

COMMUNICATION

Performances des méthodes biologiques dans le diagnostic et le suivi de la borréliose de Lyme

MOTS-CLÉS : BORRÉLIOSES. *BORRELIA*. MICROSCOPIE. CULTURE VIRALE. SÉROLOGIE. RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE

Performances of biological tests for diagnostic and follow-up of Lyme borreliosis

KEY-WORDS : BORRELIA INFECTIONS. *BORRELIA*. MICROSCOPY. VIRUS CULTIVATION. SEROLOGY. POLYMERASE CHAIN REACTION

Benoît JAULHAC*

Déclaration Publique d'intérêts : Siemens, Virbac, Bayer.

RÉSUMÉ

La borréliose de Lyme est une spirochétose transmise par piqûre de tique. La manifestation clinique la plus fréquente est l'érythème migrant. Les pathogènes peuvent ensuite disséminer par voie hématogène vers différents tissus et organes, incluant principalement le système nerveux, les articulations, et la peau. Les tests biologiques, principalement basés sur la sérologie, sont essentiels au diagnostic de la maladie, à l'exception de l'érythème migrant dont le diagnostic reste clinique. Les performances tests biologiques sont exposées et discutées.

SUMMARY

Lyme borreliosis is caused by spirochaetes transmitted by ticks. The most common clinical manifestation is erythema migrans. The infecting pathogen can then spread to other tissues and organs, including the nervous system, the joints and the skin. Laboratory evidence of infection, mainly serology, is essential for the diagnosis of Lyme borreliosis, except in the case of typical erythema migrans. Performance of biological tests are presented and discussed.

* CNR des *Borrelia-Borrelia* et EA 7290, Faculté de Médecine et Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Plateau Technique de Microbiologie, 1 rue Koeberlé, 67000 STRASBOURG.
Article reçu le 8 septembre 2016, accepté le 19 septembre 2016

Introduction

La borréliose de Lyme est la zoonose la plus fréquente de l'Hémisphère Nord [1]. Elle est, comme son nom l'indique, due à des spirochètes de la famille des *Borreliaceae* dont la taxonomie a été récemment remaniée. Les agents de la borréliose de Lyme sont transmis à l'Homme par piqûre de tique dite dure, du genre *Ixodes* : *Ixodes ricinus* en Europe, *I. scapularis* et *I. pacificus* en Amérique de Nord, *I. persulcatus* en Europe de l'Est et en Asie [2]. Bien que de l'ADN de *Borrelia* ait été détectée récemment chez des moustiques [3], cela ne constitue pas pour autant de preuve de compétence vectorielle, aucun des arthropodes autre qu'*Ixodes* ou insectes (*Dermacentor*, *Culex*, *Aedes* notamment) portant ces bactéries n'ayant à ce jour été montré compétent pour transmettre ces bactéries à l'Homme.

Le nom de la borréliose de Lyme provient de celui de la ville de Lyme (Connecticut, États-Unis) où, en 1977, les manifestations articulaires de la maladie ont été rapportées pour la première fois [4] alors que les premières aspects dermatologiques et neurologiques de la maladie ont été décrits au début du XX^e siècle en Europe [5], [6]. Les diverses manifestations cliniques de la maladie n'ont été regroupées dans le cadre nosologique de la borréliose de Lyme que dans les années quatre-vingt, après la découverte par Willy Burgdorfer de l'agent étiologique, dont l'espèce type, *Borrelia burgdorferi*, porte le nom.

Suite à un remaniement taxonomique récent [7], [8], deux genres bactériens sont maintenant distingués : les genres *Borrelia* et *Borrelia*. Le genre *Borrelia* comprend dorénavant exclusivement les espèces de *Borrelia* agents de fièvres récurrentes, responsables de syndromes fébriles avec des récurrences survenant après piqûre de tiques ou de poux. Parmi ces espèces, un intérêt récent est porté à l'espèce *Borrelia miyamotoi*, présente en Europe et pouvant donner soit des fièvres élevées potentiellement récurrentes, soit sur terrain profondément immunodéprimé des tableaux de méningo-encéphalites [9]; [10].

Le nouveau genre *Borrelia* comprend maintenant les espèces responsables de la borréliose de Lyme (correspondant à l'ancien complexe d'espèces *B. burgdorferi* sensu lato). *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*, *B. burgdorferi*, *B. bavariensis* sont les principales espèces isolées chez l'Homme [11], [12]: *B. valaisiana*, *B. bissetti*, *B. americana* et *B. andersonii* n'ont été à ce jour détectées chez l'Homme que par PCR [12], [13], [14], [15]. Parmi les *Borrelia* agents de la borréliose de Lyme, une nouvelle espèce, *B. mayonii* isolée en 2016 aux USA chez l'Homme et chez *Ixodes scapularis*, est susceptible de donner une fièvre plus élevée que celle constatée dans la borréliose de Lyme, les quelques patients décrits présentant par ailleurs une sérologie de Lyme positive [16].

Comme les autres spirochètes d'intérêt médical, les bactéries des genres *Borrelia* et *Borrelia* ne sont visualisées ni en microscopie optique standard ni par coloration de Gram mais sont reconnaissables en microscopie optique à fond noir ou à contraste de phase. D'une longueur de 10 à 30 µm et d'un diamètre de 0,2 à 0,5 µm, les *Borrelia* se caractérisent par une ultrastructure particulière avec de 7 à 30 endoflagelles insérés aux extrémités d'un cylindre protoplasmique et dont l'enroulement autour de ce dernier confère à la bactérie à la fois sa mobilité caractéristique (associant des mouvements de rotation, de torsion et de compression) et sa forme spiralée.

Après une piqûre de tique infectée et laissée suffisamment longtemps en place pour transmettre *Borrelia*, la maladie évolue en deux phases, précoce et disséminée. La phase précoce est une infection localisée correspondant à l'apparition d'un érythème migrant (EM)

qui constitue la plus fréquente des manifestations cliniques de la borréliose de Lyme, autour de 70 à 85 % selon les études [17]. Puis, en l'absence de traitement, succède à cet EM dans 10 % à 20 % des cas environ une phase disséminée qui correspond à la propagation du pathogène par voie sanguine vers ses organes cibles profonds (système nerveux central et périphérique, articulations, notamment) et la peau à distance du point de piquûre.

À la différence de ce qui est observée dans les fièvres récurrentes, cette bactériémie dans la borréliose de Lyme est modérée, de courte durée et n'intervient qu'au début de la dissémination. La recherche de la bactérie dans le sang quand le patient est apyrétique ou souffrant de signes chroniques n'a donc pas d'intérêt dans la borréliose de Lyme. Il a été montré que les rares données par microscopie allant dans ce sens correspondaient à des artefacts et non à des *Borrelia* ; aucune souche n'a été isolée à ce jour dans le sang de patient souffrant de troubles chroniques.

Le type et la fréquence des manifestations cliniques de la maladie ne sont pas les mêmes en Europe et aux États-Unis. Ces disparités sont en partie liées à la distribution géographique transatlantique très différente des espèces pathogènes de *Borrelia* et à l'existence d'un organotropisme relatif lié à l'espèce de *Borrelia* en cause. En effet, les manifestations cliniques de la borréliose de Lyme observées aux États-Unis sont presque exclusivement attribuées à *B. burgdorferi* ss. De façon schématique, *B. burgdorferi* ss est plus souvent associé aux manifestations articulaires de la borréliose de Lyme, *B. garinii* et *B. bavariensis* aux manifestations neurologiques et *B. afzelii* aux manifestations cutanées disséminées, lymphocytome et acrodermatite chronique atrophiante (ACA) [17].

En dehors de l'érythème migrant, les autres manifestations cliniques de la maladie ne sont pas spécifiques de la borréliose de Lyme. C'est pourquoi, à l'exception de l'EM typique, la positivité d'un test biologique est requise dans les recommandations diagnostiques de tous les pays européens, pour confirmer le diagnostic de borréliose de Lyme.

Diagnostic biologique de la borréliose de Lyme

Les techniques existantes pour un diagnostic biologique direct

La recherche directe des *Borrelia* est réalisable par culture ou biologie moléculaire sur biopsie (de peau ou synoviale) ou sur liquide (liquide articulaire, LCR).

La culture *in vitro* des *Borrelia* utilise des milieux liquides spécifiques : BSK-II, BSK-H (version modifiée commercialisée du précédent) et MKP, incubés à une température à 32-34 °C. Le temps de génération moyen des *Borrelia* est long (7 à 20 heures), d'où un délai de positivité des cultures en général supérieur à 15 jours, voire plusieurs semaines. La croissance de *Borrelia* ne troublant pas le milieu BSK, les cultures doivent être systématiquement vérifiées une fois par semaine au microscope à fond noir pendant 8 semaines avant de conclure à un résultat négatif [17]. Les *Borrelia* étant des bactéries très fragiles, les prélèvements doivent également être ensemencés immédiatement au lit du patient dans le milieu BSK.

En pratique, ces contraintes techniques aboutissent, dans le cas d'une utilisation sur échantillons humains, à un usage réservé en Europe à quelques laboratoires spécialisés

employant un personnel expérimenté. Si les performances de la culture sont bonnes à partir de prélèvements d'EM, cette méthode manque en revanche très nettement de sensibilité (variant de 10 % à <1 %) lorsqu'elle est appliquée à d'autres échantillons (LCR, ACA, liquide articulaire). En France, le CNR des *Borrelia-Borrelia* est, avec le CNR allemand et un laboratoire de référence slovène, l'un des laboratoires européens ayant isolé le plus de souches humaines à partir de différents types d'échantillons biologiques ; ces souches sont régulièrement échangées entre les différents laboratoires.

La recherche directe de *Borrelia* par amplification génique *in vitro* (PCR principalement) présente l'avantage de s'affranchir de différentes contraintes liées à la culture, et permet d'identifier les différentes espèces de *Borrelia*. Les cibles génomiques utilisées sont variées, de même que les protocoles PCR, aboutissant à des performances disparates, tant en terme de sensibilité que de spécificité ou de spectre de détection [18], d'où l'importance pour les laboratoires utilisant cette méthode à but diagnostique de participer à des contrôles de qualité externes, ainsi que le recommande le Haut Comité de Santé Publique dans son rapport du 28 Mars 2014 [19]. À l'heure actuelle, quelques coffrets PCR commerciaux sont disponibles mais leurs performances sont mal connues ; le CNR français a observé des problèmes sur un coffret PCR testé. La PCR *Borrelia* n'est par ailleurs pas inscrite à la NABM.

En terme de performance, la sensibilité de la PCR est similaire à celle de la culture pour l'EM mais s'avère nettement supérieure à celle de la culture dans les manifestations disséminées et tardives cutanées et articulaires de la maladie [17]. Il est néanmoins important de garder à l'esprit qu'un résultat de PCR négatif ne permet pas d'éliminer le diagnostic. L'utilisation de la PCR *Borrelia* pour confirmer un diagnostic en présence d'une sérologie négative n'est pas recommandée, hormis certaines situations particulières comme les lésions cutanées précoces atypiques et les neuroborrélioses débutantes [20]. À l'instar de la culture, la recherche directe des *Borrelia* par PCR reste donc actuellement l'apanage de laboratoires spécialisés.

Il est à noter que la place de la PCR est différente pour les *Borrelia* agents de fièvres récurrentes (*B. miyamotoi*, *B. crocidurae*, *B. hispanica* et autres espèces) pour lesquelles la PCR est actuellement le seul outil diagnostique disponible avec la microscopie, et est un test sensible quand il est appliqué au sang du patient. Il est possible que cette différence soit à l'origine de certaines confusions dans la place de cet outil. Aucun milieu de culture universel pour ces espèces de *Borrelia* agents de fièvres récurrentes n'est actuellement disponible et la sérologie des fièvres récurrentes ne constitue pas un outil performant.

L'examen microscopique au fond noir ou en contraste de phase, ne possède pas les performances suffisantes pour être un outil utile au diagnostic biologique de la borréliose de Lyme. Sa sensibilité est très faible en raison d'une charge bactérienne réduite dans les tissus ou les liquides de ponction. De plus, quelle que soit la technique microscopique utilisée (observation de l'état frais au microscope à fond noir, ou observation après fixation et coloration argentique ou coloration au Giemsa), la spécificité de l'examen direct est modérée, des artefacts pouvant en effet être responsables d'interprétations faussement positives, y compris par un observateur entraîné. Le récent engouement, en France ou dans d'autres pays, pour la microscopie à fond noir pour la détection de *Borrelia* et/ou de *Babesia* [21] est lié à une absence de validation de la méthode. Ainsi, lors d'une étude à l'aveugle, 85 % des échantillons sanguins de sujets contrôles indemnes étaient détectés positifs versus 66 % de ceux des sujets atteints de borréliose de Lyme. De plus, les échantillons contenant des

éléments structuraux interprétés comme des *Borrelia* n'ont jamais été confirmés comme tels par PCR [22]. Cette mauvaise interprétation de la lecture de ces éléments pourrait avoir été à l'origine d'un signalement à l'Institut de veille sanitaire en 2014 et pour lesquels les évaluateurs ont conclu à l'absence de structures évoquant des *Borrelia* et à la présence de nombreux artefacts (rapport disponible auprès de Santé Publique France). Pour toutes ces raisons, l'examen direct n'est pas recommandé pour le diagnostic de la borréliose de Lyme et doit être limité au diagnostic des *Borrelia* agents fièvres récurrentes, où la charge bactérienne sanguine est nettement plus élevée.

Il apparaît donc clairement que, parmi les techniques directes, seules l'amplification génique *in vitro* et la culture sont, en tenant compte de leurs limites, réellement applicables et validées pour la recherche de ces bactéries.

Les outils du diagnostic biologique indirect

En raison des limitations des méthodes directes, la sérologie est la technologie actuellement majoritairement retenue pour étayer le diagnostic biologique des formes disséminées et tardives de la borréliose de Lyme. La sérologie met en évidence la présence d'anticorps spécifiques de l'hôte dirigés contre des antigènes de *Borrelia* dans le sang et/ou dans le LCR. Les techniques ELISA, en permettant la détection séparée des IgG et des IgM, présentent une meilleure spécificité et une interprétation plus aisée des résultats que les techniques détectant les Ig totales, car l'apparition des IgM précède celle de IgG de plusieurs semaines.

Les tests sérologiques de première intention sont actuellement en France réalisés de façon largement majoritaire par ELISA. Les préparations antigéniques utilisées dans ces tests correspondent soit à des lysats bactériens complets (antigènes natifs), soit à des antigènes purifiés et/ou recombinants (comme les lipoprotéines de surface OspC, DbpA, p41i ou VlsE par exemple) soit à une association de lysats bactériens complets et d'antigènes recombinants. L'utilisation d'antigènes recombinants peut contribuer à améliorer la sensibilité et/ou la spécificité du test. Ces tests ELISA sont basés dans 80 % des cas sur une ou plusieurs des 3 espèces de *Borrelia* majoritaires en France et en Europe [19]. Le manque de spécificité des tests de 1^{ère} intention ne permet qu'un *screening* initial des patients suspects de borréliose de Lyme. Comme pour toute autre sérologie infectieuse, des faux positifs peuvent être dus à des réactions croisées lors d'autres pathologies infectieuses (syphilis, infections à EBV par exemple) ou de pathologies dysimmunitaires (lupus ou polyarthrite rhumatoïde par exemple).

Il est donc nécessaire, devant une sérologie positive ou douteuse en ELISA, de confirmer la spécificité des anticorps par immuno-empreinte (tests « maison » ou coffrets commerciaux) réalisés sur le sérum (et/ou LCR) [23], [24]. Les immuno-empreintes basées sur l'utilisation d'antigènes recombinants de *Borrelia* permettent une lecture plus aisée que les tests basés sur des antigènes natifs [24]. Des critères d'interprétation standardisés (basés sur le nombre et la nature des antigènes contre lesquels réagissent les anticorps du patient) ont été proposés [25], [26] mais leur application est limitée par la diversité et le manque de standardisation des antigènes utilisés. In fine, chaque fabricant commercialise actuellement un mélange qui lui est spécifique, assorti de critères de positivité qui lui sont propres, dont le contenu n'est pas toujours précisé dans les notices du fabricant [19]. Il a été ainsi demandé à l'ANSM de

clarifier les notices des fabricants pour la fin de l'année 2016. Parallèlement, le CNR des *Borrelia-Borrelia* évalue les performances (en termes de sensibilité, spécificité et praticabilité) de ces tests d'immuno-empreinte.

Les performances analytiques des trousse *Borrelia* (ELISA ou immuno-empreinte) sont variables d'un fabricant à l'autre, et le marquage CE des trousse commerciales n'est actuellement pas un critère suffisant pour garantir leur qualité. Au sein de l'ESCMID (European Society for Microbiology and Infectious Diseases), l'ESGBOR (European Study Group on Lyme Borreliosis), qui compte actuellement plus de 70 membres de 28 pays européens et dont le CNR français est membre depuis sa création en 2011, recommande une spécificité minimale de 90 % pour les tests de première intention (soit moins de 10 % de faux positifs) et d'au moins 95 % pour les tests de confirmation par immuno-empreinte [27].

Indications, interprétation et limites des tests sérologiques

En cas de piqûre de tique isolée, aucun test biologique n'est justifié. La surveillance clinique simple de la zone piquée pendant un mois à la recherche du développement ultérieur d'un éventuel EM, associée à la surveillance de la survenue de signes généraux est suffisante.

Au stade d'érythème migrant, la sérologie n'est pas indiquée, car elle est négative dans 50 % des cas européens [17], [23]. En effet, comme toute infection localisée, l'EM, qui représente 70 à 85 % des formes cliniques de borreliose de Lyme, ne déclenche qu'une faible réponse du système immunitaire. La sérologie n'a donc aucun intérêt et risque même, en cas de négativité, de faire rejeter à tort le diagnostic, le patient courant alors le risque d'évoluer ultérieurement vers une atteinte disséminée, neurologique ou articulaire notamment. Lorsque les manifestations cutanées sont atypiques, la réalisation d'une biopsie cutanée, après avis spécialisé, est possible, par une *punch-biopsy* de 3 à 4 mm sur le pourtour de la lésion. Si un résultat positif obtenu par culture ou par PCR permet de lever le doute diagnostique, un résultat négatif ne permet pas d'exclure une borreliose de Lyme, la sensibilité de la culture et de la PCR étant équivalente, de l'ordre de 50 % [17].

Si le diagnostic de la phase cutanée initiale typique de la maladie (EM) ne nécessite aucun examen microbiologique, il n'en va pas de même des manifestations disséminées secondaires ou tardives dont le diagnostic, parfois difficile, repose sur la confrontation de données anamnestiques (contact possible avec le vecteur), cliniques et biologiques.

À la phase disséminée de la maladie, la sérologie est presque toujours positive. Elle est par contre d'interprétation délicate, la question principale étant de rattacher ou non une sérologie positive à une borreliose de Lyme évolutive. La présence d'anticorps anti-*Borrelia* chez des sujets exposés à des piqûres de tique répétées (forestiers, randonneurs...) peut en effet résulter d'une inoculation antérieure de *Borrelia* passée inaperçue, comme en témoigne la séroprévalence élevée d'anticorps anti-*Borrelia* chez les sujets sains dans les régions endémiques pour cette zoonose [28]. En effet, une infection par *Borrelia* génère le plus souvent la production d'anticorps sans développement d'une infection clinique. De plus, les tests sérologiques ne permettent pas actuellement de faire la distinction entre une infection

active et une cicatrice sérologique [29]. Un taux d'anticorps spécifiques anti- *Borrelia* peut ainsi persister plus de 10 ans après un traitement efficace [30].

Lorsque le test ELISA est négatif, l'immuno-empreinte n'a pas d'utilité et ne doit pas être réalisée car un résultat positif est alors d'interprétation clinique délicate. Ainsi, une méta-analyse récente de la littérature sur les tests ELISA et immuno-empreintes, a montré que la sensibilité des tests par immuno-empreinte n'était globalement pas meilleure que celle des tests ELISA [31]. La réalisation isolée d'une immuno-empreinte sans réalisation préalable d'un test ELISA réduit par ailleurs la probabilité pré-test d'une borréliose de Lyme, ce qui entraîne une diminution de la valeur prédictive positive de la sérologie et génère une proportion importante de faux positifs [24] notamment pour les IgM ([32].

Le diagnostic biologique des manifestations neurologiques de la borréliose de Lyme repose sur l'analyse conjointe du sang et du LCR [33]. Celui-ci montre en général une hyperprotéinorachie modérée, associée à une réaction cellulaire de type lymphoplasmocytaire. Cette inflammation, présente dans plus de 93 % des méningoradiculites [33] peut être modérée au début des neuroborrélioses aiguës et dans les paralysies faciales isolées. La sérologie de Lyme est positive dans le sérum à la phase aiguë dans 72 à 93 % des cas ; cette sensibilité s'est améliorée avec les tests commercialisés depuis les années 2000 [31] et le taux de positivité dans le LCR est supérieur à 90 % [33]. La recherche d'une synthèse intrathécale d'anticorps spécifiques est nécessaire pour confirmer le diagnostic de neuroborréliose, car elle permet de séparer une transsudation passive d'anticorps sériques à travers la barrière hémato-encéphalique d'une production intrathécale d'anticorps anti-*Borrelia* qui signe la neuroborréliose [23, 34]. La détermination de l'index de synthèse intrathécale spécifique repose sur la comparaison des taux d'anticorps spécifiques entre LCR et sérum prélevés le même jour, de préférence rapportée à l'index d'immunoglobulines totales ou d'albumine dans ce LCR et ce sérum [34]. En cas de doute diagnostique, la réalisation d'une PCR peut se discuter dans les 2 premières semaines de la maladie (malgré sa sensibilité < 30 %), car un résultat positif permet de rattacher valablement les manifestations neurologiques observées à une borréliose de Lyme.

Dans l'acrodermatite chronique atrophique (ACA), la sensibilité de la sérologie de Lyme est ≥ 98 % [31]. La très forte valeur prédictive négative de la sérologie doit alors faire remettre en cause le diagnostic évoqué en cas de négativité de la sérologie [50]. Les taux d'IgG dépistés par ELISA sont en général très élevés, sans constituer un critère de gravité. De même, la présence ou la persistance d'IgM à ce stade tardif de la maladie (dans 20 % des cas dans l'expérience du CNR) n'est pas un marqueur de gravité ou d'échec possible du traitement. Lorsqu'il subsiste un doute sur l'étiologie des lésions cutanées, l'histologie, la culture ou la PCR constitue une aide au diagnostic. À la différence des manifestations neurologiques de la borréliose de Lyme, la PCR présente ici l'avantage d'une bien meilleure sensibilité (> 60 %) que la culture (10 % à 30 % selon les séries) et devrait être privilégiée dans cette indication [17], [35].

Le diagnostic d'arthrite de Lyme repose sur l'association d'une sérologie sérique positive et d'un faisceau d'arguments cliniques et anamnestiques compatibles. Comme pour l'ACA, la séropositivité est ≥ 95 % avec des taux élevés d'anticorps habituellement [31], et un résultat sérologique négatif doit faire rediscuter le diagnostic. L'analyse du liquide articulaire confirme le caractère inflammatoire de l'épanchement et l'examen bactériologique standard

permet d'éliminer une arthrite septique. La mise en évidence d'anticorps spécifiques dans le liquide articulaire est possible mais n'apporte pas d'information supplémentaire par rapport à la sérologie sanguine. La recherche directe par PCR dans le liquide articulaire et/ou sur biopsie synoviale est possible en cas de doute diagnostique, avec une sensibilité beaucoup plus élevée de la PCR par rapport à la culture [11].

Il est à noter que même après traitement efficace, les anticorps anti-*Borrelia* (IgM compris) peuvent persister pendant des mois, voire des années après la guérison [30]. La sérologie n'est donc d'aucune utilité pour le suivi des patients traités, et la présence d'IgM n'est pas synonyme d'une infection active à *Borrelia* [35].

Conclusion

La maladie ou borréliose de Lyme est une pathologie infectieuse liée à des bactéries du genre *Borrelia*, récemment séparé taxonomiquement des *Borrelia*. Son diagnostic associe des critères épidémiologiques, anamnestiques, cliniques et biologiques compatibles avec une borréliose de Lyme. Le plus souvent, les outils biologiques reposent sur la sérologie, fondée sur le dépistage d'anticorps spécifiques par une technique ELISA, complétée devant un résultat positif ou douteux par une immuno-empreinte qui confirmera ou infirmera la spécificité de ces anticorps anti *Borrelia*. La recherche directe de *Borrelia* ou de *Borrelia* par culture ou par PCR reste l'apanage de laboratoires spécialisés mais représente une aide précieuse pour le diagnostic des formes atypiques de la maladie ou lorsque les données cliniques n'ont pas permis d'établir de façon certaine le diagnostic étiologique.

Il est donc important, devant des signes cliniques persistant depuis plusieurs mois avec une sérologie bien conduite et négative, de rechercher d'autres hypothèses étiologiques qu'une infection à *Borrelia*. En effet, l'association d'une clinique non spécifique avec des éléments biologiques parfois complexes, peut parfois donner lieu à des interprétations disparates voire des diagnostics erronés chez des patients en grande souffrance présentant des symptomatologies complexes inexplicables.

L'enjeu de ces futures années est celui de la recherche, de la recherche collaborative entre cliniciens, biologistes et chercheurs, et tel est notre devoir de médecins respectueux de la souffrance d'autrui. C'est de la confrontation de points de vue différents que naît la créativité et les avancées médicales, pour le plus grand bénéfice des patients au service desquels nous sommes tous et qui méritent toute notre attention.

RÉFÉRENCES

- [1] Medlock JM, Hansford KM, Bormane A, Derdakova M, Estrada-Peña A, George JC, et al. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit Vectors*. 2013;6:1.
- [2] Piesman J, Eisen L. Prevention of tick-borne diseases. *Annu Rev Entomol*. 2008;53:323-43.

- [3] Melaun C, Zotzmann S, Santaella VG, Werblow A, Zumkowski-Xylander H, Kraiczy, P, Klimpel S. Occurrence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in different genera of mosquitoes (Culicidae) in Central Europe. Ticks Tick Borne Dis. 2016;7(2):256-63.
- [4] Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, et al. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. Arthritis Rheum. 1977;20(1):7-17.
- [5] Lipschütz, B. Uber eine seltene Erythemform (Erythema Chronicum Migrans). Arch Dermatol Syph. 1913;118:349-356.
- [6] Garin, C., and C. Bujadoux. Paralyse par les tiques. J Med Lyon. 1922;77:765-767.
- [7] Oren A, Garrity GM. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015;65:1105–1111.
- [8] Adeolu M, Gupta RS. A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borreliella* gen. nov. containing the members of the Lyme disease *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi* sensu lato complex). Antonie Van Leeuwenhoek 2014;105(6):1049–72.
- [9] Platonov AE, Karan LS, Kolyasnikova NM, Makhneva NA, Toporkova MG, et al. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. Emerg Infect Dis. 2011;17(10):1816-23.
- [10] Hovius JW, de Wever B, Sohne M, Brouwer MC, Coumou J, Wagemakers A, et al. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. Lancet. 2013;382(9892):658.
- [11] Stanek G, Reiter M. The expanding Lyme *Borrelia* complex—clinical significance of genomic species ? Clin Microbiol Infect. 2011;17(4):487-93.
- [12] Girard YA, Fedorova N, Lane RS. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* and detection of *B. bissettii*-Like DNA in serum of North-coastal california residents. J Clin Microbiol. 2011;49(3):945-54.
- [13] Diza E, Papa A, Vezyri E, Tsounis S, Milonas I, Antoniadis A. *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. Emerg Infect Dis. 2004;10(9):1692-3.
- [14] Rudenko N, Golovchenko M, Mokráček A, Piskunová N, Ruzek D, Mallatová N, et al. Detection of *Borrelia bissettii* in cardiac valve tissue of a patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech Republic. J Clin Microbiol. 2008;46(10):3540-3.
- [15] Clark KL, Leydet BF, Threlkeld C. Geographical and genospecies distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA detected in humans in the USA. J Med Microbiol. 2014;63(Pt 5):674-84.
- [16] Pritt BS, Mead PS, Johnson DK, Neitzel DF, Respicio-Kingry LB, Davis JP, et al. Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with

unusually high spirochaetemia: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2016 pii: S1473-3099(15)00464-8.

- [17] Strle F, Stanek G. Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. *In: Lipsker D, Jaulhac B. Curr Probl Dermatol.* Basel:Karger; 2009.p. 51-110.
- [18] Faller M, Hiergeist A, Reischl U, Margos G, Hizo-Teufel C, Koloczek J et al. EU-wide external quality assesment study on the sensitivity and specificity of different amplication protocol for détection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. 14th International Conference on Lyme Borreliosis and other tick-borne disease. Vienna, 27-30 Spetember 2015.
- [19] Avis du HCSP relatif à la borréliose de Lyme – du 28 Mars 2014.
- [20] Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18(3):484-509.
- [21] Laane MM, Mysterud I. A simple method for the detection of live *Borrelia* spirochaetes in human blood using classical microscopy techniques. *Biol and Biomed Reports.* 2013;3(1):15–28.
- [22] Aase A, Ondrej H, Øjvind Ø, et al. Validate or falsify: lessons learned from a microscopy method claimed to be useful for detecting *Borrelia* and *Babesia* organisms in human blood. *Infect Dis.* 2016; 48(6):411-9.
- [23] Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, Kristoferitsch W, O'Connell S, Ornstein K, Strle F, Gray J. Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(1):69-79.
- [24] Hunfeld KP, Kraiczy P. When is the best time to order a Western blot and how should it be interpreted? *In: Lipsker D, Jaulhac B, editors. Curr Probl Dermatol.* Basel:Karger;2009.p.167-77.
- [25] Robertson J, Guy E, Andrews N, et al. A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol.* 2000;38(6):2097-102.
- [26] Hauser U, Lehnert G, Lobentanz R, et al. Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J Clin Microbiol.* 1997;35(6):1433-44.
- [27] European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB). Serology: diagnostic guidelines.
- [28] Rigaud E, Jaulhac B, Garcia-Bonnet N, Hunfeld KP, Féménia F, Huet D, et al. Seroprevalence of seven pathogens transmitted by the Ixodes ricinus tick in forestry workers in France. *Clin Microbiol Infect.* 2016 pii: S1198-743X(16)30141-0.
- [29] Halperin JJ, Baker P, Wormser GP. Common misconceptions about Lyme disease. *Am J Med.* 2013;126(3):264 e1-7.

- [30] Kalish RA, McHugh G, Granquist J, Shea B, Ruthazer R, Steere AC. Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. *Clin Infect Dis*. 2001;33(6):780-5.
- [31] Leeflang MM, Ang CW, Berkhout J, Bijlmer HA, Van Bortel W, Brandenburg AH, et al. The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2016;16:140.
- [32] Seriburi V, Ndukwe N, Chang Z, et al. High frequency of false positive IgM immunoblots for *Borrelia burgdorferi* in clinical practice. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(12):1236-40.
- [33] Ogrinc K, Lusa L, Lotrič-Furlan S, Bogovič P, Stupica D, Cerar T, Ružić-Sabljić E, Strle F. Course and Outcome of Early European Lyme Neuroborreliosis (Bannwarth Syndrome): Clinical and Laboratory Findings. *Clin Infect Dis*. 2016;63(3):346-53.
- [34] Blanc F, Jaulhac B, Fleury M, de Seze J, de Martino SJ, Remy V, Blaison G, Hansmann Y, Christmann D, Tranchant C. Relevance of the antibody index to diagnose Lyme neuroborreliosis among seropositive patients. *Neurology*. 2007;69(10):953-8.
- [35] Lenormand C, Jaulhac B, Debarbieux S, Dupin N, Granel-Brocard F, Adamski H, Barthel C, Cribier B, Lipsker D. Expanding the clinicopathological spectrum of late cutaneous Lyme borreliosis (acrodermatitis chronica atrophicans [ACA]): A prospective study of 20 culture- and/or polymerase chain reaction (PCR)-documented cases. *J Am Acad Dermatol*. 2016;74(4):685-92.