Interprétation de l’immunoblot de la maladie de Lyme : importance des protéines OspC et VlsE.

Englos le 14 mars 2014

Lionel Chapy

www.labco.eu
TESTS BIOLOGIQUES

Depuis 2011, tests de 3\textsuperscript{ème} génération en Elisa et en Blot basés sur des protéines recombinantes beaucoup plus spécifiques.

NABM :

Elisa négatif : pas de Blot
Elisa douteux ou positif : confirmation par un Blot
PROBLEMES DE L’ELISA

- Pas de standardisation européenne

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 August; 30(8): 1027–1032.
Large differences between test strategies for the detection of anti-Borrelia antibodies are revealed by comparing eight ELISAs and five immunoblots

- Le seuil est fixé de façon plus ou moins aléatoire

- Faux positifs

- Faux négatifs (20 à 25 %)
Beaucoup plus spécifique que l’Elisa

Recherche plus de borrélia (burgdoferi, alfzelii, garinii, spielmanii, bavariensis)

Recherche sur IgG ET IgM

Mais pas de standardisation d’interprétation et problème de sensibilité de seuil
L’IMMUNOBLOT

- BLOT : Un blot positif **N’IMPLIQUE PAS** une maladie de Lyme et un blot négatif **N’EXCLUT PAS** une maladie de Lyme.
Protéines immunogènes

Flagelline p41 = 336 A.A enveloppe externe du flagelle phase initiale (E.M) (persiste tant que la maladie est evolutive.)

Proteines de membrane externe « osp » = « outer surface protein »

- ospa: reconnue le plus tardivement / certaines formes chroniques : arthrite.
- ospc: reponse igg + igm precoce et intense
- proteine p39 = membrane / tres specifique.
- lipoproteine vlse = pathogenicite.
- proteine p100 = cylindre cytoplasmique
- proteine p18 = proteine de surface

Connaissance des genes / de leurs proteines : importance dans methodes de diagnostic.
RESULTAT

| PM  | Nom           | Points IgG | Points IgM |
|-----|---------------|------------|------------|
| 100 | p100          | 5          | 5          |
| 66  | VlsE          | 5          | 5          |
| 58  | p58           | 4          | 4          |
| 41  | P41 flagelline| 1          | 1          |
| 39  | BmpA          | 5          | 4          |
| 31  | OspA          | 5          | 5          |
| 22  | OspC          | 5          | 8          |
| 18  | p18           | 5          | 5          |

POSITIF: quand supérieur ou égal à 7
Limite : quand égal à 6
Négatif : quand inférieur ou égal à 5
Présence des protéines positives y compris celles en dessous du CutOff

Bande
p41(3,4); *p39(0,6); *OspCBss(0,9); OspCBaf(1,8); OspCBga(1,9); OspCBsp(1,7)

Résultat
positive, 9 point(s)

Score WB IgM

Visualisation des protéines
Figure 11 : Transmission de *Borrelia* de la tique vers l’hôte

D’après Mehlhorn, 2001
IMPORTANCE DE LA PROTEINE OspC (1/2)

La protéine OspC est portée par le plasmide circulaire cp26

Le gène OspC est très polymorphe

58 groupes OspC : 22 chez Borrelia burgdorferi
22 chez Borrelia afzelii
14 chez Borrelia garinii

dont 35 % sont des groupes invasifs
IMPORTANCE DE LA PROTEINE OspC (2/2)

Se fixe au plasminogène

Les Ac OspC sont les premiers à apparaître

Ac protecteurs et destructeurs

Ne vas plus exprimer l’OspC
IMPORTANCE DE LA PROTEINE VlsE (1/1)

21 plasmides
- 12 linéaires dont lp28 = VlsE

Considérée comme la protéine de la pathogénicité

Les borrélias qui ont perdu le plasmide p28 sont incapables d’entraîner une infection persistante et sont rapidement éliminées par le système immunitaire

Possède 15 cassettes interchangeable pour échapper au système immunitaire

Essentiellement en IgG
PROBLEMES D’INTERPRETATION

- Les Ac disparaissent au fil du temps
- La présence d’IgM seules n’est pas synonyme d’infection récente
- Les anticorps sont rarement protecteurs
ORDRE D’APPARITION DES AC

1) OspC IgM

2) P41 IgM

3) VlsE IgG
Ce que l’on peut dire :

- Un résultat positif en immunoblot confirme un contact avec une borrélia

- Un résultat positif en immunoblot n’implique pas une maladie de lyme active

- Tout résultat positif ou douteux doit entrainer un dialogue entre le biologiste et le clinicien.
QUELQUES EXEMPLES DE RESULTATS

Rappel de la sérologie ELISA

IgG : négatif si < à 0,20
      positif si >= à 0,20

IgM : négatif si < à 0,20
      >= à 0,20 et < à 0,32 : douteux
      positif si >= à 0,32
Exemple 1

- ENFANT DE 13 ANS

- ELISA G : 6,36

- ELISA M : 0,17
Rapport patient recomLine Borrelia

Interprétation

Bande
p100(6,1); VnIII(7,4); p58(2,2); p44(5,5); p39(4,9); *OspCBl(0,9); *OspCBlgA(0,4); *OspCBlgA(0,6); OspCBlgA(1,0); p18BlgA(8,4)

Résultat

POSITIVE : 30 points

Information du test

Test: recomLine Borrelia
Firma: Mikrogen

Correction arrière-plan: active Tolerance Cutoff -15

Screening Résultat:
Elisa IgA: n.a.
Elisa IgG: n.a.
Elisa IgM: n.a.

* en dessous de Cut Off
Exemple N° 2

- Homme 38 ans

J0 : Elisa : $G = 0.03$
  $M = 0.16$ donc négatif et pas de blot de réalisé

J30 (après traitement antibiotique)
  $G = 0.09$
  $M = 0.62$ donc positif avec réalisation d’un blot.
Rapport patient recomLine Borrelia

Prénom:  
Nom de famille:  
Anniversaire:  
ID echantillonner:  
ID Patient: 3284929884

Interprétation

Bande  
p41(1,1); *OspCBBa(0,9); OspCBAf(1,9); OspCBBg(2,1); OspCBBp(1,4)

Résultat

Blot M à J30
Elisa = 0.62

POSI TIVE: 9 points

Information du test

Test: recomLine Borrelia  
Firme: Mikrogen

Contrôle:  
Correction arrière-plan: active  
Tolérance CutOff -15

Screening Résultat:
Elisa IgA: n.a.  
Elisa IgG: n.a.  
Elisa IgM: n.a.

* en dessous de Cut Off

Date de test: 16.10.2013

recomScan v.3.4.122.869
alldiag
Rapport patient recomLine Borrelia

Prénom: [Blank]
Nom de famille: [Blank]
Anniversaire: [Blank]
ID de l'échantillonner: 3284929884
ID Patient: 3284929884

Interprétation

*Bande (0.4):

Résultat:

blot IgG à J30
elisa : 0,09

NEGATIVE : 0 points

Bandelette et Diagramme

Information du test

Test: recomLine Borrelia
Firme: Mikrogen

Launch de plan: active
Tolérance CutOff: -15

Correction arrière-plan: active

Elisa IgA: n.a.
Elisa IgG: n.a.
Elisa IgM: n.a.

* en dessous de Cut Off

Date de test: 16.10.2013
Instinué
Rapport patient recomLine Borrelia

Prénom: [Handwritten] Anniversaire: [Handwritten] ID d'échantillon: [Handwritten]
Nom de famille: [Handwritten] ID Patient: TEST

Interprétation

Bande: *p41(0,9); *OspCBaI(0,8); OspCBga(1,1); *OspCBsp(0,6)

Résultat: POSITIVE : 8 points
Blot M à J0
Elisa = 0,16 (négatif)

Bandelette et Diagramme

Information du test

Test: recomLine Borrelia Firme: Mikrogen
Contrôle:
Correction arrière-plan: active Tolérance CutOff = -15
Screening Résultat:
Elisa IgA: n.a.
Elisa IgG: n.a.
Elisa IgM: n.a.

* en dessous de Cut Off

Date de test: 23.10.2013 Intitulé: recomScan v.3.4.122.869
alldiag
Exemple N° 3

- Homme 71 ans

**J0 : Elisa :**
- $G = 3.84$
- $M = 0.28$

**J90 (après traitement antibiotique)**
- $G = 1.88$
- $M = 0.28$
Rapport patient recomLine Borrelia

Interprétation

Résultat: POSITIVE : 14 points

Bandelette et Diagramme

Information du test

Test: recomLine Borrelia
Firme: Mikrogen

Correction arrière-plan: active

Tolérance CutOff -15

Elisa IgA: n.a.
Elisa IgG: n.a.
Elisa IgM: n.a.

* en dessous de Cut Off

Date de test: 09.07.2013
Intitulé: recomScan v.3.4.122.869 alldiag
Rapport patient recomLine Borrelia

Interprétation

Bande

*p41(0,3); *OscpCBa(0,4); OscpCBaf(1,0); *OscpCBg(0,8); OscpCBsp(1,6); *p18Bg(0,2); *p18Bsp(0,2)

Résultat

Blot M J0

Elisa : 0.28

Bandelette et Diagramme

Information du test

Test: recomLine Borrelia
Firme: Mikrogen

Contrôle:
Correction arrière-plan: active
Tolérance CutOff : -15

Screening Résultat:
Elisa IgA: n.a.
Elisa IgG: n.a.
Elisa IgM: n.a.

* en dessous de Cut Off

Date de test: 09.07.2013
Intitulé: recomScan v.3.4.122.869 aldiag
Rapport patient recomLine Borrelia

Interprétation
Bande: *p100(0,7); VlsE(4,2); p58(1,7); p41(3,4); p39(0,3); *OspCBox(a0,3); *OspCBoxp(0,3); p18Baf(1,7)

Résultat

POSITIVE : 15 points
Blot G J90
Elisa : 1.88

Bandelette et Diagramme

Information du test
Test: recomLine Borrelia
Firme: Mikrogen

Contrôle:
Correction arrière-plan: active
Tolérance CutOff -15

Screening Résultat:
Elisa IgA: n.a.
Elisa IgG: n.a.
Elisa IgM: n.a.

* en dessous de Cut Off

Rapport NK CD57/56 : 0.47
N : 0.35 à 0.75
Rapport patient recomLine Borrelia

Prénom: [blank] Anniversaire: [blank] ID d'échantillonner: [blank]
Nom de famille: [blank] ID Patient: 2937

Interprétation

Bande: *p41(0,4); *OspCBss(0,8); OspCBfal(1,5); OspCBgal(1,6); OspCBisp(1,2)

Résultat

Blot IgM J90 Elisa : 0.28

POSITIVE : 8 points

Bandelette et Diagramme

Information du test

Test: recomLine Borrelia Firme: Mikrogen
Contrôle:
Correction arrière-plan: active Tolérance CutOff : -15
Screening Résultat:
Elisa IgA: n.a. Elisa IgG: n.a. Elisa IgM: n.a.

* en dessous de Cut Off

Date de test: 09.10.2013

recomScan v.3.4.122.869 alldiag
|                | J0   | J90  |
|----------------|------|------|
| Elisa G        | 3.84 | 1.88 |
| Elisa M        | 0.28 | 0.28 |
| Blot G P100    | 0.5  | 0.7  |
| Blot G VlsE    | 3.7  | 4.2  |
| Blot G P58     | 1.5  | 1.7  |
| Blot G P41     | 0.5  | 3.4  |
| Blot G P39     | 0    | 0.3  |
| Blot G P18     | 1.6  | 1.7  |
| Blot M P41     | 0.3  | 0.4  |
| Blot M OspC Bafz | 1.0  | 1.5  |
| Blot M OspC Bgar | 0.8  | 1.6  |
| Blot M OspC B spie | 1.6  | 1.2  |
CONSEILS

Lorsque l’on a la certitude que le patient a été en contact avec une Borrélia, bien le noter sur le dossier.

POURQUOI ?
PARCE QUE

Vous ne connaissez pas le groupage HLA de votre patient

Vous ne savez pas si l’OspC de la Borrélia appartient à un groupe invasif ou non

Vous ne savez pas s’il y a eu transmission de coinfections ou non
CONSEILS

Devant toute pathologie atypique, penser à un SPL

Privilégier le dialogue Clinicien-Biologiste
REMERCIEMENTS

- La Borreliose chez le cheval par Cécile Lamouraux 2005 108 pages
- La maladie de Lyme chez les bovins : enquête séro-épidémiologique dans l’Est de la France par Xavier Patrice Vandenbroucke 2004 212 pages
- Facteurs environnementaux de variation de l’abondance des tiques ixodes ricinus dans des zones d’étude modèles en Auvergne par Chloé Boyard en 2007 232 pages
- Inflammation cutanée et Borréliose de Lyme : étude in vitro des interactions entre les cellules résidentes de la peau et Borrelia par Frédéric Schramm 2012 203 pages
- Inflammation cutanée et Borréliose de Lyme : rôle de l’immunité innée et de la tique dans la transmission à l’homme de Borrelia burgdoferi sl par Claire Marchal 2009 245 pages
- Dynamique de transmission de Borrelia afzelii par Ixodes ricinus : comparaison entre les groupes OspC par Nicolas Tonetti 2012 203 pages
- Modification du risque d’une maladie multi-hôtes suite à l’introduction d’une espèce réservoir : cas de la maladie de Lyme et du tamia de Sibérie en Ile de France par Maud Marsot 2011 232 pages
- Infection et autoimmunité : approches expérimentales des mécanismes de rupture de la tolérance B lymphocytaire par Anne Woods 2007 102 pages
- Etude du polymorphisme du gène OspC de Borrélia Burgdoféri sl et de son implication dans l’invasivité chez l’homme par Vanessa Lagal 2004 118 pages
- LIONEL CHAPY
- 06 79 36 93 07
- 04 73 28 83 83