

**VIROTECH Borrelia + VlsE IgG ELISA
(Borrelia + VlsE IgG ELISA)**

Référence : EC022G00 Codage couleur : doré/rouge

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards

Référence : EC022L60

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set

Référence : EN022L65

Données sur les performances du diagnostic du liquide céphalo-rachidien comprises

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>



Freigabedatum: 25.3.2019

REV 15 / VIROTECH Borrelia + VlsE IgG ELISA FR

Sommaire

1. Usage prévu.....	3
2. Signification diagnostique.....	3
3. Principe du test	4
4. Contenu	4
4.1 Contenu (Kit de test IgG)	4
4.2 Contenu (IgG LCR-Set).....	4
5. Stockage et conservation du kit et des réactifs prêts à l'emploi.....	4
6. Mesures de précaution et mises en garde	5
7. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit).....	5
8. Réalisation du test SÉRODIAGNOSTIC.....	5
8.1 Echantillons	5
8.2 Préparation des réactifs	5
8.3 Réalisation du test ELISA VIROTECH	6
8.4 Utilisation de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA.....	6
9. Interprétation du test SÉRODIAGNOSTIC.....	6
9.1 Contrôle du bon fonctionnement du test.....	7
9.2 Calcul des unités VIROTECH (VE).....	7
9.3 Schéma d'interprétation des IgG	7
9.4 Limites du test.....	7
10. Données sur les performances SÉRODIAGNOSTIC.....	8
10.1 Sensibilité diagnostique.....	8
10.2 Sensibilité et spécificité	8
10.3 Réactivité croisée	8
10.4 Propagation (valeurs escomptées)	8
10.5 Coefficient de variation intra-essai (répétabilité)	9
10.6 Coefficient de variation intra-essai (reproductibilité)	9
11. Données sur les performances DIAGNOSTIC DU LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN	9
11.1 Sensibilité et spécificité	9
11.2 Réactivité croisée	10
12. Littérature	10
13. Schéma du déroulement du test.....	11

1. Usage prévu

Le test *Borrelia afzelii*+VlsE IgG ELISA (souche PKo) est un test de dépistage (Screening-Test) destiné à la détermination semi-quantitative et qualitative des anticorps IgG contre *Borrelia burgdorferi* au sens large dans le sérum humain. Il convient en même temps pour la détermination quantitative des synthèses d'anticorps IgG et IgM du SNC par examen parallèle de paires sérum-LCR. En ce qui concerne l'antigène utilisé, il s'agit d'un mélange de la souche recommandée pour l'Europe B. afzelii PKo, de la souche B. garinii PBr et de la souche B. burgdorferi ZS7.

2. Signification diagnostique

La borréliose de Lyme est une maladie systémique due à une infection causée par le spirochète *Borrelia burgdorferi* (1,2). La transmission du spirochète à l'humain se produit lors d'une piqûre par une tique infectée. En Europe, la tique *Ixodes ricinus* a été identifiée comme vecteur principal (5). A ce jour, pour l'Europe, au moins trois souches de *Borrelia burgdorferi* humanopathogènes ont été décrites, et regroupées sous l'appellation *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) : *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* et *Borrelia afzelii* (3,5,6)

Dans le cas de la borréliose de Lyme, il s'agit d'une maladie multisystémique évoluant par stades affectant principalement la peau, les articulations et le système nerveux. En raison du large éventail des manifestations cliniques qui surviennent, le diagnostic de la borréliose de Lyme s'avère difficile (5). Entre autres, la délimitation vis-à-vis de diverses maladies dermatiques (par exemple le lymphome cutané à cellules B, le lupus érythémateux), neurologiques (par exemple la sclérose en plaques) et internes (par exemple l'arthrite, la cardite) (15) est pertinente du point de vue diagnostique différentiel.

Le diagnostic sérologique de la borréliose de Lyme est compliqué par les facteurs suivants, entre autres :

- une sérologie négative n'exclut pas une borréliose de Lyme, surtout aux stades précoces L'érythème migrant (stade primaire) est même séronégatif dans environ 50 % des cas (14)
- il se peut tout à fait que la formation d'anticorps IgM n'ait pas lieu
- les anticorps IgM peuvent persister pendant de nombreux mois (10,11)
- les anticorps IgG peuvent encore être détectables même des années après une rémission clinique (10,11)
- des réactions croisées avec d'autres micro-organismes ont été observées (8,13). Les maladies bactériennes telles que la syphilis et les infections virales herpétiques (notamment l'EBV) y jouent un rôle important (12). Des réponses faussement positives des anticorps peuvent aussi se produire en présence d'anticorps auto-immunes (13).

La fonction de la sérologie de la borréliose de Lyme consiste à étayer la clarification d'un soupçon cliniquement fondé. La sérologie de la borréliose de Lyme peut alors apporter des informations importantes sur la séronégativité ou corroborer le soupçon d'existence d'une infection récente ainsi que d'une infection avancée. Un résultat positif aux anticorps doit toutefois impérativement être évalué dans le contexte de l'image clinique (14).

Il est recommandé de procéder à la sérologie de la borréliose de Lyme en deux étapes (16). Au cours de la première étape, les échantillons à étudier sont analysés avec un test de dépistage sensible (la directive MiQ12/2000 recommande d'employer un ELISA comme test de dépistage). Ensuite, l'étude des sérums limites et positifs se poursuit au moyen d'un test de confirmation (Line Immuno Assay/Western Blot). Le procédé Western Blot permet l'analyse spécifique de la réponse des anticorps dirigée contre des agents antigènes individuels.

Grâce à une toute nouvelle évolution, pour le diagnostic, on dispose désormais également d'antigènes exprimés *in vivo*. La particularité de ces antigènes est qu'ils ne sont exprimés *in vivo* par les borrelies que chez le mammifère infecté (humain). Parmi ces antigènes exprimés *in vivo*, la protéine VlsE, qui englobe diverses géno-espèces, est extraordinaire (17, 18, 19). Outre l'OspC, celle-ci est un second marqueur précoce, notamment dans la sérologie IgG. Au cours des études, il s'est avéré que dans les borrelies précoces, outre l'OspC dans l'IgM, on trouvait fréquemment la VlsE dans l'IgG, et qu'ainsi, on pouvait accroître radicalement la sensibilité du diagnostic de la borréliose de Lyme précoce.

Neuroborréliose

Dans le cadre d'une infection borrelienne, on désigne par le terme de neuroborréliose les symptômes qui concernent le système nerveux. De 10 à 15% de patients atteints de borréliose contractent une neuroborréliose. Celle-ci se déclenche en moyenne cinq semaines après la piqûre de la tique. Chez les patients atteints de neuroborréliose, le diagnostic clinique

préssumé peut être confirmé par des altérations inflammatoires du liquide céphalo-rachidien et par la détection d'une synthèse intrathécale d'anticorps spécifiques aux borrelies. La production intrathécale d'anticorps spécifiques se détecte en déterminant l'indice d'anticorps. La production intrathécale d'anticorps spécifiques à *B. afzelii* se développe, chez les patients non traités, au cours de la deuxième semaine de la maladie, est décelable au bout de trois semaines chez environ 75 % des patients, et au bout de huit semaines chez 99 % d'entre eux. Chez les patients présentant des symptômes sur une période de plus de deux à trois mois, un test négatif aux anticorps anti-borrelies exclut presque la possibilité d'une neuroborreliose. La détection positive d'anticorps spécifiques aux borrelies ne prouve à elle seule aucune infection active par *Borrelia afzelii*. A l'inverse, dans la phase initiale d'une infection borrelienne, en particulier en cas de traitement antibiotique précoce, la sérologie borrelienne peut être négative (9). Dans certaines circonstances, lors d'une neuroborreliose aiguë, il se peut que la synthèse IgG n'ait pas lieu, seuls des anticorps IgM étant donc décelables (20).

3. Principe du test

L'anticorps recherché dans le sérum humain 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.

4. Contenu

4.1 Contenu (Kit de test IgG)

1. **Une microplaque** composée de 96 puits détachables à revêtement antigénique, lyophilisée
2. **Tampon de dilution PBS (bleu, prêt à l'emploi) 2 x 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
3. **Solution de lavage PBS (concentrée au facteur 20) 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
4. **Contrôle négatif des IgG, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
5. **Contrôle cut-off des IgG, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
6. **Contrôle positif des IgG, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
7. **Conjugué IgG (anti-humain), 11 ml**, conjugué à la peroxydase de raifort (Chèvre ou Mouton) avec stabilisants des protéines et conservateur en tampon tris, prêt à l'emploi
8. **Substrat de tétraméthylbenzidine en solution (TBM 3,3',5,5'-TMB), 11 ml**, prêt à l'emploi
9. **Solution d'arrêt au citrate, 6 ml**, contient un mélange à l'acide.

4.2 Contenu (IgG LCR-Set)

Standards IgG Borrelia ELISA pour la quantification des concentrations d'anticorps spécifiques de l'agent pathogène, 4 flacons de 1 000 µl, sérum humain avec stabilisateurs des protéines et conservateur, prêt à l'emploi, 100 UA ; 25 UA ; 6,2 UA ; 1,5 UA

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 contentant 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 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 deessai	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
Absorbant facteur rhumatoïde	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
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 sérums de contrôle 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 contrôles, 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 (TMB), 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. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit)

1. Eau distillée/déminéralisée
2. Pipette à plusieurs conduits 50 µl, 100 µl
3. Micropipettes : 10 µl, 100 µl, 1000 µl
4. Tubes à essai
5. Chiffons en cellulose
6. Couvercles pour les plaques ELISA
7. Poubelle pour les déchets infectieux
8. Dispositif de lavage manuel pour test ELISA, ou dispositif de lavage automatique des plaques de microtitrage
9. Spectrophotomètre pour plaques de microtitration avec filtre 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm)
10. Incubateur

8. Réalisation du test SÉRODIAGNOSTIC

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

8.1 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.

Les échantillons doivent être préparés 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).

8.2 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 contrôles prêts à l'emploi (contrôle positif, contrôle valeur-seuil, contrôle négatif) sont spécifiques des paramètres et doivent être utilisés exclusivement avec le lot de lames indiqué dans le certificat de contrôle de qualité.

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 barettes.
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).

8.3 Réalisation du test ELISA VIROTECH

1. Pour chaque série, pipeter 100 µl de tampon de dilution (blanc) prêt à l'emploi de contrôle négatif, de contrôle cut-off et de contrôle positif des IgG, ainsi que des sérums dilués des patients. Nous recommandons d'opter pour une double distribution (blanc, contrôles et sérums patients) : pour le contrôle cut-off, la double distribution est absolument indispensable. Dilution de travail pour les sérums patients : 1+100 ; par ex. 10 µl de sérum + 1 ml de tampon de dilution.
2. Après la distribution, incuber la plaque à 37 °C pendant 30 minutes (avec couvercle).
3. 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.
4. Déposer 100 µl de conjugué prêt à l'emploi dans tous les puits.
5. Incubation des conjugués : 30 minutes à 37 °C (avec couvercle).
6. Mettre fin à l'incubation du conjugué en effectuant quatre lavages (voir le point 3).
7. Déposer 100 µl de substrat TMB dans chacun des puits.
8. Incubation de la solution de substrat : 30 minutes à 37 °C (avec couvercle, placer dans un endroit sombre).
9. Arrêt de la réaction : déposer 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.
10. 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

8.4 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 :

1. 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.
2. 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.
3. 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.

9. Interprétation du test SÉRODIAGNOSTIC

Les contrôles prêts à l'emploi sont destinés à une détermination semi-quantitative des anticorps IgG et IgM dont la concentration est indiquée en unités VIROTECH (VE). Les fluctuations dues à la réalisation du test sont compensées par la méthode de calcul, ce qui permet d'obtenir une reproductibilité élevée. Pour le calcul des unités VIROTECH (VE), utiliser les moyennes des valeurs de DO.

9.1 Contrôle du bon fonctionnement du test

a) Valeurs de DO

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

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

b) Unités VIROTECH (VE)

Les unités VIROTECH (VE) du contrôle cut-off sont fixées à 10 VE. Le nombre de VE calculées pour le contrôle positif doit être compris dans la plage indiquée dans le certificat de contrôle-qualité.

Si les exigences (concernant les valeurs de DO et les unités VIROTECH) ne sont pas remplies, répéter le test.

9.2 Calcul des unités VIROTECH (VE)

L'extinction de la valeur à blanc (450/620 nm) doit impérativement être soustraite de toutes les extinctions.

$$VE_{\text{(contrôle positif)}} = \frac{DO_{\text{(contrôle positif)}}}{DO_{\text{(contrôle cut - off)}} \times 10$$
$$VE_{\text{(sérum patient)}} = \frac{DO_{\text{(sérum patient)}}}{DO_{\text{(contrôle cut - off)}} \times 10$$

9.3 Schéma d'interprétation des IgG

Résultat (VE)	Évaluation
< 9,0	négatif
9,0 à 11,0	plage limite
> 11,0	positif

1. Si le nombre d'unités VIROTECH (VE) mesurées pour l'échantillon est supérieur à la limite supérieure de la zone grise, les échantillons seront considérés comme positifs.
2. Si le nombre d'unités VIROTECH (VE) mesurées est compris dans la zone grise indiquée, la concentration en anticorps n'est pas significativement élevée ; les échantillons seront alors considérés comme étant à la limite. Pour qu'une infection soit mise en évidence de façon sûre, il est nécessaire de déterminer la teneur en anticorps des deux échantillons sériques. Un échantillon sérique doit être testé directement après le début de l'infection, un deuxième échantillon cinq à dix jours plus tard (sérum de convalescent). La concentration des deux échantillons doit être déterminée de façon parallèle. Il n'est pas possible d'établir de diagnostic correct sur la base de l'évaluation d'un seul échantillon sérique.
3. Si les valeurs mesurées sont inférieures à la zone grise définie, l'échantillon ne contient pas d'anticorps spécifiques aux antigènes en quantité décelable. Les échantillons seront alors considérés comme étant négatifs.

9.4 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. La réaction croisée entre les Borrelia et d'autres spirochètes peut engendrer l'obtention d'un résultat positif erroné. Des réactions croisées peuvent survenir dans les sérums des patients présentant les infections suivantes : syphilis (*Treponema pallidum*), pian (*Treponema pertenue*), borrélioses (borréliose spéc.), leptospiroses (leptospirose spéc.). De même, des réactions croisées peuvent survenir en cas de maladies herpétiques (CMV, HSV, parvovirus) (12,13).
3. Suite à une infection EBV (mononucléose infectieuse), une formation non spécifique des anticorps anti-Borrelia peut survenir, surtout ceux de la classe des IgM (12, 13).
4. Le test ELISA Borrelia afzelii + VlsE IgG est un test de détection (screening) ayant une sensibilité et une sécurité diagnostiques maximales. Conformément à la méthode de diagnostic en deux temps, un test de confirmation (Line Immuno Assay/ Western Blot) devrait être effectué pour vérifier les résultats situés à la limite ou positifs.

10. Données sur les performances SÉRODIAGNOSTIC

10.1 Sensibilité diagnostique

Pour établir la sensibilité diagnostique, les classes immunitaires IgG et IgM ont été évaluées ensemble. 105 sérums ont été testés sur le *Borrelia afzelii*+VlsE IgG ELISA et sur le *Borrelia afzelii* IgM ELISA. Des sérums caractérisés cliniquement provenant de patients présentant des manifestations précoces de borréliose de Lyme (n=43) et des manifestations de neuroborréliose (n=18), d'arthrite de Lyme (n=19) et d'ACA (n=25) ont été testés. La sensibilité diagnostique s'élève à 99,0 %. Le sérum non recensé est issu du collectif des manifestations précoces.

Lors du calcul de la sensibilité diagnostique, les sérums limites (n=2) n'ont pas été pris en compte.

10.2 Sensibilité et spécificité

Pour déterminer la sensibilité et la spécificité, des sérums positifs caractérisés cliniquement ainsi que des sérums de donneurs sanguins ont été testés dans le *Borrelia afzelii*+VlsE IgG ELISA et dans le *Borrelia burgdorferi* ELISA (sans VlsE recombinante).

Sensibilité

Collectif sérologique (n=106) ; manifestation précoce de borréliose de Lyme (n=43), ACA (n=25), arthrite de Lyme (n=19), neuroborréliose (n=19).

Borrelia afzelii+VlsE IgG ELISA	Borrelia burgdorferi ELISA (sans VlsE recombinante)		
	positive	négative	limite
positive	82	11	3
négative	0	8	0
limite	0	2	0

La sensibilité du *Borrelia afzelii*+VlsE IgG ELISA dépasse 99,0 %.

Les sérums limites n'ont pas été pris en compte lors du calcul.

Spécificité

Collectif sérologique (n=119) ; sérums de banque du sang (n=112), sérums de femmes enceintes (n=7).

Borrelia afzelii+VlsE IgG ELISA	Borrelia burgdorferi ELISA (sans VlsE recombinante)		
	positive	négative	limite
positive	0	3	6
négative	1	95	3
limite	1	10	0

La spécificité du *Borrelia afzelii*+VlsE IgG ELISA s'élève à 97 %.

Les sérums limites n'ont pas été pris en compte lors du calcul.

10.3 Réactivité croisée

Avec les sérums tréponémiques positifs, les réactions croisées sont connues.

Dans le cadre d'infections virales herpétiques (prépondérantes dans le cas de l'EBV), la formation d'anticorps réactifs aux borrelies peut survenir.

Il peut en outre se produire des réactions croisées avec les sérums mycoplasmiques, *Helicobacter pylori*, CMV, parvoviraux et *Yersinia*, ainsi qu'avec les sérums auto-immunes.

10.4 Propagation (valeurs escomptées)

Le tableau suivant représente le test de 85 sérums de donneurs sanguins :

	IgG
négative	71
limite	8
positive	6

Ceci correspond à un taux de propagation de 7 %.

10.5 Coefficient de variation intra-essai (répétabilité)

Dans un essai, les bandes de différentes plaques d'un lot ont été testées avec un sérum. Le coefficient de variation ainsi établi est inférieur à 9 %.

10.6 Coefficient de variation intra-essai (reproductibilité)

Dans 12 séries de tests indépendantes, un sérum positif, un sérum limite et un sérum négatif ont été testés dans des laboratoires différents et par des sujets différents.

Sérum	Valeur moyenne de la DO	Coefficient de variation des unités VIROTECH
Négative	0,14	9,57 %
Limite	0,31	12,16 %
Positive	1,48	10,68 %

11. Données sur les performances DIAGNOSTIC DU LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN

11.1 Sensibilité et spécificité

Pour déterminer la sensibilité **diagnostique**, des paires liquide céphalo-rachidien/sérum définies et positives à la neuroborréliose ont été testées dans le VIROTECH ELISA.

Sensibilité diagnostique IgG

	n	%
Somme	26	100
pathologique	26	100
normal	0	0

La sensibilité dépasse 99,9 %. Elle se situe donc dans la plage de sensibilité de la procédure de détection des anticorps indiquée dans la directive MIQ au stade II / III (70-100 %) du diagnostic de la borréliose de Lyme.

Pour déterminer la spécificité **diagnostique**, des paires liquide céphalo-rachidien/sérum définies et négatives au CNC ont été testées dans le VIROTECH ELISA.

Spécificité diagnostique IgG

	n	%
Somme	19	100
pathologique	0	0
normal	19	100

La spécificité dépasse 99,9% pour les IgG.

Pour déterminer la sensibilité et la spécificité, des paires liquide céphalo-rachidien/sérum de neuroborrélioses avérées, des paires liquide céphalo-rachidien/sérum avec soupçon de neuroborréliose et des paires liquide céphalo-rachidien/sérum définies et négatives au CNC ont été testées dans le VIROTECH Borrelia afzelii+VlsE IgG Liquor ELISA et dans un test de référence.

Sensibilité et spécificité IgG

Paires liquide céphalo-rachidien/sérum (n=59)

VIROTECH ELISA	Test de référence	
	pathologique	normal

pathologique	26	3
normal	0	30

Dans l'IgG, la sensibilité du *Borrelia afzelii*+VlsE IgG Liquor ELISA dépasse 99,9 %, tandis que la spécificité atteint 90,6 %.

11.2 Réactivité croisée

Avec les sérums tréponémiques positifs, les réactions croisées sont connues.

Dans le cadre d'infections virales herpétiques (prépondérantes dans le cas de l'EBV), la formation d'anticorps réactifs aux borrelies peut survenir.

Il peut en outre se produire des réactions croisées avec les sérums mycoplasmiques, *Helicobacter pylori*, CMV, parvoviraux et *Yersinia*, ainsi qu'avec les sérums auto-immunes.

12. Littérature

1. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Lyme disease - a tick -borne spirochetosis?, Science 216:1317-19.
2. Steere, A.C. (1989), Lyme Disease, N. Engl. J. Med. 321:586-96.
3. Dressler, F., Ackermann, R. and Steere, A.C. (1994), Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme Borreliosis, J. Infect. Dis. 169: 313-318.
4. Hofmann, H. (1996) Lyme Borreliosis . Problems of Serological Diagnosis, Infection 24, No. 6 :470-472.
5. Pfister, H-W., Wilske, B. (1994) Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects, The Lancet Vol. 343: 1013-1015.
6. Dressler, F. (1994) Lyme borreliosis in European children and adolescents, Clinical and Experimental Rheumatology 12 (Suppl. 10) :49-54.
7. Hansen, K. (1993), Laboratory Diagnostic Methods in Lyme Borreliosis, Elsevier Science Publishing Co., Inc.:12.
8. Tewald, F. Braun, R. (1998), Durchführung und Interpretation serologischer Tests bei Verdacht auf Borrelioseninfektion, Clin.Lab. 44: 897-902.
9. Goosens, H.A.T., Bogaard, van den A.E., Nohlmans, M.K.E., (1999), Evaluation of Fifteen commercially available serological tests for diagnosis of Lyme borreliosis, Eur.J. Microbiol.Infect.Dis 18: 551-560.
10. Craft, J.E., Fischer, D.K., Shimamoto, G.T. and Steere, A.C. (1986), Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G late in the illness., J. Clin. Invest. 78:934-39.
11. Craft, J.E., Grodzicki, R.L. and Steere, A.C. (1984), Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests, J. Inf. Dis. 149:789-95.
12. Goosens, H.A.T., Bogaard, van den A.E., Nohlmans, M.K.E., (1999), Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus Infections cause false positive results in IgM two-test protocol for early Lyme-Borreliosis, Infection 27 No.3: 231.
13. Horst, H. (1997), Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier, 3., überarbeitete Auflage, Spitta Verlag: 128-130.
14. RKI (1999), Ratgeber Infektionskrankheiten, Lyme-Borreliose, Epidemiologisches Bulletin, überarbeitete Auflage
15. Oschmann und Kraiczy (1998) Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis, UNI-MED-Verlag 48-67.
16. Wilske et al. MiQ12/2000; Urban&Fischer
17. Zhang, J-R. et al.; Antigenic variation in Lyme disease *Borrelia* by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes; Cell 1997. 89:275-285
18. Lawrenz, M.B. et al.; Human antibody responses to VlsE antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*; American Society of Clinical Microbiology; Dec. 1999: 3997-4004.
19. Wang, D., Botkin, D.J. and Norris, S.J.; Characterization of the vls antigenic variation loci of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia garinii* Ip90 and *Borrelia afzelii* ACAI (2003); Molecular Microbiology; 47(5): 1407-1417.
20. Felgenhauer K, Beuche W: Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen; Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1999

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 à 1:101

Exemple :

10 µl de sérum/plasma + 1000 µl de tampon de dilution
(le tampon de dilution est prêt à l'emploi)

Réalisation du test

Incubation des échantillons	30 minutes à 37 °C	100 µl d'échantillons patients blanc (tampon de dilution) et contrôles
↓		
Laver 4 fois		400 µl de solution de lavage bien tapoter
↓		
Incubation du conjugué	30 minutes à 37 °C	100 µl de conjugué IgG
↓		
Laver 4 fois		400 µl de solution de lavage bien tapoter
↓		
Incubation du substrat	30 minutes à 37 °C	100 µl de substrat
↓		
Arrêt		50 µl de solution d'arrêt agiter avec précaution
↓		
Mesure de l'extinction		photomètre à 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm)