlamydia trachomatis*, *Herpes* virus or *Haemophilus ducreyi*, but also aphthous ulceration and caustic or traumatic ulcerations. In the study population, 48.6% of patients were HIV-positive (29 studies). The use of antibiotics within the weeks

prior to sampling was reported in 52% of studies (12/23). Overall, 17 studies mentioned controlling for inhibitory substances before PCR (25.8%).

Quality assessment and impact on pooled estimates

Most studies fulfilled the quality criteria related to bias (66.7% to 95.6%, depending on the item). The study population was judged as representative of those who will receive the test in practice in 85.3% of studies. Finally, most studies fulfilled the items related to quality reporting (61.8% to 86.8%, depending on the item). Syphilis diagnosis was established following the CDC recommendations in 66.7% of studies (table 1). In GUD (n=42 studies), DFM was used to diagnose syphilis in half of them. Pooled sensitivities and specificities were significantly lower in studies comparing PCR to inaccurate reference tests than those using adequate reference tests (table 2).

Pooled estimates of sensitivity and specificity

To correctly assess the diagnostic performance of PCR, we performed the meta-analysis on the 46 studies that used the recommended reference tests to diagnose syphilis. Pooled results are shown in table 2. Pooled sensitivities were very low for blood samples, except in studies of neonates with congenital syphilis (n=4). By blood compartment, depending on the stage, both serum or plasma provided higher sensitivities than whole blood, but not significantly (table 2). In contrast with blood, sensitivities were systematically higher than 70% for ulcer or skin lesions. In neurosyphilis, the sensitivity in cerebrospinal fluid (CSF) was close to 50%. We compared regular PCR with nested PCR, real-time PCR, and multiplex-PCR (data not shown). Sensitivities of nested PCR or regular PCR, depending on the stage and specimen, were higher than with real-time and multiplex-PCR in all biological specimens and syphilis stages, without reaching statistical significance. Specificity was less often assessed than

sensitivity. Globally, the pooled specificities were high (table 2). However, the pooled specificities for blood and CSF specimens were as low as 83% in some stages, while they were systematically higher than 95% for ulcer and skin lesions. Specificities remained comparable between the three blood compartments (table 2) and specificities were similar by PCR method used.

In studies using adequate reference tests, a positive PCR in ulcer or skin lesions was highly suggestive of syphilis and 17.3 to 21.1 times as likely to occur in patients with early syphilis, as opposed to patients without. In contrast, a negative PCR was less useful and was 0.27 to 0.36 times as likely to occur in patients with early syphilis, as opposed to those without (table 2). In studies using adequate reference tests in the ulcers or skin lesions from early syphilis, we found significantly higher LR+ and lower LR- compared to those using inadequate reference tests (table 2). Regarding the usefulness of PCR in congenital syphilis diagnosis, the LR+ was higher than the threshold of 10 in the CSF of newborns while LR+ was lower in the blood.

Publication bias

A potential publication bias was detected for some pooled LR (data not shown), but it did not change the conclusions of the meta-analysis.

Factors explaining heterogeneity

Sources of heterogeneity were explored for LR- in ulcers from primary syphilis and for LR+ plus LR- in lesion swabs from early syphilis. We did not find any association between LR- or LR+, depending on the stage, the year of publication, or the gross national income (data not shown). The only factor that explained heterogeneity in the LR+ of lesion swabs from early syphilis was the PCR target: polymerase A gene (*polA* gene) provided a significantly higher

LR+ than the 47KD lipoprotein gene (*tpp47*), but both provided excellent LR+: 41.0 (25.3-66.6) versus 14.8 (8.9-24.5), respectively (p=0.004). The heterogeneity in the LR- of lesion swabs from early syphilis was explained by the type of PCR with a lower LR- when standard PCR was used compared to multiplex-PCR: 0.31 (0.22-0.45) and 0.51 (0.44-0.59), respectively (p=0.02).

Discussion

This meta-analysis indicates that, when the reference tests are adequate, the sensitivity of *T. pallidum* PCR is moderate, while its specificity is very good. However, the diagnostic performance varied with the biological specimen tested, especially for sensitivity. The best performance was found in ulcers from primary syphilis and, more generally, symptomatic lesions provided higher sensitivities than blood or even CSF. In the blood, PCR sensitivity was higher in plasma or serum than in whole blood. Regarding the PCR method, nested PCR or regular PCR were more sensitive than multiplex or real-time PCR in all syphilis stages and specimens. The inadequacy of reference tests recommended by the CDC was also associated with lower sensitivity. In addition, the PCR target and the type of PCR also explained heterogeneity in the subgroup of studies that used adequate reference tests. PCR targeting the *polA* gene provided higher LR+ than those targeting the 47KD lipoprotein gene (*tpp47*).

Regular PCR provided lower LR- than multiplex-PCR.

Some studies have showed that PCR sensitivities and specificities were higher in blood compared to ulcer and chancre^{14,20-27} and this result was confirmed by our meta-analysis. The potential explanations are that DNA extraction from blood provided a lower yield than skin lesions,^{24,27} thus postulating a higher *T. pallidum* load in skin lesions than in blood,²⁸ but also that substances may be present in whole blood and inhibit PCR.²⁹ Nonetheless, clinical lesions are only present in the early symptomatic phase of the disease. In the case of asymptomatic

disease, even if the ear lobe was proven to provide the highest DNA yield, these results were described in only one study³⁰ and blood remains the easiest media to use. When stratified by blood compartment, sensitivities were higher in plasma or serum than in whole blood and this confirms the results from previous studies on a larger number of cases.^{20,30}

Regarding the PCR technique itself, some authors suggested that its lack of sensitivity was related to non-specific inhibitory substances in whole blood that could be controlled when extracting DNA.⁸ Apart from DNA extraction, *T. pallidum* genes targeted and the PCR method used might also explain the great heterogeneity of PCR sensitivity. Castro et al.³⁰ compared the 47KD lipoprotein gene (*tpp47*) to *polA* gene and to a combination of both on the same biological samples. They showed that PCR targeting 47KD lipoprotein gene (*tpp47*) was the most sensitive but we did not find any difference. They also worked on paired data and used the same material to compare PCR targets and this might have increased the power of the study. Regarding the PCR method used, we did not find significant differences in their diagnostic performance. Multiplex PCR has the advantage of identifying multiple infectious agents, but already showed a lower sensitivity to detect *T. pallidum*.³¹ By contrast, nested PCR increases sensitivity by amplifying a secondary target within the first run product.²⁴ Finally, real-time PCR presents the advantages to provide rapid and quantitative results and also to reduce the likelihood of contamination. To our knowledge, no previous study has compared the performance of different PCR methods in syphilis diagnosis and meta-analysis allows to make such comparisons on a larger number of cases.

The LR+ was above the threshold value of 10 that is considered as the lower limit of clinical usefulness for some authors, but the LR- was above the threshold of 0.10 considered as the higher limit to rule out the diagnosis.³² However, we should not interpret the LR in isolation. The pre-test probability of the disease should also be considered when estimating the post-PCR probability of syphilis. Figure 1 illustrates the post-test probability as a function

of the pre-test probability, using the LR obtained in ulcers from primary syphilis. When the pre-test probability of syphilis is 16%, the risk of having syphilis reaches 80% if the PCR is positive in ulcers, and 5% if the PCR is negative. For syphilis prevalence above 16%, a positive PCR increases the post-test probability above 80%. In contrast, below 16%, a negative PCR test is informative, as it pushes the probability of disease to very low values.

Our study has several limitations. First, we were not able to test the heterogeneity factors in all subgroups due to the small number of studies available. Although HIV status may influence reference tests,³³ disaggregated data to explore HIV as a potential heterogeneity factor were insufficient. Second, regarding the PCR technique itself, some hypotheses were not tested due to lack of information. For instance, DNA extraction and purification can be done either manually or automatically and this could also modify PCR sensitivity.⁹ It is also important to test systematically for the presence of substances that inhibit PCR³⁴ and this was done in a small proportion of studies, but we were unable to obtain the information for the remaining reports. Furthermore, the amplification procedure needs to be done at least in triplicate in order to achieve acceptable reproducibility,³⁵ but none of the selected studies reported using this method. Finally, the gold standard to diagnose syphilis remains animal infectivity testing or RIT, but this is not routinely performed.⁵ As an alternative, the CDC recommends the use of DFM or DFA for the direct detection of *T. pallidum* in clinical specimens from early syphilis. DFM is a reference test in the diagnosis of syphilis, but not the gold standard. As a consequence, the assessment of the diagnostic performance of PCR may be biased.³⁶

In conclusion, this meta-analysis confirmed that PCR could be a useful tool in the diagnosis of ulcer or chancres following risky sexual behaviour, especially when serology is not yet reactive or in a large number of regions when DFM is not available. We showed also a

large heterogeneity of diagnostic values between studies and the diagnostic performance of PCR varied largely according to the biological specimen. The summary of the published diagnostic values by specimen and clinical stage of syphilis may help to guide future clinical practice.

Acknowledgments

We thank Ms Rosemary Sudan for editorial assistance and Dr Youri Popowski for his help in the translation of the Russian publication. We thank also all the following authors for their kind collaboration (S. Alexander, J. Bakobaki, R. Castro, J. Gratrix, IF. Hoffman, N. Karoly, MA. Kingston, H. Liu, IM. Mackay, I. Martin, GT. Noordhoek, N. O'Farrell, G. Paz-Bailey, G. Riedner, AE. Singh, W. Sturm, M. Sutton, V. Woznicová).

Authors' contributions

AGA coordinated the work, searched relevant abstracts, assessed published work, extracted data, analyzed, and interpreted the data. SL searched relevant abstracts, assessed published work, and extracted data. BN searched relevant abstracts. CC analyzed and interpreted the data. TVP took responsibility for the integrity of data and the accuracy of the data analysis. AGA wrote the paper with important contributions from SL, BN, CC, and TVP.

License statement

"The Corresponding Author has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, an exclusive licence (or non exclusive for government employees) on a worldwide basis to the BMJ Publishing Group Ltd to permit this article (if accepted) to be published in STI and any other BMJ PGL products and sub-licences such use and exploit all subsidiary rights, as set out in our licence

<http://group.bmj.com/products/journals/instructions-for-authors/licence-forms>".

References

1. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. Geneva: World Health Organization, 2001. Available from: http://www.who.int/hiv/pub/sti/en/who_hiv_aids_2001.02.pdf.
2. Torrone EA, Bertolli J, Li J, Sweeney P, et al. Increased HIV and primary and secondary syphilis diagnoses among young men--United States, 2004-2008. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;58:328-35.
3. Zetola NM, Bernstein KT, Wong E, et al. Exploring the relationship between sexually transmitted diseases and HIV acquisition by using different study designs. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009;50:546-51.
4. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm.Rep*. 1997;46(RR-10):1-55.
5. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:1-21.
6. Liu H, Rodes B, Chen CY, et al. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. *J Clin Microbiol* 2001;39:1941-1946.
7. Burstain JM, Grimpel E, Lukehart SA, et al. Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991;29:62-69.
8. Grimpel E, Sanchez PJ, Wendel GD, et al. Use of polymerase chain reaction and rabbit infectivity testing to detect *Treponema pallidum* in amniotic fluid, fetal and neonatal sera, and cerebrospinal fluid. *J.Clin.Microbiol*. 1991;29:1711-1718.

9. Noordhoek GT, Wolters EC, de Jonge ME, et al. Detection by polymerase chain reaction of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid from neurosyphilis patients before and after antibiotic treatment. *J Clin Microbiol* 1991;29:1976-1984.
10. Sanchez PJ, Wendel GD, Jr., Grimpel E, et al. Evaluation of molecular methodologies and rabbit infectivity testing for the diagnosis of congenital syphilis and neonatal central nervous system invasion by *Treponema pallidum*. *J Infect Dis* 1993;167:148-57.
11. Wicher K, Noordhoek GT, Abbruscato F, et al. Detection of *Treponema pallidum* in early syphilis by DNA amplification. *J.Clin.Microbiol.* 1992;30(2):497-500.
12. Whiting P, Rutjes AW, Reitsma JB, et al. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. *BMC Med Res Methodol* 2003;3:25.
13. Whiting P, Harbord R, Kleijnen J. No role for quality scores in systematic reviews of diagnostic accuracy studies. *BMC Med Res Methodol* 2005;5:19.
14. Flasarova M, Smajs D, Matejkova P, W et al. Molecular detection and subtyping of *Treponema pallidum subsp. pallidum* in clinical specimens. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Immunologie* 2006;55:105-111.
15. Rodionova EN, Gushchin AE, Shipulin GA, Khludova NA, Toporovskii LM, Nikolenko IA, et al. Detection of *Treponema pallidum* DNA and RNA in clinical material from patients with syphilis at different stages. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2003 May-Jun:43-50.
16. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 1986;7:177-88.
17. Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, et al. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 2003;327:557-60.

18. Duval S, Tweedie R. Trim and fill: A simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics* 2000;56:455-63.
19. Marra CM, Maxwell CL, Smith SL, Lukehart SA, Rompalo AM, Eaton M, et al. Cerebrospinal fluid abnormalities in patients with syphilis: association with clinical and laboratory features. *J Infect Dis* 2004;189:369-76.
20. Castro R, Prieto E, Aguas MJ, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Lisbon, Portugal. *J Clin Microbiol* 2009;47:2510-2.
21. Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trellu L, et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. *Sex Transm Inf* 2009;85:264-269.
22. Heroldova M, Woznicova V. *PolA* PCR in syphilis diagnostic. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:643.
23. Kouznetsov AV, Weisenseel P, Trommler P, et al. Detection of the 47-kilodalton membrane immunogen gene of *Treponema pallidum* in various tissue sources of patients with syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;51:143-145.
24. Martin IE, Tsang RS, Sutherland K, et al. Molecular characterization of syphilis in patients in Canada: azithromycin resistance and detection of *Treponema pallidum* DNA in whole-blood samples versus ulcerative swabs. *J Clin Microbiol* 2009;47:1668-73.
25. Sutton MY, Liu H, Steiner B, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in an Arizona County with increasing syphilis morbidity: Use of specimens from ulcers and blood. *J Infect Dis* 2001;183:1601-1606.
26. Tipple C, Hanna MO, Hill S, et al. Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection. *Sex Transm Infect* 2011;87:479-85.

27. Peng RR, Wang AL, Li J, Tucker JD, Yin YP, Chen XS. Molecular typing of *Treponema pallidum*: a systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Nov;5:e1273.
28. Salazar JC, Rathi A, Michael NL, Radolf JD, Jagodzinski LL. Assessment of the kinetics of *Treponema pallidum* dissemination into blood and tissues in experimental syphilis by real-time quantitative PCR. *Infect Immun*. 2007;75:2954-8.
29. Al-Soud WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol*. 2001 Feb;39:485-93.
30. Castro R, Prieto E, Aguas MJ, et al. Detection of *Treponema pallidum sp pallidum* DNA in latent syphilis. *Int J STD AIDS* 2007;18:842-845.31.
31. Morse SA, Trees DL, Htun Y, et al. Comparison of clinical diagnosis and standard laboratory and molecular methods for the diagnosis of genital ulcer disease in lesotho: Association with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1997; 175: 583-9.
32. Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett D, for the Evidence-Based Medicine Working Group. User's guides to the medical literature. III. ow to use an article about the diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring my patients? *JAMA* 1994;271:703-7.
33. Augenbraun MH, DeHovitz JA, Feldman J, et al. Biological false-positive syphilis test results for women infected with human immunodeficiency virus. *Clin.Infect.Dis*. 1994;19:1040-1044.
34. Orle KA, Gates CA, Martin DH, et al. Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. *J Clin Microbiol* 1996;34:49-54.

35. Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, et al. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *leptospira* species in clinical materials. *PLoS One* 2009;4:e7093
36. Valenstein PN. Evaluating diagnostic tests with imperfect standards. *Am J Clin Pathol* 1990;93:252-8.

Figure legend

Figure 1. Post-test probabilities (with 95% confidence intervals) of *T. pallidum* PCR for different values of syphilis prevalence taking a LR+ of 21.0 (15.5-28.4) and a LR- of 0.27 (0.18-0.40).

Table 1. Summary of the 69 principal study characteristics by syphilis stage and in all stages.

	Primary	Secondary	Early	Latent	Neurosyphilis	Congenital	All stages
Number of studies	30	25	21	12	10	7	69*
Continent, n (% per stage)							
Africa	6 (20.0%)	0 (0.0%)	6 (28.6%)	0 (0.0%)	1 (10.0%)	0 (0.0%)	13
Asia	2 (6.7%)	1 (4.0%)	5 (23.8%)	1 (8.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	8
Eastern Europe	4 (13.3%)	5 (20.0%)	0 (0.0%)	3 (25.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	5
Oceania	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (9.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2
North America	9 (30.0%)	6 (24.0%)	2 (9.5%)	3 (25.0%)	3 (30.0%)	6 (85.7%)	16
South America	0 (0.0%)	2 (8.0%)	3 (14.3%)	0 (0.0%)	1 (10.0%)	1 (14.3%)	4
Western Europe	9 (30.0%)	11 (44.0%)	3 (14.3%)	5 (41.7%)	5 (50.0%)	0 (0.0%)	20
Specimen, n (% per stage)							
Blood	10 (33.3%)	13 (52.0%)	2 (9.1%)	10 (83.3%)	1 (11.1%)	6 (85.7%)	42
Ulcer/lesion	27 (90.0%)	18 (72.0%)	20 (90.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	65
Cerebrospinal fluid	1 (3.3%)	1 (4.0%)	2 (9.1%)	2 (16.7%)	8 (88.8%)	3 (42.9%)	17
Aqueous humor	0 (0.0%)	1 (4.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1
Placenta	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (14.3%)	1
Amniotic fluid	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (28.6%)	2
Type of PCR, n (% per stage)							

Multiplex PCR	9 (30.0%)	1 (4.0%)	15 (71.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	25
Standard PCR	13 (43.3%)	12 (48.0%)	4 (19.0%)	7 (58.3%)	8 (80.0%)	7 (100%)	44
Real-time PCR	4 (13.3%)	5 (20.0%)	1 (4.8%)	2 (16.7%)	1 (10.0%)	0 (0.0%)	13
Nested PCR	4 (13.3%)	7 (28.0%)	1 (4.8%)	3 (25.0%)	1 (10.0%)	0 (0.0%)	16
PCR Target, n (% per stage)							
<i>tpp47</i> gene	19 (63.3%)	13 (52.0%)	16 (76.2%)	6 (50.0%)	7 (70.0%)	4 (57.1%)	65
<i>polA</i> gene	7 (23.3%)	9 (36.0%)	3 (14.3%)	3 (25.0%)	0 (0.0%)	2 (28.6%)	24
<i>bmp</i> gene	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (9.5%)	1 (8.3%)	1 (10.0%)	0 (0.0%)	4
<i>tmpC</i> gene	1 (3.3%)	1 (4.0%)	0 (0.0%)	1 (8.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3
16SrRNA gene	2 (6.6%)	1 (4.0%)	1 (4.8%)	1 (8.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	5
<i>tmpA</i> gene	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (10.0%)	0 (0.0%)	1
Combination of targets	2 (6.6%)	1 (4.0%)	0 (0.0%)	2 (16.7%)	0 (0.0%)	1 (14.3%)	6
Number of patients							
Total	4417	1398	2885	534	397	217	9848
Cases	1516	604	762	494	205	116	3697
Controls	2901	794	2123	40	192	101	6151
% Male	73.4%	76.5%	77.8%	70.2%	80.5%	NA	75.3%
Range of median age, years	26-37	31-42	25-37	35-37	37	NA	23-42
Accurately reported reference test	19 (63.3%)	18 (72.0%)	12 (57.1%)	10 (83.3%)	9 (90.0%)	7 (100%)	46 (66.7%)*

*The number of studies exceeds the sum of the stages as one study could report data on several stages.

Table 2. Pooled sensitivities, specificities, and likelihood ratios (positive and negative) of *T. pallidum* PCR (random effects) with their heterogeneity (I^2), by syphilis stage and biological specimen tested.

<i>Stage/specimen</i>	<i>n</i>	Sensitivity (95% CI)	<i>I</i> ²	<i>n</i>	Specificity (95% CI)	<i>I</i> ²	<i>n</i>	Positive LR (95% CI)	<i>I</i> ²	<i>n</i>	Negative LR (95% CI)	<i>I</i> ²
<i>Primary syphilis</i>												
Blood*												
Adequate reference tests	8	37.7 (18.0-62.4)	66.9%	4	95.7 (84.3-98.9)	0.0%	3	5.4 (1.0-28.5)	0.0%	3	0.78 (0.63-0.96)	0.0%
Whole blood	6	36.1 (24.2-50.0)		4	95.7 (84.3-98.9)							
Serum	3	50.2 (27.2-73.2)		1	93.7 (46.1-99.6)							
Plasma	2	39.4 (19.3-63.8)		-	-							
Inadequate reference tests	1	5.6 (0.3-50.5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ulcer***												
Adequate reference tests	15	78.4 (68.2-86.0)	75.4%	11	96.6 (95.5-97.5)	0.0%	10	21.0 (15.5-28.4)	0.0%	10	0.27 (0.18-0.40)	82.7%
Inadequate reference tests	11	42.2 (31.8-53.3)	79.6%	20	96.7 (94.3-98.1)	50.1%	9	11.1 (5.6-21.9)	61.0%	9	0.70 (0.60-0.82)	85.1%
<i>Secondary syphilis</i>												
Blood*												
Adequate reference tests	9	52.2 (37.3-66.7)	71.1%	4	83.3 (51.1-96.0)	49.3%	4	2.6 (0.9-7.6)	25.2%	4	0.66 (0.50-0.87)	0.0%
Whole blood	7	54.2 (41.0-66.8)		3	93.2 (72.2-98.6)							
Serum	3	42.4 (11.4-80.8)		2	93.6 (87.4-96.8)							
Plasma	3	55.3 (16.2-88.9)		1	91.7 (37.8-99.5)							
Inadequate reference tests	2	34.4 (0.7-97.6)	77.1%	1	93.7 (87.4-97.0)	-	1	12.4 (5.3-29.3)	-	1	0.18 (0.01-2.24)	-
Lesion swabs§												
Adequate reference tests	13	72.0 (57.1-83.2)	64.7%	9	96.3 (92.1-98.3)	0.0%	9	17.3 (8.1-37.0)	0.0%	9	0.36 (0.24-0.55)	66.7%
Inadequate reference tests	4	66.2 (49.5-79.6)	28.0%	2	97.6 (71.6-99.8)	75.6%	2	27.9 (1.3-58.8)	79.0%	2	0.35 (0.18-0.69)	68.0%
<i>Early syphilis</i>												
Blood*												
Adequate reference tests	19	41.6 (28.5-56.0)	79.9%	7	94.8 (86.0-98.2)	0.0%	6	6.4 (2.0-20.0)	0.0%	6	0.73 (0.61-0.87)	0.0%
Whole blood	13	41.2 (26.5-57.6)		7	94.8 (86.0-98.2)							

Serum	9	42.6 (24.8-62.5)		2	92.8 (62.7-99.0)						
Plasma	6	41.1 (20.2-65.7)		1	91.7 (37.8-99.5)						
Inadequate reference tests	1	83.3 (19.4-99.0)	-	1	93.7 (87.4-97.0)	-	1	12.4 (5.3-29.3)	-	1	0.18 (0.01-2.24) -
Lesion swabs ^{§§}											
Adequate reference tests	36	75.9 (68.5-82.0)	79.0%	26	96.5 (95.0-97.6)	43.7%	25	21.1 (13.2-33.5)	62.9%	25	0.32 (0.25-0.41) 84.3%
Inadequate reference tests	18	50.3 (40.5-60.1)	85.6%	16	95.5 (92.9-97.2)	70.6%	16	9.2 (6.0-14.2)	60.6%	16	0.58 (0.50-0.68) 86.7%
<i>Neurosyphilis</i> ^{**}											
CSF	8	47.4 (31.7-63.7)	75.5%	4	85.0 (39.9-98.0)	89.9%	4	4.5 (0.9-23.6)	91.1%	4	0.54 (0.27-1.07) 69.1%
<i>Latent syphilis</i> ^{**}											
Blood	13	31.2 (22.4-41.5)	66.8%	4	83.5 (22.7-98.9)	78.5%	2	1.8 (0.0-304.3)	89.5%	2	1.41 (0.08-25.64) 87.8%
Whole blood	6	20.2 (9.3-38.4)		3	72.1 (8.6-98.6)						
Serum	3	20.9 (1.6-81.2)		1	97.6 (71.3-99.9)						
Plasma	5	39.4 (33.8-45.4)		-							
CSF	3	6.0 (3.6-10.0)	0.0%	1	87.5 (26.6-99.3)	0.0%	-	-	-	-	-
<i>Congenital syphilis</i> ^{**}											
Blood	4	83.0 (55.0-95.2)	40.3%	3	88.8 (79.9-94.1)	0.0%	3	8.1 (4.4-15.2)	0.0%	3	0.11 (0.04-0.33) 0.0%
CSF	3	62.2 (42.2-78.8)	6.2%	3	96.4 (89.5-98.8)	0.0%	3	17.5 (5.6-55.0)	0.0%	3	0.44 (0.28-0.67) 0.1%

* In blood, the estimates and LR are not reported among studies using inadequate reference tests due to small numbers (<3).

** For neurosyphilis, latent and congenital syphilis, all studies used the adequate reference tests.

*** Comparison of LR+ in ulcers between adequate and inadequate reference tests provided significant difference with p=0.01. Comparison of LR- was also significantly different with p=0.002.

§ Comparison of LR+ then LR- in skin lesions between adequate and inadequate reference tests provided a non significant difference.

§§ Comparison of LR+ in skin lesions between adequate and inadequate reference tests were significantly different with p=0.006 as the comparison of LR- (p=0.003).

CSF, cerebrospinal fluid; LR: likelihood ratio.

Word counts: 247 (abstract), 2694 (text); 2 tables; 1 figure; 3 appendices.

Appendix 1. Search strategy and quality assessment of the studies selected in the systematic review and meta-analysis.

Search strategy

In order to identify published studies, we did a systematic literature review using a combination of MeSH terms (“syphilis” OR “*Treponema pallidum*” OR “neurosyphilis”) AND (“polymerase chain reaction” OR “PCR” OR “molecular amplification”), hand-searching of online journals, and scanning of reference lists of identified articles. We searched Medline (Pubmed), Embase, and Web of Science between January 1990 and January 2012 without language restriction, as well as abstract books of the Annual Meeting of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (2000-2011), International Society for Sexually Transmitted Diseases Research meetings (2003-2011), Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (1999-2011), International Union against Sexually Transmitted Infections (2009), and the International Congress on Infectious Diseases (2004-2009). In case of multiple publications, the last available publication presenting complete data was included. No attempt was made to obtain information from unpublished studies. Full details of the search strategy and results including a listing of the potentially relevant papers identified by the search strategy but not included in this review, are available in a study protocol.

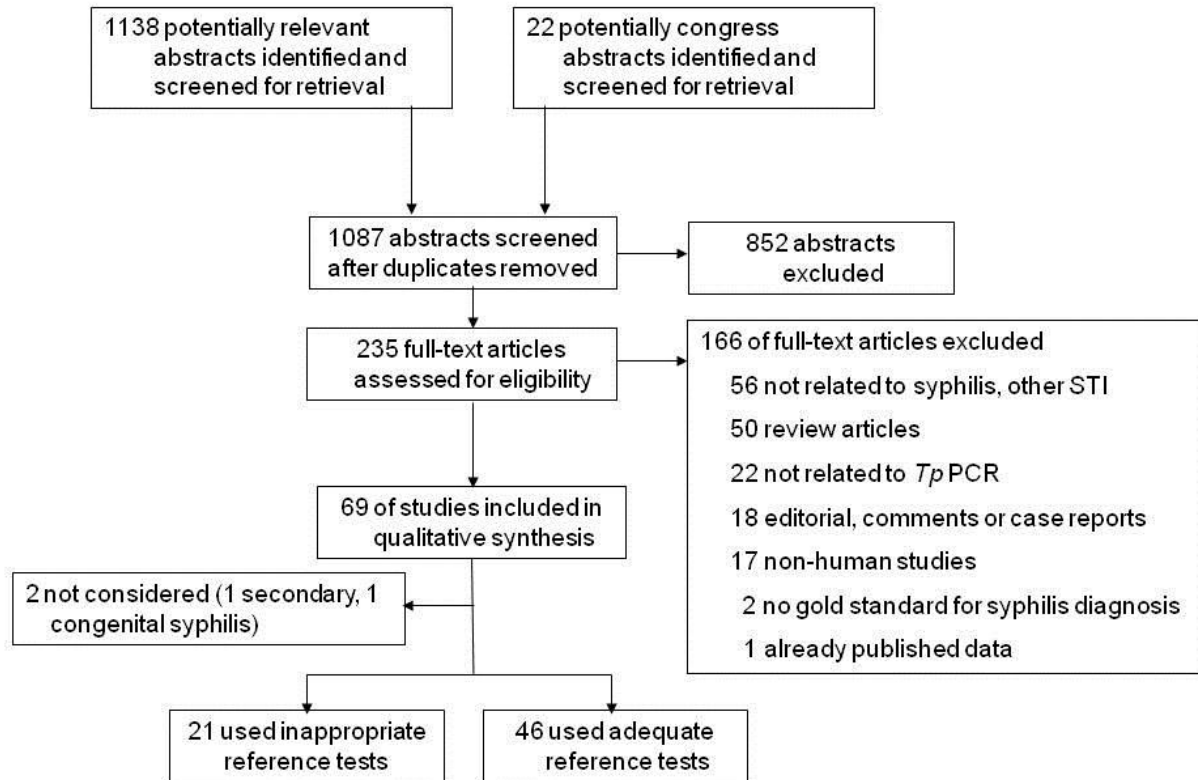
Quality assessment

We assessed the methodological quality of each selected study by using the quality assessment tool for diagnostic accuracy studies (QUADAS). QUADAS includes 14 items rated as “yes”, “no”, or “unclear”. The study is judged as unbiased if the reference tests correctly classified the patients (item 3), if the time elapse between the realization of the

reference test and the new test is short enough (item 4), if all the sample or a random selection of the study population received the reference test (item 5), if all patients received the same reference tests regardless of the new test's results (item 6), if the reference test was independent of the new test (item 7), if the new test was interpreted without knowledge of the results of the reference test (item 10), if the reference test results were interpreted without knowledge of the results of the new test (item 11) and if the same clinical data were available when test results were interpreted as would be available when the test is used in practice (item 12).

The quality of the study was judged as good if the selection criteria were clearly described (item 2), if the execution of the new test was described in sufficient detail to permit its replication (item 8), and if the execution of the reference test was described in sufficient detail to permit its replication (item 9). The first item is assessing the representativeness of the study population. The last two items of the QUADAS (items 13 and 14) were considered as irrelevant for the present study.

Appendix 2. Flow diagram for selection of articles



Appendix 3. Characteristics of included studies by syphilis stage

First author (year)	Country	Age*	Men, %	HIV+, %	N	Specimen	PCR (gene)	Target	Gold standard definition	TP/D+	TN/D-
<i>Primary syphilis (N=30)</i>											
Ahmed et al (2003) ^{w1}	Tanzania	27.4	52.9	49.0	102	Ulcer	47KD lipoprotein gene (47KD) (<i>tpp47</i>)		C+NTT+TT	1/26	76/76
Alessi et al (2004) ^{w2}	Italy	ND	ND	ND	37	Ulcer	47KD (<i>tpp47</i>)		Unknown	20/22	15/15
Ballard et al (2007) ^{w3}	South Africa	ND	97.0	46.7	868	Ulcer	47KD (<i>tpp47</i>)		C+NTT+TT	145/447	403/421
Behets et al (1999) ^{w4}	Madagascar	26.3	70.9	ND	196	Ulcer	47DK (<i>tpp47</i>)		C+NTT+TT	52/164	28/32
Beyrer et al (1998) ^{w5}	Thailand	ND	21.1	45.8	38	Ulcer	47KD (<i>tpp47</i>)		C	0/2	35/36
Castro et al (2009) ^{w6}	Portugal	ND	ND	ND	14	Ulcer	<i>polA</i> gene		C+NTT+TT	9/9	ND
					14	Plasma	<i>polA</i> gene		C+NTT+TT	6/14	ND
					14	W. blood	<i>polA</i> gene		C+NTT+TT	4/14	ND
Flasarova et al (2006) ^{w7}	Czech Rep.	35**	54.1	ND	10	Ulcer	<i>tppC</i> gene		C+NTT+TT	2/2	ND
					10	Serum	<i>tppC</i> gene		C+NTT+TT	0/10	ND
					3	W. blood	<i>tppC</i> gene		C+NTT+TT	0/3	ND
Gayet-Ageron (2009) ^{w8}	Switzerland	41.8	87.8	40.5	26	Ulcer	47DK (<i>tpp47</i>)		C+DDTP+NTT+TT	8/10	7/7

					26	W. blood	47DK (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	5/18	7/7
					26	Serum	47DK (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	6/11	7/7
Grange et al. (2012) ^{w9}	France	37-47	96.0	38.0	65	Ulcer	47DK (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+NTT+TT	52/65	41/43
Heroldova et al (2004) ^{w10}	Czech Rep.	ND	ND	ND	3	Ulcer	<i>polA</i> gene	C+DDTP+NTT+TT	0/1	2/2
					3	Serum	<i>polA</i> gene	C+NTT+TT	1/3	ND
Heymans et al (2010) ^{w11}	Netherlands	32 ^{**}	74.1	ND	716	Ulcer	<i>polA</i> gene	C+DDTP+NTT+TT	83/114	592/602
Kouznetsov et al (2005) ^{w12}	Russia	ND	ND	ND	2	Ulcer	47DK (<i>tpp47</i>)	C+RIT+NTT+TT	2/2	ND
					2	Serum	47DK (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	½	ND
					2	Plasma	47DK (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	0/2	ND
Marfin et al (2001) ^{w13}	USA	ND	ND	ND	11	W. blood	<i>polA</i> gene	C+NTT+TT	1/7	4/4
Marra et al (2004) ^{w14}	USA	37 ^{**}	74.8	72.1	5	CSF	16S rRNA	C+NTT+TT	0/5	ND
Martin et al. (2010) ^{w15}	Canada	37	47.0	ND	31	Ulcer	47DK (<i>tpp47</i>)+ <i>polA</i> + <i>b</i> <i>mp genes</i>	C+DDTP+NTT+TT	31/31	ND
Martin et al (2009) ^{w16}	China	37.3	75.5	2.0	49	Ulcer	<i>polA</i> + <i>bmp</i> +47 KD	C+DDTP+NTT+TT	38/39	10/10
Martin et al (2009) ^{w17}	Canada	36 ^{**}	69.1	ND	30	Ulcer	47DK (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+NTT+TT	9/15	16/16
					30	W. blood	47DK (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+NTT+TT	0/9	14/14
Mertz et al (1998) ^{w18}	USA	35 ^{**}	68.0	6.0	516	Ulcer	47DK (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+NTT	48/75	423/441

Mertz et al (1998) ^{w19}	USA	ND	77.6	25.2	47	Ulcer	47DK (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	23/47	92/96
Moodley et al. (2003) ^{w20}	South Africa	26**	74.6	75.1	587	Ulcer	47DK (<i>tpp47</i>)	C+NTT+ TT	39/91	484/496
Muller et al. (2010) ^{w21}	Austria	42	67.4	8.1	4	Biop.	<i>polA</i> gene	ND	4/4	120/120
Orle et al (1996) ^{w22}	USA	ND	ND	ND	278	Ulcer	47kDa47DK (<i>tpp47</i>)	C+ DDTP+NTT+ TT	64/83	186/195
Palmer et al (2003) ^{w23}	UK	ND	71.7	20.0	37	Ulcer	47DK (<i>tpp47</i>)	C+ DDTP+NTT+ TT	18/19	17/17
Paz-Bailey et al (2010) ^{w24}	South Africa	32**	100	100	32	Ulcer	47DK (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	20/32	ND
Pope et al (2005) ^{w25}	USA	31**	68.2	ND	90	Ulcer	<i>polA</i> gene	C+DDTP+NTT+TT	15/42	80/80
Riedner et al (2003) ^{w26}	Tanzania	ND	0	89.6	216	Ulcer	47DK (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	12/52	164/164
Rodionova et al (2003) ^{w27}	Russia	ND	ND	ND	24	W. blood	47DK (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+NTT+TT	22/24	ND
		ND	ND	ND	24	W. blood	16sRNA	C+DDTP+NTT+TT	24/24	ND
Scott et al. (2010) ^{w28}	Scotland	ND	ND	ND	15	Ulcer	47DK (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	13/13	ND
					15	Ulcer	47DK (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+NTT+TT	3/6	ND
Sutton et al. (2001) ^{w29}	USA	32.7	71.1	ND	45	W. blood	<i>polA</i> gene	C+DDTP+NTT	1/1	ND
					45	Ulcer	<i>polA</i> gene	C+DDTP+NTT	29/31	ND
Tipple et al. (2011) ^{w30}	UK	36	98.0	52.5	14	W. blood	47DK (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+TT	3/14	28/28
					14	Ulcer	47DK (<i>tpp47</i>)	C+DTTP+TT	14/14	27/28
Secondary syphilis (N=25)										
Alessi et al (2003) ^{w2}	Italy	ND	ND	ND	8	Skin swab	47KD (<i>tpp47</i>)	Unknown	6/8	ND

Behets et al (1999) ^{w31}	Jamaica	30.1	82.9	22.0	20	Ulcer	47KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	11/20	264/284
Buffet et al (2007) ^{w32}	France	34.4	91.7	50.0	12	Skin biop.	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+NTT+TT	9/12	24/24
Castro et al (2009) ^{w6}	Portugal	ND	ND	ND	7	Skin biop.	<i>polA</i> gene	C+NTT+TT	6/7	ND
					7	Plasma	<i>polA</i> gene	C+NTT+TT	5/7	ND
					7	W. blood	<i>polA</i> gene	C+NTT+TT	4/7	ND
Cornut et al. (2011) ^{w33}	France	ND	ND	ND	5	Aqueous humor	<i>polA</i> gene	C+NTT+TT	3/5	ND
Cruz et al. (2010) ^{w34}	Colombia	31 ^{**}	35.1	5.3	57	Skin biop.	<i>polA</i> gene	C+NTT+TT	12/26	ND
					57	W. blood	<i>polA</i> gene	C+NTT+TT	8/12	3/3
Flasarova et al (2006) ^{w7}	Czech Rep.	35 ^{**}	54.1	ND	8	Lesions	<i>tppC</i> gene	C+NTT+TT	1/3	ND
					8	Serum	<i>tppC</i> gene	C+NTT+TT	0/8	ND
					1	W. blood	<i>tppC</i> gene	C+NTT+TT	0/1	ND
Gayet-Ageron (2009) ^{w8}	Switzerland	41.8	87.8	40.5	40	Lesion	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+NTT+TT	1/5	5/5
					40	W. blood	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	11/31	5/5
					40	Serum	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	7/15	5/5
					40	Plasma	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	2/2	5/5
Grange et al. (2012) ^{w9}	France	37-47	96.0	38.0	44	Swabs	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+NTT+TT	38/44	2/43
Heroldova et al (2004) ^{w10}	Czech Rep.	ND	ND	ND	17	Lesion	<i>polA</i> gene	C+NTT	1/1	ND
					17	Serum	<i>polA</i> gene	C+NTT	2/17	ND

Heymans et al (2010) ^{w11}	Netherlands	32 ^{**}	74.1	ND	133	Lesion	<i>polA</i> gene	C+NTT+DDTP+TT	33/77	55/56
Kouznetsov et al (2005) ^{w12}	Russia	ND	ND	ND	6	Lesion	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	4/4	ND
					6	Serum	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	5/6	ND
					6	Plasma	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	1/6	ND
Marfin et al (2001) ^{w13}	USA	ND	ND	ND	5	W. blood	<i>polA</i> gene	C+NTT+TT	1/1	4/4
Martin et al (2009) ^{w17}	Canada	36 ^{**}	69.1	ND	16	W. blood	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	4/8	12/12
Martin et al. (2010) ^{w15}	Canada	37	47.0	ND	7	W. blood	47 KD	C+DDTP+NTT+TT	4/7	ND
						Swabs	(<i>tpp47</i>)+ <i>polA</i> + <i>b</i>		4/7	ND
							<i>mp</i>			
Marra et al (2004) ^{w14}	USA	37 ^{**}	74.8	72.1	59	CSF	16S rRNA	C+NTT+TT	11/59	ND
Muller et al. (2010) ^{w21}	Austria	42 ^{**}	67.4	8.1	34	Skin biop.	<i>polA</i> gene	Unknown	26/34	120/120
Palmer et al (2003) ^{w23}	UK	ND	71.7	20.0	57	Lesion	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+DDTP+TT	8/10	47/47
Pope et al (2005) ^{w25}	USA	31 ^{**}	68.2	ND	44	Lesion	<i>polA</i> gene	C+DDTP+NTT+TT	9/12	80/80
Rodionova et al (2003) ^{w27}	Russia	ND	ND	ND	153	W. blood	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+ NTT+TT	107/153	ND
Sutton et al. (2001) ^{w29}	USA	32.7	71.1	ND	45	W. blood	<i>polA</i> gene	C+ NTT	1/1	ND
					45	Lesion	<i>polA</i> gene	C+DDTP+NTT	8/8	ND
Talha et al (2009) ^{w35}	Hungary	26.7	100	5.3	113	Serum	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	2/2	104/111
Tipple et al. (2011) ^{w30}	UK	36	98.0	52.5	19	W. blood	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+TT	11/19	ND
					5	Ulcer	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+DTTP+TT	5/5	ND

Wenhai et al (2004) ^{w36}	China	ND	66.7	ND	24	Skin biop.	47 KD (<i>tpp47</i>)	Unknown	10/24	ND
Zoechling et al (1997) ^{w37}	Austria	ND	ND	ND	11	Skin biop.	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+TT	4/6	5/5
<i>Early syphilis (primary, secondary or, early latent) (N=21)</i>										
Becker et al. (2010) ^{w38}	India	31	49.3	29.4	280	Ulcer	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	8/27	249/249
Behets et al (1999) ^{w31}	Jamaica	30.1	82.9	22.0	304	Ulcer	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	23/64	232/240
Bruisten et al (2001) ^{w39}	Netherlands	ND	59.3	ND	364	Ulcer	<i>bmp</i> gene	DDTP or NTT+TT	12/16	348/348
Chung et al. (1994) ^{w40}	Korea	ND	ND	ND	23	CSF	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	6/23	ND
Garcia et al. (2011) ^{w41}	Chile	ND	66.0	ND	33	Ulcer	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+NTT	20/21	12/12
Hoyo et al. (2005) ^{w42}	Malawi	ND	68.7	ND	12	Ulcer	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	4/12	124/125
Htun et al. (1998) ^{w43}	Lesotho	ND	ND	ND	92	Ulcer	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	23/34	58/58
Kingston et al. (2004) ^{w44}	UK	ND	94.4	50.0	72	Ulcer	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+NTT+TT	20/22	ND
Kouznetsov et al (2005) ^{w12}	Russia	ND	ND	ND	4	Serum	47KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	2/4	ND
					4	Plasma	47KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	0/4	ND
Leslie et al (2007) ^{w45}	Australia	ND	84.6	20.9	301	Ulcer	<i>polA</i> gene	C+DDTP+NTT+TT	41/51	246/250
Liu et al (2005) ^{w46}	China	ND	ND	ND	51	Ulcer	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+DDTP	7/8	40/43
Mackay et al (2006) ^{w47}	Australia	24.8 ^{**}	58.2	100	64	Ulcer	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	18/29	35/35
Malonza et al (1999) ^{w48}	Kenya	25 ^{**}	84.9	35.9	245	Ulcer	<i>polA</i> gene	C+NTT+TT	52/69	156/176
Marra et al (2004) ^{w14}	USA	37 ^{**}	74.8	72.1	34	CSF	16S rRNA	C+NTT+TT	3/34	ND
Morse et al. (1997) ^{w49}	Lesotho	23 ^{**}	66.0	36.0	105	Ulcer	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	21/63	33/35

O'Farrell et al (2008) ^{w50}	South Africa	29.9	100	74.1	162	Ulcer	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	3/9 ^{***}	7/10 ^{***}
Pietravallo et al (1999) ^{w51}	Italy	ND	ND	ND	23	Ulcer	<i>bmp</i> gene	C+DDTP+NTT	13/14	ND
					23	Serum	<i>bmp</i> gene	C+NTT	9/14	ND
Risbud et al (1999) ^{w52}	India	25 ^{**}	92.1	22.2	302	Ulcer	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+NTT+TT	33/106	179/196
Sanchez et al (2002) ^{w53}	Dom. Rep.	31	100	13.6	81	Ulcer	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+NTT+TT	4/6	75/75
Sanchez et al (2002) ^{w53}	Peru	31	100	13.6	63	Ulcer	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+NTT+TT	3/3	57/57
Suntoke et al (2009) ^{w54}	Uganda	29 ^{**}	50.0	43.0	94	Ulcer	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	5/11	83/83
Sutton et al (2001) ^{w29}	USA	32.7	74.1	ND	44	Ulcer	<i>polA</i> gene	C+DDTP+NTT	41/44	ND
					41	W. blood	<i>polA</i> gene	C+DDTP+NTT	15/41	ND
Wang et al. (2002) ^{w55}	China	34.9	89.9	ND	227	Ulcer	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT/DDTP+TT	71/96	121/131
<i>Neurosyphilis (N=10)</i>										
Castro et al. (2005) ^{w56}	Portugal	ND	ND	ND	21	CSF	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	18/21	119/122
Garcia et al. (2011) ^{w41}	Chile	ND	66.0	ND	31	CSF	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+ NTT+TT	4/8	23/23
Gordon et al (1994) ^{w57}	USA	35	81.8	90.9	10	CSF	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+RIT+NTT+TT	3/10	ND
Hay et al (1990) ^{w58}	UK	ND	ND	48.5	33	CSF	<i>tmpA</i> gene	C+NTT+TT	10/19	7/14
Marra et al. (1996) ^{w59}	USA	ND	ND	100	81	CSF	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	0/2	0/23
Marra et al (2004) ^{w14}	USA	37 ^{**}	74.8	72.1	65	CSF	16S rRNA	C+NTT+TT	16/65	ND
Molepo et al (2007) ^{w60}	South Africa	ND	64.0	ND	50	CSF	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	23/40	5/10
Moskophidis (1996) ^{w61}	Germany	ND	ND	ND	10	CSF	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	6/10	ND

Noordhoek et al (1991) ^{w62}	Netherlands	ND	ND	ND	27	CSF	<i>bmp</i> gene	C+NTT+TT	7/27	ND
Tipple et al. (2011) ^{w30}	UK	36	98.0	52.5	3	W. blood	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+TT	0/3	ND
<i>Latent syphilis (excluding early latent) (N=12)</i>										
Castro et al (2007) ^{w63}	Portugal	ND	ND	ND	69	Plasma	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	31/69	ND
					69	W. blood	47KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	27/69	ND
					69	Serum	47KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	18/69	ND
					69	Plasma	<i>polA</i> gene	C+NTT+TT	25/69	ND
					69	W. blood	<i>polA</i> gene	C+NTT+TT	19/69	ND
					69	Serum	<i>polA</i> gene,	C+NTT+TT	14/69	ND
					69	Plasma	47 KD	C+NTT+TT	29/69	ND
					69	W. blood	(<i>tpp47</i>)+ <i>polA</i>	C+NTT+TT	26/69	ND
					69	Serum	47 KD	C+NTT+TT	19/69	ND
Castro et al (2009) ^{w6}	Portugal	ND	ND	ND	61	Plasma	(<i>tpp47</i>)+ <i>polA</i>	C+NTT+TT	21/61	ND
							47 KD			
Castro et al (2009) ^{w6}	Portugal	ND	ND	ND	61	Plasma	<i>polA</i> gene	C+NTT+FTATT	21/61	ND
							(<i>tpp47</i>)+ <i>polA</i>			
Castro et al (2009) ^{w6}	Portugal	ND	ND	ND	61	W. blood	<i>polA</i> gene	C+NTT+FTATT	14/61	ND
							(<i>tpp47</i>)+ <i>polA</i>			
Chung et al. (1994) ^{w40}	Korea	ND	ND	ND	3	CSF	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	2/3	5/5
Flasarova et al (2006) ^{w7}	Czech Rep.	35**	54.1	ND	74	Serum	<i>tppC</i> gene	C+NTT+TT	0/74	ND

Gayet-Ageron (2009) ^{w8}	Switzerland	41.8	87.8	40.5	9	W. blood	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	0/6	3/3
Kouznetsov et al (2005) ^{w12}	Russia	ND	ND	ND	3	Plasma	47KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	0/3	ND
					3	Serum	47KD (<i>tpp47</i>)	C+NTT+TT	0/3	ND
Marfin et al. (2001) ^{w13}	USA	ND	ND	ND	13	W. blood	<i>polA</i> gene	C+NTT+TT	8/13	ND
Marra et al (2004) ^{w14}	USA	37 ^{**}	74.8	72.1	194	CSF	16S rRNA	C+NTT+TT	10/194	ND
Martin et al (2009) ^{w17}	Canada	36 ^{**}	69.1	ND	20	W. blood	<i>polA+bmp</i> +47K	C+NTT+TT	0/8	12/12
							D			
Pietravalle et al (1999) ^{w51}	Italy	ND	ND	ND	29	Serum	<i>bmp</i> gene	C+NTT	6/9	20/20
Rodionova et al (2003) ^{w27}	Russia	ND	ND	ND	42	W. blood	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+DDTP+NTT+TT	8/42	ND
Tipple et al. (2011) ^{w30}	UK	36	98.0	52.5	8	W. blood	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+TT	1/8	ND

<i>Congenital syphilis (N=7)</i>										
First author (year)	Country	Subject	Age	HIV+, %	N	Specimens	PCR target	Gold standard definition	TP/D+	TN/D-
Casal et al. (2011) ^{w64}	Brazil	Mother	21.8	22.2	36	W. blood (DNA)	<i>polA gene</i>	C+NTT+TT	24/33	ND
Genest et al (1996) ^{w65}	USA	Newborn	-	-	49	Placenta (DNA)	47 KD (<i>tpp47</i>)	NTT+TT	6/38	11/11
Grimpel et al (1991) ^{w66}	USA	Newborn	-	-	20	Serum (DNA)	47 KD (<i>tpp47</i>)	RIT	8/9	10/11
						CSF (DNA)	47 KD (<i>tpp47</i>)	RIT	3/7	11/11
		Mother	ND	ND	12	Amniotic fluid (DNA)	47 KD (<i>tpp47</i>)	DDTP+RIT	8/8	3/4
Hollier et al (2001) ^{w67}	USA	Mother	22.3	ND	20	Amniotic fluid (DNA)	<i>polA gene</i>	C+DDTP+RIT	9/12	8/8
Martin et al (2009) ^{w17}	Canada	Newborn	-	-	3	Cord blood (DNA)	47 (<i>tpp47</i>)+ <i>bmp</i> + <i>polA</i> <i>genes</i>	KD C+NTT+TT	1/3	ND
Michelow et al (2002) ^{w68}	USA	Newborn			76	Cord blood (DNA)	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+RIT+NTT+TT	16/17	53/59
						CSF (DNA)	47 KD (<i>tpp47</i>)	C+RIT+NTT+TT	11/17	57/59

Sanchez et al (1993) ^{w69}	USA	Newborn	-	-	19	Serum (DNA)	47 KD (<i>tpp47</i>)	C++NTT+TTC+RIT+NTT	6/7	10/12
						CSF (DNA)	47 KD (<i>tpp47</i>)		5/6	12/12

*Age in mean; DNA: amplification on DNA; cDNA: amplification from an initial RNA sample; TP: true positives, D+: syphilis diagnosed by the reference test (TP/D+ = sensitivity), TN: true negatives, D-: no syphilis (TN/D- = specificity), **Median age, ND: not done, C: clinical signs, DDTP: direct detection of *T. pallidum* (animal infectivity testing, dark field microscopy, direct fluorescent antibody test for *T. pallidum*), NTT: non treponemal tests (VDRL, RPR, TRUST), TT: treponemal tests (FTA-ABS, MHA-TP), RIT: rabbit infectivity testing, CSF: cerebrospinal fluid. ***Data provided by the authors, different from those published in the paper.

References

- w1. Ahmed HJ, Mbwana J, Gunnarsson E, et al. Etiology of genital ulcer disease and association with human immunodeficiency virus infection in two Tanzanian cities. *Sex Transm Dis* 2003;30(2):114-119.
- w2. Alessi E, Ghislanzoni M, Scioccati L, et al. Polymerase chain reaction: A useful adjunct to the diagnosis of syphilis. Technical note and preliminary results. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia* 2004;139(1):75-80.
- w3. Ballard RC, Koornhof JH, Chen CY, et al. The influence of concomitant HIV infection on the serological diagnosis of primary syphilis in southern Africa. *South African Medical Journal* 2007;97(11 III):1151-1154.
- w4. Behets FM, Andriamiadana J, Randrianasolo D, et al. Chancroid, primary syphilis, genital herpes, and lymphogranuloma venereum in Antananarivo, Madagascar. *J Infect Dis* 1999;180(4):1382-5.
- w5. Beyrer C, Jitwatcharanan K, Natpratan C, et al. Molecular methods for the diagnosis of genital ulcer disease in a sexually transmitted disease clinic population in Northern Thailand: Predominance of herpes simplex virus infection. *J Infect Dis* 1998;178(1):243-246.
- w6. Castro R, Prieto E, Aguas MJ, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Lisbon, Portugal. *J Clin Microbiol* 2009;47(8):2510-2.
- w7. Flasarova M, Smajs D, Matejkova P, et al. Molecular detection and subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in clinical specimens. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2006;55(3):105-11.
- w8. Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trellu L, et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. *Sex Transm Inf* 2009;85(4):264-269.

- w9. Grange PA, Gressier L, Dion PL, et al. Evaluation of a PCR test for the detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. *J Clin Microbiol* 2012.
- w10. Heroldova M, Woznicova V. *PolA* PCR in syphilis diagnostic. *Clin Microbiol Infect* 2004;10(Suppl 3):643.
- w11. Heymans R, van der Helm JJ, de Vries HJ, et al. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol* 2010;48(2):497-502.
- w12. Kouznetsov AV, Weisenseel P, Trommler P, et al. Detection of the 47-kilodalton membrane immunogen gene of *Treponema pallidum* in various tissue sources of patients with syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;51(2):143-145.
- w13. Marfin AA, Liu H, Sutton MY, et al. Amplification of the DNA polymerase I gene of *Treponema pallidum* from whole blood of persons with syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;40(4):163-166.
- w14. Marra CM, Maxwell CL, Smith SL, et al. Cerebrospinal fluid abnormalities in patients with syphilis: association with clinical and laboratory features. *J Infect Dis* 2004;189(3):369-376.
- w15. Martin IE, Tsang RS, Sutherland K, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* strains in western Canada: predominance of 14d subtypes. *Sex Transm Dis* 2010;37(9):544-8.
- w16. Martin IE, Gu W, Yang Y, et al. Macrolide resistance and molecular types of *Treponema pallidum* causing primary syphilis in Shanghai, China. *Clin Infect Dis* 2009;49(4):515-21.
- w17. Martin IE, Tsang RS, Sutherland K, et al. Molecular characterization of syphilis in patients in Canada: azithromycin resistance and detection of *Treponema pallidum* DNA in whole-blood samples versus ulcerative swabs. *J Clin Microbiol* 2009;47(6):1668-73.

- w18. Mertz KJ, Weiss JB, Webb RM, et al. An investigation of genital ulcers in Jackson, Mississippi, with use of a multiplex polymerase chain reaction assay: High prevalence of chancroid and human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1998;178(4):1060-1066.
- w19. Mertz KJ, Trees D, Levine WC, et al. Etiology of genital ulcers and prevalence of human immunodeficiency virus coinfection in 10 US cities. The Genital Ulcer Disease Surveillance Group. *J Infect Dis* 1998;178(6):1795-8.
- w20. Moodley P, Sturm PD, Vanmali T, et al. Association between HIV-1 infection, the etiology of genital ulcer disease, and response to syndromic management. *Sex Transm Dis* 2003;30(3):241-5.
- w21. Muller H, Eisendle K, Brauning W, et al. Comparative analysis of immunohistochemistry, polymerase chain reaction and focus-floating microscopy for the detection of *Treponema pallidum* in mucocutaneous lesions of primary, secondary and tertiary syphilis. *Br J Dermatol* 2010;165(1):50-60.
- w22. Orle KA, Gates CA, Martin DH, et al. Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. *J Clin Microbiol* 1996;34(1):49-54.
- w23. Palmer HM, Higgins SP, Herring AJ, et al. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sex Transm Infect* 2003;79(6):479-483.
- w24. Paz-Bailey G, Sternberg M, Puren AJ, et al. Determinants of HIV type 1 shedding from genital ulcers among men in South Africa. *Clin Infect Dis* 2010;50(7):1060-7.
- w25. Pope V, Fox K, Liu H, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* from North and South Carolina. *J Clin Microbiol* 2005;43(8):3743-3746.

- w26. Riedner G, Rusizoka M, Hoffmann O, et al. Baseline survey of sexually transmitted infections in a cohort of female bar workers in Mbeya Region, Tanzania. *Sex Transm Infect* 2003;79(5):382-7.
- w27. Rodionova EN, Gushchin AE, Shipulin GA, et al. Detection of *Treponema pallidum* DNA and RNA in clinical material from patients with syphilis at different stages. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2003(3):43-50.
- w28. Scott LJ, Gunson RN, Carman WF, et al. A new multiplex real-time PCR test for HSV1/2 and syphilis: an evaluation of its impact in the laboratory and clinical setting. *Sex Transm Infect* 2011;86(7):537-9.
- w29. Sutton MY, Liu H, Steiner B, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in an Arizona County with increasing syphilis morbidity: Use of specimens from ulcers and blood. *J Infect Dis* 2001;183(11):1601-1606.
- w30. Tipple C, Hanna MO, Hill S, et al. Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection. *Sex Transm Infect* 2011;87(6):479-85.
- w31. Behets FM, Brathwaite AR, Hylton-Kong T, et al. Genital ulcers: etiology, clinical diagnosis, and associated human immunodeficiency virus infection in Kingston, Jamaica. *Clin Infect Dis* 1999;28(5):1086-90.
- w32. Buffet M, Grange PA, Gerhardt P, et al. Diagnosing *Treponema pallidum* in secondary syphilis by PCR and immunohistochemistry. *J Invest Dermatol* 2007;127(10):2345-2350.
- w33. Cornut PL, Sobas CR, Perard L, et al. Detection of *Treponema pallidum* in aqueous humor by real-time polymerase chain reaction. *Ocul Immunol Inflamm* 2011;19(2):127-8.
- w34. Cruz AR, Pillay A, Zuluaga AV, et al. Secondary syphilis in cali, Colombia: new concepts in disease pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4(5):e690.

- w35. Talha E, Juhasz E, Kanizsai S, et al. Molecular detection of *T. pallidum* by PCR in seronegative cases. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2009;56(2):181-189.
- w36. Wenhai L, Jianzhong Z, Cao Y. Detection of *Treponema pallidum* in skin lesions of secondary syphilis and characterization of the inflammatory infiltrate. *Dermatology* 2004;208(2):94-97.
- w37. Zoechling N, Schluepen EM, Soyer HP, et al. Molecular detection of *Treponema pallidum* in secondary and tertiary syphilis. *Br J Dermatol* 1997;136(5):683-686.
- w38. Becker M, Stephen J, Moses S, et al. Etiology and determinants of sexually transmitted infections in Karnataka State, South India. *Sex Transm Dis* 2010;37(3):159-164.
- w39. Bruisten SM, Cairo I, Fennema H, et al. Diagnosing genital ulcer disease in a clinic for sexually transmitted diseases in Amsterdam, The Netherlands. *J Clin Microbiol* 2001;39(2):601-605.
- w40. Chung KY, Lee MG, Lee JB. Detection of *Treponema pallidum* by polymerase chain reaction in the cerebrospinal fluid of syphilis patients. *Yonsei Med J* 1994;35(2):190-197.
- w41. Garcia CP, Grassi CB, Fich SF, et al. Laboratory diagnosis of *Treponema pallidum* infection in patients with early syphilis and neurosyphilis through a PCR-based test. *Rev Chilena Infectol* 2011;28(4):310-315.
- w42. Hoyo C, Hoffman I, Moser BK, et al. Improving the accuracy of syndromic diagnosis of genital ulcer disease in Malawi. *Sex Transm Dis* 2005;32(4):231-7.
- w43. Htun Y, Morse SA, Dangor Y, et al. Comparison of clinically directed, disease specific, and syndromic protocols for the management of genital ulcer disease in Lesotho. *Sex Transm Inf* 1998;74:S23-S28.

- w44. Kingston MA, Higgins SP. Audit of the management of early syphilis at North Manchester General Hospital. *Int J STD AIDS* 2004;15(5):352-4.
- w45. Leslie DE, Azzato F, Karapanagiotidis T, et al. Development of a real-time PCR assay to detect *Treponema pallidum* in clinical specimens and assessment of the assay's performance by comparison with serological testing. *J Clin Microbiol* 2007;45(1):93-96.
- w46. Liu AY, Jiang MJ, Yin YP, et al. Detection of pathogens causing genital ulcer disease by multiplex polymerase chain reaction. *Chinese Medical Sciences Journal* 2005;20(4):273-275.
- w47. Mackay IM, Harnett G, Jeoffreys N, et al. Detection and discrimination of herpes simplex viruses, *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and *Calymmatobacterium (Klebsiella) granulomatis* from genital ulcers. *Clin Infect Dis* 2006;42(10):1431-1438.
- w48. Malonza IM, Tyndall MW, Ndinya-Achola JO, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of single-dose ciprofloxacin versus erythromycin for the treatment of chancroid in Nairobi, Kenya. *J Infect Dis* 1999;180(6):1886-93.
- w49. Morse SA, Trees DL, Htun Y, et al. Comparison of clinical diagnosis and standard laboratory and molecular methods for the diagnosis of genital ulcer disease in Lesotho: Association with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1997;175(3):583-589.
- w50. O'Farrell N, Morison L, Moodley P, et al. Genital ulcers and concomitant complaints in men attending a sexually transmitted infections clinic: implications for sexually transmitted infections management. *Sex Transm Dis* 2008;35(6):545-9.

- w51. Pietravallo M, Pimpinelli F, Maini A, et al. Diagnostic relevance of polymerase chain reaction technology for *T. pallidum* in subjects with syphilis in different phases of infection. *The new microbiologica* 1999;22(2):99-104. 51.
- w52. Risbud A, Chan-Tack K, Gadkari D, et al. The etiology of genital ulcer disease by multiplex polymerase chain reaction and relationship to HIV infection among patients attending sexually transmitted disease clinics in Pune, India. *Sex Transm Dis* 1999;26(1):55-62.
- w53. Sanchez J, Volquez C, Totten PA, et al. The etiology and management of genital ulcers in the Dominican Republic and Peru. *Sex Transm Dis* 2002;29(10):559-67.
- w54. Suntoke TR, Hardick A, Tobian AA, et al. Evaluation of multiplex real-time PCR for detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, *herpes simplex* virus type 1 and 2 in the diagnosis of genital ulcer disease in the Rakai District, Uganda. *Sex Transm Infect* 2009;85(2):97-101.
- w55. Wang QQ, Mabey D, Peeling RW, et al. Validation of syndromic algorithm for the management of genital ulcer diseases in China. *Int J STD AIDS* 2002;13(7):469-74.
- w56. Castro RC, Prieto ES, Santo I, et al. Detection of *Treponema pallidum* by polymerase chain reaction in the CSF of syphilis patients. ISSTD 2005 Amsterdam. Abstract WP-052. Section B9.
- w57. Gordon SM, Eaton ME, George R, et al. The response of symptomatic neurosyphilis to high-dose intravenous penicillin G in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1994;331(22):1469-1473.
- w58. Hay PE, Clarke JR, Taylor-Robinson D, et al. Detection of treponemal DNA in the CSF of patients with syphilis and HIV infection using the polymerase chain reaction. *Genitourinary Med* 1990;66(6):428-432.

- w59. Marra CM, Gary DW, Kuypers J, et al. Diagnosis of neurosyphilis in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 1996;174(1):219-221.
- w60. Molepo J, Pillay A, Weber B, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* strains from patients with neurosyphilis in Pretoria, South Africa. *Sex Transm Inf* 2007;83(3):189-192.
- w61. Moskophidis M, Peters S. Comparison of intrathecal synthesis of *Treponema pallidum*-specific IgG antibodies and polymerase chain reaction for the diagnosis of neurosyphilis. *Zbl Bakt* 1996;283(3):295-305.
- w62. Noordhoek GT, Wieles B, van der Sluis JJ, et al. Polymerase chain reaction and synthetic DNA probes: a means of distinguishing the causative agents of syphilis and yaws? *Infect Immun* 1990;58(6):2011-3.
- w63. Castro R, Prieto E, Aguas MJ, et al. Detection of *Treponema pallidum sp pallidum* DNA in latent syphilis. *Int J STD AIDS* 2007;18(12):842-845.
- w64. Casal CA, Silva MO, Costa IB, et al. Molecular detection of *Treponema pallidum sp. pallidum* in blood samples of VDRL-seroreactive women with lethal pregnancy outcomes: a retrospective observational study in northern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011;44(4):451-6.
- w65. Genest DR, ChoiHong SR, Tate JE, et al. Diagnosis of congenital syphilis from placental examination: Comparison of histopathology, Steiner stain, and polymerase chain reaction for *Treponema palladum* DNA. *Human Pathology* 1996;27(4):366-372.
- w66. Grimpel E, Sanchez PJ, Wendel GD, et al. Use of polymerase chain reaction and rabbit infectivity testing to detect *Treponema pallidum* in amniotic fluid, fetal and neonatal sera, and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1991;29(8):1711-1718.
- w67. Hollier LM, Harstad TW, Sanchez PJ, et al. Fetal syphilis: clinical and laboratory characteristics. *Obstet Gynecol* 2001;97(6):947-53.

- w68. Michelow IC, Wendel GD, Jr., Norgard MV, et al. Central nervous system infection in congenital syphilis. *N Engl J Med* 2002;346(23):1792-1798.
- w69. Sanchez PJ, Wendel GD, Jr., Grimprel E, et al. Evaluation of molecular methodologies and rabbit infectivity testing for the diagnosis of congenital syphilis and neonatal central nervous system invasion by *Treponema pallidum*. *J Infect Dis* 1993;167(1):148-57.

X.3 Annexe C : Papier relatif au chapitre V

Use of *Treponema pallidum* PCR in testing of ulcers for diagnosis of primary syphilis.

Gayet-Ageron A, Sednaoui P, Lautenschlager S, Ferry T, Toutous-Trellu L, Cavassini M, Yassir F, Martinez de Tejada B, Emonet S, Combescure C, Schrenzel J, Perneger T.

Em Inf Inf 2015;21(1): 127-129.

Use of *Treponema pallidum* PCR in Testing of Ulcers for Diagnosis of Primary Syphilis¹

Angèle Gayet-Ageron, Patrice Sednaoui, Stephan Lautenschlager, Tristan Ferry, Laurence Toutous-Trellu, Matthias Cavassini, Fatima Yassir, Begoña Martinez de Tejada, Stéphane Emonet, Christophe Combescure, Jacques Schrenzel, and Thomas Perneger

Treponema pallidum PCR (*Tp*-PCR) has been noted as a valid method for diagnosing syphilis. We compared *Tp*-PCR to a combination of darkfield microscopy (DFM), the reference method, and serologic testing in a cohort of 273 patients from France and Switzerland and found the diagnostic accuracy of *Tp*-PCR was higher than that for DFM.

Incidence of syphilis, caused by *Treponema pallidum*, has increased steadily worldwide since the early 2000s, especially in at-risk populations (1). The US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recently updated the definitions for confirmed cases of primary and secondary syphilis and now considers *Treponema pallidum* PCR (*Tp*-PCR) to be a valid diagnostic method along with darkfield microscopy (DFM) (2), which is still considered the reference test (although it remains imperfect) (3). In diagnosis of sexually transmitted ulcerative disease, a positive DFM result confirms syphilis because other *T. pallidum* subspecies are not sexually transmitted and have a different geographic distribution. However, the meaning of a negative DFM result is more uncertain. Samples from up to 20% of case-patients with syphilis may show negative DFM results when the test is performed by technicians who are not fully trained or when it is performed in suboptimal conditions (3). *Tp*-PCR is clinically useful for testing of ulcers or skin lesions in areas where syphilis prevalence is high (4), but uncertainties remain because of the variability in the reference tests used in the different diagnostic studies. Moreover, the risk for misclassification by DFM diminishes the apparent value of *Tp*-PCR when DFM is the reference test because samples from syphilis patients that

yield a negative DFM result, but a positive *Tp*-PCR result, are currently considered false-positive.

We conducted a multicenter study in France and Switzerland to evaluate the accuracy of *Tp*-PCR compared with DFM and serologic testing. To resolve the difficulty of assessing a new diagnostic test against an imperfect standard, in addition to the standard DFM diagnostics, we used an enhanced definition for the diagnosis of syphilis that combines clinical information with DFM, serologic testing, or both, to enable a fair assessment to be made of the diagnostic performance of *Tp*-PCR.

The Study

We conducted a multicenter, prospective, observational study during September 2011–September 2013 in 5 centers in Switzerland and France (online Technical Appendix, <http://wwwnc.cdc.gov/EID/article/21/1/14-0790-Techapp.pdf>). All patients who had a genital, anal, or oral ulcer suggestive of syphilis after having at-risk sexual intercourse were invited to participate in the study. We used 3 definitions that would indicate a diagnosis of syphilis: 1) positive DFM results (5); 2) a combination of nontreponemal and/or treponemal tests as recommended by CDC (2) (if possible, samples that had negative results on a first nontreponemal assay underwent a second test to identify seroconversion [6]); and 3) an enhanced definition combining clinical information suggestive of syphilis and results from DFM and serologic testing. The diagnosis of syphilis was established by positive DFM results or negative DFM results combined with positive serologic tests as defined by the second definition, plus a clinical outcome and a drop in nontreponemal titers in response to treatment.

Clinicians collected ulcer specimens in a standardized manner. All samples were then sent to the bacteriology laboratory at the University of Geneva Hospitals, where all *Tp*-PCR testing was performed by using a previously published protocol (7) and interpreted without knowledge of the patient's clinical or serologic status.

We recruited 273 patients from the 5 centers: 140 from Paris, France; 59 from Lyon, France; 40 from Geneva, Switzerland; 17 from Lausanne, Switzerland; and 17 from Zurich, Switzerland. Patients had a mean age of 39.0 years (SD 12.2); most (252, 92.3%) were men. Mean delay from ulcer appearance to date of first medical visit was 20.4 days

Author affiliations: University of Geneva Hospitals and Faculty of Medicine, Geneva, Switzerland (A. Gayet-Ageron, L. Toutous-Trellu, B. Martinez de Tejada, S. Emonet, C. Combescure, J. Schrenzel, T. Perneger); Institut Alfred Fournier, Paris, France (P. Sednaoui); Triemlihospital, Zurich, Switzerland (S. Lautenschlager); Hospices civils de Lyon, Lyon, France (T. Ferry, F. Yassir); and Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland (M. Cavassini)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2101.140790>

¹Preliminary results from this study were presented at the 53rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, September 10–13, 2013, Denver, Colorado, USA.

Table 1. Summary of the various indices of performance of *Tp*-PCR compared with DFM, serologic testing, or an enhanced definition for diagnosis of primary syphilis*

Reference testing	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Likelihood ratio (95% CI)		κ coefficient (95% CI)	Post-test probability (95% CI)	
			Positive	Negative		If <i>Tp</i> -PCR is positive (PPV)	If <i>Tp</i> -PCR is negative (1 – NPV)
DFM, n = 170	93.8% (79.2%–99.2%)	90.6% (84.4%–94.9%)	9.95 (5.89–16.82)	0.07 (0.02–0.26)	0.74 (0.62–0.87)	69.8% (53.9%–82.8%)	1.6% (0.2%–5.6%)
Serologic, n = 239	78.5% (68.4%–86.5%)	93.4% (88.2%–96.8%)	11.84 (6.44–21.77)	0.23 (0.16–0.35)	0.73 (0.64–0.82)	87.3% (78.0%–93.8%)	11.9% (7.3%–17.9%)
Enhanced definition, n = 170	87.5% (74.8%–95.3%)	99.2% (95.5%–100.0%)	106.75 (15.11–753.95)	0.13 (0.06–0.27)	0.90 (0.82–0.97)	97.7% (87.7%–99.9%)	4.7% (1.8%–10.0%)

**Tp*-PCR, *Treponema pallidum* PCR; DFM, darkfield microscopy; PPV, positive predictive value; NVP, negative predictive value.

(SD 33.9; n = 132). Most patients were men who have sex with men (n = 185 [71.4%]). Ulcer localization was genital (n = 148, 54.2%), anorectal (n = 98, 35.9%), or oral (n = 27, 9.9%). HIV status was known for 226 patients (82.8%); 53 were HIV positive, and 36 were receiving antiretroviral drug therapy. Nine patients received an initial HIV diagnosis at the time of the diagnostic work-up for syphilis.

DFM results were assessed for 170 patients (62.3%); 32 had positive results (18.8%). Results for 43 *Tp*-PCR specimens were positive; 13 of these were from patients who had negative DFM results. The proportion of negative DFM/positive *Tp*-PCR results was significantly higher for the 2 centers where DFM was performed only occasionally (6/15 [40.0%]) than for centers who performed DFM more often (7/155 [4.5%]; $p < 0.001$). The diagnostic performance of *Tp*-PCR against DFM was high (Table 1), and agreement between the 2 tests was substantial.

Specimens from 255 patients underwent serologic testing; 88 patients had positive results, and 16 patients had undetermined results. Results for *Tp*-PCR were less sensitive and had a lower negative predictive value when serologic tests results were used as reference than when DFM results were used as reference (Table 1). Under the enhanced definition, however, 16 patients who had negative DFM results were considered to have syphilis, and *Tp*-PCR provided higher specificity and positive predictive value when compared with this definition than when compared to either DFM or serologic test results alone (Table 1). When DFM was assessed against *Tp*-PCR and the enhanced definition (Table 2), DFM sensitivities were consistently lower. Additional results are shown in the online Technical Appendix.

Conclusions

Our results demonstrate that *Tp*-PCR has a high degree of accuracy for the definitive diagnosis of primary syphilis from lesion exudate or tissue. As expected, the clinical value of this test appeared sensitive to the choice of reference test but was hampered by misclassification errors from DFM. By definition, any discrepancy between *Tp*-PCR and DFM results has been considered primarily an error in *Tp*-PCR. However, this assumption may not always be accurate.

The reliability of DFM in our study was strongly associated with routine performance. We classified cases with negative DFM results, positive serologic results, and a clinical picture evocative of syphilis as false negatives of the DFM. When we used this definition as a reference, the diagnostic performance of *Tp*-PCR appeared higher, indicating that *Tp*-PCR has a high clinical usefulness either for confirming or for ruling out a suspicion of syphilis.

The strengths of our study are its prospective and multicenter design and the performance of *Tp*-PCR in a unique laboratory. The study sample was also representative of patients who may benefit from *Tp*-PCR in the future. The main limitation was the lack of a standard protocol for serologic testing, which could have affected the validity of some analyses. However, we attempted to minimize inter-center variability by using a blind assessment of all serologic assays by 2 experts.

Our results concur with those of Grange et al., who reported that *Tp*-PCR provides better sensitivity/specificity than DFM when compared with clinical suspicion of syphilis (8). Similarly, Heymans et al. estimated 87.0% sensitivity and 93.1% specificity of *Tp*-PCR compared with DFM (9).

Table 2. Summary of the various indices of performance of DFM compared with *Tp*-PCR or an enhanced definition for diagnosis of primary syphilis*

Reference testing, n = 170	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Likelihood ratios (95% CI)		κ coefficient (95% CI)	Post-test probability (95% CI)	
			Positive	Negative		If <i>Tp</i> -PCR is positive (PPV)	If <i>Tp</i> -PCR is negative (1 – NPV)
<i>Tp</i> -PCR	69.8% (53.9%–82.8%)	98.4% (94.4%–99.6%)	44.30 (11.05–177.68)	0.31 (0.20–0.48)	0.74 (0.62–0.87)	93.8% (79.2%–99.2%)	9.4% (5.6%–15.4%)
Enhanced definition	66.7% (51.6%–79.6%)	100.0% (96.9%–100.0%)	163.33 (10.2–2615.37)	0.33 (0.22–0.50)	0.74 (0.62–0.86)	100.0% (89.3%–100.0%)	11.6% (7.3%–18.0%)

**Tp*-PCR, *Treponema pallidum* PCR; DFM, darkfield microscopy; PPV, positive predictive value; NVP, negative predictive value.

Currently, DFM is less often used in routine testing than it has been in the past (10). A survey of infectious diseases specialists found that 56% have systematically performed a rapid plasma reagin test before starting treatment for syphilis (10). Only 18% repeated the test if results were negative (10), and just 2% applied direct syndromic management (11). These numbers demonstrate a lack of consensus in the decision-making process used by experts and suggest that applying the guidelines for diagnosis of syphilis is difficult in daily practice. Moreover, although serologic testing can provide a background value for the interpretation of future tests and the assessment of treatment response, these results are often noninformative in the early phase of the infection, when up to 30% of tests return false-negative results (12).

In summary, our results confirm that using *Tp*-PCR as the reference diagnostic test for early-phase syphilis may be reasonable (2). Several arguments weigh in favor of *Tp*-PCR. First, *Tp*-PCR was more accurate than DFM when assessed against the enhanced definition in our study. Second, high-quality readings of DFM are difficult to obtain (3), especially when the test is not routinely performed. Finally, the *Tp*-PCR test relies less on human expertise than DFM, which may make *Tp*-PCR results more reproducible and testing less costly if it is performed on a routine basis.

Acknowledgments

We thank Rosemary Sudan for editorial assistance; Gisela Getaz-Jimenez and Manuela Tangomo for performing the *Tp*-PCR; Deolinda Alves, Nadia Mzoughi, and Chrystelle Chapolard for help with data collection; and Bernard Hirschel and Béatrice Ninet for their advice concerning the study design. We also thank Fatiha Abed, Juan Ambrosioni, Caroline Barde, Philippe Brossard, Alexandra Calmy, Laura Ciaffi, Basile Darbellay, Donato Ferrara, Telma Maria Fok Lee Da Silva, Emmanuelle Grau, Caroline Huber, Olivier Julien, Emmanuel Laffitte, Marthe Thanh Lecompte, Damjan Nikolic, Frédéric Poffet, Sandrine Quenan, Maral Sahil, Manuel Schibler, Florence Theintz, Béatrice Trigona, Diem-Lan Vu-Cantero, Nasstasja Wassilew, C. Chapuis-Taillard, Olivier Clerc, François-Régis Duss, Laurence Feldmeyer, Stefano Giulieri, Manuel Jocallaz, I. Luchsinger, R. Kasper, Vera König, D. Reinhardt, and M. Sigg for their voluntary support regarding the recruitment of patients or their help in study implementation.

Financial support for this study was provided by the Research and Development Fund of the University of Geneva Hospitals (4-2012-II).

Dr. Gayet-Ageron is a medical doctor and researcher in the Division of Clinical Epidemiology and Infection Control Program of the University of Geneva Hospitals and Faculty of Medicine, Geneva, Switzerland. Her primary research interest is epidemiology and clinical research in the field of infectious diseases.

References

1. Torrone EA, Bertolli J, Li J, Sweeney P, Jeffries WL, Ham DC, et al. Increased HIV and primary and secondary syphilis diagnoses among young men—United States, 2004–2008. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;58:328–35.
2. Council of State and Territorial Epidemiologists. Update to public health reporting and national notification for syphilis. 2014 [cited 2014 May 30]. <http://c.ymcdn.com/sites/www.cste.org/resource/resmgr/PS/13-ID-04.pdf>
3. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8:1–21.
4. Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger TV, Combescure C. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect*. 2013;89:251–6.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *MMWR Recomm Rep*. 1997;46:1–55.
6. French P. Syphilis. *BMJ*. 2007;334:143–7.
7. Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trellu L, Lautenschlager S, Furrer H, Piguet V, et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. *Sex Transm Infect*. 2009;85:264–9.
8. Grange PA, Gressier L, Dion PL, Farhi D, Benhaddou N, Gerhardt P, et al. Evaluation of a PCR test for the detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. *J Clin Microbiol*. 2012;50:546–52.
9. Heymans R, van der Helm JJ, de Vries HJ, Fennema HS, Coutinho RA, Bruisten SM. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol*. 2010;48:497–502.
10. Dowell D, Polgreen PM, Beekmann SE, Workowski KA, Berman SM, Peterman TA. Dilemmas in the management of syphilis: a survey of infectious diseases experts. *Clin Infect Dis*. 2009;49:1526–9.
11. Workowski KA, Berman S; Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases. Treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010;59:1–110.
12. Hart G. Syphilis tests in diagnostic and therapeutic decision making. *Ann Intern Med*. 1986;104:368–76.

Address for correspondence: Angèle Gayet-Ageron, Division of Clinical Epidemiology, University of Geneva Hospitals, 6 rue Gabrielle Perret-Gentil, 1211 Geneva 14, Switzerland; email: angele.gayet-ageron@hcuge.ch



Sign up to receive email announcements when
a new article is available.

Get an online subscription at wwwnc.cdc.gov/eid/subscribe.htm

Use of *Treponema pallidum* PCR in Testing of Ulcers for Detection of Primary Syphilis

Technical Appendix

Methods

Study design, setting and study population

We conducted a multicenter, prospective, observational study between September 2011 and September 2013 in five European centers: a sexually-transmitted diseases (STD) outpatient clinic in Paris, France; the STD and infectious diseases outpatient clinics at a tertiary hospital in Lyon, France; the STD and gynecology outpatient clinics at a tertiary hospital in Geneva, Switzerland; the dermatology and infectious diseases outpatient clinics at a tertiary hospital in Lausanne, Switzerland; and the dermato-venereology outpatient clinic at a tertiary hospital in Zurich, Switzerland.

The study protocol was approved by the local institutional review boards and was exempted from approval in France since it was considered as non-interventional. All patients provided written consent before inclusion.

Diagnosis of syphilis

We used three case definitions of syphilis as described in the main paper. The confirmed case was based on dark-field microscopy (DFM) routinely performed by the same two investigators (PS and SL) in two centers (Paris and Zurich), but was occasionally performed by the physicians in charge of patients in two others (Geneva and Lausanne). In the two centers where DFM was performed occasionally, the current study served as a way to maintain the knowledge of young physicians regarding the performance of DFM.

The probable syphilis case definition was based on the combination of the Venereal Diseases Research Laboratory test (VDRL) or rapid plasma reagin (RPR) alone or combined with a microhemagglutination assay for antibodies to *T. pallidum* (MHA-TP), a fluorescent treponemal antibody-absorbed test [FTA-ABS], or enzyme immune-assay (EIA). The sequence

of nontreponemal and treponemal assays was left to the physician's discretion. Syphilis was diagnosed if VDRL or RPR was reactive and combined with positive MHA-TP or FTA-ABS in the absence of syphilis history. Positive EIA led to a diagnosis of syphilis if combined with reactive VDRL/RPR plus positive MHA-TP or FTA-ABS. Interpretation of serology was performed by two independent experts (PS and SL) and disagreement was resolved by consensus.

Other diagnoses for STD ulcers

Other diagnostic tests could be ordered to diagnose a STD ulcer, such as *herpes simplex* culture, immunofluorescence or PCR, *Chlamydia trachomatis* PCR, *Neisseria gonorrhoeae* culture or PCR, and identification of *Haemophilus ducreyi* on culture.

DNA extraction from ulcer swabs and real-time *Tp*-PCR

Clinicians were instructed to collect ulcer specimens by first gently removing necrotic material or crusts from the lesions with sterile gauze, then gently expressing the clear exudate from the ulcer. The exudate was then adsorbed on Dacron swabs and sent directly to the bacteriology laboratory at the University of Geneva Hospitals in 3mL of universal transport medium (Copan International, Murrieta, CA, USA). Samples collected in French centers were frozen at -20°C and shipped on dry ice. All *Tp*-PCRs were performed in Geneva following a previously published protocol (1). The result of *Tp*-PCR (primary outcome) was expressed as a binary result (positive/negative). We performed three technical replicates for each clinical sample and obtained three cutoff positive cycle thresholds (C_T). *Tp*-PCR was considered positive if at least two of three C_T were below 40.

Variables collected in the case report form and follow-up

Sociodemographic data, medical history, and clinical data related to the current episode of STD ulcer were anonymously collected in a standardized case report form. Four centers (Geneva, Zurich, Lausanne, and Lyon) provided data on serologic follow-up (VDRL/RPR±MHA-TP) at 3-, 6-, or 12-month intervals after treatment. Treatment response was defined by a 4-fold decline in nontreponemal test titers (2).

Sample size estimation

Based on previous studies, 80% of patients with syphilis will have a positive *Tp*-PCR (3). Therefore, 61 cases of early syphilis were needed to obtain a total width of the 95% confidence interval (CI) of 20% ($80\% \pm 10\%$) (4). We anticipated that 25% of eligible patients would have

syphilis (5,6), which led to a total of 260 patients, assuming 5% missing data. With 200 controls, we expected to estimate a specificity of 90% with a total width of 95% CI of 16% ($90\% \pm 8\%$).

Statistical analysis

The study population was described using mean $\pm$ standard deviation (SD) or median (interquartile range [IQR]) for continuous variables, and frequencies and proportions for categorical variables. Comparisons of continuous variables were done using non-parametric Mann-Whitney tests. Comparisons of categorical variables were done using the Chi-square test.

The diagnostic performance of *Tp*-PCR was assessed with DFM as the reference test. Sensitivity, specificity of *Tp*-PCR, and post-test probabilities regarding syphilis diagnosis (positive predictive value and one minus negative predictive value) were computed together with 95% CIs obtained by the Clopper-Pearson method (7). We calculated also positive and negative likelihood ratios (8). Agreement between *Tp*-PCR and DFM was assessed by kappa coefficients (with exact 95% CIs) and interpreted following the Landis and Koch scale (9). The diagnostic performance of *Tp*-PCR was then assessed with a reference test combining nontreponemal and treponemal tests and agreement was assessed. We also assessed also the diagnostic performance of DFM with 95% CI against *Tp*-PCR and against the enhanced definition.

All statistics were accompanied by their 95% CI. Statistical significance was defined as $p < 0.05$ (two-sided). All analyses were performed using Stata intercooled 13.0 (STATA Corp., College Station, TX, USA).

Results

Complementary diagnoses for ulcerative diseases

Nine patients were concomitantly diagnosed with new HIV infection and seven had negative VDRL/RPR and TPHA. For the two patients with positive serology, syphilis was retained. Ulcers were attributed to HIV for three cases and the rest was attributed to single or a combination of other pathogens (*Chlamydia trachomatis*, $n = 4$; herpes simplex virus type 2, $n = 3$; *Neisseria gonorrhoeae*, $n = 1$).

Among the 32 positive DFM, six were co-infected (18.8%) with other pathogens (*Chlamydia trachomatis*, $n = 2$; herpes simplex virus type 2, $n = 1$; *Neisseria gonorrhoeae*, $n = 1$; *Haemophilus parainfluenzae*, $n = 1$; M or group C *Streptococcus*, $n = 1$). Among the 138 patients

with negative DFM, the diagnosis was herpes simplex virus type 1 or 2 (n = 21; 15.2%), infections with *Chlamydia trachomatis* (n = 13; 9.4%), or *Neisseria gonorrhoeae* (n = 7; 5.1%), and polyinfection (n = 10; 7.2%). Twelve (8.7%) patients with negative DFM were nonetheless treated for syphilis. Among the 88 positive serologic cases, 10 (11.4%) were co-infected with another pathogen. Other diagnoses were herpes simplex virus type 1 or 2 (n = 25; 16.5%), *Chlamydia trachomatis* (n = 9; 6.0%), or *Neisseria gonorrhoeae* (n = 8; 5.3%), and polyinfection (n = 5; 3.3%).

Diagnostic performance of Tp-PCR with DFM as reference test

Among positive *Tp*-PCR, C_T values were similar between patients with positive and negative DFM (median 33.3 versus 33.0, respectively; $p = 0.89$).

Diagnostic performance of Tp-PCR with serology as reference test

A total of 255 patients were tested by serology (Appendix 3). The most frequent combinations were VDRL/RPR plus MHA-TP (n = 137 [53.7%]), VDRL/RPR plus MHA-TP and/or FTA-ABS (n = 46 [18.0%]), reactive EIA (n = 45 [17.6%]) confirmed by VDRL/RPR plus FTA-ABS and/or MHA-TP, and other combinations (n = 27 [10.6%]). The two experts had high agreement in the interpretation of serology results (kappa, 0.88; 95% CI, 0.83–0.93).

Follow-up of patients treated for syphilis

A total of 78 patients were considered by clinicians as having syphilis by either positive DFM or positive serology and were treated. Of these, 62 had a positive *Tp*-PCR (79.5%). Of the 40 patients (51.3%) with serologic follow-up, 87.5% (n = 35) showed a 4-fold decrease in VDRL or RPR titers. Among the 13 patients with negative DFM and positive *Tp*-PCR, seven were treated by intramuscular benzathine-penicillin injections (53.8%) due to a high clinical presumption of syphilis, and five (71.4%) had a 4-fold decline in nontreponemal test titers at 3 months or later signing treatment response.

References

1. Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trellu L, Lautenschlager S, Furrer H, Piguet V, et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. *Sex Transm Infect.* 2009;85:264–9. [PubMed](#)
2. Workowski KA, Berman S; Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases. Treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep.* 2010;59(RR-12):1–110. [PubMed](#)

3. Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger TV, Combescure C. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect.* 2013;89:251–6. [PubMed](#)
4. Hulley S, Cummings S, Browner W, Grady D, Newman T. Estimating sample size and power: applications and examples. In: Wilkins LW, ed. *Designing clinical research*. 3rd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2007: 65–96.
5. Hope-Rapp E, Anyfantakis V, Fouere S, Bonhomme P, Louison JB, de Marsac TT, et al. Etiology of genital ulcer disease. A prospective study of 278 cases seen in an STD clinic in Paris. *Sex Transm Dis.* 2010;37:153–8. [PubMed](#)
6. Lautenschlager S. Sexually transmitted infections in Switzerland: return of the classics. *Dermatology.* 2005;210:134–42. [PubMed](#)
7. Clopper C, Pearson E. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika.* 1934;26:404–13.
8. Simel DL, Samsa GP, Matchar DB. Likelihood ratios with confidence: sample size estimation for diagnostic test studies. *J Clin Epidemiol.* 1991;44:763–70. [PubMed](#)
9. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33:159–74. [PubMed](#)

X.4 Annexe D : Premier papier relatif au chapitre VI

Performance of the 47kDa protein membrane versus DNA polymerase I genes for detection of *Treponema pallidum* by Polymerase Chain Reaction in ulcers.

Gayet-Ageron A, Laurent F, Schrenzel J, Charton B, Jimenez-Getaz G, Tangomo M, Ferry T, Sednaoui P, Lautenschlager S, Toutous-Trellu L, Martinez de Tejada B, Cavassini M, Emonet S, Perneger T, Salord H, and the Swiss-French Collaborative Study Group on *Tp*-PCR.
J Clin Microbiol posted online 17 December 2014. doi: 10.1128/JCM.03444-14.

1 **Performance of the 47kDa membrane protein versus DNA polymerase I**
2 **genes for detection of *Treponema pallidum* by polymerase chain reaction in**
3 **ulcers**

4

5 Angèle Gayet-Ageron^{1#}, Frédéric Laurent², Jacques Schrenzel^{3,4}, Béatrice Charton⁵, Gisela
6 Jimenez-Getaz⁶, Manuela Tangomo⁷, Tristan Ferry⁸, Patrice Sednaoui⁹, Stephan
7 Lautenschlager¹⁰, Laurence Toutous-Trellu¹¹, Begoña Martinez de Tejada¹², Matthias
8 Cavassini¹³, Stéphane Emonet¹⁴, Thomas Perneger¹⁵, Hélène Salord¹⁶

9

10 ¹ Division of Clinical Epidemiology, University of Geneva Hospitals and Faculty of Medicine,
11 Geneva, Switzerland, angele.gayet-ageron@hcuge.ch

12 ² Laboratory of Bacteriology, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon,
13 France, frederic.laurent@univ-lyon1.fr

14 ³ Bacteriology Laboratory and Division of Infectious Diseases, University of Geneva
15 Hospitals, Geneva, Switzerland, Jacques.schrenzel@hcuge.ch

16 ⁴ Genomic Research Laboratory, University of Geneva Hospitals, Geneva, Switzerland,
17 Jacques.schrenzel@hcuge.ch

18 ⁵ Laboratory of Bacteriology, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon,
19 France, beatrice.charton@chu-lyon.fr

20 ⁶ Bacteriology Laboratory and Division of Infectious Diseases, University of Geneva
21 Hospitals, Geneva, Switzerland, Gisela.getaz-jimenez@hcuge.ch

22 ⁷ Genomic Research Laboratory, University of Geneva Hospitals, Geneva, Switzerland,
23 Manuela.tangomo@hcuge.ch

24 ⁸ Service de maladies infectieuses et tropicales, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils
25 de Lyon, Lyon, France, tristan.ferry@chu-lyon.fr

26 ⁹Institut Alfred Fournier, Laboratoire CNR Gonocoques, Paris, France,

27 patrice.sednaoui@institutfournier.fr

28 ¹⁰Triemlispital, Dermatologisches Ambulatorium Triemli, Zürich, Switzerland,

29 Stephan.Lautenschlager@triemli.zuerich.ch

30 ¹¹Department of Dermatology and Venereology, University of Geneva Hospitals and Faculty

31 of Medicine, Geneva, Switzerland, Laurence.trellu@hcuge.ch

32 ¹²Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Geneva Hospitals and Faculty of

33 Medicine, Geneva, Switzerland, begona.martinezdetejada@hcuge.ch

34 ¹³Service de maladies infectieuses, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne,

35 Switzerland, matthias.cavassini@chuv.ch

36 ¹⁴Bacteriology Laboratory and Division of Infectious Diseases, University of Geneva

37 Hospitals, Geneva, Switzerland, stephane.emonet@hcuge.ch

38 ¹⁵Division of Clinical Epidemiology, University of Geneva Hospitals and Faculty of

39 Medicine, Geneva, Switzerland, thomas.perneger@hcuge.ch

40 ¹⁶Laboratory of Bacteriology, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon,

41 helene.salord@chu-lyon.fr

42

43 Submitted to: *Journal of Clinical Microbiology*

44 Intended category: Short Form Paper

45 Word count (excl. abstract): 1001; 3 Tables

46 Running title: Choice of target gene for detection of Syphilis by PCR

47

48 Results from this study were presented at the 24th European Congress of Clinical

49 Microbiology and Infectious Diseases; 10-13 May 2014, Barcelona, Spain, Poster #1757 (13

50 May 2014)

51

52 *Corresponding author:*

53 Angèle Gayet-Ageron, MD, MPH

54 Division of Clinical Epidemiology

55 University of Geneva Hospitals

56 6 Rue Gabrielle Perret-Gentil

57 1211 Geneva 14, Switzerland

58 Tel.: +41 22 372 9027; Fax: +41 22 372 9035

59 E-mail: angele.gayet-ageron@hcuge.ch

60

61 The authors declare no conflict of interest.

62 **Source of funding:** Research and Development Fund of the University of Geneva Hospitals

63 (4-2012-II).

64

65

66 **Abstract**

67 *Treponema pallidum* PCR (*Tp*-PCR) is a direct diagnostic method for primary and secondary
68 syphilis, but there is no recommendation regarding the best target gene. We sequentially
69 tested 272 specimens from sexually-transmitted ulcers with *Tp*-PCR targeting *tpp47* then *polA*
70 genes. The two methods showed similar accuracy and an almost perfect agreement.

71

72

73 **Keywords:** *Treponema pallidum*; polymerase chain reaction; *Tpp47*; polymerase I, DNA;
74 specificity and sensitivity

75

76

77 Syphilis has made its come back worldwide since the early 2000s [1-3] and was reintroduced
78 among notifiable infectious diseases in Switzerland in 2006 [4, 5]. Since 2008 [6, 7], the
79 European guidelines consider *Treponema pallidum* PCR (*Tp*-PCR) as a definitive direct
80 diagnostic tool for primary or secondary syphilis. Similarly, the United States Centers for
81 Disease Control and Prevention (CDC) have changed their case definitions and now consider
82 *Tp*-PCR to confirm early syphilis when clinical manifestations are present [8]. However, no
83 specific gene was recommended as target for *Tp*-PCR. The two most widely used are the
84 *tpp47* and *polA* genes [9]. *Tpp47* encodes for a *T. pallidum* cytoplasmic membrane protein
85 [10] involved in cell wall synthesis [11] but is partly specific to *T. pallidum* subspecies
86 *pallidum* [12-14]. *PolA* encodes DNA polymerase I involved in DNA repair and replication of
87 most bacteria, and shows a number of unique features in *T. pallidum* subspecies *pallidum*
88 [15]. Other targets have been sporadically tested. However, it remains unclear if one of these
89 targets should be preferentially used.

90 We conducted a multicentre, prospective study between 2011 and 2013 in five
91 European cities: Geneva, Lausanne, Zürich in Switzerland; Paris, Lyon in France [16]. Every
92 patient presenting a sexually-transmitted ulcerative disease suggestive of syphilis was invited
93 to participate. Each patient received the conventional diagnostic tests for syphilis [17]: either
94 darkfield microscopy (DFM) or a combination of serological assays: enzyme immunoassay
95 (EIA), Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) or rapid plasma reagin (RPR),
96 treponemal microhemagglutination assay (MHA-TP), or fluorescent treponemal antibody
97 absorption test (FTA-ABS). We distinguished between 1) a *confirmed* case (positive DFM),
98 and 2) a *probable* case (reactive VDRL or RPR and reactive MHA-TP, FTA-ABS or EIA).
99 Finally, we used 3) an “*enhanced definition*” combining clinical information, results from
100 DFM and serology [16]. All patients considered as having syphilis benefited from standard
101 treatment and were followed at 3, 6 and 12 months after treatment. Treatment response was

defined by a 4-fold decline in VDRL or RPR titers [18]. Regarding *Tp*-PCR, ulcer swabs were collected then analyzed sequentially. First, *Tp*-PCR targeting *tpp47* gene (*tpp47-Tp*-PCR) was performed at the laboratory of bacteriology at the Geneva University Hospitals [19, 20]. It was considered positive if two among three replicates had cycle thresholds (C_T) <40. Then, all frozen DNA extracts were sent to Lyon (Department of bacteriology, Hôpital de la Croix-Rousse) where *Tp*-PCR targeting *polA* gene (*polA-Tp*-PCR) was performed using the primers and probes described elsewhere [21]. A single assay of *polA-Tp*-PCR was performed and was considered positive if C_T was <40. The limits of detection of the two *Tp*-PCRs were blindly compared using the same positive control (=mixed DNA from rabbit tissues and *T. pallidum* Nichols strain DNA) at dilution rates from 1/10 to 1/100,000.

During a two-year period, 273 patients were recruited and 272 specimens for *Tp*-PCR were collected (Table 1). Most patients were men presenting a genital ulceration after a mean 20 days following homosexual intercourse. Nine patients were diagnosed with human immunodeficiency virus at the initial consultation. Globally, we obtained 77 concordant-positive and 191 concordant-negative *Tp*-PCRs; two specimens revealed negative *polA-Tp*-PCR, but positive *tpp47-Tp*-PCR, and conversely two had negative *tpp47-Tp*-PCR, but positive *polA-Tp*-PCR. The kappa coefficient was 0.96 (exact 95% confidence interval: 0.93-0.99). The two *Tp*-PCRs had the same indices of diagnostic performance according to the three case definitions (Table 2) ($P=0.99$ for all comparisons, McNemar test). When we considered *Tp*-PCR as positive whenever one of the two *Tp*-PCRs was positive, sensitivity increased, especially in the “enhanced definition” group.

The mean C_T values among all positive *Tp*-PCRs were significantly lower for *polA-Tp*-PCR than for *tpp47-Tp*-PCR (28.3 ± 3.7 versus 32.1 ± 5.6 , $P < 0.001$ using Wilcoxon signed rank test). The limits of detection of the two *Tp*-PCRs were identical at a threshold 1/100,000. Among the four discordant results, none had been examined by DFM and all had clearly

127 positive serology (Table 3). Of note, *Tpp47-Tp*-PCR was considered negative in one patient
128 (one C_T values at 39.0 and two below 40), but whose *polA-Tp*-PCR was clearly positive,
129 which suggests a false-negative *tpp47-Tp*-PCR. All cases with results were treated for syphilis
130 using benzathine penicillin G 2.4 million units intramuscularly and all responded to treatment,
131 suggesting all were true positive cases.

132 We demonstrated that the diagnostic performance of the two currently used targets for
133 *Tp*-PCR were comparable in ulcers, irrespective of the case definition of syphilis. The
134 agreement between the two *Tp*-PCRs was almost perfect [22]. To our knowledge, only one
135 previous study reported a high agreement between *tpp47-Tp*-PCR and *polA-Tp*-PCR on a
136 smaller collection of 112 paired specimens from ulcers suggestive of primary syphilis [23].
137 Another study reported similar sensitivities of three types of *Tp*-PCR (*tpp47-Tp*-PCR, *polA*-
138 *Tp*-PCR, and a combination of the two) in the blood of latent syphilis cases, but did not assess
139 the agreement between the three methods [24]. Our results also confirmed the accuracy and
140 clinical value of *tpp47-Tp*-PCR [25] and *polA-Tp*-PCR [26] in primary syphilis ulcers. The
141 added value of our study is the assessment of the two *Tp*-PCR methods on a large number of
142 paired specimens selected by a standardised procedure. Any discrepancies between the two
143 techniques could not be explained by a difference in DNA extraction, since the testing
144 procedures were rigorous and fully standardized. The two *Tp*-PCR methods had the same
145 analytical limits of detection and thus had comparable sensitivities. However, our study was
146 pragmatic and the mean number of replication cycles performed was higher for *tpp47-Tp*-
147 PCR than for *polA-Tp*-PCR; this could explain why the two discrepancies favoured *tpp47-Tp*-
148 PCR. If two additional replications had been also done for *polA-Tp*-PCR, the chance of a
149 positive result would have been greater.

150 In conclusion, we confirmed that *Tp*-PCR is a useful diagnostic tool in ulcers that evoke
151 primary syphilis and that the results do not depend on the target gene, suggesting that either

152 *tpp47* or *polA* can be used in practice. Combining the results of the two *Tp*-PCRs did not
153 improve drastically the clinical utility of the test. Therefore, the supplementary cost of
154 performing an additional *Tp*-PCR targeting another gene is not justified.

155

156 **Competing interests**

157 All authors declare that they have no competing interests.

158

159 **Financial support**

160 Research and Development Fund of the University of Geneva Hospitals (4-2012-II).

161

162 **Authorship/contributions**

163 AGA designed and coordinated the prospective clinical study, collected and managed data,
164 and performed statistical analysis. PS, SL, LTT, BMT, TF, and MC were responsible or
165 coordinated patient recruitment at their site for the prospective clinical study. SE, JS, GJG and
166 MT were in charge of the technical aspect of the prospective clinical study and were
167 responsible for the interpretation of all PCR assays targeting *tpp47* gene. FL and HS were in
168 charge of the technical aspect of the prospective clinical study and were responsible for the
169 interpretation of all PCR assays targeting *polA* gene. TP supervised the study conduct and
170 gave important advice regarding the interpretation and presentation of results. AGA wrote the
171 paper with important contributions from all co-authors.

172

173

174 **Acknowledgments**

175 We thank Rosemary Sudan for editorial assistance and Christophe Combescure, PhD (Clinical
176 Research Centre, University of Geneva and Geneva University Hospitals) for data analysis
177 and creation of the figures. The authors thank also Deolinda Alves (Centre Hospitalier
178 Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland), Nadia Mzoughi, and Chrystelle Chapolard
179 (Hospices Civils de Lyon, Lyon, France) for help in data collection for the prospective
180 clinical study. The authors are grateful to Juan Ambrosioni, Caroline Barde, Philippe
181 Brossard, Alexandra Calmy, Laura Ciaffi, Donato Ferrara, Emmanuelle Grau, Olivier Julien,
182 Emmanuel Laffitte, Marthe Thanh Lecompte, Damjan Nikolic, Frédéric Poffet, Manuel
183 Schibler, Béatrice Trigona, Diem-Lan Vu-Cantero, and Nasstasja Wassilew (University
184 Hospitals of Geneva, Geneva, Switzerland); C. Chapuis-Taillard, Olivier Clerc, François-
185 Régis Duss, Laurence Feldmeyer, Stefano Giulieri, and Manuel Jocallaz, (Centre Hospitalier
186 Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland); I. Luchsinger, R. Kasper, Vera König, D.
187 Reinhardt, and M. Sigg (Triemlispital, Zürich, Switzerland) for their voluntary support
188 regarding the recruitment of patients or their help in the prospective clinical study
189 implementation. The authors thank Bernard Hirschel and Béatrice Ninet for their advice
190 concerning the study design (University Hospitals of Geneva, Geneva, Switzerland).

191

192

193 **References**

- 194 1. **Leichliter JS, Haderxhanaj LT, Chesson HW and Aral SO.** 2013. Temporal trends in
 195 sexual behavior among men who have sex with men in the United States, 2002 to 2006-
 196 2010. *J Acquir Immune Defic Syndr*; **63**:254-8
- 197 2. **Farhi D, Zizi N, Grange P, Benhaddou N, Gerhardt P, Avril MF, Dupin N.** 2009. The
 198 epidemiological and clinical presentation of syphilis in a venereal disease centre in Paris,
 199 France. A cohort study of 284 consecutive cases over the period 2000-2007. *Eur J*
 200 *Dermatol.* **19**:484-9
- 201 3. **Simms I, Fenton KA, Ashton M, Turner KM, Crawley-Boevey EE, Gorton R, Thomas**
 202 **DR, Lynch A, Winter A, Fisher MJ, Lighton L, Maguire HC, Solomou M.** 2005.
 203 The re-emergence of syphilis in the United Kingdom: the new epidemic phases. *Sex*
 204 *Transm Dis.* **32**:220-6
- 205 4. **Paget WJ, Zimmermann HP.** 1997. Surveillance of sexually transmitted diseases in
 206 Switzerland, 1973-1994: evidence of declining trends in gonorrhoea and syphilis. *Soz*
 207 *Praventivmed.* **42**:30-36
- 208 5. **Low N, Spoerri A and Zwahlen M.** 2008. [Sexuell übertragbare Infektionen (STI) in der
 209 Schweiz 1988 bis 2006]. *Bulletin Bundesamt für Gesundheit*. **8**:140-9
- 210 6. **French P, Gomberg M, Janier M, Schmidt B, van Voorst Vader P and Young H.** 2009.
 211 IUSTI: 2008 European Guidelines on the Management of Syphilis. *Int J STD*
 212 *AIDS*. **20**:300-9
- 213 7. **Janier M, Hegyi V, Dupin N, Unemo M, Tiplica GS, Potocnik M, French P, Patel R.**
 214 2014. 2014 European guideline on the management of syphilis. *J Eur Acad Dermatol*
 215 *Venereol.* **28**: 1581-93

- 216 8. **Council of State and Territorial Epidemiologists (CSTE)**. 2014. Update to Public Health
 217 Reporting and National Notification for Syphilis. Centers for Disease Control and
 218 Prevention, Atlanta, GA
- 219 9. **Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger TV and Combescure C**. 2013.
 220 Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a
 221 systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect.***89**:251-6
- 222 10. **Dallas WS, Ray PH, Leong J, Benedict CD, Stamm LV, Bassford PJ**. 1987.
 223 Identification and purification of a recombinant *Treponema pallidum* basic membrane
 224 protein antigen expressed in Escherichia coli. *Infect Immun.***55**:1106-15
- 225 11. **Ho EL, Lukehart SA**. 2011. Syphilis: using modern approaches to understand an old
 226 disease. *J Clin Invest.* **121**:4584-92
- 227 12. **Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, Gwinn M,**
 228 **Hickey EK, Clayton R, Ketchum KA, Sodergren E, Hardham JM, McLeod MP,**
 229 **Salzberg S, Peterson J, Khalak H, Richardson D, Howell JK, Chidambaram M,**
 230 **Utterback T, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Cotton MD, Fujii C, Garland S,**
 231 **Hatch B, Horst K, Roberts K, Sandusky M, Weidman J, Smith HO, Venter JC.**
 232 1998. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete.
 233 *Science.***281**:375-88
- 234 13. **Centurion-Lara A, Castro C, Shaffer JM, Van Voorhis WC, Marra CM and**
 235 **Lukehart SA**. 1997. Detection of *Treponema pallidum* by a sensitive reverse
 236 transcriptase PCR. *J Clin Microbiol.* **35**:1348-1352
- 237 14. **Miao RM, Fieldsteel AH**. 1980. Genetic relationship between *Treponema pallidum* and
 238 *Treponema pertenue*, two noncultivable human pathogens. *J Bacteriol.***141**:427-9

- 239 15. **Rodes B, Liu H, Johnson S, George R and Steiner B.** 2000. Molecular cloning of a
 240 gene (*poIA*) coding for an unusual DNA polymerase I from *Treponema pallidum*. J Med
 241 Microbiol. **49**:657-67
- 242 16. **Gayet-Ageron A, Sednaoui P, Lautenschlager S, Ferry T, Toutous-Trellu L,**
 243 **Cavassini M, Yassir F, Martinez de Tejada B, Emonet S, Combescure C, Schrenzel**
 244 **J, Perneger T.** 2015 Jan. Use of *Treponema pallidum* PCR in testing of ulcers for
 245 diagnosis of primary syphilis. Emerg Infect Dis. doi: 10.3201/eid2101.140790
- 246 17. **Centers for disease control and prevention (CDC).** 2014. STD Surveillance Case
 247 Definitions. Atlanta, GA
- 248 18. **Centers for disease control and prevention (CDC).** 2010. Sexually Transmitted
 249 Diseases. Treatment Guidelines, 2010. MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**59**:1-116
- 250 19. **Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trellu L, Lautenschlager S, Furrer H, Piguet V,**
 251 **Schrenzel J, Hirschel B.** 2009. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis
 252 from diverse biological samples. Sex Transm Infect.**85**:264-269
- 253 20. **Hsu PL, Chamberlain NR, Orth K, Moomaw CR, Zhang LQ, Slaughter CA, Radolf**
 254 **JD, Sell S, Norgard MV.** 1989. Sequence analysis of the 47-kilodalton major integral
 255 membrane immunogen of *Treponema pallidum*. Infect Immun. **57**:196-203
- 256 21. **Chen CY, Chi KH, George RW, Cox DL, Srivastava A, Rui Silva M, Carneiro F,**
 257 **Lauwers GY, Ballard RC.** 2006. Diagnosis of gastric syphilis by direct
 258 immunofluorescence staining and real-time PCR testing. J Clin Microbiol. **44**:3452-3456
- 259 22. **Landis JR, Koch GG.** 1977. The measurement of observer agreement for categorical
 260 data. Biometrics.**33**:159-74
- 261 23. **Liu H, Rodes B, Chen CY and Steiner B.** 2001. New tests for syphilis: rational design
 262 of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique
 263 regions of the DNA polymerase I gene. J Clin Microbiol.**39**:1941-1946

- 264 24. **Castro R, Prieto E, Aguas MJ, Manata MJ, Botas J, Santo I, Azevedo J, Pereira FL.**
265 2007. Detection of *Treponema pallidum* sp *pallidum* DNA in latent syphilis. Int J STD
266 AIDS.18:842-845
- 267 25. **Grange PA, Gressier L, Dion PL, Farhi D, Benhaddou N, Gerhardt P, Morini JP,**
268 **Deleuze J, Pantoja C, Bianchi A, Lassau F, Avril MF, Janier M, Dupin N.** 2012.
269 Evaluation of a PCR test for the detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. J
270 Clin Microbiol.50:546-52
- 271 26. **Heymans R, van der Helm JJ, de Vries HJ, Fennema HS, Coutinho RA and Bruisten**
272 **SM.** 2010. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis.
273 J Clin Microbiol.48:497-502
274
275

276 **Table 1.** Patient characteristics.

Variables	N=272 patients
Centre, n (%)	
Paris	140 (51.5)
Lyon	59 (21.7)
Geneva	40 (14.7)
Lausanne	17 (6.2)
Zurich	16 (5.9)
Male gender, n (%)	251 (92.3)
Mean age at the time of diagnosis, years ($\pm$ standard deviation [SD])	39.1 ($\pm$ 12.3)
Mean delay since appearance of ulcer, days ($\pm$ SD)	20.4 ($\pm$ 34.0)
Localisation of the ulcer, n (%)	
Penile/vaginal	148 (54.4)
Ano-rectal	97 (35.7)
Oral	27 (9.9)
Route of contamination, n (%)	
Homosexual	184 (71.3)
Heterosexual	70 (27.1)
Unknown	4 (1.6)
Co-infection with human immunodeficiency virus (HIV), n (%)	
Yes	53 (19.5)
No	172 (63.2)
Unknown	47 (17.3)
HIV diagnosis during current episode among HIV-positive, n (%)	9 (17.0)
Patients treated with antiretroviral therapy, n (%)	

Yes	36 (67.9)
No	14 (26.4)
Unknown	3 (5.7)
Other comorbidities, n (%)	
Chronic lymphoid leukemia	1 (0.4)
Diabetes	1 (0.4)
Under corticotherapy	1 (0.4)
Diagnosis of syphilis with the reference tests, n (%)	
Darkfield microscopy	
Positive	31 (18.3)
Negative	138 (81.7)
Serological assays	
Positive	87 (34.2)
Negative	151 (59.5)
Undetermined	16 (6.3)
Enhanced definition	
Positive	47 (27.8)
Negative	122 (72.2)
Combination of DFM and serological assays	
Positive	93 (34.8)
Negative	174 (65.2)

278 **Table 2.** Description of the results of the two *Tp*-PCRs according to the three case definitions, corresponding indices of accuracy and clinical
 279 utility for each *Treponema pallidum* polymerase chain reactions (*Tp*-PCRs) taken separately and combining the results of the two
 280 methods.

	Case definitions	Darkfield microscopy		Serological assays		Enhanced definition	
		(n=169)		(n=254)		(n=169)	
<i>Tp</i> -PCR		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
<i>Tp</i> -PCR targeting either <i>tpp47</i> * or <i>polA</i> gene (identical results)							
Positive		29	13	68	10	41	1
Negative		2	125	19	141	6	121
Accuracy and clinical utility of <i>Tp</i> -PCR targeting <i>tpp47</i> or <i>polA</i> gene* (95%CI)							
Sensitivity		93.6% (78.6-99.2)		77.0% (66.8-85.4)		87.2% (74.3-95.2)	
Specificity		90.6% (84.4-94.9)		93.4% (88.2-96.4)		99.2% (95.5-99.9)	
Positive predictive value		69.1% (52.9-82.4)		87.0% (77.4-93.6)		97.6% (87.4-99.9)	
Negative predictive value		98.4% (94.4-99.6)		87.6% (81.6-91.8)		95.3% (90.1-97.8)	
Positive likelihood ratio		9.9 (5.9-16.8)		11.6 (6.3-21.4)		106.4 (15.1-751.8)	
Negative likelihood ratio		0.07 (0.02-0.27)		0.25 (0.17-0.36)		0.13 (0.06-0.27)	

**Accuracy and clinical utility of *Tp*-PCR combining the results of
the two methods** (95%CI)**

Sensitivity	93.8% (79.2-99.2)	79.6% (69.6-87.4)	97.7% (87.7-99.9)
Specificity	90.6% (84.4-94.9)	93.4% (88.2-96.8)	95.3% (90.0-98.2)
Positive predictive value	69.8% (53.9-82.8)	87.5% (78.2-93.8)	87.5% (74.8-95.3)
Negative predictive value	98.4% (94.4-99.8)	88.7% (82.7-93.2)	99.2% (95.5-99.9)
Positive likelihood ratio	44.3 (11.0-177.7)	7.7 (5.0-12.0)	106.8 (15.1-754.0)
Negative likelihood ratio	0.31 (0.20-0.48)	0.14 (0.08-0.25)	0.13 (0.06-0.27)

281 ^{*} We found the same results with *Tp*-PCR targeting *tpp47* gene and those targeting *polA*. The presence of 2 discrepancies favouring *Tp*-PCR targeting *tpp47* gene and 2
282 discrepancies favouring *Tp*-PCR targeting *polA* gene led to the same results.

283 ^{**} Global results are based on the combination of the results of the two *Tp*-PCRs: if one of the two *Tp*-PCRs or the two *Tp*-PCRs were positive, *Tp*-PCR was globally
284 considered positive.

285

286

287 **Table 3.** Description of the four discordant results between the two types of *Treponema pallidum* polymerase chain reaction (Tp-PCR)

	Case n°1	Case n°2	Case n°3	Case n°4
Centre	Geneva	Geneva	Lyon	Zurich
Results of Tp-PCR (C _T values)				
Targeting <i>tpp47</i> gene	Positive (33.9/33.9/0)	Positive (36.0/35.0/37.0)	Negative	Negative (37.0/0/0)
Targeting <i>polA</i> gene	Negative	Negative	Positive (35.8)	Positive
Results of serological assays				
VDRL/RPR	1:64	1:16	1:32	1:4
MHA-TP	1:20480	1:2560	1:20480	1:10240
FTA-ABS	NA	1:3200	NA	Reactive
EIA	NA	NA	45.06	NA
Localisation of the ulcer	Ano-rectal	Oral	Ano-rectal	Penile
Follow-up after treatment				
Month 3	RPR 1:8, MHA-TP 1:10240	RPR 1, MHA-TP 1:1280	RPR 1:4, MHA-TP 1:10240	RPR 0, MHA-TP 1:160
Month 6	RPR 1, MHA-TP 1:2560	RPR 0, MHA-TP 1:1280	RPR 1:2, MHA-TP 1:10240	NA
Month 12	RPR 0, MHA-TP 1:1280	NA	NA	NA

288 * Three replicates were done for Tp-PCR targeting *tpp47* gene. ** As one replicate among the three was positive, Tp-PCR targeting *tpp47* gene was considered as negative.

289

290 Legend (abbreviations): *tpp47*-*Tp*-PCR: *Tp*-PCR targeting *tpp47* gene; *polA*-*Tp*-PCR: *Tp*-PCR targeting *polA* gene; NA: not available; VDRL:
291 Venereal Diseases Research Laboratory; RPR: rapid plasma reagin; MHA-TP: microhemagglutination assay for antibodies to *Treponema*
292 *pallidum*; FTA-Abs: fluorescent treponemal antibody-absorbed test; EIA: enzyme immunoassay.
293
294
295
296
297
298