VIROTECH Borrelia in vivo IgG LINE Immunoblot

(Borrelia in vivo IgG LINE-32; Borrelia in vivo IgG LINE-96)

Référence : WE222G32; WE222G96

VIROTECH Borrelia in vivo IgM LINE Immunoblot

(Borrelia in vivo IgM LINE-32; Borrelia in vivo IgM LINE-96)

Référence : WE222M32; WE222M96

VIROTECH Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot

(Borrelia in vivo + Tpn17 IgG LINE-32; Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE-96)

Référence : WE223G32; WE223G96

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

CE

Freigabedatum22.04.2022 10:17
REV 34 VIROTECH Borrelia in vivo IgG/IgM LINE Immunoblot FR

Sommaire

1. Usage prévu 3
2. Signification diagnostique 3
3. Principe du test 3
4. Contenu 4
4.1 Kit pour 32 déterminations 4
4.2 Kit pour 96 déterminations 4
5. Stockage et conservation du kit et des réactifs 4
6. Mesures de précaution et mises en garde 5
7. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit) 5
8. Echantillons 5
9. Réalisation du test 5
9.1 Préparation des échantillons 5
9.2 Préparation des réactifs 6
9.3 Réalisation du test d'immunoempreinte 6
9.4 Utilisation de dispositifs de traitement automatisé des immunoempreintes 7
10. Interprétation du test 7
10.1 Interprétation des échantillons des patients 7
10.2 Utilisation du contrôle cut-off 7
10.3 Signification des antigènes 8
10.4 Critères d'interprétation 10
10.5 Limites du test 12
11. Données sur les performances 12
11.1 Sensibilité 12
11.2 Spécificité 13
11.3 Sensibilité diagnostique 13
11.4 Spécificité diagnostique 13
11.5 Réactivité croisée 13
11.6 Propagation (valeurs escomptées) 14
11.7 Précision intra-essai (répétabilité) 14
11.8 Précision inter-essai (reproductibilité) 14
12. Données complémentaires sur les performances de la bande TpN17 du WE223G32/G9614
12.1 Sensibilité diagnostique 14
12.2 Spécificité diagnostique 14
12.3 Réactivité croisée 14
13. Littérature 14
14. Symboles 16
15. Schéma du déroulement du test 17

1. Usage prévu

Le kit LINE Immunoblot est destiné à la détection qualitative et semi-quantitative d'anticorps IgG ou IgM anti-*B. burgdorferi* sensu lato dans le sérum humain.Outre son utilisation dans le sérodiagnostic de la borréliose de Lyme, l'immunoblot IgG Line est indiqué pour le diagnostic de la neuroborréliose dans le liquide céphalo-rachidien. Pour le diagnostic dans le liquide céphalo-rachidien, veuillez demander le mode d'emploi correspondant.

2. Signification diagnostique

La borréliose de Lyme est une maladie systémique due à une infection causée par le spirochète *B. burgdorferi* (40, 41). 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 (25). A ce jour, pour l'Europe, les souches de *B. burgdorferi* humanopathogènes suivantes ont été décrites, et regroupées sous l'appellation *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) : *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii* et *B. bavariensis* (23, 25, 27, 42, 43, 44).
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 (25). Entre autres, la délimitation vis-à-vis de diverses maladies dermiques (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) (33) est pertinente du point de vue diagnostic 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.
- 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 (21, 36).
- Les anticorps IgG peuvent encore être détectables même des années après une rémission clinique (21, 36).
- des réactions croisées avec d'autres micro-organismes ont été observées (34, 35). Les maladies bactériennes telles que la syphilis ainsi que les infections virales herpétiques (notamment l'EBV) y jouent un rôle important (39). Des réponses faussement positives des anticorps peuvent aussi se produire en présence d'anticorps auto-immunes (34).

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 (20).

Il est recommandé de procéder à la sérologie de la borréliose de Lyme en deux étapes (conformément à la directive MIQ 12/2000 et à la norme DIN 58969-44 de 07/2005) (7, 45). 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 Immunoblot/Western Blot). Le procédé Line Immunoblot/Western Blot permet l'analyse spécifique de la réponse des anticorps dirigée contre des agents antigènes individuels.

3. Principe du test

Les antigènes d'agents pathogènes sont transférés sur une membrane de nitrocellulose par un procédé spécial de pulvérisation. La membrane de nitrocellulose est ensuite coupée en bandelettes individuelles.
L'incubation des bandes de nitrocellulose qui contiennent des antigènes avec des échantillons de sérum/plasma humains permet la mise en évidence d'anticorps spécifiques présents. Ces anticorps forment un complexe immun avec les antigènes fixés sur les bandelettes de test. On élimine ensuite par lavage successifs les anticorps n'ayant pas réagi, puis on incube les différentes bandelettes de nitrocellulose avec un anticorps anti-immunoglobulines humaines conjugué à la phosphatase alcaline. On élimine ensuite par lavage les anticorps conjugués n'ayant pas réagit, puis on réalise la mise en évidence optique des complexes antigène/anticorps (des anticorps liés) en ajoutant un substrat incolore, lequel produit des bandes de couleur bleu-violet (« bandes antigéniques ») lors de sa conversion enzymatique. On arrête la réaction enzyme/substrat en lavant les

bandelettes de nitrocellulose à l'aide d'eau distillée/désionisée. En fonction du modèle observé sur la bande, on peut conclure que l'on est en présence ou non d'anticorps IgG ou IgM.

4. Contenu

4.1 Kit pour 32 déterminations

1.	**Bandelettes de test en IgG ou IgM nitrocellulose** revêtues d'antigènes, renforcées par un film, ordonnées dans un carnet, prêtes à l'emploi	**1 x**	32 bandelettes
2.	**Contrôle cut-off des IgG ou des IgM**, sérum humain, prédilué	**1 x**	1,0 ml
3.	**Tampon de dilution/lavage**, pH 7,3 (concentr. 10x), avec conservateur et Tris	**2x**	50 ml
4.	**Conjugué IgG ou IgM** (concentr. 100x) phosphatase alcaline (chèvre) anti-humaine , avec conservateur	**1 x**	0,7 ml
5.	**Substrat** (BCIP/NBT), prêt à l'emploi	**1 x**	57 ml
6.	**Fiche-journal d'interprétation**, pour la consignation et l'archivage des résultats.	**1 x**	1 unité

4.2 Kit pour 96 déterminations

1.	**Bandelettes de test en IgG ou IgM nitrocellulose** revêtues d'antigènes, renforcées par un film, ordonnées dans un carnet, prêtes à l'emploi	**3 x**	32 bandelettes
2.	**Contrôle cut-off des IgG ou des IgM**, sérum humain, prédilué	**2 x**	1,0 ml
3.	**Tampon de dilution/lavage**, pH 7,3 (concentr. 10x), avec conservateur et Tris	**4x**	50 ml
4.	**Conjugué IgG ou IgM** (concentr. 100x) phosphatase alcaline (chèvre) anti-humaine , avec conservateur	**3 x**	0,7 ml
5.	**Substrat** (BCIP/NBT), prêt à l'emploi	**3 x**	57 ml
6.	**Fiche-journal d'interprétation**, pour la consignation et l'archivage des résultats.	**3x**	1 unité.

Disponible en supplément sur demande :

IgG ou IgM- Contrôle positif, sérum humain, prédilué, 0,5 ml.
Vous trouverez les bandes positives ≥ bandes cut-off dans le certificat joint à la livraison.
(Réf. : IgG : WE222P60 / WE223P60 ou IgM : WE222P80)

IgG/IgM- Contrôle négatif, sérum humain, prédilué, 0,5 ml.
Le contrôle négatif ne présente pas de bandes ou tout au moins pas de bandes ≥ bandes cut-off pertinentes pour l'évaluation.
(Réf. : IgG/IgM : WE222N10 ou WE223N60)

5. Stockage et conservation du kit et des réactifs

Conserver 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. Ne pas congeler les réactifs, ni les exposer à des températures élevées.
2. Ne pas utiliser les réactifs après l'expiration de la date de péremption.
3. Eviter de stocker les réactifs dans un lieu où ils sont soumis à une forte lumière.
4. Le substrat BCIP/ NBT en solution est photosensible et il doit être conservé à l'abri de toute lumière.
5. **Bandelettes de nitrocellulose** : utiliser les bandelettes immédiatement après les avoir sorties de leur sachet. Refermer hermétiquement le sachet contenant les bandelettes restantes et stocker celui-ci à une température comprise entre 2 et 8 °C. Pour archiver les résultats, il est impératif de tenir les bandelettes de test en nitrocellulose à l'abri de tout rayonnement direct du soleil afin éviter que les bandes ne se décolorent.

Matériel	Etat	Conservation	Date de péremption
Echantillons d'essai	Non dilué	+2 jusqu'à +8° C	1 semaine
Bandes de test	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (conservation dans le sachet fournil)	3 mois
Contrôles	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois

Conjugué	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
	Dilué	+2 jusqu'à +8° C	env. 6 h
Substrat	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
Solution de lavage	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
	Dilué final (prêt à l'emploi)	+2 jusqu'à +8° C	4 semaines
	Dilué final (prêt à l'emploi)	*ou* température ambiante	2 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 sérums de contrôle, les échantillons, les échantillons dilués, les conjugués et les bandelettes de test en nitrocellulose doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés comme tels. Les dispositions légales respectives en vigueur pour les laboratoires doivent être appliquées.
2. Lors de la réalisation de l'immunoempreinte, porter des gants à usage unique et utiliser une pincette en plastique.
3. Eliminer le matériel et les produits utilisés dans le respect des directives nationales en vigueur.
4. Les bacs d'incubation ont été conçus par le fabricant pour n'être utilisés qu'une seule fois. Le fabricant décline toute responsabilité s'ils sont utilisés plusieurs fois. Dans le cas d'une réutilisation éventuelle, il est recommandé de les désinfecter après utilisation en les laissant tremper plusieurs heures dans une solution d'eau de javel à 1 % (hypochlorite de sodium), de les nettoyer et de les rincer à fond à l'eau du robinet et à l'eau distillée/désionisée.

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

1. Bac d'incubation (peut être commandé en fonction des besoins ; référence du produit : WE300.08)
2. Agitateur (vertical non centrifuge)
3. Une pissette pour l'arrêt
4. Pipette ou dispositif de lavage des mains
5. Micropipettes de 5 µl à 1500 µl
6. Pointes de pipette
7. Tubes à échantillons de 2 à 20 ml
8. Pincette en plastique
9. Eau distillée ou désionisée
10. Papier filtre

8. 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. Pour l'utilisation du liquide cérébro-spinal, voir le mode d'emploi séparé Liquor LINE.

9. Réalisation du test

Le respect scrupuleux des consignes de travail de VIROTECH Diagnostics est une condition essentielle à l'obtention de résultats corrects.

9.1 Préparation des échantillons

1. 15 µl de sérum ou de plasma sont nécessités par échantillon de patient. Pour le traitement du liquide cérébro-spinal/sérum, seule la dilution du liquide cérébro-spinal/sérum séparée et calculée individuellement par classe d'Ig doit être utilisée (voir le mode d'emploi Liquor LINE).
2. Les échantillons sanguins doivent être prélevés de manière aseptique par ponction veineuse. Il faut séparer le sérum après coagulation complète (ce qui n'est pas le cas pour le plasma). Lorsque les sérums doivent être conservés pendant une période prolongée, ceux-ci doivent être congelés à -20 °C.
3. Eviter de congeler et décongeler les sérums plusieurs fois.

4. Ne pas utiliser de sérums ayant été inactivés par la chaleur, ni de sérums hyperlipémiques, hémolytiques ou contaminés par des bactéries, car ils pourraient engendrer l'obtention de résultats faussés.
5. Ne pas utiliser les échantillons sériques opaques (surtout après la décongélation) ; le cas échéant, les centrifuger (5 minutes à 1 000 x g), pipeter le surnageant translucide et l'utiliser pour le test.

9.2 Préparation des réactifs

1. Afin de simplifier la routine des travaux de laboratoire, les mêmes temps d'incubation et les mêmes composantes (si les temps d'incubation et les composantes sont communs aux tests) peuvent être utilisés pour tous les LINEs et EcoBlots. L'utilisation des contrôles cut-off s'effectue de façon spécifique aux paramètres et au lot.
2. Avant la dilution de chacun des réactifs de test, amener le concentré correspondant à la température ambiante. Utiliser uniquement de l'eau distillée/désionisée de qualité élevée et à température ambiante.
3. Bien homogénéiser les dilutions avant de réaliser le test.
4. **Tampon de dilution et de lavage**
   Diluer le tampon de dilution et de lavage concentré (10X) au 1/10 avec de l'eau distillée ou désionisée pour obtenir une solution de lavage 1X (10ml/50ml/100ml de tampon concentré + 90ml/450ml/900ml d'eau dist./déionisée) et bien mélanger.
   Les tampons de dilution/de lavage concentrés et dilués sont susceptibles de présenter une coloration jaune. Celle-ci n'a aucune influence ni sur la durée de conservation du tampon de dilution/de lavage, ni sur le fonctionnement et la validité diagnostique du dosage.
5. **Conjugué IgG ou IgM**
   Ajouter 1 volume de conjugué phosphatase alcaline IgG ou IgM (100x) dans 100 volumes de tampon de dilution et de lavage préparé 1X. 1,5 ml de solution de conjugué sont nécessaires pour chaque échantillon de sérum. Voir le tableau de dilution du conjugué (point « Schéma de déroulement du test »).
6. **Substrat en solution**
   Le substrat est prêt à l'emploi.

9.3 Réalisation du test d'immunoempreinte

Attention : Les barrettes de test en nitrocellulose ne doivent être testées que dans la classe d'Ig spécifiée (voir l'étiquette apposée sur le carnet de l'innumnoempreinte ainsi que la désignation indiquée sur chacune des barrettes de test).

Pour une réalisation et une interprétation correctes du test Borrelia in vivo LINE, il est impératif d'utiliser un contrôle cut-off spécifique aux paramètres et au lot pour chaque test.

Pour obtenir un diagnostic sûr des *Borrelia*, réaliser l'LINE pour les IgG et pour les IgM.

1. Effectuer le test à température ambiante.
2. Pour chaque échantillon, déposer une bandelette dans la rainure d'un bac d'incubation propre. Dans la mesure du possible, saisir les bandelettes uniquement au niveau de leur extrémité portant un marquage.
3. Pour chaque bandelette, déposer 1,5 ml de **tampon de dilution et de lavage** prêt à l'emploi et placer le tout sur l'agitateur. Veiller à ce que les bandelettes de test en nitrocellulose soient recouvertes de liquide de façon homogène ; les bandelettes ne doivent pas sécher pendant toute la durée du test.
4. Les bandelettes de test en nitrocellulose renforcée sont complètement humidifiées au bout d'une minute et elles peuvent être incubées à plat sur leur face avant ou sur leur face arrière, ou bien en position latérale.
5. Dans la mesure du possible, y pipetter **15 µl de sérum/plasma du patient** resp. **100 µl du contrôle cut off / positif / négatif**, au bord supérieur de la fin de la bande marqué. Incuber les sérums patient et les contrôles pendant **30 minutes** sur l'agitateur. Pendant le pipetage et lorsque l'on dépose les produits, veiller à ce qu'aucune contamination croisée des différents échantillons patients n'ait lieu.

6. Aspirer la totalité du liquide des rainures, ou bien le faire s'écouler avec beaucoup de précaution. Lorsque l'on fait s'écouler le liquide, les bandelettes en nitrocellulose restent collées au fond des rainures. Egoutter le liquide restant sur un papier absorbant.
7. **Laver** les bandelettes : incuber chacune des bandelettes avec 1,5 ml de tampon de dilution et de lavage **3 x 5 minutes** sur l'agitateur. Toujours aspirer ou faire égoutter la totalité du tampon de dilution. Avant la fin du dernier lavage, préparer la quantité nécessaire de dilution fraîche de conjugué (voir le tableau).
8. Aspirer la totalité du liquide des rainures, ou bien le faire s'écouler (voir le point 6).
9. Dans chacune des rainures d'incubation correspondantes, déposer 1,5 ml de la **dilution de conjugué** préparée et incuber le tout pendant **30 minutes** sur l'agitateur.
10. Aspirer la totalité du liquide des rainures, ou bien le faire s'écouler.
11. **Laver** les bandelettes : incuber chacune des bandelettes avec 1,5 ml de tampon de dilution et de lavage **3 x 5 minutes** sur l'agitateur. Toujours aspirer ou faire égoutter la totalité du tampon de dilution. Rincer ensuite **une fois pendant une minute** avec de l'**eau distillée /désionisée**.
12. Aspirer la totalité du liquide des rainures, ou bien le faire s'écouler (voir le point 6).
13. Déposer 1,5 ml de **substrat en solution** prêt à l'emploi dans chacune des rainures et laisser se développer sur l'agitateur pendant **10 ± 3 minutes.**
14. **Arrêter** le développement de la couleur en éliminant des rainures le substrat en solution. Laver ensuite les bandelettes **trois fois** et sans incubation intermédiaire. Pour chaque lavage, utiliser 1,5 ml d'eau **distillée/désionisée**.
15. Faire égoutter l'eau distillée/désionisée et faire sécher les bandelettes sur un papier absorbant propre. La coloration de l'arrière–fond que l'on peut observer lorsque les bandelettes en nitrocellulose sont humides disparaît complètement lorsque les bandelettes sont sèches. Les bandelettes en nitrocellulose renforcée nécessitent une durée de séchage plus longue que les bandelettes classiques en nitrocellulose.
16. Utiliser le protocole d'évaluation ci-joint pour l'interprétation des résultats. Les informations des bandes très spécifiques inscrites sur la fiche-journal facilitent l'interprétation des résultats des échantillons des patients.

Schéma du déroulement du test, voir dernière page

9.4 Utilisation de dispositifs de traitement automatisé des immunoempreintes

Pour l'exécution automatisée des blots et des LINE, les appareils suivants sont validés : Apollo et ProfiBlot. En principe, tous les automates blot courants sont adéquats.

10. Interprétation du test

Pour garantir une interprétation sûre, chaque bandelette LINE est dotée de deux contrôles.

1. **Contrôle sérique** (= serum control) **:**
   La bande d'incubation sérique n'apparaît en dessous de la ligne de marquage (= markline) qu'après l'incubation avec le sérum patient.
2. **Contrôle de conjugué** (= conjugate control) **:**
   La bandelette LINE a une bande de contrôle du conjugué qui apparaît avec le conjugué correspondant après l'incubation.

Le test est valide si le contrôle sérique et le contrôle interne du conjugué sont clairement visibles sur la bandelette en nitrocellulose qui a été développée.

Se reporter à la fiche-journal pour obtenir des informations sur la position de la bande de contrôle sérique/de conjugué.

10.1 Interprétation des échantillons des patients

Se reporter à la fiche-journal pour obtenir des informations sur la position et la désignation de la bande réactive.

Bandes IgM : OspC, VlsE-Mix, p39 et une bande EBV pour le diagnostic d'exclusion

Bandes IgG : VlsE-Mix, p39, p83/100, (iv1), (iv2), (iv3), (iv4) et la bande TpN17 pour le diagnostic d'exclusion (uniquement pour WE 223G)

10.2 Utilisation du contrôle cut-off

Les bandes dont l'intensité est plus faible que celle de la bande cut-off du contrôle cut-off ne seront pas prises en compte dans l'interprétation.

Bande cut-off IgM : OspC

Bande cut-off IgG : VlsE-Mix

10.3 Signification des antigènes

Liste des antigènes de *Borrelia burgdorferi* utilisés, hautement purifiés (OspC) et recombinants (VlsE, p83/100, p39, BBA36, BBO323, Crasp3 et pG), l'antigène EBV-Viral Capsid gp125 et l'antigène TpN17. Le mélange VlsE se compose de deux antigènes recombinants de la génoespèce *Borrelia burgdorferi* s. s. et Borrelia garinii.

Antigène/ Description	**Importance des antigènes**	**Spécificité des anticorps dans LINE**	**Souches originales/purification**
OspC (p23), antigène natif purifié	**O**uter **s**urface **p**rotein **C**. Lipoprotéine codée par des plasmides (6, 22, 26, 28). Marqueur central pour les manifestations précoces de la borréliose de Lyme dans la sérologie de l'IgM (1, 4, 8, 9, 15, 22, 28, 29, 31, 32). Importance biologique : L'OspC est vraisemblablement nécessaire à la réussite de l'infection initiale du mammifère hôte pour la *B. burgdorferi* s. l. (46, 47, 48, 49). Les spirochètes expriment l'OspC lorsque la tique se gorge de sang et au cours de la phase précoce de l'infection du mammifère hôte (46). Suite à la transmission des spirochètes au mammifère, l'expression de l'OspC diminue à nouveau. La lipoprotéine ne semble pas être nécessaire à la persistance de l'infection (47, 47). Tilly et al. supposent que l'OspC prévient la phagocytose des spirochètes au cours de la phase précoce de l'infection du mammifère hôte (50).	Spécifique (3, 8, 22, 28, 30, 31, 32)	*B. afzelii* PKo (à l'origine isolée à partir d'une lésion d'érythème migrant humain en Allemagne) / purifiée par l'intermédiaire d'une SDS-Page de préparation
VlsE, recombinante	**V**ariable major protein **l**ike **s**equence **E**. Lipoprotéine *B. burgdorferi* exprimée *in vivo* avec des épitopes hautement immunogéniques conservés – par rapport à différentes géno-espèces. Dans la sérologie de l'IgM, des réactivités contre la VlsE sont notamment constatées dans les sérums de patients atteints d'une borréliose de Lyme au stade précoce. 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 (2). Importance biologique : *B. burgdorferi* 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 » (51, 52, 53).	Spécifique	*B. burgdorferi* B31 (à l'origine isolée à partir d'une tique infectée sur l'île Shelter Island, N.Y.*), B. garinii* IP90 (à l'origine isolée à partir d'une tique isolée en Russie) / Purifiée à partir de la bactérie *E. coli* par l'intermédiaire d'une chromatographie d'affinité Ni-NTA
p39 (BmpA), recombinante	**B**orrelial **m**embrane **p**rotein **A**. Marqueur central codé par chromosome (6, 19) dans la sérologie de l'IgG pour les cas de borréliose de Lyme disséminée (4, 8, 18). Les protéines Bmp sont des lipoprotéines de fonction inconnue.	Hautement spécifique (4, 5, 6, 8, 14, 15, 18, 31, 32)	*B. afzelii* PKo (à l'origine isolée à partir d'une lésion d'érythème migrant humain en Allemagne) / purifiée à partir de la bactérie *E. coli* par l'intermédiaire d'une chromatographie d'affinité Ni-NTA

p83/100, recombinant	Antigène codé par chromosome associé au cylindre protoplasmique (12, 13), conservé dans *B. burgdorferi* s. l. (17). Marqueur central dans la sérologie de l'IgG pour les cas de borréliose de Lyme au stade avancé (8, 24, 29).	Hautement spécifique (3, 5, 8, 22, 24, 29, 31)	*B. afzelii* PKo (à l'origine isolée à partir d'une lésion d'érythème migrant humain en Allemagne) / purifiée à partir de la bactérie *E. coli* par l'intermédiaire d'une chromatographie d'affinité Ni-NTA
BBA36 (iv1)*, recombinant	Antigène de 22 kDa dirigé contre la *B. burgdorferi* exprimé *in vivo* et codé sur lp54. Le BBA36 affiche des épitopes hautement immunogéniques conservés – par rapport à différentes géno-espèces. Le BBA36 est un marqueur central dans la sérologie de l'IgG pour les cas de borréliose de Lyme au stade avancé (infections disséminées) (10).	Hautement spécifique	*B. afzelii* MMS (à l'origine isolée à partir d'une tique infectée en Allemagne) / Purifié à partir de la bactérie *E. coli* par l'intermédiaire d'une chromatographie d'affinité Ni-NTA
BBO323 (iv2)*, recombinant	Antigène de 42 kDa dirigé contre la *B. burgdorferi* exprimé *in vivo* et à codage chromosomique. Le BBO323 affiche des épitopes hautement immunogéniques conservés – par rapport à différentes géno-espèces. Le BBO323 est un marqueur central dans la sérologie de l'IgG pour les cas de borréliose de Lyme au stade avancé (infections disséminées). (54)	Spécifique	*B. burgdorferi* ZS7 (à l'origine isolée à partir d'une tique infectée en Allemagne) / Purifiée à partir de la bactérie *E. coli* par l'intermédiaire d'une chromatographie d'affinité Ni-NTA
Crasp3 (iv3)*, recombinante	**C**omplement **r**egulator-**a**quiring **s**urface **p**rotein3. Antigène superficiel de 21 kDa dirigé contre la *B. burgdorferi* exprimé *in vivo* et codé sur cp32-8. Membre de la famille des Erp. Marqueur central dans la sérologie de l'IgG pour les cas de borréliose de Lyme au stade avancé (infections disséminées). La Crasp3 renforce la résistance complémentaire (11, 54).	Hautement spécifique	*B. burgdorferi* ZS7 (à l'origine isolée à partir d'une tique infectée en Allemagne) / Purifiée à partir de la bactérie *E. coli* par l'intermédiaire d'une chromatographie d'affinité Ni-NTA
pG (iv4)*, recombinant	Antigène de 22 kDa dirigé contre la *B. burgdorferi* exprimé *in vivo* et codé sur cp32-3. Membre de la famille des Erp. Marqueur central dans la sérologie de l'IgG pour les cas de borréliose de Lyme au stade avancé (infections disséminées) (16).	Hautement spécifique	*B. burgdorferi* ZS7 / *B. afzelii* MMS (à l'origine isolée à partir d'une tique infectée en Allemagne) / Purifié à partir de la bactérie *E. coli* par l'intermédiaire d'une chromatographie d'affinité Ni-NTA

EBV VCA-gp125	Antigène immunodominant de la capside du virus d'Epstein-Barr (**V**irus **C**apsid **A**ntigen). Les anticorps dirigés contre le VCA-gp125 disparaissent en règle générale quelques semaines après l'infection par l'EBV.	Marqueur hautement spécifique dans la sérologie de l'IgM pour une infection primaire par l'EBV	La purification du gp125 a lieu à partir de lysat cellulaire total (cellules humaines infectées par l'EBV) à l'aide de la chromatographie d'affinité sous utilisation d'un anticorps monoclonal anti-gp125
Treponema pallidum TpN17 recombinant (uniquement pour WE223G)	Marqueur d'une syphilis primaire, secondaire et latente	hautement spécifique pour tous les stades d'infection	*Treponema pallidum/* Purifiée à partir de la bactérie *E. coli* par l'intermédiaire d'une chromatographie d'affinité Ni-NTA

*(iv1-4) = Antigènes exprimés in vivo (iv)

10.4 Critères d'interprétation

L'interprétation des résultats sérologiques doit toujours inclure le tableau clinique, les données épidémiologiques et les autres résultats d'analyses existants.

Interprétation générale recommandée (IgM + IgG) des antigènes de Borrelia

Pour obtenir un diagnostic sûr des *Borrelia*, réaliser l'LINE pour les IgG et pour les IgM et évaluer les résultats de façon commune.

Seules les bandes positives dont l'intensité est supérieure ou égale à celle de la bande cut-off seront considérées comme positives.

Bande(s) apparue(s) dans les IgM		**Bande(s) apparue(s) dans les IgG**	**Interprétation**
Aucunes bandes ou bandes < à la bande cut-off	**ou**	Aucunes bandes ou bandes < à la bande cut-off **ou** 1 bande IgG (à l'exception de VlsE)	**Négatif**
1 bande IgM (à l'exception de l'OspC)	**ou**	Bande IgG VlsE	**Plage limite**
Bande IgM OspC **ou** 2 bandes IgM ou plus	**ou**	2 bandes IgG ou plus	**Positif**
1 bande IgM	**et**	1 bande IgG	**Positif (*)**

(*) La constellation de la ligne à arrière-fond gris montre la combinaison d'une seule bande pour les IgM et d'une bande pour les IgG ; l'interprétation globale (IgM + IgG) devra être considérée comme positive.

Recommandation d'interprétation en cas de EBV-gp125 positif dans la sérologie IgM.
Dans le cadre d'une primo-infection à EBV, la stimulation polyclonale des lymphocytes B peut entraîner des réactivités des anticorps contre les antigènes de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (55). Ceci peut entraîner l'obtention de résultats faussement positifs à la borréliose de Lyme. Pour réduire au maximum l'obtention de tels résultats erronés, le test VIROTECH Borrelia in vivo IgM LINE Immunoblot contient l'antigène de virus à capside (VCA) gp125 du virus d'Epstein-Barr. Si, en sérologie IgM et/ou IgG, il y a réaction, non seulement des antigènes de Borrelia burgdorferi, mais également des gp125 avec une intensité ≥ à celle de la bande cut-off-IgM, il convient de contrôler par mesure de sécurité le statut EBV complet du sérum (par exemple à l'aide du VIROTECH EBV IgG LINE Immunoblot ; numéros de commande : WE102G32/96 et VIROTECH EBV IgM LINE Immunoblot ; numéros de commande : WE102M32/96).
La bande **EBV-gp125** n'est pas validée pour une utilisation dans le diagnostic des liquides.

Évaluation conseillée de la bande TpN17
La bande antigène TpN17 *Treponema pallidum* **(uniquement pour WE223G)**
Dans le cadre du sérodiagnostic de la borréliose de Lyme, on observe des réactions croisées avec d'autres micro-organismes. Des infections par le virus de l'herpès (en particulier EBV) ainsi que des pathologies d'origine bactérienne, comme la syphilis, jouent ici un rôle important. La MiQ12/2000 borréliose de Lyme recommande : « en cas de test dont les résultats sont limites ou positifs (note : de la sérologie de la borréliose de Lyme), un test de recherche de la syphilis (par exemple TPHA) doit être effectué pour exclure les résultats faussement positifs dus à des anticorps aux réactions croisées envers les tréponèmes. »
La bande TpN17 sert à la détection de résultats faussement limites/positifs dans le sérodiagnostic de la borréliose de Lyme dus à des anticorps aux réactions croisées en raison d'une infection de *Treponema pallidum* (syphilis).

Si, dans le cas d'une VIROTECH Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot, la bande TpN17 présente une réaction ≥ à celle de la bande cut-off IgG et simultanément une réaction des antigènes de Borrelia dans l'IgM et/ou dans l'IgG, il convient, par mesure de sécurité, de contrôler le statut syphilis complet du sérum (par exemple, avec VIROTECH Treponema pallidum IgG LINE Immunoblot, numéros de commande : WE150G16/32 et VIROTECH Treponema pallidum IgM LINE Immunoblot, numéros de commande : WE150M16/32).

Il faut impérativement veiller aux points suivants :

a. la bande TpN-17 ne saurait, en ce qui concerne la sensibilité et la spécificité, remplacer un diagnostic différentiel complet de la syphilis ;
b. une bande antigène TpN17 négative n'exclut pas systématiquement la possibilité de l'existence d'anticorps contre les *Treponema pallidum* ;
c. un résultat positif de la bande antigène TpN17 doit être conforté par des tests de confirmation *Treponema pallidum* appropriés (par exemple : VIROTECH WE150) ;
d. la bande TpN-17 n'est pas validée pour une utilisation dans le diagnostic des liquides.

Constellations typiques de résultats
Les antigènes ont été ordonnés sur les barrettes du test Borrelia in vivo LINE de façon à ce que les antigènes réagissant de préférence avec les anticorps de patients atteints d'une borréliose de Lyme en stade précoce (par ex. : IgG anti-OspC, anti-VlsE-IgM, anti-VlsE) se situent dans la partie supérieure de la barrette (à proximité de lignes de marquage). Les antigènes réagissant de préférence avec les anticorps des patients atteints de borrélioses de Lyme de stade avancé (par ex. : p83, BBA36, BBO323, Crasp3, pG)se trouvent dans la partie inférieure de la barrette (loin des lignes de marquage). Ainsi, l'aspect optique de la répartition de la bande donne déjà une indication sur le stade de l'infection (du stade précoce au stade avancé de la borréliose de Lyme).

Exemples de constellations fréquentes pour les stades infectieux suivants :

Stade de la borréliose	Sérologie IgM	Sérologie IgG
Borrélioses de Lyme au stade précoce	OspC	VlsE
	VlsE	VlsE
	p39	VlsE
	2 bandes ou plus	aucune ou VlsE
	OspC	aucune
Borrélioses de Lyme disséminées	Apparitions possibles : de zéro bandes à toutes les bandes IgM.	VlsE et p39
		2 bandes
Borrélioses de Lyme au stade avancé	Les bandes IgM apparaissent de plus en plus en arrière-plan.	En règle générale, le nombre de bandes IgG augmente avec la progression de l'infection. Les bandes apparaissent dans diverses combinaisons. p39, p83, VlsE, iv1-4 (BBA36, BBO323, Crasp3 et pG)

10.5 Limites du test

1. Un résultat sanguin négatif n'exclut pas totalement la possibilité d'une infection par des B. *burgdorferi s.l.* Il est possible que l'échantillon ait été prélevé avant l'apparition des anticorps ou que le titre d'anticorps soit inférieur à la limite de détection du test.
2. Le traitement des patients aux antibiotiques à un stade précoce de la maladie (35, 37) peut entraîner le blocage de la réponse immunitaire, ce qui empêchera la mise en évidence d'anticorps spécifiques anti-*B. burgdorferi* .
3. La réaction croisée entre les *Borrelia* et d'autres spirochètes peut entraîner l'apparition de bandes associées aux Borrelia, ce qui peut conduire à l'obtention d'un résultat positif erroné. Des réactions croisées peuvent survenir dans les sérums des patients présentant par exemple les infections suivantes : syphilis (*Treponema pallidum*), pian (*Treponema pertenue*), borrélioses (borréliose spéc.), leptospiroses (leptospirose spéc.) (38). De même, des réactions croisées peuvent survenir en cas de virus herpétiques (HSV, CMV, parvovirus) (34, 39). Si, avec VIROTECH Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot (WE223G), il apparaît, outre des réactivités aux antigènes de la borréliose de Lyme, une réactivité à l'antigène TpN17, il convient de tenir compte des remarques faites au point 9.4 (évaluation conseillée de la bande TpN17).
4. Dans le cadre d'une primo-infection à EBV, la stimulation polyclonale des lymphocytes B peut entraîner des réactivités des anticorps contre les antigènes de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (34, 39). Si, avec VIROTECH Borrelia in vivo IgM LINE Immunoblot il apparaît, outre des réactivités IgM et/ou IgG envers les antigènes de Borrelia, une réactivité envers l'EBV-gp125, il faut exclure une mononucléose par diagnostic différentiel.
5. Dans de rares cas, les sérums des patients peuvent afficher des bandes « inversées » (fond sombres, bandes blanches) ; ne pas les interpréter : l'immunoempreinte n'est pas interprétable dans ces cas. Il faudra contrôler le sérum à l'aide d'autres méthodes sérologiques.

11. Données sur les performances

Lors du calcul de la sensibilité, le groupe de diagnostics Érythème migrant (EM), Érythème chronique migrant (ECM), et Érythèmes migrants multiples (MEM), neuroborréliose, ainsi que le groupe de diagnostics Acrodermatite chronique atrophiante (ACA), arthrite, ont été traités séparément.

11.1 Sensibilité

Pour établir la sensibilité, des collectifs de sérums caractérisés cliniquement, qui ont été prédéterminés avec un autre Western Blot comme méthode de référence (résultat), ont été testés.

Collectifs de sérums : ACA n = 18, neuroborréliose n = 8, MEM, EM, ECM n = 72.

Lors du calcul de la sensibilité, les résultats limites n'ont pas été pris en compte.

Au vu du résultat, on obtient une sensibilité de 97,0 %.

11.2 Spécificité

Pour établir la spécificité, 85 sérums de donneurs sanguins, qui ont été prédéterminés avec un ELISA comme méthode de référence (résultat), ont été testés.
Lors des calculs de la spécificité, les résultats limites n'ont pas été pris en compte.

Au vu du résultat, on obtient une spécificité de 97,2%.

11.3 Sensibilité diagnostique

Pour établir la sensibilité diagnostique, des sérums caractérisés cliniquement provenant de patients atteints d'EM, ECM, MEM (n=122), de neuroborréliose (n=53) ainsi qu'ACA et d'arthrite (n=65) ont été testés dans l'IgG et l'IgM (source des sérums : Prof. Hofmann, Munich ; Dr. Talaska, Brieskow-Finkenheerd).

Collectifs de sérums (n=122)		LINE		
		Négative	**Limite**	**Positive**
Résultat diagnostique/clinique	**EM, ECM, MEM**	17	10	95

Collectifs de sérums (n=53)		LINE		
		Négative	**Limite**	**Positive**
Résultat diagnostique/clinique	**Neuroborréliose**	4	2	47

Collectifs de sérums (n=65)		LINE		
		Négative	**Limite**	**Positive**
Résultat diagnostique/clinique	**ACA, arthrite**	0	0	65

Lors des calculs de la sensibilité diagnostique, les résultats limites n'ont pas été pris en compte.

Pour le collectif de sérums EM, ECM et MEM, il en résulte une sensibilité diagnostique de 84,8 %, pour le collectif de sérums Neuroborréliose, une sensibilité diagnostique de 92,2 %, et pour le collectif de sérums ACA et Arthrite, une sensibilité diagnostique de 100 %.

11.4 Spécificité diagnostique

28 sérums humains provenant de personnes exemptes de soupçon clinique de présence de borréliose de Lyme ont été testés. Sur ces 28 sérums, un seul était positif et un seul limite

Il en résulte une spécificité diagnostique de 96,3 %.

11.5 Réactivité croisée

Maladies auto-immunes

10 sérums auto-immunes, tous négatifs dans le Borrelia in vivo LINE, ont été testés.

Tréponème pâle

Sur 15 sérums positifs au tréponème pâle, dans le Borrelia in vivo LINE, quatre étaient positifs et un négatif ; avec la procédure de référence appliquée (ELISA, Western Blot), un nombre de résultats faussement positifs nettement supérieur a été constaté.

EBV

Sans marqueur diagnostic exclusif, sur 12 sérums avec infection EBV primaire, deux ont réagi comme positifs, et un comme limite (les tests comparatifs ont révélé nettement plus de résultats borréliens non spécifiquement positifs que le Borrelia in vivo LINE). Les 12 sérums ayant tous réagi avec la bande gp125, ils ont pu être identifiés comme faux positifs.

11.6 Propagation (valeurs escomptées)

87 donneurs sanguins ont été testés. 6% d'entre eux étaient positifs dans le résultat global.

11.7 Précision intra-essai (répétabilité)

Pour établir la répétabilité, dans une série de tests IgG et IgM, 30 bandelettes de buvardage d'une membrane en nitrocellulose ont été incubées avec un sérum montrant des réactions faibles à fortes sur les bandes antigéniques.
Sur l'ensemble de la feuille de cellulose, les bandelettes respectives présentent des intensités homogènes.

11.8 Précision inter-essai (reproductibilité)

Pour déterminer la reproductibilité, 3 sérums ont été testés dans l'IgM et l'IgG (un sérum négatif, un contrôle limite et un contrôle positif). L'opération s'est déroulée sur 10 séries de tests différentes auprès de 3 sujets.
Dans la totalité des tests, les spécifications sérologiques ont été précisément atteintes.

12. Données complémentaires sur les performances de la bande TpN17 du WE223G32/G96

12.1 Sensibilité diagnostique

Pour déterminer la sensibilité diagnostique, 64 sérums syphilitiques caractérisés cliniquement ont été testés dans l'IgG. La bande TpN17 montre une sensibilité de 93,7 %.

Collectifs de sérums (n=64)	Borrelia in vivo LINE Immuno Assay
négative	4
limite	1
positive	59

12.2 Spécificité diagnostique

Pour établir la spécificité diagnostique, 116 sérums de borréliose de Lyme caractérisés cliniquement ont été testés dans l'IgG. La bande TpN17 montre une spécificité qui dépasse 99.9 %.

12.3 Réactivité croisée

En tout, 79 sérums à réactivité croisée potentielle (infections primaires EBV, sérums auto-immunes) et 43 sérums de femmes enceintes ont été testés dans l'IgG. La bande TpN17 montre une spécificité qui dépasse 99.9 %.

13. Littérature

1. Aguero-Rosenfeld et al., 1993 Serodiagnosis in early Lyme disease. J. Clin. Microbiol. 31:3090-3095
2. Zhang, J-R. et al.; Antigenic variation in Lyme disease Borrelia by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes; Cell 1997. 89:275-285
3. Bruckbauer et al., 1992 Cross reactive Proteins of *Borrelia burgdorferi*. Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis. 11:224-232.
4. Dressler et al., 1993 Western blotting in the seradiagnosis of Lyme disease J. infect Dis. 176:392-400
5. Engstroem et al., 1995 Immunoblot Interpretation criteria for Serodiagnosis of Early Lyme Disease. J. Clin. Microbiol. 33:419-427
6. Fawcett et al., 1993 Detection of antibodys to the recombinant P39 protein of *Borrelia burgdorferi* using enzyme immunoassay and immunoblotting. J. Rheumatol. 20:734-738
7. Wilske et al., 12/2000, Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik für Lyme-Borreliose, pp. 38ff., Urban&Fischer Verlag
8. Hauser et al., 1997 Interpretation criteria for Standardized Western Blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. J. Clin. Microbiol. 35:1433-1444
9. Marianne J. Mathiesen et al., 1996 Analysis of the human antibody response to outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* and *B. afzelii*. Med. Microbiol. Immunol. 185:121-129

10. Wallich, R. et al.; Artificial-infection protocols allow immunodetection of novel Borrelia burgdorferi antigens suitable as vaccine candidates against Lyme disease; Eur. J. Immunol. 2003. 33:708-719
11. Kraiczy, P. et al.; Immune evasion of Borrelia burgdorferi: mapping of a complement inhibitor factor H-binding site of BbCRASP-3, a novel member of the Erp protein family; Eur. J. Immunol. 2003. 33:697-707
12. LeFebvre et al., 1990 The 83-kilodalton antigen of *Borrelia burgdorferi* which stimulates immunoglobulin M (IgM) and IgG responses in infected hosts is expressed by a chromosomal gene. Clin. Microbiol. 28:1673-1676
13. Luft et al., 1992 The 93-kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi*: an immundominant protoplasma cylinder antigen. Infect. Immun. 60:4309-4321
14. Ma et al., 1992 Serodiagnosis of Lyme borreliosis by Western immunoblot: reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 30:370-376
15. Moskophidis et al., 1995 Wertigkeit des Immunoblots in der Serodiagnostik der Lyme Borreliose. lab. Med. 19:231-237
16. Wallich, R. et al.; Molecular cloning and immunological characterization of a novel linear-plasmid-encoded gene, pG, of Borrelia burgdorferi expressed only in vivo; Infection and Immunity 1995 Sept:3327-3335
17. Roessler et al., 1995 Molecular and immunological characterization of the p83/100 protein of various *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates Med. Microbiol. Immunol. 184:23-32
18. Roessler et al., 1997 Heterogeneity of BmpA (P39) among European isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Influence of Interspecies varability on Serodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 35:2725-2758
19. Simpson et. al., 1990 reactivity of human Lyme borreliosis sera with a 39-kilodalton antigen specific to *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 28:1329-1337
20. RKI (1999), Ratgeber Infektionskrankheiten, Lyme-Borreliose, Epidemiologisches Bulletin, überarbeitete Auflage
21. 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
22. Wilske et al., 1986 Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A 263:92-102
23. Dressler, F. (1994) Lyme borreliosis in European children and adolescents, Clinical and Experimental Rheumatology 12 (Suppl. 10) :49-54
24. Wilske et al., 1988 Immunochemische Analyse der Immunantwort bei Spätmanifestationen der Lyme Borreliose. Zbl. Bakt. Hyg. A 267:549-558
25. Pfister,H-W., Wilske, B. (1994) Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects, The Lancet Vol. 343: 1013-1015.
26. Wilske & Preac-Mursic 1993 Microbiological diagnosis of Lyme Borreliose in: Aspects of Lyme borreliosis: Weber, Burgdorferi eds. Springer, Berlin 267-300
27. 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
28. Wilske et al., 1993 Immunological and Molecular Polymorphism of OspC, an Immunodominant Major Outer Surface Protein of *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 61:2182-2191
29. Wilske et al., 1994 Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Med. Microbiol. Immunol. 183:43-59
30. Wilske, 1995 Diagnostik der *Borrelia burgdorferi*-Infektion. Internist 36:114-119
31. Wilske et al., 1997 *Borrelien*. Diagnostische Bibliothek 48:1-12, Blackwell Verlag
32. Zöller et al., 1991, Validity of Western immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme borreliosis, J. Clin. Microbiol. 29:174-182
33. Oschmann und Kraiczy, (1998), Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis“, UNI-MED-Verlag
34. Horst, H. (1997), Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankeit) bei Mensch und Tier, 3., überarbeitete Auflage, Spitta Verlag: 128-130
35. Tewald, F. Braun, R. (1998), Durchführung und Interpretation serologischer Tests bei Verdacht auf Borrelieninfektion, Clin. Lab. 44: 897-902
36. 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
37. Shrestha M., R.L. Grodzicki, A.C. Steere (1985) Diagnosing early Lyme disease. Am. J. Med. 78: 235-40
38. Magnarelli, L.A., J.F. Anderson and R.C. Johnson (1987), Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. J. Infect. Dis. 156: 183-88

39. 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
40. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Lyme disease - a tick -borne spirochetosis?, Science 216:1317-19.
41. Steere, A.C. (1989), Lyme Disease, N. Engl. J. Med. 321:586-96.
42. 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 characterizartion of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species Borrelia spielmanii sp. Nov. Int J Med Microbiol. 2008; 298(3-4): 279-90
43. 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. 75(10): 4817-25
44. 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
45. Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN, DIN 58969-44, Medizinische Mikrobiologie-Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektionskrankheiten –Teil44: Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi*, Juli 2005, Beuth Verlag GmbH.
46. Grimm, D., Tilly, K., Byram, R., Stewart, P.E., Krum, J.G., Bueschel, D.M., Schwan, T.G., Policastro, P.F., Elias, A.F., Rosa, P.A. (2004) Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 3142-3147
47. Tilly, K., Krum, J.G., Bestor, A., Jewett, M.W., Grimm, D., Bueschel, D., Byram, R., Dorward, D., Vanraden, M.J., Stewart, P., Rosa, P. (2006) *Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. Infect Immun 74: 3554-3564
48. Xu, Q., Seemanapalli, S.V., McShan, K., Liang, F.T. (2006) Constitutive expression of outer surface protein C diminishes the ability of *Borrelia burgdorferi* to evade specific humoral immunity. Infect Immun 74: 5177-5184
49. Xu, Q., McShan, K., Liang, F.T. (2007a) Identification of an ospC operator critical for immune evasion of *Borrelia burgdorferi*. Mol Microbiol 64: 220-231
50. Tilly, K., Bestor, A., Jewett, M.W., Rosa, P. (2007) Rapid clearance of Lyme disease spirochetes lacking OspC from skin. Infect Immun 75: 1517-1519
51. Bankhead, T., Chaconas, G. (2007) The role of VlsE antigenic variation in the Lyme disease spirochete: persistence through a mechanism that differs from other pathogens. Mol Microbiol. 65(6): 1547-58
52. Bykowski, T., Babb, K., von Lackum, K., Riley, S.P., Norris, S.J., Stevenson, B. (2006) Transcriptional regulation of the *Borrelia burgdorferi* antigenically variable VlsE surface protein. J Bacteriol 188: 4879-4889
53. Norris, S.J. (2006) Antigenic variation with a twist - the Borrelia story. Mol Microbiol 60: 1319-1322
54. Nowalk et al. (2006), Serologic Proteome Analysis of *Borrelia burgdorferi* Membrane-Associated Proteins, Infection and Immunity 74, No.7: 3864-3873
55. Poggensee, G. et al (2008), Lyme.Borreliose: Forschungsbedarf und Forschungsansätze, Bundesgesundheitsblatt 50: 1329-1339

14. Symboles

Voir le mode d'emploi.

15. Schéma du déroulement du test

Réalisation du test en bref :

Incubation des échantillons	**30 minutes**	15 µl de sérum/plasma du patient/100 µl de contrôle dans 1,5 ml de tampon de dilution sérique
Lavage	**3 x 5 minutes**	Avec 1,5 ml de tampon de lavage et de dilution
Incubation du conjugué	**30 minutes**	Avec 1,5 ml de conjugué dilué (1 + 100)
Lavage	**3 x 5 minutes**	Avec 1,5 ml de tampon de lavage et de dilution
	1 x 1 minute	Avec de l'eau distillée/désionisée
Incubation du substrat	**10 ± 3 minutes**	Avec 1,5 ml de substrat en solution
Arrêt	**3 x sans incubation.**	Avec 1,5 ml de l'eau distillée/désionisée

Tableau de dilution du conjugué : (valeurs arrondies)

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

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

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

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