

VIROTECH Liquor/CSF Standards

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards Référence : EC022L60

Borrelia IgM Liquor/CSF Standards Référence : EC022L80

CMV IgG Liquor/CSF Standards Référence : EC113L60*

EBV IgG Liquor/CSF Standards Référence : EC102L60

FSME/TBE IgG Liquor/CSF Standards Référence : EC117L60

FSME/TBE IgM Liquor/CSF Standards Référence : EC117L80

HSV 1 (gG1) IgG Liquor/CSF Standards Référence : EC130L60

HSV 2 (gG2) IgG Liquor/CSF Standards Référence : EC131L60

HSV Screen IgG Liquor/CSF Standards Référence : EC108L60

Masern/Measles IgG Liquor/CSF Standards Référence : EC105L60

Masern/Measles IgM Liquor/CSF Standards Référence : EC105L80

Mumps IgG Liquor/CSF Standards Référence : EC106L60

Rubella IgG Liquor/CSF Standards Référence : EC109L60

VZV IgG Liquor/CSF Standards Référence : EC110L60

VZV IgM Liquor/CSF Standards Référence : EC110L80

VZV IgA Liquor/CSF Standards Référence : EC110L40

**Veillez consulter également notre diagnostic céphalorachidien avec un mode
d'emploi séparé pour Rubella IgG EC109L00**

POUR DIAGNOSTIC IN-VITRO UNIQUEMENT

**VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim**

**Tél. : +49-6142-6909-0
Télécopie : +49-6142-966613
<http://www.virotechdiagnostics.com>**



Sommaire

1. Usage prévu.....	3
2. Signification diagnostique	3
3. Principe du test	3
4. Contenu.....	4
5. Stockage et conservation du kit et des réactifs prêts à l'emploi	4
6. Mesures de précaution et mises en garde	4
7. Réalisation du test	4
7.1 Echantillons	4
7.2 Préparation des réactifs	5
7.3 Réalisation du test ELISA VIROTECH	5
7.4 Utilisation de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA	6
8. Interprétation du test	6
8.1 Contrôle du bon fonctionnement du test.....	6
8.2 Evaluation.....	7
8.3 Calcul de l'index d'anticorps IA (avec exemple).....	7
8.4 Interprétation.....	9
8.5 Limites du test.....	9
9. Littérature	10
10. Schéma du déroulement du test	11

1. Usage prévu

Les contrôles étalons pour liquide céphalorachidien sont destinés à l'élaboration d'une courbe d'étalonnage que l'on utilisera pour la mise en évidence d'une synthèse SNC d'anticorps par l'organisme, par examen parallèle de paires de liquide céphalorachidien. On déterminera le quotient – du liquide céphalorachidien et du sérum – spécifique de l'agent pathogène. Le rapport entre ce quotient d'anticorps spécifiques de l'agent pathogène et le quotient d'immunoglobulines globales est l'index d'anticorps (IA).

2. Signification diagnostique

Dans le cas des infections aiguës du système nerveux central (SNC) ainsi que des processus inflammatoires chroniques (sclérose en plaque par exemple), des anticorps spécifiques à l'agent pathogène se forment dans le SNC. Dans le premier cas, il s'agit d'anticorps agissant contre l'agent pathogène. Dans le second cas, une réponse immunitaire intrathécale polyspécifique contre éventuellement plusieurs agents est possible sans présence effective d'agents. (1, 2).

Dans leur majorité, les infections bactériennes du SNC se distinguent par des résultats de l'examen du liquide céphalorachidien hautement pathologiques et plutôt caractéristiques. Le dépistage des infections virales du SNC au moyen du diagnostic du liquide céphalorachidien est fondamentalement possible de deux façons, en fonction du stade de l'infection et du statut immunitaire individuel : soit par dépistage antigénique direct, soit par détermination des anticorps spécifiques à l'agent pathogène. A l'inverse des agents bactériens, il est notoire que la culture des agents viraux est complexe, les procédés alternatifs de détection spécifique à l'agent pathogène impliquant en règle générale une méthodologie rigoureuse. Certes, le dépistage des anticorps spécifiques à l'agent pathogène n'intervient généralement qu'au plus tôt 6 jours après le début de la maladie, mais relève désormais de la routine en matière de diagnostic du liquide céphalorachidien (3).

Les anticorps détectés dans le liquide céphalorachidien (LCR) peuvent aussi bien y être diffusés par le plasma que provenir d'une synthèse du SNC locale (production d'anticorps intrathécale). Pour clarifier une infection du SNC, on peut faire appel à l'indice d'anticorps spécifiques (AI), qui indique le rapport entre le quotient d'anticorps spécifiques et le quotient d'immunoglobulines totales. Nous sommes alors en présence d'une synthèse locale d'anticorps si le quotient d'anticorps spécifiques à l'agent d'une catégorie d'anticorps déterminée est supérieur au quotient d'immunoglobulines totales afférent (vous trouverez des informations détaillées dans notre brochure sur le diagnostic du liquide céphalorachidien).

3. Principe du test

L'anticorps recherché dans le sérum humain et le liquide céphalorachidien forme un immunocomplexe avec l'antigène coaté sur la plaque. Les immunoglobulines non fixées sont éliminées lavage. Le conjugué enzymatique se fixe à cet immunocomplexe. Les immunoglobulines non fixées sont à leur tour éliminées par lavage. Après l'ajout de substrat TMB en solution, l'activité enzymatique (peroxydase) engendre l'apparition d'un colorant bleu qui tourne au jaune lorsque l'on y ajoute la solution d'arrêt.

L'extinction (DO) de la solution colorée est en relation proportionnelle directe avec la concentration de l'anticorps IgG, IgM ou IgA analysé dans le sérum ou le liquide céphalorachidien. Pour détecter une synthèse d'anticorps SNC propres, il est nécessaire de procéder à une quantification des concentrations d'anticorps mesurées et présentes en premier lieu dans les extinctions. Cette fonction est remplie par les séries de sérums étalons à concentrations graduées d'anticorps spécifiques à un agent pathogène, séries permettant d'établir une courbe de référence de façon manuelle ou à l'aide de programmes adéquats, cette courbe permettant la conversion des valeurs de DO déterminées en des unités non dénommées fixées arbitrairement (wME). Pour déterminer ledit index d'anticorps (IA), on effectue un calcul dans lequel interviennent le nombre d'unités de mesure non dénommées (wME) et les concentrations sérologiques ou céphalorachidiennes globales en IgG, IgM ou IgA (voir le calcul de IA au chapitre 8.3). Cet index d'anticorps donne le quotient (d'anticorps spécifiques à un agent pathogène) recherché sous forme d'un multiple ou d'une fraction du quotient global d'immunoglobulines. La valeur est donc indépendante de l'état individuel de fonctionnement de la barrière hémato-méningée. L'index d'anticorps permet de tirer une conclusion sur la présence et l'envergure d'une synthèse SNC propre d'anticorps spécifiques de l'agent pathogène. Cette méthode n'est pas valable en cas de synthèse intrathécale polyspécifique d'immunoglobulines parce que le quotient des IgX totales n'est plus adéquat en tant que paramètre de barrière et qu'il doit être remplacé par ladite valeur seuil (voir le point Calcul du seuil, 7.3.4 B).

4. Contenu

Etalons de quantification des concentrations des anticorps spécifiques de l'agent pathogène, quatre flacons de 1000 µl chacun, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi, 100 wME ; 25 wME ; 6,2 wME ; 1,5 wME (wME = unités arbitraires non dénommées).

5. Stockage et conservation du kit et des réactifs prêts à l'emploi

Stocker le kit à une température comprise entre 2 et 8 °C. La durée de conservation des différents composants est indiquée sur leur étiquette ; la durée de conservation du kit est indiquée sur le certificat de contrôle-qualité.

1. Après avoir détaché les puits individuels nécessaires, remettre les puits restants dans un sachet fermé hermétiquement et contenant un dessiccateur, puis stocker ce sachet à une température comprise entre 2 et 8 °C. Stocker à nouveau les réactifs à une température comprise entre 2 et 8 °C immédiatement après leur utilisation.
2. Le conjugué prêt à l'emploi et le substrat TMB en solution sont photosensibles et doivent donc être conservés à l'abri de toute lumière. Si la solution de substrat se colore suite à une exposition à la lumière, jeter la solution.
3. Prélever uniquement la quantité de conjugué prêt à l'emploi ou de TMB étant nécessaire à la réalisation du test. Si un excédent de conjugué ou de TMB a été prélevé, ne pas le réinjecter dans son récipient, mais l'éliminer.

Matériel	Etat	Conservation	Date de péremption
Echantillons d'essai	Dilué	+2 jusqu'à +8° C	max. 6 h
	Non dilué	+2 jusqu'à +8° C	1 semaine
Contrôles	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Plaque de microtitration	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (conservation dans le sachet fourni avec un sachet d'agent de dessiccation)	3 mois
RF-SorboTech	Non dilué, Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
	Dilué	+2 jusqu'à +8° C	1 semaine
Conjugué	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
Tétraméthylbenzidine (TMB)	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
Tampon de dilution PBS (bleu)	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Solution d'arrêt	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Solution de lavage	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
	Dilué final (prêt à l'emploi)	+2 jusqu'à +25° C	4 semaines

6. Mesures de précaution et mises en garde

1. Les étalons utilisés ont réagi négativement aux tests de détection des anticorps du HIV1, du HIV2, de l'hépatite C ainsi que de l'antigène HBs. Toutefois, tous les échantillons, les échantillons dilués, les étalons, les conjugués et la microplaque doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés comme tels. Les dispositions légales respectives en vigueur pour les laboratoires doivent être appliquées.
2. Les composants contenant des conservateurs, la solution d'arrêt au citrate et la tétraméthylbenzidine (TBM), ont un effet irritant sur la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement les parties du corps touchées à l'eau courante et consulter éventuellement un médecin.
3. Eliminer le matériel et les produits utilisés dans le respect des directives nationales en vigueur.

7. Réalisation du test

Le respect scrupuleux des consignes de travail de VIROTECH Diagnostics est le préalable à obtenir des résultats corrects.

7.1 Echantillons

Le sérum ou le plasma (en l'occurrence, le type d'anticoagulants n'est pas important) peut être utilisé comme matériel à analyser, même lorsque seul le sérum est mentionné dans la notice.

Pour les échantillons sériques, respecter les consignes suivantes :

Les échantillons doivent être préparé directement avant commencer le test.

Lorsque les sérums doivent être conservés pendant une période prolongée, ceux-ci doivent être congelés. Il est déconseillé de décongeler les sérums plusieurs fois.

1. N'utiliser que des sérums frais non inactivés.
2. Ne pas utiliser d'échantillons hyperlipémiques, hémolytiques ou contaminés par des bactéries, ni de sérums à l'aspect trouble (résultats positifs/négatifs faussés).

Pour les échantillons de liquide céphalorachidien, respecter les consignes suivantes :

Toujours effectuer les dilutions de sérum peu de temps avant le test.

Pour les conserver plus longtemps, aliquoter les échantillons de LCR et les congeler à -80 °C pour éviter de les décongeler plusieurs fois.

1. Toujours réaliser les ponctions veineuses et lombaires au même moment ou presque.
2. N'utiliser que des liquides céphalorachidiens limpides, acellulaires et n'étant pas inactivés.
3. Ne pas utiliser de liquides céphalorachidiens contaminés au niveau hémolytique ou microbien, ni de liquides céphalorachidiens à l'aspect trouble.
4. Il est possible d'utiliser un LCR congelé à condition que les conditions stipulées aux points 2 et 3 soient remplies.

7.2 Préparation des réactifs

Le système de diagnostic VIROTECH Diagnostics offre une grande flexibilité, grâce à la possibilité d'utiliser le tampon de dilution et de lavage, le TMP, la solution d'arrêt au citrate ainsi que le conjugué pour tous les paramètres et les lots. Les étalons sont spécifiques aux paramètres et doivent exclusivement être utilisés avec le lot de plaque qui leur est affecté. Le certificat de contrôle-qualité du kit à sérum correspondant donne des indications sur les combinaisons autorisées pour des différents lots de plaque et d'étalons entre eux.

1. Régler l'incubateur à 37 °C et vérifier que cette température règne bien à l'intérieur de celui-ci avant de commencer l'incubation.
2. Amener tous les réactifs à la température ambiante ; ouvrir ensuite l'emballage avec les bandelettes de test.
3. Bien agiter les composants liquides avant leur utilisation.
4. Compléter le concentré de solution de lavage avec de l'eau distillée / déminéralisée pour obtenir 1 litre (au cas où le concentré formerait éventuellement des cristaux, portez-le à température ambiante avant de le diluer et agitez bien avant utilisation).
5. **Diagnostic des IgM : adsorption préliminaire à l'aide de RF-SorboTech.**
Des titrages d'IgG ou des facteurs rhumatismaux élevés peuvent gêner la mise en évidence d'anticorps IgM ou engendrer l'obtention de résultats positifs ou négatifs erronés. **Les sérums doivent être prétraités avec le RF-SorboTech** (agent d'adsorption VIROTECH) (attention : pour les IgM anti-VZV, utiliser le tampon de dilution vert). Pour les contrôles des IgM et pour les étalons, l'adsorption préliminaire est superflue.

7.3 Réalisation du test ELISA VIROTECH

- Par principe, les paires de liquide céphalorachidien ou de sérum doivent être analysées dans la même série, sur une même microplaque.
- Nous recommandons de déposer en double les valeurs à blanc, les sérums standard et les échantillons de LCR.
- Afin de limiter le plus possible les effets de matrice, utiliser le liquide céphalorachidien à une dilution de travail de 1 :2 et le sérum à une dilution de travail de 1 :404. Pour le diagnostic des IgM, il est recommandé de commencer avec une dilution à 1 :101 et, le cas échéant (- dépassement du point contrôle de 100 wME) de terminer avec une dilution de 1 :404. En général, pour le diagnostic de l'IgG, de l'IgM et de l'IgA, il est recommandé d'utiliser deux dilutions pour le LCR et le sérum, p. ex. LCR 1 :2 et 1 :4 ; sérum 1 :101 et 1 :404 pour exclure l'analyse en cas d'excès d'anticorps.
- Pour le diagnostic des IgM, réaliser le traitement préalable au RF-SorboTech (attention : pour les IgM anti-VZV, utiliser le tampon de dilution vert).

1. Pour chaque test, pipeter **100 µl** du **tampon de dilution** (valeur à blanc), des **sérums standard prêts à l'emploi**, (le cas échéant) des **contrôles IA prêts à l'emploi** ou des **contrôles de qualité des sérums** et des **échantillons de LCR et de sérum** dilués.

Dilution de travail pour les échantillons sériques :

IgG : 1 :404 ; (par exemple : 5 µl de sérum + 500 µl de tampon de dilution (1 :101 dilution), puis dilution 1 :4, par exemple 100µl de dilution 1 :101 + 300µl de tampon de dilution)

IgM : 1 :101 ; (par exemple : 10 µl de sérum + 1 ml de tampon de dilution/RF-SorboTech).

IgA : 1 :404 ; ; (par exemple : 5 µl de sérum + 500 µl de tampon de dilution (1 :101 dilution), puis dilution 1 :4, par exemple 100µl de dilution 1 :101 + 300µl de tampon de dilution).

Dilution de travail pour échantillons de LCR : 1 :2; par exemple : 150 µl d'échantillon de LCR + 150 µl de tampon de dilution.

- Après la distribution, incuber à **37 °C** la plaque pendant **30 minutes** (avec couvercle).
- Mettre fin à la période d'incubation par **quatre lavages** effectués chacun à l'aide de **350 à 400 µl de solution de lavage** pour chaque puits. Ne pas laisser de solution de lavage dans les puits, mais en éliminer les derniers restes en tapotant la plaque sur une protection en cellulose étendue à cet effet sur le plan de travail.
- Déposer **100 µl de conjugué prêt à l'emploi** dans tous les puits.
- Incubation des conjugués : **30 minutes à 37 °C** (avec couvercle).
- Mettre fin à l'incubation du conjugué en effectuant **quatre lavages** (voir le point 3).
- Déposer **100 µl de substrat TMB en solution** dans chacun des puits.
- Incubation de la solution de substrat : 30 minutes à 37 °C (avec couvercle, placer dans un endroit sombre).
- Arrêt de la réaction avec le substrat : pipetter **50 µl de solution d'arrêt** dans chacun des puits. Agiter la plaque avec précaution, jusqu'à ce que les liquides se soient complètement mélangés et qu'ils présentent une couleur jaune uniforme.
- Mesurer les extinctions à **450/620 nm** (longueur d'onde de référence 620-690nm). Régler le photomètre de façon à ce que la valeur à blanc mesurée soit déduite de toutes les autres extinctions. La mesure photométrique doit être réalisée **en l'espace d'une heure** à partir de l'ajout de la solution d'arrêt.

Schéma du déroulement du test, voir dernière page

7.4 Utilisation de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA

Tous les tests ELISA de VIROTECH Diagnostics peuvent être effectués à l'aide de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA. L'utilisateur s'engage à procéder à une validation de l'appareil à intervalles réguliers.

VIROTECH Diagnostics recommande la procédure suivante :

- Lors de la mise à disposition de l'appareil ou lorsque des réparations importantes ont été effectuées sur le dispositif de traitement automatisé des tests ELISA, VIROTECH Diagnostics recommande de réaliser la validation du dispositif en se conformant aux directives du fabricant de l'appareil.
- Il est recommandé de contrôler ensuite le dispositif de traitement automatisé des tests ELISA à l'aide du kit de validation (EC250.00). Ce contrôle régulier à l'aide du kit de validation doit être effectué au moins une fois par trimestre.
- Lors de chaque cycle d'essai, les critères de validation du certificat de contrôle-qualité du produit doivent impérativement être remplis.

Cette manière de procéder assure le fonctionnement irréprochable de votre processeur ELISA et sert de plus à la garantie de qualité du laboratoire.

8. Interprétation du test

8.1 Contrôle du bon fonctionnement du test

Pour garantir le fonctionnement optimal du kit, les valeurs de DO du sérum standard IgG-100 UMA, IgM- ou IgA-AK et du sérum standard IgG-6,2 UMA, IgM- ou IgA AK doivent être supérieures aux valeurs minimums indiquées dans le certificat de contrôle de qualité. Si on utilise les contrôles IA, les plages indiquées dans le certificat de contrôle de qualité doivent être atteintes. Sinon (si on n'utilise pas de contrôles IA), la validité du test doit être vérifiée à l'aide des contrôles de qualité des sérums.

a) Valeurs de DO

La DO de la valeur à blanc doit être <0,15.

Les DO des contrôles négatifs doivent être inférieures aux valeurs indiquées dans le certificat de contrôle de qualité, les DO des contrôles positifs et des contrôles cut-off doivent être supérieures aux valeurs indiquées dans le contrôle de certificat de qualité.

b) Unités VIROTECH (UV)

Les unités VIROTECH (UV) définies pour les contrôles cut-off sont de 10 UV. Les UV calculées pour les contrôles positifs doivent se situer dans les limites indiquées dans le certificat de contrôle de qualité.

Si les critères (valeurs de DO, UV) ne sont pas remplis, le test doit être répété.

8.2 Evaluation

Pour le diagnostic du LCR, le calcul au moyen du contrôle cut-off – comme en sérologie – **n'est pas** possible.

Pour quantifier la teneur des paires de sérum et de liquide céphalorachidien en anticorps spécifiques, une courbe de référence est tracée manuellement ou avec des instruments à l'aide des sérums standard IgG, IgM ou IgA-AK. On porte pour cela les valeurs de DO des sérums standard en ordonnée (axe y) et la concentration d'anticorps en wME en abscisse (axe x).

La courbe de référence ainsi créée de façon manuelle ou à l'aide d'instruments (100 wME, 25 wME, 6,2 wME, 1,5 wME) doit posséder une inclinaison suffisante, une origine proche de celle des coordonnées et l'écart de chacun de ses points avec le trajet extrapolé de la courbe doit être acceptable.

Lors de leur lecture sur la courbe, les valeurs de DO des paires de sérum et de liquide céphalorachidien peuvent alors être exprimées wME et de façon correspondante après multiplication par les facteurs de dilution des concentrations de l'anticorps IgG, IgM ou IgA spécifique de l'agent pathogène dans le sérum et le LCR. Pour obtenir des indices d'anticorps d'une valeur plausible, ne pas prendre en compte les valeurs de DO inférieures à 0,05 et les valeurs wME inférieures à 1,5 ou supérieures à 100. Pour les valeurs de DO conduisant à des valeurs supérieures à 100 wME, il est possible d'utiliser une dilution supérieure à 1 :101/1 :404 pour le sérum et une dilution supérieure à 1 :2 pour le liquide céphalorachidien, à condition de tenir compte de cette modification du taux de dilution.

Pour simplifier le calcul de l'IA, VIROTECH propose des logiciels LCR conviviaux.

8.3 Calcul de l'index d'anticorps IA (avec exemple)

Abréviations :

$IgX_{tot.} = IgX$ total (IgG, IgM ou IgA, mg/l)

$IgX_{spéc.} = IgX$ (IgG, IgM ou IgA) spécifique à l'agent pathogène

Q = quotient

Q_{alb} = quotient du taux d'albumine du liquide céphalorachidien et du taux d'albumine du sérum (en mg/l)/nécessaire uniquement en association avec le calcul de la valeur seuil !

8.3.1 $QIgX_{spéc.}$ (quotient d'anticorps spécifiques de l'agent pathogène)

Sérum

- Valeurs de DO lue : 0,700
- Concentration déterminée pour cette valeur, par lecture de la courbe de référence : 3,5 wME
- Dilution : 1:400

Liquide céphalorachidien

- Valeurs de DO lue : 0,500
- Concentration déterminée pour cette valeur, par lecture de la courbe de référence : 2,5 wME
- Dilution : 1:2

$$Q IgX_{spéc.} = \frac{IgX_{spéc.} \text{ LCR (wME)} \times \text{dilution}}{IgX_{spéc.} \text{ sérum (wME)} \times \text{dilution}} = \frac{2,5 \text{ wME} \times 2}{3,5 \text{ wME} \times 400} = 3,6 \times 10^{-3}$$

8.3.2 $QIgX$ (quotient d'immunoglobulines globales : valeur de la chimie clinique)

- $IgX_{LCR} = 33 \text{ mg/l}$
- $IgX_{sérum} = 10000 \text{ mg/l}$

$$QIgX_{tot.} = \frac{IgX_{LCR \text{ tot.}}}{IgX_{sérum \text{ tot.}}} = \frac{33 \text{ mg/l}}{10,000 \text{ mg/l}} = 3,3 \times 10^{-3}$$

8.3.3 Calcul de Q_{SEUIL} (calcul du quotient seuil)

En cas de synthèse supplémentaire polyspécifique intrathécale des immunoglobulines, le quotient des IgX totales ne peut plus être utilisé pour le calcul de l'IA. Il convient alors d'utiliser ledit Q_{LIM} à la place du quotient des IgX totales. Pour cela, il est nécessaires de déterminer également le quotient albumine (valeur de la chimie clinique).

Calcul de la valeur seuil (selon Reiber) :

$$\begin{aligned} Q_{LIM-IgG} &= 0,93 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 6 \times 10^{-6}} - 1,7 \times 10^{-3} \\ Q_{LIM-IgM} &= 0,67 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 120 \times 10^{-6}} - 7,1 \times 10^{-3} \\ Q_{LIM-IgA} &= 0,77 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 23 \times 10^{-6}} - 3,1 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

8.3.4 Calcul de l'index d'anticorps

A. $Q_{IgX} < Q_{LIM}$

L'index d'anticorps (IA) indique le rapport entre le quotient d'anticorps spécifiques de l'agent pathogène et le quotient de l'immunoglobuline totale. Cela permet de mettre en évidence une synthèse d'anticorps spécifiques à l'agent pathogène ainsi que de quantifier celle-ci. Dans ce cas, on utilise le quotient des immunoglobulines totales en tant que paramètre de barrière.

$$IA = \frac{Q_{IgX \text{ spec.}}}{Q_{IgX \text{ tot.}}} = \frac{\frac{IgX \text{ spéc. LCR} \times \text{dilution}}{IgX \text{ spéc. sérum} \times \text{dilution}}}{\frac{IgX \text{ tot. LCR}}{IgX \text{ tot. sérum}}} = \frac{3,6 \times 10^{-3}}{3,3 \times 10^{-3}} = 1,1$$

B. $Q_{IgX} > Q_{LIM}$

Si l'on a par contre une synthèse supplémentaire polyspécifique intrathécale des immunoglobulines, le quotient des immunoglobulines globales ne peut plus être utilisé pour le calcul de la valeur de l'IA, car la synthèse d'anticorps recherchée (et éventuellement présente) peut alors être soit faussée ou même méconnaissable au niveau de son ampleur. Dans ces cas, on calcule (voir la formule) ladite valeur seuil du quotient immunoglobulines à l'aide du quotient albumine supplémentaire à déterminer ou bien on la détermine de façon graphique. Cette valeur seuil sera alors utilisée à la place du quotient d'immunoglobulines mesuré pour le calcul de la valeur de l'IA.

$$IA = \frac{Q_{IgX \text{ spéc.}}}{Q_{Lim}}$$

8.4 Interprétation

IA – Évaluations (4) :

AI : < 0,6	non détectable:	inattendu en théorie, se produit occasionnellement en routine, pas de signification pathologique, recherche d'erreurs recommandée
AI : 0,6 – 1,3	normale :	une production intrathécale d'anticorps est improbable
AI : 1,4 – 1,5	indéterminée :	il est recommandé de tester de nouveau l'échantillon ou de tester une deuxième paire de sérum et de liquide céphalorachidien
AI : >1,5	pathologique :	indice d'une production intrathécale d'anticorps

1. Etant donné qu'au moins quatre résultats différents (anticorps sériques et du LCR en unités de mesure, valeur totale des IgG, IgM ou IgA du sérum et du LCR, albumine du LCR et du sérum en mg/l) entrent dans le calcul de la valeur IA pertinente pour le diagnostic, toutes les erreurs méthodiques et aléatoires s'additionnent ici. Dans le cas le plus désavantageux, une reproduction d'erreurs allant dans la même direction est possible, laquelle pourra le plus probablement être reconnue par une recherche effectuée en double ou mieux par la mesure de deux dilutions d'échantillon distinctes. C'est la raison pour laquelle on considère qu'une valeur seuil d'IA cliniquement pertinente de 1,5 constitue l'indice d'une synthèse locale d'anticorps spécifiques de l'agent pathogène.
2. Normalement, on a pour les anticorps de catégorie IgG, IgM ou IgA spécifiques de l'agent pathogène le même rapport entre le liquide céphalorachidien et le sérum que celui obtenu pour la fraction générale des IgG, IgM ou IgA. Théoriquement, la valeur d'IA à escompter est donc 1,0. Des examens correspondants ont montré que pour tous les anticorps spécifiques d'un agent pathogène, on a une plage de référence allant de 0,6 à 1,3. Des valeurs IA comprises entre 1,4 et 1,5 sont à considérer comme indéterminées. A condition que la qualité d'analyse soit suffisante, on devra considérer toutes les valeurs d'IA individuelles supérieures à 1,5 comme pathologiques et se caractérisant par une synthèse propre du SNC des anticorps spécifiques à un agent pathogène.
3. Les valeurs d'IA inférieures à 0,6 ne sont théoriquement pas possibles et en règle générale, elle indiquent une erreur d'analyse.
4. Sans rapport clinique correspondant, les valeurs d'IA accrues ne permettent pas à elles seules de tirer une conclusion sûre sur la présence de la phase aiguë d'une maladie infectieuse du SNC. Il est possible que les synthèses d'anticorps propres polyspécifiques SNC de la classe des IgG – mais également de la classe des IgM – perdurent dans le temps. En règle générale, les augmentations d'IA IgM sont la preuve de poussées d'infections du SNC. En cas de doutes, une modification significative de la valeur de l'IA correspondant à une évolution du titre est, dans le cas de deuxième détermination, favorable au diagnostic d'une infection du système nerveux central. Un tel contrôle doit impérativement être réalisé sur un autre échantillon de liquide céphalorachidien supplémentaire qui aura été prélevé en quantité suffisante et au terme de l'écoulement d'une durée suffisante. En règle générale, l'indication de celle-ci est cependant uniquement le point de vue clinique.

8.5 Limites du test

1. L'interprétation des résultats sérologiques doit toujours inclure le tableau clinique, les données épidémiologiques et les éventuels autres résultats d'analyses existants.
2. En cas de très hautes concentrations d'anticorps spécifiques d'un agent pathogène dans le liquide céphalorachidien ou le sérum, le risque est que la concentration en antigènes disponible dans les cavités ne soit pas suffisante pour remplir les conditions optimales d'une détermination quantitative des anticorps. Si l'on soupçonne un excédant d'anticorps (tenir compte de la courbe de Heidelberg et du résultat obtenu pour le liquide céphalorachidien total), il faudra alors effectuer une deuxième détermination avec une concentration sérique ou de liquide céphalorachidien plus élevée.

9. Littérature

1. Zimmermann K., Liquordiagnostik, MTA 11 (1996)4 ; 258 - 260
2. Reiber H, Lange P., Virus-spezifische Antikörper in Liquor und Serum. ELISA-Analytik und Auswertung mittels Antikörper-Index und Quotientendiagramm, Lab.med. 15: 204 (1991) 204 - 207
3. Linke E, Zimmermann K: Liquordiagnostik; hauseigene Liquorbroschüre 2003
4. Petereit, Sindern, Wick (2007): Leitlinien der Liquordiagnostik und Methodenkatalog der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie, Springer Verlag, ISBN 978-3-540-39017-6

Préparation des échantillons patients et de la solution de lavage

▼ **Solution de lavage :** ajouter de l'eau distillée/déminéralisée au concentré pour obtenir un volume total d'un litre.

▼ **Dilution du Échantillons IgG/IgA à 1:404**

▼ **Dilution du LCR à 1:2**

Exemple :

1:101: 5 µl de sérum/plasma + 500 µl de tampon de dilution

1:404: 100 µl de sérum dilué 1 :101 + 300 µl de tampon de dilution

150 µl d'échantillon de LCR + 150 µl de tampon de dilution

▼ **Dilution du Échantillons IgM à 1:101/1:404**

▼ **Dilution du LCR à 1:2**

Adsorption du facteur rhumatoïde avec RF

Exemple :

1:101: 5 µl de sérum/plasma + 450 µl de tampon de dilution +1 goutte RF-SorboTech

Incuber pendant 15 minutes à température ambiante.

1:404: 100 µl de mélange sérum /tampon de dilution/RF-SorboTech + 300 µl de tampon de dilution

50 µl de RF-SorboTech + 200 µl de tampon de dilution

225 µl de mélange RF-SorboTech-tampon + 225 µl d'échantillon de LCR

Incuber pendant 15 minutes à température ambiante.

Réalisation du test

