

VIROTECH Borrelia Vet. + OspA IgG LINE Immunoblot

(Borrelia Vet. + OspA IgG LINE Hund/Dog)

N° de commande : DE226G32

Borrelia Vet. + OspA IgG LINE Set Pferd/Horse

N° de commande : DE226K62

**UNIQUEMENT DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO chez les chiens
et les chevaux**

**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	3
4.	Contenu.....	3
4.1	Kit pour 32 déterminations	3
4.2	Kit pour chevaux	4
5.	Stockage et conservation du kit et des réactifs	4
6.	Mesures de précaution et mises en garde	4
7.	Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit)	5
8.	Réalisation du test	5
8.1	Préparation des échantillons	5
8.2	Préparation des réactifs	5
8.3	Réalisation du western blot	5
8.4	Utilisation de processeurs pour western blot	6
9.	Interprétation du test	6
9.1	Interprétation des échantillons de chien/cheval	6
9.2	Utilisation du témoin seuil	7
9.3	Signification des antigènes.....	7
9.4	Critères d'interprétation	8
9.5	Limites du test.....	9
10.	Données sur les performances	9
10.1	Chien	10
10.2	Cheval	10
11.	Littérature	10
12.	Schéma du déroulement du test	12

1. Usage prévu

Le test Borrelia vétérinaire plus OspA Line de VIROTECH est un kit de test western blot LINE pour la détection qualitative des anticorps IgG spécifiques anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato dans le sérum canin ou équin. Ce kit diagnostique permet de distinguer chez le chien une infection sauvage d'une vaccination.

2. Signification diagnostique

Généralités

L'agent infectieux de la borréliose de Lyme (BL), le spirochète *B. burgdorferi* a été découvert en 1981 par Burgdorfer et Barbour et classé comme espèce du genre *Borrelia* (1).

La borréliose de Lyme (BL) est une maladie systémique provoquée par une infection aux spirochètes *B. burgdorferi* (7,8). La transmission des spirochètes se fait par la piqûre d'une tique infectée. En Europe, il a été établi que la tique *Ixodes ricinus* était le principal vecteur (2,5). Des espèces de *B. burgdorferi* pathogènes pour l'homme ont été décrites en Europe et sont réunies de manière générique sous le nom de *B. burgdorferi*. Il s'agit des espèces *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis* et *B. spielmanii* (5,6,9,10,11).

On ignore encore dans quelle mesure les animaux (chiens et chevaux) sont aussi atteints de la BL après une infection par *B. burgdorferi* s.l. À l'heure actuelle, on suppose que la plupart des animaux infectés ne présentent (initialement) aucun changement clinique. En général, le propriétaire de l'animal consulte pour la première fois un vétérinaire une fois que des symptômes (p. ex. boiterie) apparaissent. Dans ce cas, une détermination sérologique des IgG est indiquée (12,13).

Tableau clinique chez le chien :

Un déclin de l'état de santé général accompagné d'anorexie et de fièvre ainsi qu'une boiterie intermittente causée par l'arthrite sont les plus solides indicateurs d'une BL chez le chien. Outre ces symptômes, une lymphadénopathie a été observée dans environ 5 % des cas et des troubles rénaux graves, dans environ 2 % des cas (3).

Tableau clinique chez le cheval :

Au cours d'une étude allemande, 50 chevaux ont été évalués sur la base des symptômes de la maladie après une infection par *B. burgdorferi*. La forte proportion de maladies oculaires (conjonctivite, kératoconjonctivite, rétinite) était frappante. Toutefois, les symptômes généraux peu spécifiques de la maladie, comme un amaigrissement et une baisse des performances (24 %) ainsi que l'inflammation articulaire (12 %) et la boiterie (10 %) étaient les symptômes les plus fréquents ayant donné lieu à une consultation vétérinaire. On a observé plusieurs cas de polyarthrite pouvant toucher pratiquement toutes les articulations des extrémités (4).

3. Principe du test

Les protéines de l'antigène de l'agent infectieux sont transférées sur une membrane de nitrocellulose au moyen d'un procédé de pulvérisation spécial. La membrane de nitrocellulose est ensuite découpée en bandelettes individuelles.

L'incubation des bandelettes de nitrocellulose contenant les antigènes avec des échantillons de sérum canin ou équin permet ensuite la détection des anticorps spécifiques présents. Ces anticorps forment des complexes immunitaires avec les antigènes fixés sur les bandelettes de test. Après avoir éliminé les anticorps non liés à l'étape de lavage, les bandelettes de nitrocellulose individuelles sont incubées avec anticorps IgG anti-chien et anti-cheval conjugués à la phosphatase alcaline. Une fois que les anticorps conjugués non liés ont été éliminés lors d'une nouvelle étape de lavage, les complexes antigène/anticorps sont rendus visibles par l'ajout d'un substrat non coloré qui forme des bandes bleu-violet par réaction enzymatique. La réaction enzyme/substrat est arrêtée par lavage des bandelettes de nitrocellulose avec de l'eau distillée/désionisée. Selon le motif de bandes observé, il est possible d'établir la présence d'anticorps IgG spécifiques.

4. Contenu

4.1 Kit pour 32 déterminations

- | | |
|---|--------------------------|
| 1. Bandelettes de nitrocellulose avec antigènes vaporisés, stabilisées sur un film, triées en carnets, prêtes à l'emploi | 1x 32 bandelettes |
| 2. Témoin seuil d'IgG , sérum canin, prédilué | 1x 0,5 ml |
| 3. Tampon de dilution/lavage , pH 7,3 (conc. 10x), avec Tris et agent conservateur | 2x 50 ml |

4. **Conjugué IgG anti-chien** (conc. 100x)
Anti-chien, phosphatase alcaline (lapin), avec agent conservateur **1x 0,7 ml**
5. **Substrat (BCIP/NBT)**, prêt à l'emploi **1x 57 ml**
6. **Feuille de protocole d'évaluation pour chien**
pour consigner et archiver les résultats **1x 1 feuille**

4.2 Kit pour chevaux

Disponible sur demande (DE226K62)

1. **Témoin seuil d'IgG**, sérum équin, prédilué **1x 0,5 ml**
2. **Conjugué IgG anti-cheval** (conc. 100x)
Anti-cheval, phosphatase alcaline (lapin), avec agent conservateur **1x 0,7 ml**
3. **Feuille de protocole d'évaluation pour cheval**
pour consigner et archiver les résultats **1x 1 feuille**

5. Stockage et conservation du kit et des réactifs

Conserver le kit de test à une température de 2 à 8 °C. La durée de vie des différents composants figure sur leur étiquette respective ; voir la durée de vie du kit sur l'étiquette extérieure du kit.

4. Ne pas congeler les différents réactifs et ne pas les exposer à de fortes températures.
5. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
6. Éviter d'exposer les réactifs à une lumière intense pendant l'entreposage.
7. La solution de substrat BCIP/NBT est sensible à la lumière et doit être conservée à l'obscurité.
8. **Bandelettes de test de nitrocellulose** : Utiliser immédiatement les bandelettes après les avoir sorties de leur pochette. Fermer hermétiquement la pochette contenant les bandelettes non utilisées et le conserver à une température de 2 à 8 °C. Pour l'archivage des résultats, les bandelettes de test de nitrocellulose doivent impérativement être protégées de la lumière directe du soleil afin d'éviter une décoloration des bandelettes.

Matériel	État	Entreposage	Stabilité
Échantillons de test	non dilués	+2 à +8 °C	1 semaine
Bandelettes de test	après l'ouverture	+2 à +8 °C (entreposage dans la pochette fournie)	3 mois
Témoins	après l'ouverture	+2 à +8 °C	3 mois
Conjugué	après l'ouverture	+2 à +8 °C	3 mois
	dilué	+2 à +8 °C	environ 6 heures
Substrat	après l'ouverture	+2 à +8 °C (à l'abri de la lumière)	3 mois
Solution de lavage	après l'ouverture	+2 à +8 °C (à l'abri de la lumière)	3 mois
	dilution finale (prêt à l'emploi)	+2 à +8 °C	4 semaines
	dilution finale (prêt à l'emploi)	ou à la température ambiante	2 semaines

6. Mesures de précaution et mises en garde

1. Les sérums témoins, les échantillons, les échantillons dilués, les conjugués et les bandelettes de test de nitrocellulose doivent être considérés comme un matériel potentiellement infectieux et être manipulé en conséquence. Les différentes directives pour les travaux de laboratoire doivent être suivies.
2. Lors de l'exécution du western blot, porter des gants jetables et utiliser une pince en plastique.
3. L'élimination des matériaux utilisés doit se faire dans le respect des directives nationales.
4. Les bacs d'incubation ont été conçus par le fabricant pour un usage unique. L'utilisateur doit assumer la responsabilité de la réutilisation des bacs d'incubation. En cas de réutilisation éventuelle, nous recommandons de désinfecter après

utilisation les bacs d'incubation pendant plusieurs heures dans une solution de hypochlorite de sodium à 1 %, de les nettoyer et de les rincer abondamment à l'eau du robinet puis avec de l'eau distillée/désionisée.

7. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit)

1. Bac d'incubation (les numéros de commande figurent sur le catalogue des produits)
2. Agitateur (vertical et non centrifuge)
3. Un pulvérisateur pour l'arrêt
4. Pipette ou lave-main
5. Micropipettes 5 µl - 1500 µl
6. Embouts de pipettes
7. Tubes à essai (tubes) volume de 2-20 ml
8. Pince en plastique
9. Eau distillée/désionisée
10. Papier filtre

8. Réalisation du test

Il est obligatoire de suivre fidèlement la procédure décrite par VIROTECH Diagnostics afin d'obtenir des résultats corrects.

8.1 Préparation des échantillons

1. 15 µl de sérum sont nécessaire par échantillon
2. Les échantillons de sang doivent avoir été prélevés dans des conditions aseptiques par ponction veineuse. Séparer le sérum après coagulation totale. Les échantillons peuvent être conservés pendant 1 semaine à une température de 2 à 8 °C. Les sérums doivent être congelés à une température de -20 °C pour être conservés plus longtemps.
3. Éviter de soumettre les sérums à cycles multiples de congélation-décongélation.
4. Ne pas utiliser les échantillons de sérum d'apparence turbide (en particulier après la décongélation), les centrifuger au besoin (5 min à 1000 x g), pipeter le liquide surnageant clair et l'utiliser dans le test.

8.2 Préparation des réactifs

1. Porter tous les concentrats de réactifs de test à température ambiante avant la dilution. Uniquement utiliser de l'eau distillée/désionisée de qualité supérieure et à température ambiante.
2. Bien mélanger les dilutions avant l'exécution du test.

Tampon de dilution/lavage

Le tampon de dilution/lavage est concentré 10x. Diluer le concentré de tampon de dilution/lavage à 1:10 avec de l'eau distillée ou désionisée (10 ml/50 ml/100 ml de concentré + 90 ml/450 ml/900 ml d'eau distillée/désionisée) et bien mélanger. Le tampon de dilution/lavage concentré ou dilué peut prendre une coloration jaune. Cette coloration jaune n'a aucune influence sur la durée de vie du tampon de dilution/lavage ni sur la fonctionnalité et la valeur diagnostique du test.

3. Conjugué IgG

Diluer le conjugué 1 + 100 avec la dilution finale du tampon de dilution/lavage et bien mélanger. 1,5 ml de solution de travail diluée de conjugué est nécessaire pour chaque échantillon de sérum. Voir tableau de dilution du conjugué (Point : « Schéma de déroulement du test »).

4. Solution de substrat

La solution de substrat est livrée prête à l'emploi.

8.3 Réalisation du western blot

Pour l'exécution et l'évaluation correctes de la LINE, chaque cycle de test doit comprendre les témoins seuils propres aux paramètres et au lot.

1. Le test est effectué à température ambiante.
2. Placer pour chaque échantillon 1 bandelette dans la rigole d'un bac d'incubation propre. Ne toucher les bandelettes dans la mesure du possible qu'à l'endroit indiqué à l'extrémité supérieure.

3. Pipeter pour chacun 1,5 ml de **tampon de dilution/lavage** prêt à l'emploi et placer sur l'agitateur. Veiller à ce que les bandelettes de test de nitrocellulose soient uniformément recouvertes de liquide, les bandelettes ne doivent pas sécher pendant toute l'exécution du test.
4. Les bandelettes de test de nitrocellulose stabilisées sont complètement humidifiées en une minute et peuvent être incubées à l'endroit, à l'envers ou sur le côté.
5. Pipeter **15 µl de sérum canin/équien** (pour une dilution de 1+100) ou **100 µl de témoin seuil**, dans la mesure du possible sur la partie marquée à l'extrémité supérieure de la bandelette. Incuber le sérum canin/équien et le témoin pendant **30 minutes** sur l'agitateur. Veiller à éviter toute contamination croisée des échantillons de patient lors du pipetage et du transfert consécutif.
6. Aspirer ou verser avec précaution tout le liquide des rigoles. En versant le liquide, les bandelettes de test de nitrocellulose restent dans le fond des rigoles. Éliminer le reste de liquide avec un papier absorbant.
7. **Lavage** des bandelettes : incuber chaque bandelette avec 1,5 ml de tampon de dilution/lavage prêt à l'emploi pendant **3 x 5 minutes** sur l'agitateur. Toujours aspirer ou verser complètement le tampon de lavage. Avant d'effectuer la dernière étape de lavage, préparer la quantité nécessaire de dilution de conjugué fraîche (voir tableau).
8. Aspirer ou verser complètement le liquide des rigoles (voir point 6).
9. Pipeter respectivement 1,5 ml de la **dilution de conjugué** préparée dans les rigoles d'incubation correspondantes et incuber dans l'agitateur pendant **30 minutes**.
10. Aspirer ou verser complètement le liquide des rigoles.
11. **Lavage** des bandelettes : incuber chaque bandelette avec 1,5 ml de tampon de dilution/lavage prêt à l'emploi pendant **3 x 5 minutes** sur l'agitateur. Toujours aspirer ou verser complètement le tampon de lavage. Rincer ensuite pendant **1 x 1 minutes** avec de l'**eau distillée/désionisée**.
12. Aspirer ou verser complètement le liquide des rigoles (voir point 6).
13. Pipeter respectivement 1,5 ml de **solution de substrat** prête à l'emploi et développer dans l'agitateur pendant **10 ± 3 minutes**.
14. **Arrêter** le développement de couleur en versant la solution de substrat. Laver ensuite les bandelettes sans incubation intermédiaire **3 x** avec respectivement 1,5 ml d'**eau distillée/désionisée**.
15. Verser l'eau distillée/désionisée et faire sécher les bandelettes sur un papier absorbant propre. La coloration de fond qui peut être observée sur les bandelettes de nitrocellulose humides disparaît complètement sur les bandelettes séchées. Les bandelettes de test de nitrocellulose stabilisées nécessitent plus de temps que les bandelettes de test de nitrocellulose conventionnelles pour sécher.
16. Utiliser le protocole d'évaluation fourni pour l'évaluation. Le marquage des bandes spécifiques sur la feuille de protocole facilite l'évaluation des échantillons de sérum canin/équien.

Schéma de déroulement de test, voir dernière page

8.4 Utilisation de processeurs pour western blot

Les appareils suivants sont validés pour le traitement automatisé de LINE : Profiblot et Apollo

En principe, tous les appareils de traitement blot automatique disponibles dans le commerce sont adaptés.

9. Interprétation du test

Pour faciliter l'évaluation, chaque bandelette LINE est équipée d'un témoin de fonction de test (sérum témoin) :

1. **Sérum témoin** (= serum control).

Le kit de test dispose d'une bande de sérum témoin commune pour le chien et le cheval :

La bande d'incubation du sérum n'apparaît sous la ligne de marquage (= mark line) qu'après l'incubation avec du sérum.

Le test est valide lorsque le témoin de sérum apparaît clairement sur la bandelette de test de nitrocellulose développée.

Vérifiez sur la feuille de protocole la position des bandes de sérum témoin.

9.1 Interprétation des échantillons de chien/cheval

Veuillez vous reporter à la feuille de protocole pour la position et le marquage des bandes réactives.

Bandes IgG : VlsE-Mix-chien, OspA-Mix, DbpA-Mix, OspC-Mix, BmpA (p39), p58, p83, VlsE-Mix-cheval

9.2 Utilisation du témoin seuil

Les bandes dont l'intensité est plus faible que celle de la bande seuil du témoin seuil ne sont pas prises en compte pour l'évaluation.

Bande seuil IgG chien : OspA-Mix

Bande seuil IgG cheval : VlsE-Mix

9.3 Signification des antigènes

Liste des antigènes *B. burgdorferi* hautement purifiés et recombinants :

1. Le **VlsE-Mix** consiste en deux antigènes recombinants des géno-espèces *B. burgdorferi sensu stricto* (B31) et *B. garinii* (IP90).
2. Le **OspA-Mix** consiste en trois antigènes recombinants des géno-espèces *B. afzelii* (PKo), *B. garinii* ZQ1 et *B. burgdorferi s.s.ZS7*
3. Le **OspC-Mix** consiste en trois antigènes recombinants des géno-espèces *B. afzelii* (PKo), *B. bavariensis* (PBi) et *B. burgdorferi sensu stricto* (ZS7).
4. Le **DdpA-Mix** consiste en deux antigènes recombinants des géno-espèces *B. bavariensis* (PBi) et *B. garinii* (PBr) et de l'antigène hautement purifié *B. afzelii* (PKo).

Antigène/ Description	Signification des antigènes	Spécificité des anticorps dans LINE
VlsE-Mix 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 – VlsE est un antigène de 35 kDa codé sur lp28-1. <u>Importance biologique :</u> <i>B. burgdorferi</i> s.l. peut persister dans les mammifères infectés malgré une réponse immunitaire active. On pense que la variation antigénique combinatoire de la protéine de surface VlsE contribue à sa persistance - en tant que « mécanisme d'évasion immunitaire ». Marqueur du contact avec l'agent pathogène ou une infection sauvage par <i>B. burgdorferi</i> s.l.	Spécifique
OspA-Mix recombinant	Outer surface protein A • On observe des titres d'anticorps dirigés contre OspA en particulier après une vaccination	Hautement spécifique
DbpA-Mix Hautement purifié/ recombinant	Decorin binding protein A (aussi « Outer surface protein 17 » ou p17). Lipoprotéine codée par des plasmides. Les DbpAs de divers isolats des espèces <i>B. burgdorferi</i>, <i>B. afzelii</i>, <i>B. garinii</i>, <i>B. bavariensis</i> et <i>B. spielmanii</i> ont été décrites comme des antigènes sensibles et spécifiques qui se renforcent mutuellement dans leur réactivité. • Les anticorps dirigés contre DbpA sont particulièrement observés dans les cas de borréliose de Lyme au stade avancé/disséminée	Hautement spécifique
OspC-Mix (p23) recombinant	Outer surface protein C. Lipoprotéine codée par des plasmides Protéine de surface • Les anticorps dirigés contre OspC sont observés autant dans les cas d'infection sauvage qu'occasionnellement, après une vaccination	Hautement spécifique

BmpA (p39) <i>B.afzelii</i> (PKo) recombinant	Borrelial membrane protein A. Marqueur central codé par chromosome dans la sérologie IgG pour les cas de borréliose de Lyme disséminée.	Hautement spécifique
p58 recombinant <i>B.bavariensis</i> (PBi)	Oligopeptide permease protein A-2 (OppA-2). Lipoprotéine codée par chromosome conservée entre les espèces. • Les anticorps dirigés contre p58 sont particulièrement observés dans les cas de borréliose de Lyme au stade avancé/disséminée	Hautement spécifique
p83 recombinant <i>B.afzelii</i> (PKo)	Antigène codé par chromosome associé au cylindre protoplasmique, conservé dans <i>B. burgdorferi</i> sensu lato. Marqueur central dans la sérologie IgG pour les cas de borréliose de Lyme au stade avancé.	Hautement spécifique

9.4 Critères d'interprétation

9.4.1 Critères d'interprétation chez le chien :

Interprétation IgG recommandée chez le chien

Information généralement pour les bandes $\geq$ l'intensité de bande seuil. Exception : VlsE isolée

Chien	Résultat	Interprétation
0 bande ou bandes < seuil	négatif	Aucune indication d'un contact avec l'agent pathogène

VlsE-Chien		Résultat	Interprétation
Isolé	= seuil	négatif	Aucune indication d'un contact avec l'agent pathogène
	> seuil	Infection	Indication d'une infection
+ ≥ 1 bande (en dehors d'OspA)		Infection	Indication d'une infection

sans OspA et sans VlsE-Chien	Résultat	Interprétation
0 - 1 bande	négatif	Aucune indication d'un contact avec l'agent pathogène
2 - 3 bandes	limite	Indication d'un contact avec l'agent pathogène
≥ 4 bandes	Infection	Indication d'une infection

OspA		Résultat	Interprétation
isolé ou + ≥ 1 bande (sauf VlsE)		Vaccination	Vaccination
+ VlsE-chien isolé	= seuil	Vaccination	Vaccination
	> seuil	Vaccination + infection	Vaccination plus indication d'infection
+ VlsE-chien + ≥ 1 bande		Vaccination + infection	Vaccination plus indication d'infection

Ne considérez pas le VlsE-bande cheval pour l'interprétation chien.

9.4.2 Critères d'évaluation chez le cheval :

Évaluation IgG recommandée chez le cheval

Information généralement pour les bandes $\geq$ l'intensité de bande seuil

Cheval	Résultat	Interprétation
0 bande ou bandes < seuil	négatif	Aucune indication d'un contact avec l'agent pathogène

VlsE-Cheval	Résultat	Interprétation
+ 0 - 2 bandes	limite	Indication d'un contact avec l'agent pathogène
+ $\geq$ 3 bandes	Infection	Indication d'une infection

Cas particulier	Résultat	Interprétation
VlsE-cheval + DbpA + 1 bande	Infection	Indication d'une infection

sans VlsE-cheval	Résultat	Interprétation
0 - 2 bandes	négatif	Aucune indication d'un contact avec l'agent pathogène
3 bandes	limite	Indication d'un contact avec l'agent pathogène
$\geq$ 4 bandes	Infection	Indication d'une infection

Ne considérez pas le VlsE-bande chien pour l'interprétation cheval.

OspA ne doit pas être considéré comme une bande spécifique dans les réactions immunitaires équine à *B. burgdorferi* s.l.

En cas de résultat négatif ou limite et si l'on soupçonne sur le plan clinique une borréliose de Lyme, un nouveau prélèvement sanguin doit être réalisé environ 4 à 6 semaines plus tard. Cela s'applique aux chevaux comme aux chiens.

9.5 Limites du test

1. Lors de l'évaluation des résultats sérologiques, le tableau clinique et tout autre résultat de laboratoire doivent **toujours** être pris en compte.
2. Un résultat négatif au Western blot n'exclut pas entièrement la possibilité d'une borréliose puisque les anticorps pourraient toujours être sous la limite de détection.

Si l'on soupçonne toujours une infection sur le plan clinique, un deuxième prélèvement sanguin doit être effectué 4 à 6 semaines plus tard.

3. Les anticorps IgG sont aussi décelables plusieurs années après une rémission clinique.
4. Les réactions croisées entre *B. burgdorferi* s.l. et d'autres spirochètes, en particulier les leptospires, sont un phénomène connu.

10. Données sur les performances

Origine des sérums :

Le prof. Reinhard Straubinger, D.M.V., de la faculté de médecine vétérinaire du département de sciences vétérinaires de l'Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen a obtenu 217 sérums canins définis et 149 sérums équins définis.

Une comparaison a été réalisée avec le test en deux stades de la faculté de médecine vétérinaire, considéré ici comme le test standard. La comparaison a été effectuée sous la direction du professeur Straubinger à Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, à Munich, et a donné les résultats suivants :

10.1 Chien

Procédure de test ou d'évaluation	Sérums canins (n=217)			
Interprétation avec le test en deux stades Prof. Straubinger	49 négatifs	46 vaccinations	94 infections 8 résultats limites	20 vaccinations + infections
Borrelia vétérinaire plus OspA LINE	49 négatifs	42 vaccinations 3 vaccinations + infections 1 négatif	95 infections 2 résultats limites 3 vaccinations + infections 2 négatifs	18 vaccinations + infections 1 vaccination 1 infection

Les sérums négatifs ont tous été décelés correctement.

98 % des vaccinations ont été décelées, avec 3 cas supplémentaires d'infection. Le seul cas négatif a été identifié comme une « vaccination faible » au test en deux stades. Il y avait une bande OspA nette, mais elle était < seuil.

Le nombre de cas limites était nettement réduit dans le cas des infections. Trois vaccinations supplémentaires ont été décelées.

Dix-huit cas de vaccination + infection ont été confirmés de cette façon. On a trouvé 1 cas de vaccination pure et 1 cas d'infection pure.

10.2 Cheval

Procédure de test ou d'évaluation	Sérums équins (n=149)		
Interprétation avec le test en deux stades Prof. Straubinger	50 négatifs	41 résultats limites 9 résultats limites/négatifs	45 infections 4 infections/contacts avec l'antigène
Borrelia vétérinaire plus OspA LINE	50 négatifs	16 résultats limites 7 infections 27 négatifs	33 infections 11 résultats limites 5 négatifs

Ce tableau montre que plusieurs sérums équins qui avaient été classifiés auparavant de résultat positif/limite ont classifiés comme nettement négatifs avec le test Borrelia vétérinaire plus OspA LINE.

Cela semble aussi correspondre avec la réalité diagnostique. Selon le laboratoire du prof. Straubinger de la faculté de médecine vétérinaire, les rapports disponibles indiquent qu'il tend à y avoir beaucoup de résultats positifs avec les systèmes de test et les critères d'évaluation actuels qui ne doivent pas être considérés comme fiables pour un diagnostic définitif.

11. Littérature

1. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982); Lyme disease – a tick-borne spirochetosis?; Science 216:1317-19.
2. Barbour, A.G. and Hayes, S.F. (1986); Biology of Borrelia species; Microbiol. Rev. 50(4):381-400.
3. Horst, H.; Zeckenborreliose Lyme-Krankheit bei Mensch und Tier; 4. überarbeitete Auflage; Demeter-Verlag im Spitta Verlag; 2003: 194-208;210-215;216-228
4. Liebisch, G.; Der Nachweis von Borrelien bei Haus und Wildtieren: Patienten oder Reservoir der Lyme-Borreliose?; 22. Kongress der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft; 8.-11. April 1997; Bad Nauheim.
5. Pfister, H.-W., Wilske, B. (1994) Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects, The Lancet Vol. 343: 1013-1015.
6. 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
7. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Lyme disease - a tick -borne spirochetosis?, Science 216:1317-19.

8. Steere, A.C. (1989), Lyme Disease, N. Engl. J. Med. 321:586-96.
9. Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U.C., Ruzic-Sabljic, E., Leonhard, S., Hofmann, H., Weber, K., Pfister, K., Strle, F., Wilske, B. (2007) Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. Int J Med Microbiol
10. Herzberger, P., Siegel, C., Skerka, C., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U., van Dam, A., Wilske, B., Brade, V., Zipfel, P.F., Wallich, R., Kraiczy, P. (2007) Human pathogenic *Borrelia spielmanii* sp. nov. resist complement-mediated killing by direct binding of immune regulators factor H and FHL-1. Infect Immun
11. Wang, G., van Dam, A.P., Dankert, J. (1999) Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with lyme borreliosis. J Clin Microbiol 37: 3025-3028
12. Krupka, I. (2010) Infektionen mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato und deren serologischer Nachweis mittels spezifischer C6-Peptide bei Hunden sowie im murinen Infektionsmodell ; Inaugural-Dissertation der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig : 1 ; 8-10
13. Krupka I , Pantchev N, Weise M, Straubinger RK. Durch Zecken übertragbare bakterielle Infektionen bei Hunden: Seroprävalenzen von *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato und *Ehrlichia canis* in Deutschland. Praktischer Tierarzt 2007 ;10(88) :776-87
14. May Katharina, (2009) Enzym-Immunoassay und Western Blot zum Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* sensu lato bei gesunden Pferden ; Inaugural-Dissertation der Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich

12. Schéma du déroulement du test

Version courte de la réalisation du test :

Incubation de l'échantillon	30 minutes	15 µl de sérum canin/équin/100 µl de témoin
dans 1,5 ml chacun de tampon de dilution/lavage		
Lavage	3 x 5 minutes	Avec 1,5 ml de tampon de dilution/lavage cha-
cun		
Incubation du conjugué	30 minutes	Avec 1,5 ml de dilution d'emploi (1 + 100)
Lavage	3 x 5 minutes	Avec 1,5 ml de tampon de dilution/lavage cha-
cun		
1 x 1 minute	Avec de l'eau distillée/désionisée	
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

Tableau de dilution du conjugué à utiliser le conjugué de chien et de cheval : (arrondi)

Nombre de bandelettes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tampon de dilution/lavage	1,5 ml	3,0 ml	4,5 ml	6,0 ml	7,5 ml	9,0 ml	11,0 ml	12,0 ml	14,0 ml	15,0 ml
Concentré conjugué	15 µl	30 µl	45 µl	60 µl	75 µl	90 µl	110 µl	120 µl	140 µl	150 µl
Volume final	1,515 ml	3,03 ml	4,545 ml	6,06 ml	7,575 ml	9,09 ml	11,11 ml	12,12 ml	14,14 ml	15,15 ml

Nombre de bandelettes	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Tampon de dilution/lavage	17,0 ml	18,0 ml	20,0 ml	21,0 ml	23,0 ml	24,0 ml	26,0 ml	27,0 ml	29,0 ml	30,0 ml
Concentré conjugué	170 µl	180 µl	200 µl	210 µl	230 µl	240 µl	260 µl	270 µl	290 µl	300 µl
Volume final	17,17 ml	18,18 ml	20,2 ml	21,21 ml	23,23 ml	24,24 ml	26,26 ml	27,27 ml	29,29 ml	30,3 ml

Nombre de bandelettes	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Tampon de dilution/lavage	32,0 ml	33,0 ml	35,0 ml	36,0 ml	38,0 ml	39,0 ml	41,0 ml	42,0 ml	44,0 ml	45,0 ml
Concentré conjugué	320 µl	330 µl	350 µl	360 µl	380 µl	390 µl	410 µl	420 µl	440 µl	450 µl
Volume final	32,32 ml	33,33 ml	35,35 ml	36,36 ml	38,38 ml	39,39 ml	41,41 ml	42,42 ml	44,44 ml	45,45 ml

Nombre de bandelettes	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Tampon de dilution/lavage	47,0 ml	48,0 ml	50,0 ml	51,0 ml	53,0 ml	54,0 ml	56,0 ml	57,0 ml	59,0 ml	60,0 ml
Concentré conjugué	470 µl	480 µl	500 µl	510 µl	530 µl	540 µl	560 µl	570 µl	590 µl	600 µl
Volume final	47,47 ml	48,48 ml	50,5 ml	51,51 ml	53,53 ml	54,54 ml	56,56 ml	57,57 ml	59,59 ml	60,6 ml