

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

Référence : EC024G00 Codage couleur : doré/rouge

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards

Référence : EC022L60

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set

Bestell-Nr.: EN022L65

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

POUR DIAGNOSTIC IN-VITRO UNIQUEMENT

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



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) | 5 |
| 5. Stockage et conservation du kit et des réactifs prêts à l'emploi | 5 |
| 6. Mesures de précaution et mises en garde | 5 |
| 7. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit) | 6 |
| 8. Réalisation du test SÉRODIAGNOSTIC | 6 |
| 8.1 Echantillons | 6 |
| 8.2 Préparation des réactifs | 6 |
| 8.3 Réalisation du test ELISA VIROTECH | 6 |
| 8.4 Utilisation de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA | 7 |
| 9. Interprétation du test SÉRODIAGNOSTIC | 7 |
| 9.1 Contrôle du bon fonctionnement du test | 7 |
| 9.2 Calcul des unités VIROTECH (VE) | 7 |
| 9.3 Schéma d'interprétation des IgG | 8 |
| 9.4 Limites du test | 8 |
| 10. Données sur les performances SÉRODIAGNOSTIC | 9 |
| 10.1 Sensibilité diagnostique | 9 |
| 10.2 Spécificité diagnostique | 9 |
| 10.3 Comparaison des méthodes | 9 |
| 10.4 Réactivité croisée | 10 |
| 10.5 Prévalence | 10 |
| 10.6 Coefficient de variation intra-essai (répétabilité) | 10 |
| 10.7 Coefficient de variation intra-essai (reproductibilité) | 10 |
| 11. Données sur les performances DIAGNOSTIC DU LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN | 11 |
| 11.1 Sensibilité et spécificité | 11 |
| 11.2 Réactivité croisée | 11 |
| 12. Littérature | 12 |
| Schéma du déroulement du test | 13 |

1. Usage prévu

Le test ELISA B. afzelii+VlsE IgG Europe (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.

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 borrélioses 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 présumé peut être confirmé par des altérations inflammatoires du liquide céphalo-rachidien et par la détection d'une synthèse

intrathécale d'anticorps spécifiques aux borréliées. 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-borréliées exclut presque la possibilité d'une neuroborréliose. La détection positive d'anticorps spécifiques aux borréliées ne prouve à elle seule aucune infection active par *Borrelia afzelii*. A l'inverse, dans la phase initiale d'une infection borrélienne, en particulier en cas de traitement antibiotique précoce, la sérologie borrélienne peut être négative (9). Dans certaines circonstances, lors d'une neuroborréliose aiguë, il se peut que la synthèse IgG n'ait pas lieu, seuls des anticorps IgM étant donc décelables (20).

L'antigène utilisé constitue un mélange obtenu à partir de la souche de *B. afzelii* PKo recommandée pour l'Europe (à l'origine isolée à partir d'une lésion d'érythème migrant humain en Allemagne), de la souche de *B. garinii* PBr (à l'origine isolée à partir de liquide céphalo-rachidien d'un patient atteint d'une neuroborréliose en Allemagne), de la souche de *B. burgdorferi* ZS7 (à l'origine isolée à partir d'une tique infectée en Allemagne) et de la *B. burgdorferi* B31 (à l'origine isolée à partir d'une tique infectée sur l'île Shelter Island, N.Y.).

| Souche | Antigène | Description | Purification | Spécificité des antigènes |
|---------------------------------|-------------------|---|---|---------------------------|
| <i>Borrelia afzelii</i> PKo | Antigène de lysat | Lysat cellulaire bactérien, contient tous les antigènes natifs | Extrait cellulaire brut conditionné dans un tampon de phosphate | sensible |
| <i>Borrelia burgdorferi</i> ZS7 | Antigène de lysat | Lysat cellulaire bactérien, contient tous les antigènes natifs | Extrait cellulaire brut conditionné dans un tampon de phosphate | sensible |
| <i>Borrelia garinii</i> PBr | Antigène de lysat | Lysat cellulaire bactérien, contient tous les antigènes natifs | Extrait cellulaire brut conditionné dans un tampon de phosphate | sensible |
| <i>Borrelia burgdorferi</i> B31 | VlsE, recombinant | Variable major protein like sequence E. Lipoprotéine exprimée <i>in vivo</i> avec des épitopes hautement immunogéniques conservés – par rapport à différentes géno-espèces. Dans la sérologie de l'IgG, des réactivités contre la VlsE sont constatées dans les sérums de patients atteints d'une borréliose de Lyme au stade précoce et avancé. La VlsE représente un marqueur de la borréliose de Lyme dans la sérologie de l'IgG commun à tous les stades de maladie. La VlsE est un antigène de 35 kDa codé sur lp28-1. | Purifiée à partir de la bactérie <i>E. coli</i> par l'intermédiaire d'une chromatographie d'affinité Ni-NTA | spécifique |

3. Principe du test

L'anticorps recherché dans le sérum humain forme un immunocomplexe avec l'antigène coâté 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')**, 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 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 |
| 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. Couvertres 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 de 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).

10. Données sur les performances SÉRODIAGNOSTIC

10.1 Sensibilité diagnostique

Pour déterminer la sensibilité diagnostique, un total de 79 échantillons cliniquement caractérisés provenant de patients présentant des Manifestations Précoces de la maladie de Lyme (n=36), une Neuroborréiose (n=11), une arthrite de Lyme (n=12) et une ACA (n=20) ont été testés avec le VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA. La sensibilité diagnostique a été déterminée séparément pour chaque phase clinique. Les échantillons limite (n=3) n'ont pas été pris en compte dans le calcul de la sensibilité diagnostique.

| sensibilité diagnostique Manifestations Précoces | négative | limite | positive | sensibilité [%] |
|---|----------|--------|----------|-----------------|
| | 12 | 2 | 22 | 64,7 |

| sensibilité diagnostique ACA | négative | limite | positive | sensibilité [%] |
|---------------------------------|----------|--------|----------|-----------------|
| | 0 | 0 | 20 | 100 |

| sensibilité diagnostique Lyme-Arthrite | négative | limite | positive | sensibilité [%] |
|---|----------|--------|----------|-----------------|
| | 0 | 0 | 12 | 100 |

| sensibilité diagnostique Neuroborréiose | négative | limite | positive | sensibilité [%] |
|--|----------|--------|----------|-----------------|
| | 1 | 1 | 9 | 90,0 |

10.2 Spécificité diagnostique

Pour déterminer la spécificité diagnostique, un total de 93 échantillons provenant de donneurs de sang sains en Allemagne ont été testés avec un ELISA de référence. Les échantillons négatifs sur le test de référence ont ensuite été testés sur le VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA. La spécificité diagnostique a été déterminée. Les échantillons limites (n=2) n'ont pas été pris en compte dans le calcul de la spécificité diagnostique.

| spécificité diagnostique | négative | limite | positive | spécificité [%] |
|--------------------------|----------|--------|----------|-----------------|
| | 87 | 2 | 4 | 95,6 |

10.3 Comparaison des méthodes

Pour déterminer la sensibilité et la spécificité, des échantillons positifs et cliniquement caractérisés provenant de patients atteints de la maladie de Lyme (n=79) et des échantillons provenant de donneurs de sang sains d'Allemagne (n=101) ont été testés avec le VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA et avec un ELISA de référence.

| Exemple de collectif (n=180) | ELISA de référence | | | |
|--|--------------------|--------|----------|----|
| | négative | limite | positive | |
| VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA | négative | 94 | 5 | 3 |
| | limite | 4 | 0 | 2 |
| | positive | 8 | 3 | 61 |

Les échantillons limites n'ont pas été pris en compte dans le calcul de la sensibilité et de la spécificité.

Il en résulte une sensibilité de 95 % pour le VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA.

Il en résulte une spécificité de 92 % pour le VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA.

10.4 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.

L'apparition de réactions croisées avec des échantillons de sérum à Mycoplasma, Helicobacter pylori, CMV, parvovirus et Yersinia ainsi que des échantillons de sérum auto-immun est possible dans de plus rares cas.

Le test B. afzelii+VlsE IgG Europe ELISA a servi à analyser les réactions croisées d'échantillons de sérum positif au *Treponema pallidum*, d'échantillons de sérum positif à l'EBV ainsi que d'échantillons de sérum auto-immun :

| Collectif | pos | neg | limite | Somme |
|--|-----|-----|--------|-------|
| Sérums positifs au <i>Treponema pallidum</i> | 4 | 8 | 10 | 22 |
| Sérums positifs à l'EBV | 0 | 9 | 1 | 10 |
| Sérums auto-immuns | 1 | 14 | 0 | 15 |

10.5 Prévalence

Un panel de 101 échantillons provenant de donneurs de sang sains en Allemagne a été testé avec le VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA.

| VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA | negative | limite | positive |
|---|----------|--------|----------|
| Exemple de collectif (n=101) | 89 | 3 | 9 |

Cela donne une prévalence de 8,9 %.

Dans la littérature, des prévalences de 4 à 15 % ont été décrits pour la période 1989-2012. (23)

10.6 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 %.

10.7 Coefficient de variation intra-essai (reproductibilité)

Lors de 10 séries de tests indépendants, 3 sérums ont été testés à chaque fois. Les coefficients de variation ainsi établis sont inférieurs à 15 %.

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

La détection d'une production intrathécale d'anticorps spécifique repose sur la mesure de l'indice d'anticorps selon Reiber (21)

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.

Sensibilité 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 +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 +VlsE IgG Liquor ELISA dépasse 99,9 %, tandis que la spécificité atteint 90,6 %.

11.2 Réactivité croisée

On retrouve les mêmes anticorps dans le liquide céphalo-rachidien et le sérum (22). Des réactions croisées sont donc susceptibles de se produire avec des anticorps dirigés contre le même agent pathogène lors du diagnostic sérologique comme du diagnostic du liquide céphalo-rachidien. Les données tirées des examens de sérologie sont donc applicables au diagnostic du liquide céphalo-rachidien.

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
21. Reiber H., und Lange P. (1991) Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain, Clin Chem 37: 1153-60
22. Reiber, H. und Peter J. B. (2001) Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs, Journal of the Neurological Sciences 184: 101-122.
23. Estimates for Lyme borreliosis infections based on models using sentinel canine and human seroprevalence data. M.J. Cook and B.K. Puri (2020). Infectious Disease Modelling 5 (2020) 871-888. <https://doi.org/10.1016/j.idm.2020.10.004>.

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) |