Etude rétrospective sur l'Elispot Borrelia INF-g avant et après traitement antibiotique chez des patients traités pour maladie vectorielle à tiques.

Cécile MARTARESCHE* pharmacien biologiste, Lionel CHAPY* pharmacien biologiste, * laboratoire de biologie médicale BARLA (réseau SYNLAB), Nice, FRANCE.

L'Elispot Borrelia INF-g est un test biologique de type IGRA, qui permet d'explorer la réponse immunitaire cellulaire vis à vis d'une infection à Borrelia. Il permet de détecter, à partir du sang du patient, la présence de lymphocytes T effecteurs spécifiques de Borrelia capables de sécréter, in vitro, de l'INF-g en présence d'antigènes de Borrelia. Un résultat positif de façon significative de l'Elispot Borrelia INF-g signifie une phase active de Borrelia en cours ou récente. Un résultat négatif signifie, à priori, une absence de phase active de Borrelia en cours ou récente[1, 2]. La sérologie, qui explore l'immunité humorale, est un indicateur de contact avec la Borrelia mais n'est pas indicatif de l'activité de l'infection. La sérologie n'est pas indiquée comme outil de suivi de l'efficacité du traitement[3]. La surveillance post-thérapeutique est essentiellement clinique mais peut parfois s'avérer délicate.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'apport de l'Elispot Borrelia INF-g dans le suivi de l'évolution clinique pour contribuer à évaluer l'efficacité du traitement antibiotique, particulièrement aux stades disséminés tardifs de la borréliose.

ILADS EUROPE 2017
Paris May 19-20

MOTS CLEFS : IGRA (INFg Release Assay)**, Elispot Borrelia, SPPT** (symptômes polymorphiques persistants après piqûre de tique).

MATÉRIEL ET MÉTHODE :

Abbréviations: IGRA: INFg Release Assay, PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells, HCSP: Haut conseil santé publique, SPPT: Persistant polymorphic symptoms après piqûre de tique, PWM : Pokeweed Mitogen, EM : érytheme migrant.

Méthode : dix patients adultes ont été sélectionnés rétrospectivement sur la base de leur résultat d'Elispot Borrelia INF-g positif en dehors de tout traitement antibiotique. Il y avait 5 hommes et 5 femmes, âgés de 41 ans en moyenne (de 24 à 61 ans). Un questionnaire clinique leur a été proposé regroupant les données suivantes : origine géographique, notion de piqûre de tique connue (figure 1), érythème migrant observé, résultat de la sérologie Borrelia (Elisa et/ou Immunoblot), datation des symptômes (moins de 6 mois/ plus de 6 mois), grille et score des symptômes (SPPT : Symptômes polymorphes persistants après piqûre de Tique - HCSP 2014[4]), traitement antibiotique reçu (figure 2), et évolution clinique après la prise d'antibiotiques. Un second Elispot a été réalisé trois mois après la fin du traitement antibiotique. Les évolutions cliniques exprimées ont été clasées en trois catégories : absence d'amélioration, amélioration modérée, amélioration significative.

Techniques :
dans notre laboratoire la sérologie de dépistage Borrelia a été réalisée par technique immunoluminométrie avec le kit Liaison IgG et IgM de Diasorin. La sérologie de confirmation a été réalisée par technique Immunoblot avec le kit IgG et IgM Lymecheck de Biosynex Alldiag (Mikrogen). L'Elispot Borrelia a été réalisé avec le kit LymeSpot Borrelia INFg de AID (figure 3).

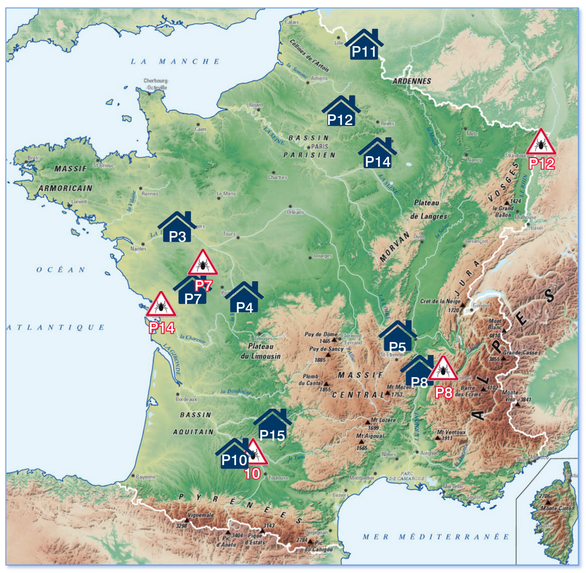

Figure 1 :
Origine géographique des patients et lieux des piqûres de tiques connues.

					cures ATB	
P3	♀	26	×	>6	Ceftriaxone/ Flagyl/ Tetralysal/ Plaquenil/Tinidazol	<3
P4	♂	31	×	>6	Azythromycine/ tetralysal/ ciprofloxacine/doxycycline/rifadine/bactrim	3
P5	♂	36	×	>6	fluvermal/doxycycline/clarythromycine/fluconazole	4
P7	♂	61	·	>6	antibiotiques/antifongiques/antiparasitaires/HE	9
P8	♂	46	·	>6	josamycine/cefuroxime/doxycycline puis ceftriaxone/doxycycline/fungizone	27
P10	♂	61	◎	>6	doxycycline/flagyl/azythromycine	7
P11	♀	31	×	<6	oxycycline/azythromycine/tinidazol/fluconazol/	14
P12	♀	34	◎	>6	azythromycine/doxycycline/fluconazol/tinidazol	11
P14	♀	34	·	>6	lagyl/azythromycine/fluconazol puis ceftriaxone/doxycycline puis roxythromycine/plaquenil/cefpodoxime puis fluvermal	12
P15	♂	50	×	>6	tetracycline/plaquenil	3

P12 identification du patient ; ♀ homme ; ♂ femme ; 34 âge du patient en années ; >6 ancienneté des symptômes en mois ; · piqûre sans EM ; × absence de piqûre ; ◎ piqûre avec EM ; 6 durée du traitement en mois

Figure 2 :
réponses des patients au questionnaire clinique.

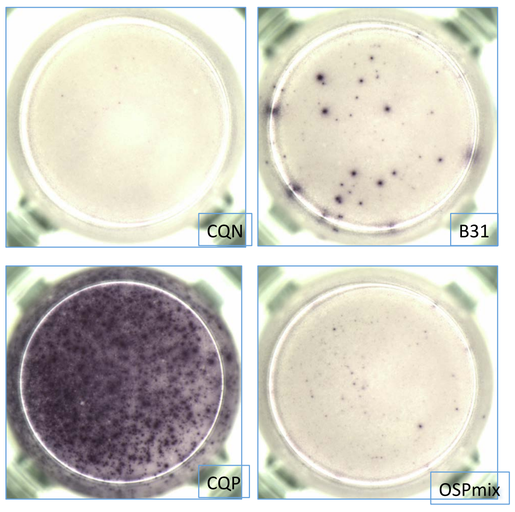

Figure 3 : réaction Elispot Borellia

Réaction Elispot Borellia

Les lymphocytes du patient sont déposés sur une plaque coatée avec les anticorps anti-INFg, en duplicate : puits contrôle interne négatif CQN (lymphocytes seuls), puits contrôle interne positif CQP (lymphocytes et PWM), puits avec un antigène spécifique de Borrelia : B31 (lysat de la souche B31, Borrelia burgdorferi stricto sensu), OSPmix (mélange de protéines recombinantes issues des espèces Borrelia afzelli, B. garinii et B. spielmanii).

La présence d'INFg a été révélée par la réaction immunoenzymatique, visualisée sous forme d'un spot ; un spot correspondant à un lymphocyte activé.

Les résultats sont rendus sous forme d'un index de stimulation (SI). Pour B31, le résultat est limite pour 2< SI <4, et positif pour un SI > 4 ; et le résultat est positif pour OSPmix à partir de SI> 2.

RÉSULTATS BIOLOGIQUES

Quatre patients avaient une sérologie de dépistage Elisa Borrelia positive, dont seulement deux sérologies ont été confirmées par un Immunoblot positif. Un patient signalait un antécédent d'Immunoblot IgG positif. Avant traitement antibiotique, tous les patients avaient un Elispot Borrelia INF-g positif. Après traitement, l'Elispot est devenu négatif pour sept des dix patients. Parmi les trois patients dont l'Elispot était encore positif après traitement (P10, P12, P14), deux présentaient une amélioration clinique modérée (P10 et P12) et un patient présentait une amélioration clinique significative (P14) (figures 4 et 5).

patient	sérologie elisa IgM	sérologie elisa IgG	Immuno blot IgA	Immuno blot IgG	1er ElISpot date	1er ElISpot résultat B1	1er ElISpot résultat Ospmix	2 ème ElISpot date	2 ème ElISpot résultat B1	2 ème ElISpot résultat Ospmix	amélioration
P3	Neg	Neg	Neg	Neg	08/04/15	11	10,33	31/08/15	1	1	*
P4	Neg	Neg	Neg	Neg	07/07/15	2,86	5,29	06/07/16	1	1	*
P5	Neg	Neg	Neg	Neg	04/11/15	4,24	3,59	05/07/16	1	1	***
P7	/	Pos*	/	Pos*	27/05/15	7,9	4,5	13/04/16	1	1	*
P8	Neg	Pos 69	Neg	Neg 5, VlsE pos	21/04/15	3,75	3,75	19/04/16	1	1	***
P10	/	/	Neg	Neg	27/04/16	15	6,5	28/03/17	19	9,5	*
P11	Pos 2,45	Neg	Neg	Neg	19/04/16	24	7	07/02/17	1	1	***
P12	Neg	Neg	/	/	24/05/16	23	7	01/02/17	13	10	*
P14	Pos 1,55	Neg	Pos* p41 OspC	Neg fev 2016 Pos* 2014	10/08/16	82	5,5	10/01/17	43	2	*
P15	/	/	Neg	Neg fev16 Pos 2014	09/08/16	21,5	19,5		1	1	***

Figure 4: résultats biologiques des sérologie et d'Elispot.
Amélioration modérée= * Amélioration significative = ***
* résultat déclaratif, non disponible

Evolution des résultats d'EliSpot Borrelia INFG avant/après traitement

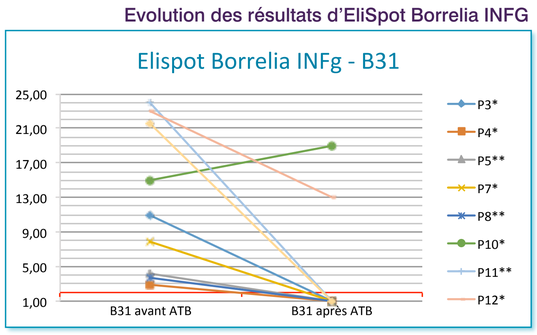

Figure 5a : avec antiène B31

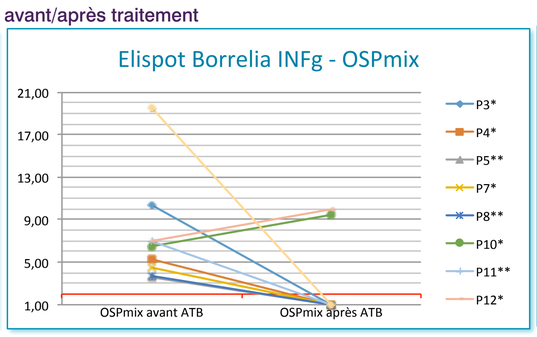

Figure 5b : avec antigène OSPmix

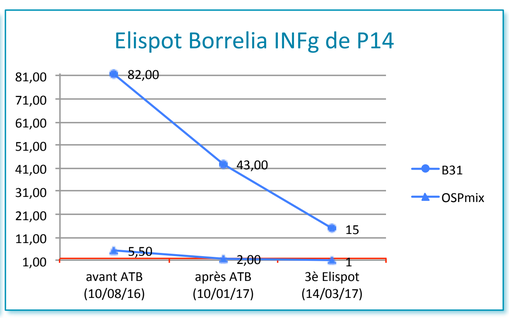

Figure 5c : cas particulier du patient 14. Il présentait une amélioration clinique significative mais conservait un Elispot positif ; un 3è Elispot a été fait 3 mois plus tard, et celui-ci montre une négativation partielle du résultat en regard d'une amélioration franche de la clinique.

RÉSULTATS CLINIQUES

Les réponses aux questions sur les symptômes cliniques exprimés par les patients ont permit d'établir leur prévallence avant traitement (figure 6). Après traitement antibiotique, cinq patients présentaient une amélioration clinique significative (P5, P8, P11, P14, P15) et cinq patients une amélioration modérée (P3, P4, P7, P10, P12). Les évolutions cliniques exprimées après traitement antibiotique ont été classées en 3 catégories, détaillées dans la figure 7.

Grille diagnostique SPPT (HCSP 2014, CHRONIMED)		prévalence
Fatigue non réactionnelle à un vécu psychique conflictuel douloureux		
Fatigue > 6mois physique (coup de fatigue, besoin de sieste, fatigue sportive)		90,00%
Fatigue > 6mois psychique (anxiété, dépression, insatisfaction)		90,00%
Fatigue > 6mois intellectuelle (brain fog, trouble mémoire, ralentissement, baisse résultats scolaires)		90,00%
Fatigue > 6mois : troubles sommeil		90,00%
Critères musculaires		
1	Muscles: crampes nocturnes ou au repos	70,00%
2	Muscles: myoclonies, sursauts d'endormissement (impression de tomber)	60,00%
3	Muscles: impatience jambes, diurne, en position assise	40,00%
4	Muscles: sensation de manque d'air (besoin de souffler ou d'inspirer profondément, dyspnée d'effort)	70,00%
5	Muscles: fasciculation d'une paupière	60,00%
Critères vasculaires		
6	Vaisseaux: ecchymoses spontannées ou au moindre choc	10,00%
7	Vaisseaux: sueurs escessives nocturnes, rash/flush (visage ou torse)	80,00%
8	Vaisseaux: troubles visuels atypiques intermittents (flou visuel, ombres visuelles latérales fugaces, pseudo-hallucinations, tâches, photophobie excessive…)	90,00%
9	Vaisseaux: palpitations	70,00%
10	Vaisseaux: lipothymie positionnelles	40,00%
11	Vaisseaux: frilosité générale, extrémités froides, S Raynaud	100,00%
12	Vaisseaux: dysesthésies / lache les objets / gestes imprécis	20,00%
13	Vaisseaux: acouphènes unilatérales	70,00%
14	Vaisseaux: jambes lourdes vespérales	20,00%
Critères irritatifs (doivent être quasi quotidiens)		
15	Irritation: prurit cutané, flush, rash	70,00%
16	Irritation: arthralgies / myalgies / tendinites / migratrices / céphalées / crampes / lombalgie / dorsalgie / craquements nuque	70,00%
17	Irritation: irritation occulaire (yeux secs)	30,00%
18	Irritation: irritation pharyngée, rhinites perannuelle non allergique, ronflements, envie de sucre	70,00%
19	Irritation: gastralgie, troubles transit, troubles intestinaux, nausées, urines moussantes	90,00%

Figure 6 : prévalence des symptômes avant traitement

Patient	score avant ATB	score après ATB	évolution clinique
P3	19	14	*
P4	17	10	*
P5	8	2	***
P7	10	6,5	*
P8	13	3,5	***
P10	13	7,5	*
P11	7	2	***
P12	14	10,5	*
P14	15	6	***
P15	15	0	*

Figure 7 : évolutions cliniques classement selon trois catégories.
0 = absence d'amélioration (< 20% des symptômes améliorés),
* = amélioration modérée (20 – 50% des symptômes améliorés),
*** =amélioration significative (50- 80 % des symptômes améliorés).

Bibliographie
1 *Volker von Baehr « The Lymphocyte Transformation Test for Borrelia Detects Active Lyme Borreliosis and Verifies Effective Antibiotic Treatment », The Open Neurology Journal, 2012, 6, (Suppl 1-M5) 104-112*
2 *Callister Steven « Detection of IFN-γSecretion by T Cells Collected Before and After Successful Treatment of Early Lyme Disease », Clin Infect Diseases, 2016, 62 (10)*
3 *« Borréliose de Lyme : diagnostic biologique », DGS France, Déc 2015*
4 *« La Borreliose de Lyme », rapport du Haut Conseil de la Santé Publique – France, Mars 2014*

CONCLUSION

Dans notre étude rétrospective sur dix patients, l'Elispot Borrelia INF-g est corrélé avec l'évolutivité clinique après traitement antibiotique : il se négative lors des améliorations cliniques significatives et reste positif lors de la persistance des symptômes. Ces résultats permettent d'envisager Elispot Borrelia comme un outil supplémentaire à la disposition du clinicien lors du suivi de l'efficacité des traitements antibiotiques chez les patients traités pour les maladies vectorielles à tique. Il sera nécessaire de reproduire cette étude sur un nombre plus important de patients pour le confirmer.

CONTACT
Dr Cécile MARTARESCHE, pharmacien biologiste,
laboratoire de biologie médicale BARLA (réseau SYNLAB)
Centre biologique médical Saint Roch, 5 bd Pierre Sémard, 06300 Nice FRANCE.
cecile.martaresche@labo-barla.eu tel : + 33 4 92 00 43 20 www.labo-barla.eu

Poster design: Brigitte MATHIS pour Réseau SYNLAB, mai 2017