

Diagnostic du liquide céphalo-rachidien

à l'aide d'un Immunoblot

VIROTECH Borrelia in vivo IgG LINE Immunoblot
(Borrelia in vivo IgG LINE-32; Borrelia in vivo IgG LINE-96)

N° de commande: WE222G32; N° de commande: WE222G96

VIROTECH Borrelia in vivo IgM LINE Immunoblot
(Borrelia in vivo IgM LINE-32; Borrelia in vivo IgM LINE-96)

N° de commande: WE222M32; N° de commande: WE222M96

VIROTECH Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot
(Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE-32; Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE-96)

N° de commande: WE223G32; N° de commande: WE223G96

VIROTECH Borrelia Europe IgG LINE Immunoblot
(Borrelia EU IgG LINE-32; Borrelia EU IgG LINE-96)

N° de commande: WE224G32; N° de commande: WE224G96

VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot
(Borrelia EU IgM LINE-32; Borrelia EU IgM LINE-96)

N° de commande: WE224M32; N° de commande: WE224M96

VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot
(Borrelia EU + TpN17 IgG LINE-32; Borrelia EU + TpN17 IgG LINE-96)

N° de commande: WE225G32; N° de commande: WE225G96

POUR DIAGNOSTIC IN-VITRO UNIQUEMENT



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Allemagne

Tél.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Site Internet: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Sommaire

1. Usage	3
2. Réalisation du test.....	3
2.1 Substances d'analyse et préparation des réactifs	3
2.2 Prise en compte de la synthèse intrathécale d'IgG/IgM polyspécifique	4
2.3 Réalisation du Immunoblot	5
3. Évaluation du test.....	5
4. Limites du test.....	5
5. Performances de mesure des concentrations d'IgG du test VIROTECH Borrelia in vivo IgG LINE Immunoblot/ VIROTECH Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE	6
5.1 Sensibilité diagnostique	6
5.2 Sensibilité	6
5.3 Spécificité	6
6. Performances de mesure des concentrations d'IgG du test VIROTECH Borrelia Europe IgG LINE Immunoblot /Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot.....	6
6.1 Sensibilité diagnostique	6
6.2 Sensibilité	7
6.3 Spécificité	7
7. Performances de mesure des concentrations d'IgM du test VIROTECH Borrelia in vivo IgM LINE/ VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot.....	7
7.1 Sensibilité	7
7.2 Spécificité	7
8. Schéma de déroulement du test.....	9

1. Usage

Outre une utilisation dans le diagnostic sérologique de la borréliose de Lyme, les Immunoblots IgG/IgM LINE Immunoblot conviennent aussi à une utilisation dans le diagnostic de la neuroborréliose. Ils servent en complément de la mesure de l'AI à l'aide du test ELISA réalisé en amont à une extension de la détection d'une synthèse propre au SNC (intrathécale) d'anticorps spécifiques dirigés contre *Borrelia burgdorferi* au sens large qui permet alors d'appuyer le diagnostic d'une neuroborréliose. Le Immunoblots peut fournir plus rapidement un résultat pathologique en présence d'une réponse immunitaire (encore) faible (en fonction de la méthode appliquée), notamment dans les cas incertains.

La condition préalable à l'utilisation ciblée de ces systèmes d'analyse diagnostique consiste à obtenir des concentrations d'IgG/IgM totale égales dans le liquide céphalo-rachidien et dans le sérum de chaque patient (cf. point 2.1) et, le cas échéant, à prendre en compte une synthèse intrathécale polyspécifique (cf. point 2.2).

Les tests *Borrelia* LINE avec diagnostic différentiel conviennent aussi à une utilisation dans le diagnostic du liquide céphalo-rachidien en négligeant les bandes d'exclusion (bande TpN17 dans l'IgG et l'EBV-VCA dans l'IgM).

2. Réalisation du test

2.1 Substances d'analyse et préparation des réactifs

Aucun composant supplémentaire n'est nécessaire en plus des Immunoblots *Borrelia* LINE pour procéder à l'analyse.

Les concentrations recommandées d'IgG/IgM totale (IgG/IgM tot.) des échantillons de liquide céphalo-rachidien et de sérum utilisés s'élèvent à 30 mg/l pour l'IgG et à 0,5 mg/l pour l'IgM. Les concentrations d'IgG/IgM totale supérieures doivent être diluées en conséquence.

Le seuil de détection du test *Borrelia* LINE pour le liquide céphalo-rachidien s'élève à 10 mg/l dans l'IgG.

À des concentrations de protéines < 30 mg/l et > 10 mg/l, il n'est possible de se prononcer que de manière restreinte en cas de résultat négatif en raison de la réduction des concentrations de protéines. Une production intrathécale d'anticorps spécifiques ne doit pas être exclue dans ce cas.

La quantité recommandée de 30 mg/l doit être considérée comme une concentration de dilution optimale qui permet aussi de prévenir une sursaturation.

La même recommandation s'applique à l'IgM. Un seuil de détection inférieur de 0,2 mg/l a été défini dans ce cas

Le liquide céphalo-rachidien et le sérum sont dilués à l'aide d'un tampon de dilution/lavage. Le facteur de dilution (FD) est calculé comme suit :

$$\text{FD (LCR)} = \frac{\text{IgG}_{\text{tot. LCR}} \text{ (mg/l)}}{30 \text{ (mg/l)}}$$

$$\text{FD (Sérum)} = \frac{\text{IgG}_{\text{tot. sérum}} \text{ (mg/l)}}{30 \text{ (mg/l)}}$$

Exemple : IgG

$$\text{FD (LCR)} = \frac{60 \text{ mg/l}}{30 \text{ (mg/l)}} = 2$$

= dilution du liquide céphalo-rachidien : 1:2

$$\text{FD (LCR)} = \frac{\text{IgM}_{\text{tot. LCR}} \text{ (mg/l)}}{0,5 \text{ (mg/l)}}$$

$$\text{FD (Sérum)} = \frac{\text{IgM}_{\text{tot. sérum}} \text{ (mg/l)}}{0,5 \text{ (mg/l)}}$$

Exemple : IgM

$$\text{FD (LCR)} = \frac{3,00 \text{ mg/l}}{0,5 \text{ (mg/l)}} = 6$$

= dilution du liquide céphalo-rachidien : 1:6

$$\text{FD (Sérum)} = \frac{27\,000 \text{ mg/l}}{30 \text{ (mg/l)}} = 900$$

= dilution du sérum : 1:900

$$\text{FD (Sérum)} = \frac{750 \text{ mg/l}}{0,5 \text{ (mg/l)}} = 1500$$

= dilution du sérum : 1:1500

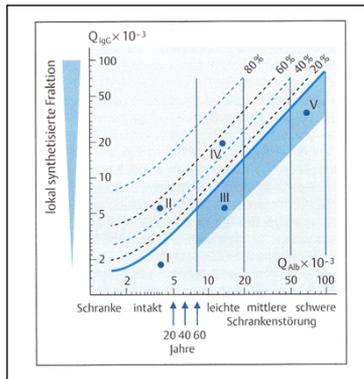
2.2 Prise en compte de la synthèse intrathécale d'IgG/IgM polyspécifique

En présence d'une synthèse intrathécale d'IgG/IgM polyspécifique démontrée, les concentrations mesurées d'IgG/IgM totale dans le liquide céphalo-rachidien ne doivent pas être utilisées pour calculer le facteur de dilution.

Dans ces cas, les concentrations d'IgG/IgM totale dans le liquide céphalo-rachidien ne peuvent être utilisées pour calculer le rapport d'évaporation qu'après la réduction correspondant à la fraction d'IgG/IgM de production intrathécale.

La fraction en pourcentage de synthèse d'IgG/IgM locale peut être reprise dans le diagramme de Reiber de calcul du quotient, la fraction absolue pouvant être calculée selon la formule suivante : $\text{IgX (loc)} = (\text{QIgX} - \text{Qlim(IgX)}) \times \text{IgX sérum (mg/l)}$

Exemple : diagramme de Reiber pour l'IgG



Légende pour l'IgG

I Résultat normal

II Synthèse intrathécale de l'IgG en cas de barrière hépato-encéphalique intacte (ici p. ex. 50 %)

III Léger dysfonctionnement de la barrière (p. ex. méningite virale)

IV Synthèse intrathécale de l'IgG (ici p. ex. 50 %) en cas de léger dysfonctionnement de la barrière (p. ex. SeP)

V Grave dysfonctionnement de la barrière

Exemple:

Les concentrations d'IgG totale dans le liquide céphalo-rachidien (IgG_{tot} LCR) s'élèvent à 60 mg/l et la synthèse locale de l'IgG (fraction d'IgG de production intrathécale) atteint 40 % (d'après le diagramme de Reiber) :

$$\text{Fraction d'IgG de production intrathécale (mg/l)} = \frac{60 \text{ mg/l} \times 40 \%}{100 \%} = 24 \text{ mg/l}$$

$$\text{FD (LCR)} = \frac{\text{IgG}_{\text{tot LCR}} \text{ (mg/l)} - \text{Fraction d'IgG de production intrathécale (mg/l)}}{30 \text{ (mg/l)}} = \frac{60 \text{ mg/l} - 24 \text{ mg/l}}{30 \text{ mg/l}} = 1,2$$

cela signifie qu'il convient ici de diluer le liquide céphalo-rachidien selon un rapport de 1: 1,2 (p. ex. 1,5 ml de LCR + 0,3 ml de tampon de dilution)

Les concentrations d'IgM totale dans le liquide céphalo-rachidien (IgM_{tot} LCR) s'élèvent à 3,5 mg/l et la synthèse locale de l'IgM (fraction d'IgM de production intrathécale) atteint 30 % (diagramme de Reiber) :

$$\text{Fraction d'IgM de production intrathécale (mg/l)} = \frac{3,5 \text{ mg/l} \times 30 \%}{100 \%} = 1,05 \text{ mg/l}$$

$$\text{FD (LCR)} = \frac{\text{IgM}_{\text{tot. LCR}} \text{ (mg/l)} - \text{Fraction d'IgM de production intrathécale (mg/l)}}{0,5 \text{ (mg/l)}} = \frac{3,5 \text{ mg/l} - 1,05 \text{ mg/l}}{0,5 \text{ mg/l}} = 4,9$$

cela signifie qu'il convient ici de diluer le liquide céphalo-rachidien au rapport de 1: 4,9 (p. ex. 1 ml de LCR + 3,9 ml de tampon de dilution ou 0,5 ml de LCR + 1,95 ml de tampon de dilution)

2.3 Réalisation de l'Immunoblot

Veuillez vous reporter au protocole de sérologie avec les VIROTECH Borrelia in vivo IgG/IgM LINE Immunoblot / VIROTECH Borrelia Europe IgG/IgM LINE Immunoblot (Chapitre 8. Réalisation d'un test) pour connaître la suite de la procédure.

Veuillez également vous reporter au point 8 Brève procédure de réalisation d'un test pour des paires sérum/liquide céphalo-rachidien à la fin des présentes instructions.

Les bandelettes de Immunoblot pour l'analyse d'une paire sérum/liquide céphalo-rachidien doivent provenir du même carnet d'immuno-empreintes. Il convient si possible d'utiliser des bandelettes proches pour une paire sérum/liquide céphalo-rachidien et ces deux dernières doivent être traitées au cours d'une série.

À la différence de la réalisation classique des tests LINE, la **durée d'incubation pour le sérum et le liquide céphalo-rachidien** est augmentée à **16 heures**. Il convient de recouvrir le bassin d'incubation de Parafilm afin de prévenir toute évaporation potentielle au cours de cette durée. Toutes les autres étapes sont identiques à celles de la réalisation classique du westernblot VIROTECH. Il convient impérativement de veiller à prévenir toute contamination croisée des échantillons de patient lors du pipetage et du transfert consécutif.

Une analyse de comparaison interne a permis de démontrer la possibilité de réduire la durée d'incubation de 30 minutes pour les paires liquide céphalo-rachidien/sérum (diagnostic d'urgence). Cela entraîne néanmoins une réduction du spectre ainsi que de l'intensité des bandes. Une évaluation est uniquement possible en cas de détection de la synthèse intrathécale d'anticorps dès après cette brève incubation (p. ex. en cas d'échantillons de sérum à haute titration). Une évaluation fiable n'est pas possible en cas de résultat négatif et doit être vérifiée suite à une durée d'incubation de 16 heures. Un temps d'incubation de 16 heures est en principe recommandé de manière standard.

3. Évaluation du test

L'analyse des bandelettes de l'Immunoblot a lieu de manière simplement visuelle. Les bandes spécifiques à la borreliose de la bandelette de liquide céphalo-rachidien sont à cette occasion comparées à celles de la bandelette de sérum.

Une **synthèse intrathécale** des anticorps IgG/IgM spécifiques à la borreliose existe **si** :

- une ou plusieurs bandes sont visibles uniquement sur la bandelette de liquide céphalo-rachidien, mais pas sur la bandelette de sérum
- une ou plusieurs bandes sont nettement plus intenses sur la bandelette de liquide céphalo-rachidien que sur la bandelette de sérum

4. Limites du test

Un résultat ELISA non suspect (valeur d'AI normale ou non calculable) doit être soit confirmé par une analyse supplémentaire à l'aide de l'Immunoblot en cas de persistance d'un soupçon appuyé d'un point de vue clinique relatif à la présence d'une neuroborreliose, soit complété de manière efficace au sens du diagnostic de suspicion.

Une analyse complémentaire avec le Immunoblot est aussi recommandée dans tous les cas soupçonnés de neuroborreliose restant incertains d'un point de vue diagnostique.

Un résultat négatif de l'Immunoblot Borrelia LINE ne signifie néanmoins pas dans tous les cas l'exclusion définitive d'une neuroborreliose. De manière générale, les résultats de Immunoblot ne doivent pas être traités comme un test de confirmation

définitive dans le cadre du diagnostic du liquide céphalo-rachidien et ne doivent être évalués qu'en rapport avec le tableau clinique, notamment au vu de conséquences thérapeutiques.

L'utilisation de la bande TpN 17 dans l'IgG et de la bande EBV-VCA dans l'IgM n'a pas été validée pour une utilisation dans le diagnostic du liquide céphalo-rachidien.

5. Performances de mesure des concentrations d'IgG du test VIROTECH Borrelia in vivo IgG LINE Immunoblot/ VIROTECH Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE

5.1 Sensibilité diagnostique

77 paires liquide céphalo-rachidien/sérum caractéristiques d'un point de vue clinique provenant de patients atteints de neuroborréliose démontrée ont été testés avec le test Borrelia LINE IgG afin de déterminer la sensibilité diagnostique.

Paires sérum-liquide céphalo-rachidien (n=77)		Borrelia in vivo LINE IgG		
		Négatif	Limite	Positif
Résultat diagnostique	Neuroborréliose	6	0	71

Une sensibilité diagnostique pour l'IgG de 92,2 % a été calculée en rapport avec le résultat diagnostique.

5.2 Sensibilité

77 paires liquide céphalo-rachidien/sérum ont été analysées en comparaison avec un test ELISA de référence (résultat) afin de déterminer la sensibilité.

Paires sérum-liquide céphalo-rachidien (n=77)		Borrelia in vivo LINE IgG	
		Négatif	Positif
Résultat (ELISA)	Négatif	0	0
	Positif	6	71

La sensibilité pour l'IgG s'élève à 92,2 %.

5.3 Spécificité

31 paires liquide céphalo-rachidien/sérum ont été analysées en comparaison avec un test ELISA de référence (résultat) afin de déterminer la spécificité.

Paires sérum-liquide céphalo-rachidien (n=31)		Borrelia in vivo LINE IgG	
		Négatif	Positif
Résultat (ELISA)	Négatif	26	5
	Positif	0	0

Une spécificité pour l'IgG de 83,9 % a été calculée en rapport avec le résultat.

6. Performances de mesure des concentrations d'IgG du test VIROTECH Borrelia Europe IgG LINE Immunoblot /Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot

6.1 Sensibilité diagnostique

15 paires liquide céphalo-rachidien/sérum caractéristiques d'un point de vue clinique provenant de patients atteints de neuroborréliose démontrée ont été testés avec le test Borrelia Europe LINE IgG afin de déterminer la sensibilité diagnostique.

Paires sérum/liquide céphalo-rachidien (n=15)		Borrelia Europe LINE IgG		
		Négatif	Limite	Positif
Résultat diagnostique	Neuroborréliose	0	0	15

Une sensibilité diagnostique pour l'IgG/IgM de > 99,9 % a été calculée en rapport avec le résultat diagnostique.

6.2 Sensibilité

15 paires liquide céphalo-rachidien/sérum ont été analysées en comparaison avec le test Borrelia LINE (résultat) comme Immunoblot référence afin de mesurer la sensibilité.

Paires sérum/liquide céphalo-rachidien (n=15)		Borrelia Europe LINE IgG	
		Négatif	Positif
Résultat (Immunoblot)	Négatif	0	0
	Positif	0	15

Une sensibilité pour l'IgG/IgM de > 99,9 % a été calculée en rapport avec le résultat.

6.3 Spécificité

Pour déterminer la spécificité, 9 paires sérum/liquide avec une suspicion de neuroborréliose ont été testées en comparaison avec la Borrelia LINE comme immunoblot de référence (résultats).

Ces paires sérum/liquide céphalo-rachidien affichent une valeur d'AI normale dans le cadre du test ELISA et le soupçon de neuroborréliose n'a dans un premier temps pas pu être confirmé. L'analyse réalisée à l'aide du test Borrelia Europe LINE IgG a démontré la présence de bandes plus ou moins intenses aussi bien dans le liquide céphalo-rachidien que dans le sérum dans 4 cas sur 9, un résultat qui ne peut être associé qu'à une synthèse intrathécale des anticorps correspondants. Ces 4 paires sérum/liquide céphalo-rachidien ont aussi été identifiées comme pathologiques par le test Borrelia in vivo LINE IgG. En cas de persistance du soupçon clinique, il est recommandé de procéder à un contrôle de l'évolution consécutif à ces résultats. Une manifestation achevée ou en développement peut en effet être associée à la neuroborréliose supposée.

7. Performances de mesure des concentrations d'IgM du test VIROTECH Borrelia in vivo IgM LINE/ VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot

7.1 Sensibilité

Pour déterminer la sensibilité, 9 paires sérum/liquide ont été testées par rapport à un test ELISA Borrelia Liquor de référence

Paires sérum/liquide céphalo-rachidien (n=9)		Borrelia in vivo LINE IgM Europe LINE IgM	
		Négatif	Positif
Résultat (ELISA)	Négatif	0	0
	Positif	0	9

7.2 Spécificité

Pour déterminer la spécificité, 10 paires sérum/liquide avec une suspicion de neuroborréliose ont été testées par rapport à ELISA comme référence (résultat).

Ces paires sérum/liquide céphalo-rachidien affichent un AI normal dans le cadre du test ELISA. L'analyse réalisée présente un résultat positif ne pouvant être associé qu'à une synthèse intrathécale des anticorps correspondants pour 8 paires sérum/liquide céphalo-rachidien sur 9 analysées à l'aide du test Borrelia in vivo LINE IgG et pour 8 paires sérum/liquide

céphalo-rachidien sur 10 pour le test Borrelia Europe LINE. En cas de persistance du soupçon clinique, il est recommandé de procéder à un contrôle de l'évolution consécutif à ces résultats.

8. Schéma de déroulement du test

Brève procédure de réalisation d'un test pour des paires sérum/liquide céphalo-rachidien :

Incubation du sérum/liquide céphalo-rachidien dilution de sérum et de liquide céphalo-rachidien calculée avec concentrations d'IgG/IgM totale identiques (30 mg/l pour l'IgG, 0,5 mg/l pour l'IgM).	16 heures (avec couverture)	1,5 ml de la
		(Attention : prendre en compte la synthèse intrathécale de l'IgG/IgM polyspécifique !)
Lavage chacun	3 x 5 minutes	Avec 1,5 ml de tampon de dilution/lavage
Incubation du conjugué	30 minutes	Avec 1,5 ml de dilution d'emploi (1 + 100)
Lavage chacun	3 x 5 minutes	Avec 1,5 ml de tampon de dilution/lavage
1 x 1 minute	Avec de l'eau distillée/déionisée	
Incubation du substrat	10 ± 3 minutes	Avec 1,5 ml de solution de substrat
Interruption	3 x sans incubation intermédiaire	Avec 1,5 ml d'eau distillée/déionisée