

BIO-RAD

PLATELIA™ LYME IgM

96 TESTS

72951

**DETECTION QUALITATIVE DES ANTICORPS IgM
ANTI-BORRELIA BURGDORFERI SENSU LATO DANS
LE SERUM OU LE PLASMA HUMAIN PAR METHODE
IMMUNOENZYMATIQUE**

IVD

1- DOMAINE D'UTILISATION

Platelia™ Lyme IgM est un test immunoenzymatique par immunocapture pour la détection qualitative des anticorps IgM dirigés contre *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans le sérum ou le plasma humain.

2- INTERET CLINIQUE

La borréliose de Lyme, ou maladie de Lyme, est une maladie infectieuse non contagieuse, due à une bactérie de la famille des Spirochetaceae, *Borrelia burgdorferi*, transmise par des tiques du genre *Ixodes* (2). Le réservoir du germe est constitué par toute une variété d'animaux. La transmission à l'homme se fait lors de la morsure des tiques, et le risque de transmission est d'autant plus grand que la morsure dure plus longtemps.

La maladie de Lyme est largement répandue dans les régions tempérées et froides de l'hémisphère nord, de la Chine à l'Amérique du Nord et de la Scandinavie à l'Afrique du Nord. On estime environ à 17 000 le nombre de cas annuels aux Etats-Unis (3), et à plus de 50 000 celui en Europe, où il semble exister un gradient positif d'ouest en est (4).

Il est maintenant établi que la bactérie *Borrelia burgdorferi*, décrite en 1984 comme une espèce unique, est un complexe de plusieurs espèces, dont trois ont un pouvoir pathogène certain pour l'homme : *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (ss), *Borrelia garinii* et *Borrelia afzelii* (7). Les trois espèces pathogènes circulent en Europe tandis que seule *B. burgdorferi* sensu stricto est retrouvée aux Etats-Unis.

Les symptômes de la maladie de Lyme sont variés et parfois difficiles à reconnaître (6). L'évolution clinique se déroule selon trois phases distinctes. Le stade précoce (Stade I), peut être asymptomatique ou se traduire par un tableau pseudo-grippal. Dans 50 à 80% des cas, on note l'apparition plusieurs jours ou semaines après la morsure de la tique d'un rash cutané inflammatoire à extension centrifuge d'aspect très particulier nommé erythema migrans (EM). En l'absence de traitement, la dissémination des *Borrelia* par voie sanguine se traduit quelques semaines plus tard par la survenue d'arthrites inflammatoires, d'atteintes neurologiques et méningées, de manifestations cutanées ou cardiaques (Stade II). Après plusieurs mois ou années, la maladie évolue vers une forme chronique associant à des degrés divers acrodermatite chronique atrophiante, encéphalopathie, encéphalomyélite et arthrite chronique (Stade III) (1).

Il existe un tropisme organique particulier à chacune des espèces. Si le premier stade d'érythème migrant est indistinctement lié aux trois espèces, l'évolution vers une forme neurologique est préférentiellement associée à l'espèce *B. garinii*, les arthrites plutôt à *B. burgdorferi* ss, l'acrodermatite chronique atrophiante étant quant à elle spécifique de *B. afzelii*.

Le diagnostic de maladie de Lyme ne doit être posé qu'après une évaluation rigoureuse des antécédents du patient, de ses critères cliniques et biologiques, et de l'évaluation du risque de contamination. En raison des difficultés de l'examen direct, de la culture bactérienne et de la mise en œuvre des techniques de biologie moléculaire, la sérologie reste l'élément clé du diagnostic biologique de la maladie de Lyme (1,5,8). Les anticorps IgM anti-*Borrelia burgdorferi* apparaissent en général 3 à 6 semaines après le début de l'infection et peuvent persister pendant l'évolution de la maladie. La réponse IgG est plus tardive et n'atteint son pic qu'après des mois, voire des années. S'il est moins utile au stade précoce, le diagnostic sérologique s'avère en revanche indispensable lors des stades secondaires ou tertiaires, notamment en l'absence d'érythème migrant. Lorsque la sérologie est négative et le contexte clinique évocateur, une nouvelle sérologie doit être réalisée 3 semaines après le premier prélèvement. La présence d'IgM spécifiques n'est pas synonyme d'infection récente, de même que la présence d'IgG n'est pas toujours le signe d'une infection ancienne.

La nature des antigènes et des anticorps utilisés dans les réactifs Platelia™ Lyme IgM (Réf. 72951) et Platelia™ Lyme IgG (Réf. 72952) permettent respectivement la détection des anticorps spécifiques IgM et IgG dirigés contre les différentes souches américaines et européennes de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* ss, *B. garinii*, *B. afzelii*).

3- PRINCIPE

Platelia™ Lyme IgM est un test permettant la détection qualitative des anticorps IgM anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato dans le sérum ou le plasma humain par une méthode immunoenzymatique par immunocapture des IgM sur phase solide.

Des anticorps anti-chaînes μ humaines sont utilisés pour sensibiliser la microplaque. Un mélange d'antigène *Borrelia* et d'anticorps monoclonal anti-antigène *Borrelia* marqué à la peroxydase est utilisé comme conjugué. La mise en œuvre du test comprend les étapes suivantes :

- **Etape 1**

Les échantillons à étudier ainsi que les contrôles sont dilués au 1/101 puis déposés dans les cupules de la microplaque. Durant cette incubation de 1 heure à 37°C, les IgM présentes dans l'échantillon sont captées par les anticorps anti- μ fixés sur les cupules de la microplaque. Les IgG et les autres protéines sériques sont éliminées par les lavages pratiqués à la fin de l'incubation.

- **Etape 2**

Le conjugué (mélange d'antigène *Borrelia* et d'anticorps anti-*Borrelia* marqué à la peroxydase) est déposé dans toutes les cupules de la microplaque. Durant cette incubation de 1 heure à 37°C, si l'échantillon testé contient des anticorps IgM spécifiques de *Borrelia*, ceux-ci vont fixer le conjugué. Le conjugué en excès non lié est éliminé par les lavages pratiqués à la fin de l'incubation.

- **Etape 3**

La présence des complexes immuns (anti-chaîne μ humaine / IgM anti-*Borrelia* / Antigène *Borrelia* / Anticorps monoclonal anti-*Borrelia* marqué à la peroxydase) éventuellement formés est révélée par l'addition dans chaque cupule d'une solution de révélation enzymatique.

- **Etape 4**

Après incubation à température ambiante (+18-30°C), la réaction enzymatique est stoppée par addition d'une solution d'acide sulfurique 1N. La densité optique lue à 450/620 nm, interprétée par rapport à une valeur seuil, permet de confirmer ou d'infirmer la présence d'IgM anti-*Borrelia* dans l'échantillon testé.

4- COMPOSITION DE LA TROUSSE

Les réactifs sont fournis en quantité suffisante pour réaliser 96 déterminations en un maximum de 6 séries. Tous les réactifs sont destinés à l'usage exclusif du diagnostic *in vitro*.

Etiquetage		Réactifs	Présentation
R1	Microplate	Microplaque (prêt à l'emploi) : 12 barrettes de 8 cupules à puits sécables sensibilisées par des anticorps anti-chaînes μ humaines	1
R2	Concentrated Washing Solution	Solution de lavage (10x) : Tampon TRIS-NaCl (pH 7,4), 1% Tween® 20. Conservateur : 0,01 % ProClin™ 300	2 x 100 mL
R3	Negative Control	Contrôle Négatif : Sérum humain négatif en IgM anti- <i>Borrelia</i> , en antigène HBs et en anticorps anti-VIH1, anti-VIH2 et anti-VHC Conservateur : 0,15% ProClin™ 300	1 x 0,75 mL
R4	Cut-off Control	Contrôle Valeur Seuil : Sérum humain réactif pour les IgM anti- <i>Borrelia</i> , et négatif en antigène HBs et en anticorps anti-VIH1, anti-VIH2 et anti-VHC Conservateur : 0,15% ProClin™ 300	1 x 0,75 mL
R5	Positive Control	Contrôle Positif : Sérum humain réactif pour les IgM anti- <i>Borrelia</i> , et négatif en antigène HBs et en anticorps anti-VIH1, anti-VIH2 et anti-VHC Conservateur : 0,15% ProClin™ 300	1 x 0,75 mL
R6a	Antigen	Antigène (lyophilisé) : Sérum albumine bovine, Antigène <i>Borrelia</i>	2 x qs 8,0 mL
R6b	Conjugate (51x)	Conjugué (51x) : Anticorps monoclonal d'origine murine anti- <i>Borrelia</i> couplé à la peroxydase Conservateur : 0,15% ProClin™ 300	1 x 0,4 mL
R7	Diluent	Diluant pour échantillons et conjugué (prêt à l'emploi) : Tris-NaCl (pH 7,7), Sérum de veau foetal, 0,1% de Tween® 20 et rouge de phénol Conservateur : 0,15% ProClin™ 300	2 x 65 mL
R9	Chromogen TMB	Chromogène (prêt à l'emploi) : 3,3',5,5' tétraméthylbenzidine (< 0,1%), H ₂ O ₂ (<1%)	1 x 28 mL
R10	Stopping Solution	Solution d'arrêt (prêt à l'emploi) : Solution d'acide sulfurique 1N	1 x 28 mL
		Films adhésifs	4

Se reporter aux indications mentionnées sur le coffret pour connaître les conditions de conservation et la date d'expiration des réactifs.

5- PRECAUTIONS D'UTILISATION

La qualité des résultats dépend du respect des Bonnes Pratiques de Laboratoire suivantes :

- Ne pas utiliser les réactifs après la date d'expiration.
- Ne pas mélanger, ni associer au cours d'une même série, des réactifs provenant de trousse portant des numéros de lots différents.

REMARQUE: Il est possible d'utiliser d'autres lots de Solution de Lavage (R2 identifié 10x en orange), de Chromogène (R9 identifié TMB en turquoise) et de Solution d'Arrêt (R10 identifié 1N en rouge) que ceux fournis avec la trousse, sous réserve d'utiliser des réactifs strictement équivalents d'un seul et même lot au cours d'une même série.

- Avant utilisation, attendre 15 minutes que les réactifs s'équilibrent à la température ambiante (+18-30°C).
- Reconstituer ou diluer soigneusement les réactifs en évitant toute contamination.
- Ne pas réaliser le test en présence de vapeurs réactives (acides, alcalines, aldéhydes) ou de poussières qui pourraient altérer l'activité enzymatique du conjugué.
- Utiliser de préférence du matériel à usage unique. A défaut, utiliser une verrerie parfaitement lavée et rincée à l'eau distillée.
- Le lavage des cupules est une étape essentielle de la manipulation : respecter le nombre de cycles de lavages prescrit, et s'assurer que toutes les cupules sont complètement remplies, puis complètement vidées. Un mauvais lavage peut entraîner des résultats incorrects.
- Ne pas laisser la microplaque sécher entre la fin des lavages et la distribution des réactifs.
- Ne jamais utiliser le même récipient pour distribuer le conjugué et la solution de révélation.
- La réaction enzymatique est très sensible à tous métaux ou ions métalliques. Par conséquent, aucun élément métallique ne doit entrer en contact avec les différentes solutions contenant le conjugué ou le chromogène.
- Le Chromogène (R9) doit être incolore. L'apparition d'une coloration bleue indique que le réactif est inutilisable et doit être remplacé.
- Utiliser un cône de distribution neuf pour chaque échantillon.

- Vérifier l'exactitude des pipettes et le bon fonctionnement des appareils utilisés.

CONSIGNES D'HYGIENE ET DE SÉCURITÉ

Les composants d'origine humaine utilisés dans la préparation des réactifs ont été testés et trouvés non réactifs pour l'antigène de surface de l'hépatite B (Ag HBs), les anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-VHC) et les anticorps dirigés contre le virus de l'immunodéficiência humaine (anti-VIH1 et anti-VIH2). Du fait qu'aucune méthode ne peut garantir de façon absolue l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs d'origine humaine ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage :

- Considérer le matériel directement en contact avec les échantillons et les réactifs d'origine humaine ainsi que les solutions de lavage comme des produits contaminés.
- Porter des gants à usage unique lors de la manipulation des réactifs et des échantillons.
- Ne pas pipeter à la bouche.
- Eviter les éclaboussures d'échantillons ou de solutions les contenant. Nettoyer les surfaces souillées avec de l'eau de javel diluée à 10%. Si le liquide contaminant est un acide, neutraliser au préalable les surfaces souillées avec du bicarbonate de soude, puis nettoyer à l'aide d'eau de javel et sécher avec du papier absorbant. Le matériel utilisé pour le nettoyage devra être jeté dans un conteneur spécial pour déchets contaminés.
- Eliminer les échantillons, les réactifs d'origine humaine ainsi que le matériel et les produits contaminés après décontamination :
 - soit par immersion dans de l'eau de javel à la concentration finale de 5% d'hypochlorite de sodium pendant 30 minutes.
 - soit par autoclavage à 121°C pendant 2 heures minimum.

ATTENTION: ne pas introduire dans l'autoclave des solutions contenant de l'hypochlorite de sodium

- Eviter tout contact du Chromogène et de la Solution d'Arrêt avec la peau et les muqueuses.
- La manipulation et l'élimination des déchets chimiques et biologiques doivent être faites selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire.
- Tous les réactifs de la trousse sont destinés au seul usage diagnostic *in vitro*.

Attention : certains réactifs contiennent du ProClin™ 300 ≤ 0,15%



Xi - Irritant

R43 : Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau
S28-37 : Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et du savon. Porter des gants appropriés.

6- ECHANTILLONS

1. Les tests sont effectués sur des échantillons de sérum ou de plasma recueilli sur anticoagulant de type EDTA, héparine ou citrate.
2. Respecter les consignes suivantes pour le prélèvement, le traitement et la conservation de ces échantillons de sang :
 - Prélever un échantillon de sang selon les pratiques en usage.
 - Pour les sérums, laisser le caillot se former complètement avant centrifugation.
 - Conserver les tubes fermés.
 - Après centrifugation, extraire le sérum ou le plasma et le conserver en tube fermé.
 - Les échantillons seront conservés à +2-8°C si le test est effectué dans les 7 jours.
 - Si le test n'est pas effectué dans les 7 jours, ou pour tout envoi, les échantillons seront congelés à -20°C (ou plus froid).
 - Il est recommandé de ne pas procéder à plus de cinq cycles de congélation / décongélation. Les échantillons devront être soigneusement homogénéisés (Vortex) après décongélation et avant la réalisation du test.
3. Les résultats ne sont pas affectés par les échantillons contenant 90 g/l d'albumine ou 100 mg/l de bilirubine non conjuguée, les échantillons lipémiques contenant l'équivalent de 36 g/l de trioléïne (triglycéride) ou les échantillons hémolysés contenant 10 g/l d'hémoglobine.
4. Ne pas chauffer les échantillons.

7- MODE OPÉRATOIRE

7.1. MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Agitateur type Vortex.
- Appareil de lecture pour microplaques équipé de filtres 450/620 nm (*).
- Incubateur de microplaques pouvant être thermostaté à 37°C ± 1°C (*).

- Système de lavage automatique, semi-automatique ou manuel pour microplaques (*).
- Eau distillée ou désionisée stérile.
- Gants à usage unique.
- Lunettes de protection.
- Papier absorbant.
- Pipettes ou multipipettes, automatiques ou semi-automatiques, réglables ou fixes, pouvant mesurer de 10 µl à 1000 µl, et 1 ml, 2 ml et 10 ml.
- Eprouvettes graduées de 25 ml, 50 ml, 100 ml et 1000 ml.
- Hypochlorite de sodium (eau de javel) et bicarbonate de sodium.
- Conteneur de déchets contaminés.
- Tubes à usage unique

(*) Nous consulter pour une information précise concernant les appareils validés par nos services techniques.

7.2. RECONSTITUTION DES REACTIFS

- **R1**: Laisser revenir à température ambiante (+18-30°C) avant ouverture du sachet. Sortir le cadre et replacer immédiatement les barrettes non utilisées dans le sachet en vérifiant la présence du dessicant. Refermer soigneusement le sachet et le replacer à +2-8°C.
- **R2**: Diluer au 1/10 la solution R2 avec de l'eau distillée : 100 ml de R2 dans 900 ml d'eau distillée. On obtient ainsi la solution prête à l'emploi. Prévoir 350 ml de solution de lavage diluée pour une plaque entière de 12 barrettes en lavage manuel.
- **R3, R4, R5**: Diluer au 1/101 dans le Diluant (R7) (exemple : 10 µL R3 + 1 ml R7).
- **R6a**: Pour une plaque entière, reprendre le contenu de chacun des flacons par 8 ml de Diluant (R7) et bien homogénéiser. Une attente de 15 minutes environ avant le mélange avec le Conjugué (R6b) permet d'assurer une réhydratation homogène de l'antigène.
- **R6b**: Préparer la quantité de conjugué nécessaire à la réalisation d'une série en diluant un volume de conjugué concentré 51x dans 50 volumes de Diluant (R7). Pour une plaque entière, utiliser 0,3 ml de R6b et 15 ml de R7.
- **R6 (R6a+R6b)**: Mélanger volume à volume les réactifs R6a et R6b reconstitués. Pour une plaque entière, utiliser 12 ml de la solution R6a reconstituée et 12 ml de la solution R6b reconstituée. Attendre 45 minutes avant utilisation de la solution de travail du conjugué.

7.3. CONSERVATION ET VALIDITE DES REACTIFS OUVERTS ET / OU RECONSTITUES

La trousse doit être conservée à +2-8°C. Chaque élément de la trousse conservée avant ouverture à +2-8°C peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

- **R1**: Après ouverture, les barrettes conservées dans le sachet correctement refermé sont stables pendant 1 mois à +2-8°C (vérifier la présence du dessiccant).
- **R2**: Après dilution, la Solution de Lavage se conserve 2 semaines à +2-8°C. Après ouverture et en l'absence de contamination, la Solution de Lavage concentrée peut être conservée à +2-25°C jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette.
- **R3, R4, R5, R6b, R7**: Après ouverture et en l'absence de contamination, les réactifs conservés à +2-8°C sont stables pendant 1 mois.
- **R6a+R7**: Après reconstitution, l'antigène se conserve 15 jours à +2-8°C ou congelé à -20°C. L'antigène reconstitué et conservé congelé ne doit pas subir plus de trois cycles de congélation / décongélation.
- **R6b+R7** : Après reconstitution, la solution de conjugué est stable 8 heures à température ambiante (+18-30°C) ou 24 heures à +2-8°C.
- **R6 (R6a+R6b)**: Après reconstitution, la solution de travail du conjugué est stable 8 heures à température ambiante (+18-30°C).
- **R9**: Après ouverture et en l'absence de contamination, le réactif conservé à +2-8°C est stable pendant 2 mois.
- **R10**: Après ouverture et en l'absence de contamination, le réactif conservé à +2-8°C est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette.

7.4. MODE OPERATOIRE

Suivre strictement le protocole proposé et appliquer les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

Avant utilisation, laisser tous les réactifs revenir à température ambiante (+18-30°C).

Utiliser les sérums de contrôles à chaque mise en œuvre du dosage pour valider la qualité du test.

1. Etablir soigneusement le plan de distribution et d'identification des sérums de contrôle et des échantillons de patients.
2. Préparer la Solution de Lavage diluée (R2) [Se référer au Chapitre 7.2].

3. Sortir le cadre support et les barrettes (R1) de l'emballage protecteur [Se référer au Chapitre 7.2].
4. Reprendre le contenu d'un flacon R6a par 8 ml de Diluant (R7) et bien homogénéiser.
5. Diluer les sérums de contrôle R3, R4, R5 et les échantillons de patients à tester (S1, S2...) au 1/101 dans le Diluant (R7), soit 10 µl d'échantillon et 1,0 ml de Diluant (R7). Bien homogénéiser (Vortex).
6. Préparer la Solution de Conjugué (R6) : diluer au 1/51 la quantité de Conjugué (R6b) nécessaire avec le Diluant (R7). Puis mélanger volume à volume les réactifs R6a et R6b ainsi reconstitués [Se référer au Chapitre 7.2]. Ce mélange doit être préparé au moins 45 mn avant le dépôt sur la plaque. Bien homogénéiser.
7. Distribuer dans chaque cupule 200µl des sérums de contrôle et des échantillons dilués selon le schéma suivant :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5	S13									
B	R4	S6										
C	R4	S7										
D	R5	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

8. Couvrir la microplaque d'un film adhésif en appuyant bien sur toute la surface pour assurer l'étanchéité, puis incuber immédiatement la microplaque au bain-marie thermostaté ou dans un incubateur sec de microplaques pendant 1 heure ± 5 minutes à 37°C ± 1°C.
9. A la fin de la première incubation, retirer le film adhésif, aspirer le contenu de toutes les cupules dans un conteneur pour déchets contaminés (contenant de l'hypochlorite de sodium) et procéder à 4 lavages avec 350 µl de la Solution de Lavage (R2). Sécher les barrettes par retournement sur une feuille de papier absorbant et taper légèrement afin d'éliminer la totalité de la Solution de Lavage.

10. Distribuer 200 µl de la solution de travail du conjugué (R6) dans toutes les cupules. Agiter délicatement cette solution avant l'emploi.
11. Couvrir la microplaque d'un film adhésif neuf en appuyant bien sur toute la surface pour assurer l'étanchéité. Incuber la microplaque au bain-marie thermostaté ou dans un incubateur sec de microplaques pendant 1 heure \pm 5 minutes à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
12. A la fin de la deuxième incubation, retirer le film adhésif, aspirer le contenu de toutes les cupules dans un conteneur pour déchets contaminés (contenant de l'hypochlorite de sodium) et procéder à 4 lavages avec 350 µl de la Solution de Lavage (R2). Sécher les barrettes par retournement sur une feuille de papier absorbant et taper légèrement afin d'éliminer la totalité de la Solution de Lavage.
13. Distribuer rapidement, et **à l'abri de la lumière vive**, 200 µl du Chromogène (R9) dans toutes les cupules. **Laisser la réaction se développer à l'obscurité pendant 30 ± 5 minutes à température ambiante ($+18-30^{\circ}\text{C}$)**. Lors de cette incubation, ne pas utiliser de film adhésif.
14. Arrêter la réaction enzymatique en ajoutant 100 µl de la Solution d'Arrêt (R10) dans chaque cupule. Adopter la même séquence et le même rythme de distribution que pour la solution de révélation.
15. Essuyer soigneusement le dessous des plaques. Lire la densité optique à 450/620 nm à l'aide d'un lecteur de plaques dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction. Les barrettes doivent toujours être conservées à l'abri de la lumière avant la lecture.
16. S'assurer, avant la transcription des résultats, de la concordance entre la lecture et le plan de distribution des plaques et des échantillons.

8- CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

8.1. CALCUL DE LA VALEUR SEUIL (VS)

La valeur Seuil VS correspond à la moyenne des densités optiques (DO) des duplicats du Contrôle Valeur Seuil (R4) :

$VS = \text{moyenne DO R4}$

8.2. CALCUL DU RATIO ECHANTILLON

Les résultats pour un échantillon donné sont exprimés sous forme d'un ratio à l'aide de la formule suivante :

$\text{Ratio Echantillon} = \text{DO échantillon}/VS$

8.3. CONTROLE DE QUALITÉ

Analyser les résultats de DO obtenus avec les sérums de contrôle sur chaque microplaque et pour chaque série. Pour valider la manipulation, les critères suivants doivent être respectés :

- Valeurs des densités optiques :
 - $VS > 0,2$
 - $0,80 \times VS < DO \text{ R4 Repl.1} < 1,20 \times VS$
 - $0,80 \times VS < DO \text{ R4 Repl.2} < 1,20 \times VS$

(La DO individuelle de chacun des duplicats du Contrôle R4 ne doit pas s'écartier de plus de 20% de la Valeur Seuil)

- Rapports des densités optiques :
 - Ratio R3 (DO R3 / VS) < 0,5
 - Ratio R5 (DO R5 / VS) > 2,0

Si ces critères ne sont pas respectés, recommencer la manipulation.

8.4. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Ratio échantillon	Résultat	Interprétation
Ratio < 0,80	Négatif	L'échantillon est considéré négatif pour la présence d'anticorps IgM anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.
$0,80 \leq \text{Ratio} < 1,2$	Douteux	L'échantillon est considéré douteux pour la présence d'anticorps IgM anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato. Le résultat doit être confirmé par un nouveau test réalisé sur un nouvel échantillon prélevé au minimum 3 semaines après la date du 1 ^{er} examen.
Ratio $\geq 1,2$	Positif	L'échantillon est considéré positif pour la présence d'anticorps IgM anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.

En cas de suspicion d'infection, des tests sérologiques complémentaires tels que la recherche des IgG anti-*Borrelia* peuvent être utiles pour confirmer le diagnostic. En cas de sérologie positive ou douteuse, il est recommandé de tester les échantillons par une méthode de confirmation de type Western-Blot (8).

8.5. EXPERTISE DES CAUSES D'ERREUR

L'origine des réactions non validées ou non reproductibles est souvent en relation avec les causes suivantes :

- Lavage insuffisant des microplaques.

- Contamination des échantillons négatifs par un sérum ou un plasma contenant un titre élevé d'anticorps.
- Contamination ponctuelle de la solution de révélation par des agents chimiques oxydants (eau de javel, ions métalliques...).
- Contamination ponctuelle de la Solution d'Arrêt.

8.6. EXEMPLE DE CALCUL

Note: Les données suivantes ne constituent qu'un exemple et ne doivent pas être utilisées à la place des données obtenues par l'utilisateur.

Contrôles et Echantillons de patients	DO (450/620 nm)	Ratio	Résultat
R3	0,155	0,22	Négatif
R4	0,709	/	/
R4	0,697	/	/
R5	2,280	3,24	Positif
Echantillon 1	1,181	1,67	Positif
Echantillon 2, etc...	0,597	0,85	Positif

- Valeur Seuil :
 - $VS = (0,709 + 0,697) / 2 = 0,703$
- Valeurs des densités optiques :
 - DO VS = 0,703 (N > 0,200)
 - DO R4 Repl.1 = 0,709 (0,80 DO VS < DO R4 Repl.1 < 1,20 DO VS)
 - DO R4 Repl.2 = 0,697 (0,80 DO VS < DO R4 Repl.2 < 1,20 DO VS)
- Rapports des densités optiques :
 - Ratio R3 = 0,22 (N < 0,5)
 - Ratio R5 = 3,24 (N > 2,0)
- Contrôle de qualité : Conforme

9- PERFORMANCES

9.1. PRÉVALENCE

Afin de déterminer la prévalence des anticorps IgM dirigés contre *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans le sérum humain, un panel de 296 échantillons issus de donneurs de sang du Nord de la France a été testé. Les résultats obtenus sont les suivants : 286 sérums négatifs, 8 sérums douteux et 2 sérums positifs. La prévalence mesurée à l'aide du dosage Platelia™ Lyme IgM s'établit donc à 0,68% (2/296).

9.2. SPÉCIFICITÉ

9.2.1 Spécificité en zone non endémique

La spécificité a été déterminée sur un panel de 286 sérums recueillis auprès de donneurs de sang vivant en zone non endémique dans le nord de la France. Ces échantillons ont été sélectionnés sur la négativité des résultats obtenus à l'aide d'une trousse EIA commercialisée en Europe (marquage CE) et servant de référence.

9.2.2 Spécificité en zone endémique

La spécificité a également été déterminée sur un panel de 197 sérums recueillis auprès de donneurs de sang vivant en zone d'endémie dans l'est de la France, lesquels ne présentaient aucun antécédent pouvant évoquer une maladie de Lyme (absence de signes cliniques en faveur d'une borréliose, absence de notion de piqûre de tique). Ces échantillons ont été sélectionnés sur la négativité des résultats obtenus à l'aide d'une trousse EIA commercialisée en Europe (marquage CE) et servant de référence.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Panel de sérums	Négatif	Douteux ⁽¹⁾	Positif ⁽²⁾	Spécificité
Zone non endémique (n=286) [IC 95%] ⁽³⁾	280	5	1	99,6% (280/281) [98,0% - 100,0%]
Zone endémique (n=197) [IC 95%]	191	4	2	99,0% (191/193) [96,3% - 99,9%]

⁽¹⁾ les résultats douteux ont été exclus des calculs de spécificité.

⁽²⁾ l'un des trois échantillons trouvés positifs avec le test Platelia™ Lyme IgM a également été trouvé positif en Western-blot

⁽³⁾ IC 95% : intervalle de confiance à 95%.

9.3. SENSIBILITÉ

La sensibilité du dosage Platelia™ Lyme IgM a été étudiée en complémentarité de celle du dosage Platelia™ Lyme IgG (Réf. 72952) sur une population de 70 échantillons de patients atteints de diverses formes de la maladie de Lyme à différents stades cliniques. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant, et sont comparés avec ceux fournis par des trousse EIA commercialisées en Europe (marquage CE) et servant de référence :

Stade Clinique	Nombre de sérums	Platelia™ Lyme ⁽¹⁾			Référence Europe ⁽¹⁾
		IgM	IgG	IgM + IgG	IgM + IgG
Erythème migrant (Stade I) [IC 95%]	17	58,8% [32,9%-81,6%]	66,7% [38,4%-88,2%]	82,4% [56,6%-96,2%]	93,3% [68,1%-99,8%]
Neuroborréliose (Stade II) [IC 95%]	33	36,7% [19,9%-56,1%]	96,9% [83,4%-99,9%]	96,9% [83,4%-99,9%]	97,0% [84,2%-99,9%]
Acrodermatite chronique atrophiante (Stade III) [IC 95%]	5	20,0% [0,05%-71,6%]	100,0% [54,9%-100,0%]	100,0% [54,9%-100,0%]	100,0% [54,9%-100,0%]
Arthrite de Lyme (Stade III) [IC 95%]	15	0,0% [0,0%-18,1%]	100,0% [81,9%-100,0%]	100,0% [81,9%-100,0%]	100,0% [81,9%-100,0%]

⁽¹⁾ les résultats douteux ont été exclus des calculs de sensibilité.

La sensibilité du dosage Platelia™ Lyme IgM a été également étudiée sur un panel documenté fourni par le CDC (Center for Disease Control) et a été comparée avec celles obtenues à l'aide de trousse EIA commercialisées en Europe (marquage CE) et aux USA (approuvées FDA). Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Stade Clinique	Nombre de sérums	Platelia™ Lyme ⁽¹⁾			Référence Europe ⁽¹⁾	Référence USA ⁽¹⁾
		IgM	IgG	IgM + IgG	IgM + IgG	IgM + IgG
Erythème migrant [IC 95%]	28	73,7% [48,8%-90,9%]	38,5% [20,2%-59,5%]	86,4% [65,1%-97,1%]	70,4% [49,8%-86,3%]	87,0% [66,4%-97,2%]
Arthrite / Arthralgie [IC 95%]	6	40,0% [5,3%-85,3%]	100,0% [60,7%-100,0%]	100,0% [60,7%-100,0%]	100,0% [60,7%-100,0%]	100,0% [60,7%-100,0%]
Non déterminé [IC 95%]	4	100,0% [0,05%-100,0%]	100,0% [36,8%-100,0%]	100,0% [47,3%-100,0%]	100,0% [19,4%-99,9%]	100,0% [36,8%-100,0%]

⁽¹⁾ les résultats douteux ont été exclus des calculs de sensibilité.

9.3. PRÉCISION

- Précision intra-essai (répétabilité) :

Afin d'évaluer la répétabilité intra-essai, un échantillon négatif et trois échantillons positifs ont été testés à 30 reprises dans une même série. Le ratio (DO échantillon / VS) a été déterminé pour chaque échantillon. La moyenne des ratios, la déviation standard (DS) et le coefficient de variation (%CV) pour chaque échantillon sont donnés dans le tableau suivant.

Précision intra-essai (répétabilité)

N=30	Echantillon Négatif	Echantillon positif faible	Echantillon positif	Echantillon positif fort
	Ratio (DO Echantillon / Valeur Seuil)			
Moyenne	0,24	1,17	1,88	4,23
DS	0,040	0,052	0,070	0,104
% CV	15,2%	4,4%	3,7%	2,5%

- Précision inter-essai (reproductibilité) :

Afin d'évaluer la reproductibilité inter-essai, chacun des quatre échantillons (un négatif et trois positifs) ont chacun été testés en duplicate, dans deux séries par jour, sur une période totale de 20 jours. Le ratio (DO échantillon / VS) a été déterminé pour chaque échantillon. La moyenne des ratios, la déviation standard (DS) et le coefficient de variation (%CV) pour chaque échantillon sont donnés dans le tableau suivant.

Précision inter-essai (reproductibilité)

N=80	Echantillon Négatif	Echantillon positif faible	Echantillon positif	Echantillon positif fort
	Ratio (DO Echantillon / Valeur Seuil)			
Moyenne	0,24	1,21	1,76	4,18
SD	0,029	0,067	0,104	0,153
% CV	12,0%	5,5%	5,9%	3,7%

9.5. RÉACTIVITÉ CROISÉE

338 échantillons ayant des caractéristiques susceptibles d'aboutir à des réactions non spécifiques ont été testés avec la trousse Platelia™ Lyme IgM. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Panel	Nombre d'échantillons	Douteux ⁽¹⁾	Positifs	% de réactions croisées
Syphilis	83	0	1	1,2% ⁽²⁾
CMV	30	0	1	3,3% ⁽²⁾
EBV	17	1	5	29,4% ⁽³⁾
Leptospirose	15	0	2	13,3% ⁽³⁾
Malaria	20	0	6	30,0% ⁽³⁾
Anticorps anti-nucléaires (ANA)	22	1	0	0,0%
Anticorps hétérophiles (HAMA)	10	0	0	0,0%
Facteur rhumatoïde	43	0	0	0,0%
HSV	10	0	0	0,0%
Toxoplasmose	38	0	1	2,6% ⁽²⁾
Rubéole	10	0	0	0,0%
Rougeole	10	0	0	0,0%
Oreillons	10	2	0	0,0%
HIV	10	0	0	0,0%
VZV	10	0	0	0,0%
TOTAL	338	4	16	4,8%

⁽¹⁾ Les résultats douteux ont été exclus des calculs de réactions croisées.

⁽²⁾ Non significativement différent du pourcentage de prévalence en zone endémique (test de Fisher, $p > 0,05$).

⁽³⁾ Significativement différent du pourcentage de prévalence en zone endémique (test de Fisher, $p < 0,05$).

Les 16 échantillons trouvés positifs avec le test Platelia™ Lyme IgM ont été également testés avec la trousse EIA commercialisée en Europe (marquage CE) et par méthode Western-Blot. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Echantillon	Trousse EIA	Western blot ⁽¹⁾	Echantillon	Trousse EIA	Western blot ⁽¹⁾
Syphilis	Négatif	Négatif	Leptospirose	Positif	Positif
CMV	Négatif	Négatif	Malaria	Douteux	NT
EBV	Positif	Positif	Malaria	Positif	NT
EBV	Positif	Négatif	Malaria	Douteux	NT
EBV	Positif	Négatif	Malaria	Positif	NT
EBV	Positif	NT	Malaria	Négatif	NT
EBV	Positif	Douteux	Malaria	Négatif	NT
Leptospirose	Négatif	Positif	Toxoplasmose	Positif	Négatif

⁽¹⁾ NT : sérum non testé en raison d'un volume de prélèvement insuffisant.

10-LIMITES D'UTILISATION

Le diagnostic d'infection par *Borrelia burgdorferi* ne peut être définitivement établi que sur un ensemble de données cliniques et biologiques. Le résultat d'un seul test de recherche des anticorps IgM anti-*Borrelia burgdorferi* ne constitue pas en soi une preuve suffisante pour poser le diagnostic d'infection par *Borrelia burgdorferi* sensu lato. En cas de sérologie positive ou douteuse, il est recommandé de tester les échantillons par une méthode de confirmation de type Western-Blot (8).

En particulier il a été rapporté que les patients souffrant de malaria ou infectés par le virus d'Epstein Barr ou par d'autres espèces de spirochètes (leptospirose, etc...) pouvaient présenter des réactions faussement positives avec les tests de recherche des anticorps anti-*Borrelia burgdorferi*. Ces situations devront être prises en compte lors de l'interprétation des résultats obtenus avec ces tests.

11-CONTROLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot de produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation. La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par le fabricant.

12- REFERENCES

1. **Aguero-Rosenfeld, M. E., Wang, G., Schwartz, I., Wormser, G.** 2005. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**: 484-509.
2. **Burgdorfer, W., Barbour, A. G., Hayes, S. F., Benach, J. L., Grunwaldt, E., Davis, J.P.** 1982. Lyme disease – a tick-borne spirochetosis? *Science.* **216**: 1317-1319.
3. **Center for Disease Control and Prevention.** 2004. Lyme disease – United States, 2001-2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **53**: 365-369.
4. **Hubalek, Z., Halouzka, J.** 1997. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur. J. Epidemiol.* **13**: 951-957.
5. **Reed, K. D.** 2002. Laboratory testing for Lyme disease: possibilities and practicalities. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 319-324.
6. **Stanek, G., Strle, F.** 2003. Lyme borreliosis. *Lancet.* **362**: 1639-1647.
7. **Wang, G., Van Dam, A. P., Spanjaard, L., Dankert, J.** 1999. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 633-653.
8. **Wilske, B.** 2003. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **3**: 215-227.



- (US) - CE marking (European directive 98/79/CE on *in vitro* diagnostic medical devices)
 (F) - Marquage CE (Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*)
 (E) - Marcado CE (Directiva europea 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*)
 (I) - Marchiatura CE (Direttiva europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*)
 (D) - CE Konformitätskennzeichnung (Europäische Richtlinie 98/79/EG über *In-vitro*-Diagnostika)
 (P) - Marcação CE (Directiva europeia 98/79/CE relativa aos dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*)
 (S) - CE-märkning (Europa direktiv 98/79/EG om medicintekniska produkter för *in vitro*-diagnostik)
 (DK) - CE-mærkningen (Europa direktiv 98/79/EF om medicinsk udstyr til *in vitro*-diagnostik)
 (GR) - Χαρακτηρισμός CE (ευρωπαϊκή οδηγία 98/79/CE περί *in vitro* διαγνωστικές ιατρικές συσκευές)
 (PL) - CE oznaczenie (Dyrektywa unijna 98/79/CE dotycząca produktów medycznych do badań *in vitro*)
 (LT) - CE ženklas (Europos sąjungos direktyva 98/79/CE dėl *in vitro* diagnostikos medicinos prietaisų)
 (H) - CE jelzés (98/79/CE Európai Irányelv az *in vitro* orvosi diagnosztikai eszközökről)
 (EST) - CE märgistus (Euroopa direktiiv 98/79/CE *in vitro* diagnostikameditsiiniseadmete kohta)
 (SK) - CE označenie o zhode (Európska direktíva 98/79/CE pre *in vitro* diagnostické zdravotnícke postupy)
 (CZ) - CE značka (Evropská direktiva 98/79/CE o diagnostických zdravotnických prostředcích *in vitro*)



- (US) - For *in vitro* diagnostic use
 (F) - Pour diagnostic *in vitro*
 (E) - Para diagnóstico *in vitro*
 (I) - Per uso diagnostico *in vitro*
 (D) - *In-vitro*-Diagnostikum
 (P) - Para uso em diagnóstico *in vitro*
 (S) - *In vitro* diagnostik
 (DK) - *In vitro* diagnose
 (GR) - Για *in vitro* διαγνωστική χρήση
 (PL) - Do stosowania *in vitro*
 (LT) - *in vitro* diagnostikai
 (H) - Csak *in vitro* diagnosztikai alkalmazásra
 (EST) - *In vitro* diagnostiliseks kasutamiseks
 (SK) - Na diagnostiku *in vitro*
 (CZ) - Pro diagnostiku *in vitro*



- (US) - Catalogue number
 (F) - Référence catalogue
 (E) - Número de catálogo
 (I) - Numero di catalogo
 (D) - Bestellnummer
 (P) - Número de catálogo
 (S) - Katalognummer
 (DK) - Katalognummer
 (GR) - Αριθμός καταλόγου
 (PL) - Numer katalogu
 (LT) - Katalogo numeris
 (H) - Cikkszám
 (EST) - Katalooginumber
 (SK) - Katalógové číslo
 (CZ) - Katalogové číslo



- (US) - Manufacturer
 (F) - Fabricant
 (E) - Fabricante
 (I) - Produttore
 (D) - Hersteller
 (P) - Fabricante
 (S) - Tillverkad av
 (DK) - Fremstillet af
 (GR) - Κατασκευαστής
 (PL) - Producent
 (LT) - Gamintojas
 (H) - Gyártó
 (EST) - Tootja
 (SK) - Výrobca
 (CZ) - Výrobce



- (US) - Authorised Representative
 (F) - Représentant agréé
 (E) - Representante autorizado
 (I) - Distributore autorizzato
 (D) - Bevollmächtigter
 (P) - Representante Autorizado
 (S) - Auktoriserad representant
 (DK) - Autoriseret repræsentant
 (GR) - Εξουσιοδοτημένος αντιπροσωπος
 (PL) - Upoważniony Przedstawiciel
 (LT) - Įgaliotasis atstovas
 (H) - Meghatalmazott Képviselő
 (EST) - Volitatud esindaja
 (SK) - Autorizovaný zástupca
 (CZ) - Zplnomocněný zástupce



- (US) - Batch code
 (F) - Code du lot
 (E) - Código de lote
 (I) - Codice del lotto
 (D) - Chargen-Bezeichnung
 (P) - Código do lote
 (S) - Batch nr.
 (DK) - Batchkoden
 (GR) - Κωδικός παρτίδας
 (PL) - Numer serii
 (LT) - Serijos numeris
 (H) - Gyártási szám
 (EST) - Partii kood
 (SK) - Číslo šarže
 (CZ) - Číslo šarže



- (US) - Expiry date DD/MM/YYYY
 (F) - Date de peremption JJ/MM/AAAA
 (E) - Estable hasta DD/MM/AAAA
 (I) - Da utilizzare prima del GG/MM/AAAA
 (D) - Verwendbar bis TT/MM/JJJJ
 (P) - Data de expiração DD/MM/AAAA
 (S) - Utgångsdatum Dag/Månad/År
 (DK) - Anvendes før DD/MM/ÅÅÅÅ
 (GR) - Ημερομηνία λήξης DD/MM/YYYY
 (PL) - Data ważności DD/MM/YYYY
 (LT) - Galioja iki DD/MM/YYYY
 (H) - Szavatossági idő NN/HH/ÉÉÉÉ
 (EST) - Aegumistähtaeg PP/KK/AAAA
 (SK) - Použitelné do DD/MM/RRRR
 (CZ) - Datum expirace DD/MM/RRRR



(US) - Storage temperature limitation
(F) - Limites de températures de stockage
(E) - Temperatura límite
(I) - Limiti di temperatura di conservazione
(D) - Lagertemperatur
(P) - Limites de temperatura de armazenamento
(S) - Temperaturbegränsning
(DK) - Temperaturbegrænsning
(GR) - Περιορισμος θερμοκρασίας αποθηκευσης
(PL) - Temperatura przechowywania
(LT) - Saugojimo temperatūriniai apribojimai
(H) - Tárolási hőmérsékleti határok
(EST) - Piirangud säilitustemperatuurile
(SK) - Skladovacia teplota od do
(CZ) - Teplotní rozmezí od do



(US) - Consult Instruction for use
(F) - Consulter le mode d'emploi
(E) - Consulte las instrucciones de uso
(I) - Consultare le istruzioni per uso
(D) - Siehe Gebrauchsanweisung
(P) - Consulte o folheto informativo
(S) - Se instruktionsanvisning vid användning
(DK) - Se instruktion før brug
(GR) - Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης
(PL) - Sprawdź instrukcję
(LT) - Ieškokite informacijos vartojimo instrukcijoje
(H) - Olvassa el a használati utasítást
(EST) - Kasutamisel vaata instruksiooni
(SK) - Katalógové číslo
(CZ) - Viz návod k použití

- (US)** - The other languages which are required in conformity to the European Directive can be obtained from your local Bio-Rad agent.
- (F)** - Les autres langues requises par la Directive Européenne sont disponibles auprès de votre représentant Bio-Rad local.
- (E)** - Los otros idiomas que se requieren para la conformidad de la Directiva Europea puede ser obtenida en su oficina local Bio-Rad.
- (I)** - Le altre lingue che sono richieste in conformità con le Direttive Europee possono essere ottenute dal locale agente Bio-Rad.
- (D)** - Die anderen Sprachen, die in Übereinstimmung mit der europäischen IVD Direktive benötigt werden, erhalten Sie über Ihre lokale Bio-Rad Niederlassung.
- (P)** - As restantes línguas, obrigatórias em conformidade com a Directiva Europeia, podem ser obtidas através da subsidiária Bio-Rad mais próxima de si.
- (S)** - Övriga språk som krävs i enlighet med EG-direktivet kan erhållas från din lokala Bio-Rad-representant.
- (DK)** - De øvrige sprog som kræves i henhold til EU direktiv kan fås ved henvendelse til den lokale Bio-Rad leverandør.
- (GR)** - Τις υπολοίπες γλώσσες που απαιτούνται για συμμορφωση στην ευρωπαϊκή οδηγία μπορείτε να τις προμηθευθείτε από τον τοπικό σας αντιπρόσωπο Bio-Rad.
- (PL)** - Tłumaczenie w innych językach które są wymagane w Dyrektywie Unijnej może być otrzymane od lokalnego przedstawiciela firmy Bio-Rad.
- (LT)** - Vertimus, reikalingus pagal Europos sąjungos direktyvos reikalavimus, į kitas kalbas galite gauti iš vietinio Bio-Rad atstovo.
- (H)** - A leírás az Európai Irányelv által előírt egyéb nyelveken hozzáférhető a Bio-Rad helyi kirendeltségénél.
- (EST)** - Teised vastavalt Euroopa Direktiivile nõutavad keeled on saadaval kohaliku Bio-Radi edasimüüja käest.
- (SK)** - Ostatné jazykové verzie, ktoré sú vyžadované v zhode s Európskou direktívou, možno obdržať od vášho lokálneho zástupcu Bio-Rad.
- (CZ)** - Další jazykové verze vyžadované ve shodě s evropskou direktívou jsou k dispozici u lokálního zastoupení firmy Bio-Rad.



Bio-Rad

*3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France*

Tel. : +33 (0) 1 47 95 60 00

Fax.: +33 (0) 1 47 41 91 33



10/2006
code: 880079