

CAHIER DE

Formation

Biologie médicale

N°34

2005

Borréliose de Lyme



BIOFORMA

FORMATION CONTINUE DES BIOLOGISTES



Chère Consœur, Cher Confrère,

De plus en plus d'activités humaines se déroulent hors des villes et/ou en compagnie d'animaux qui peuvent être porteurs de différents parasites dont ceux qui sont responsables de la maladie de Lyme.

Les pathologies associées à ces infestations, nous le savons aujourd'hui, peuvent rester latentes pendant plusieurs années.

Grâce à la Biologie et aux techniques modernes, la collaboration Biologiste/Clinicien permet d'élucider l'origine de ces pathologies pour conduire à un traitement approprié, souvent efficace.

Ce Cahier de mise à niveau des connaissances en la matière, comme les précédents ouvrages diffusés, se veut être un outil d'usage quotidien au laboratoire pour vous et vos collaborateurs.

BIOFORMA, par cet ouvrage, poursuit sa mission de vous donner les moyens de votre formation continue conventionnelle, devenue obligatoire. Tout comme les 10.500 journées de stages en 2005 ou les 4 formations interactives via internet.

Plus de renseignements sur www.bioforma.net

Nous vous souhaitons bonne réception de ce cahier n°34 et vous prions d'accepter, Chère Consœur et Cher Confrère, nos cordiales et confraternelles salutations.

230, boulevard Raspail
75014 Paris

Tél. 01.56.54.39.39

Fax : 01.56.54.39.30

site internet : www.bioforma.net
E-mail : bioforma@wanadoo.fr

Association régie par la loi de 1901
siret : 391 155 744 00025
code APE : 8040

Adrien BEDOSSA
Président

Borréliose de Lyme

Docteur Marc Victor ASSOUS
Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier
Médecin Biologiste

SOMMAIRE

Introduction / Historique	7
--	---

Aspects épidémiologiques	9
---------------------------------------	---

Vecteurs	10
-----------------------	----

Cycle	13
--------------------	----

Réservoirs / Hôtes	13
---------------------------------	----

Épidémiologie humaine	15
------------------------------------	----

Aspects cliniques et physiopathologiques	16
---	----

En Europe	16
------------------------	----

Aux États-Unis d'Amérique	23
--	----

Spectre clinique en France	23
---	----

L'agent causal : <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	27
--	----

Caractères morphologiques et cultureux	27
---	----

Structure et Ultra structure	28
---	----

Organisation du génome	29
-------------------------------------	----

Les gènes connus et leurs produits	29
---	----

ARN ribosomiaux :	29
Flagelline.....	30
Protéines de membrane externe.....	30
Le gène de la protéine P39	31
Les protéines de choc thermique (Heat shock Protein ou HSP)	31
La protéine DbpA	32
La protéine BBK32	32
VisE et (IR)6- peptide C6	32
Caractères antigéniques	33
Polymorphisme - Diversité- Taxonomie	35

Diagnostic Biologique

Diagnostic biologique direct	40
Examen direct et culture	41
Méthodes moléculaires.....	42
Diagnostic biologique indirect	43
Les Méthodes.....	44
Méthodes quantitatives	44
Méthodes qualitatives	47
Les Résultats	48
Spécificité.....	48
Sensibilité.....	50
Cinétique des anticorps - isotypes.....	52
Réactions croisées.....	53
A propos de la notion d'exposition	54
Apport de l'avidité.....	56
Evaluations	58
Diagnostic biologique conclusions	59

SOMMAIRE

Aspects thérapeutiques	62
-------------------------------------	----

Bibliographie	64
----------------------------	----

Annexes	75
----------------------	----

Abréviations	100
---------------------------	-----

Introduction & Historique

L'histoire de la borréliose de Lyme nous conduit de l'ancien au nouveau continent ; elle commence en Europe à la fin du XIX^e siècle pour se poursuivre aux USA.

C'est en Allemagne qu'est décrite en 1883 l'Acrodermatite Chronique Atrophiante (ACA) ou maladie de Pick-Herxheimer (Buchwald 1883) puis au début du XX^e, en 1910 en Suède, l'*erythema chronicum migrans* (Afzelius, 1910), enfin en 1911 le lymphocytome cutané bénin (Burckhardt, 1911). Même si les deux dernières affections cutanées étaient associées à des piqûres de tiques, ces syndromes sont alors considérés comme trois maladies différentes.

Dans la première moitié du XX^e siècle, quelques auteurs rapportent, indépendamment les uns des autres, des éléments cliniques qui, plus tard, s'intégreront dans le spectre clinique de la borréliose de Lyme. Ainsi, Garin et Bujadoux décrivent en 1922 le premier cas d'atteinte neurologique, la transmission par une tique y est clairement évoquée. Le patient présente une lésion cutanée érythémateuse associée à des radiculalgies intenses et une méningite lymphocytaire (Garin et Bujadoux 1922). Dans les années quarante, cette entité prendra le nom de syndrome de Bannwarth ou méningoradiculite lymphocytaire (Bannwarth 1941, Bannwarth 1944). L'efficacité de la pénicilline est rapportée dans les années cinquante (Hollström 1951) suggérant ainsi l'étiologie bactérienne de l'affection. Quelques années plus tard, la transmission expérimentale d'homme à homme est décrite pour l'*Erythema chronicum migrans* (Binder et coll. 1955), pour la maladie de Pick Herxheimer (Götz 1954) et pour lymphocytome cutané bénin (Paschoud, 1958).

Après un silence de vingt ans environ, nous traversons l'Atlantique en direction des USA où, en 1977 A.C. Steere attire l'attention médicale internationale par la description d'une "épidémie" d'arthrites atteignant surtout des enfants, sévissant dans le Comté de Lyme au Connecticut (Steere et coll. 1977b). Dans sa description princeps (Steere et coll. 1977a), il relie les descriptions européennes "historiques" à "l'arthrite de Lyme", notamment en raison de la transmission par une tique et de la lésion d'inoculation qu'est l'*Erythema chronicum migrans*, mais s'étonne de l'absence d'arthrites dans le Vieux Continent. Par contre, malgré la notion bibliographique d'une sensibilité au traitement antibiotique, Steere reste sceptique quant à l'intérêt des antibiotiques à cette époque !

En 1982, la preuve de l'étiologie bactérienne de la borréliose de Lyme est apportée (Burgdorfer et coll. 1982). Un spirochète est mis en évidence dans l'intestin moyen d'une tique *Ixodes dammini* par W. Burgdorfer et cultivé dans le milieu de Kelly modifié par A. Barbour (Stoenner et coll. 1982). Les antigènes de cette bactérie sont reconnus par les anticorps

contenus dans le sérum de patients atteints d'arthrite de Lyme et de lapins infestés par la tique vectrice. Enfin, c'est en 1983 qu'est décrite dans le *New England Journal of Medicine* (Steere et coll. 1983) cette "nouvelle" maladie infectieuse, qui fut baptisée : **maladie de Lyme**. Le spirochète responsable est aussi retrouvé dans les produits pathologiques des patients (sang, LCR, peau), mais dans un faible pourcentage de cas (Benach et coll. 1983). En 1984, R. C. Johnson (Johnson et coll. 1984a) publie les résultats de ses travaux sur la position taxonomique de ce nouvel agent infectieux qui est une *Borrelia*, dont le nom d'espèce sera *Borrelia burgdorferi* en l'honneur de son découvreur Willy Burgdorfer.

La découverte de l'agent causal va déclencher une nouvelle étape dans l'histoire de la borréliose de Lyme. En effet, la diffusion de la souche originale (dénommée à cette époque *Ixodes dammini* spirochète ou B31) à de nombreuses équipes, notamment européennes, permit de rechercher les anticorps spécifiques dans les liquides biologiques des patients.

Le premier symposium international sur la maladie de Lyme (Lyme disease, 1984) s'est déroulé en 1984 aux États-Unis et le spectre complet de l'affection y fut défini en détails. Des séries de cas européens bien documentés furent également rapportées, essentiellement par les équipes allemandes et scandinaves, décrivant les complications neurologiques et dermatologiques. L'année suivante à Vienne (1985), des cas cliniques provenant des autres pays d'Europe à climat tempéré furent publiés : France, Belgique, Suisse, Europe centrale, etc.

L'analyse de toutes ces données permettait de tirer deux conclusions initiales. La première semblait concerner la prévalence des formes cliniques observées entre les deux continents. La maladie de Pick-Herxheimer était absente des USA et présente en Europe. De plus, les formes neurologiques apparaissaient comme les complications plus fréquemment observées en Europe alors qu'il s'agissait des arthrites aux États-Unis. La deuxième conclusion concernait la différence de mode de présentation épidémiologique entre l'Ancien et le Nouveau Continent. En effet aux USA, les cartes de répartition montraient une grande hétérogénéité entre les États, avec un très grand nombre de cas dans certains États et l'absence de cas pour d'autres. En Europe, il ne semblait pas exister de grandes différences, l'affection étant présente dans tous les pays à climat tempéré. Beaucoup de biais pouvaient expliquer ces différences. D'abord la documentation des cas s'opérait par l'intermédiaire de questionnaires alors que l'affection était encore mal connue des praticiens. Ensuite, c'est la sérologie qui servait à la confirmation du diagnostic alors qu'elle était d'introduction récente dans la plupart des laboratoires. Enfin, face à de nouvelles entités pathologiques, l'approche médicale est différente dans chaque pays, tant au niveau de la démarche des patients que de celle des médecins.

Ainsi, l'originalité de cette affection résidait-elle au niveau clinique et épidémiologique dans le **polymorphisme** qu'elle était capable d'exprimer. Tout ceci allait-il se confirmer dans les autres domaines d'étude de cette "nouvelle" maladie et surtout de la bactérie responsable ?

Aspects épidémiologiques

La borréliose de Lyme apparaît comme l'affection vectorielle la plus fréquente aux USA et probablement en Europe. La circulation de *Borrelia burgdorferi* sensu lato s'inscrit dans un schéma épidémiologique complexe constitué de plusieurs systèmes élémentaires illustré par la **figure 1**.

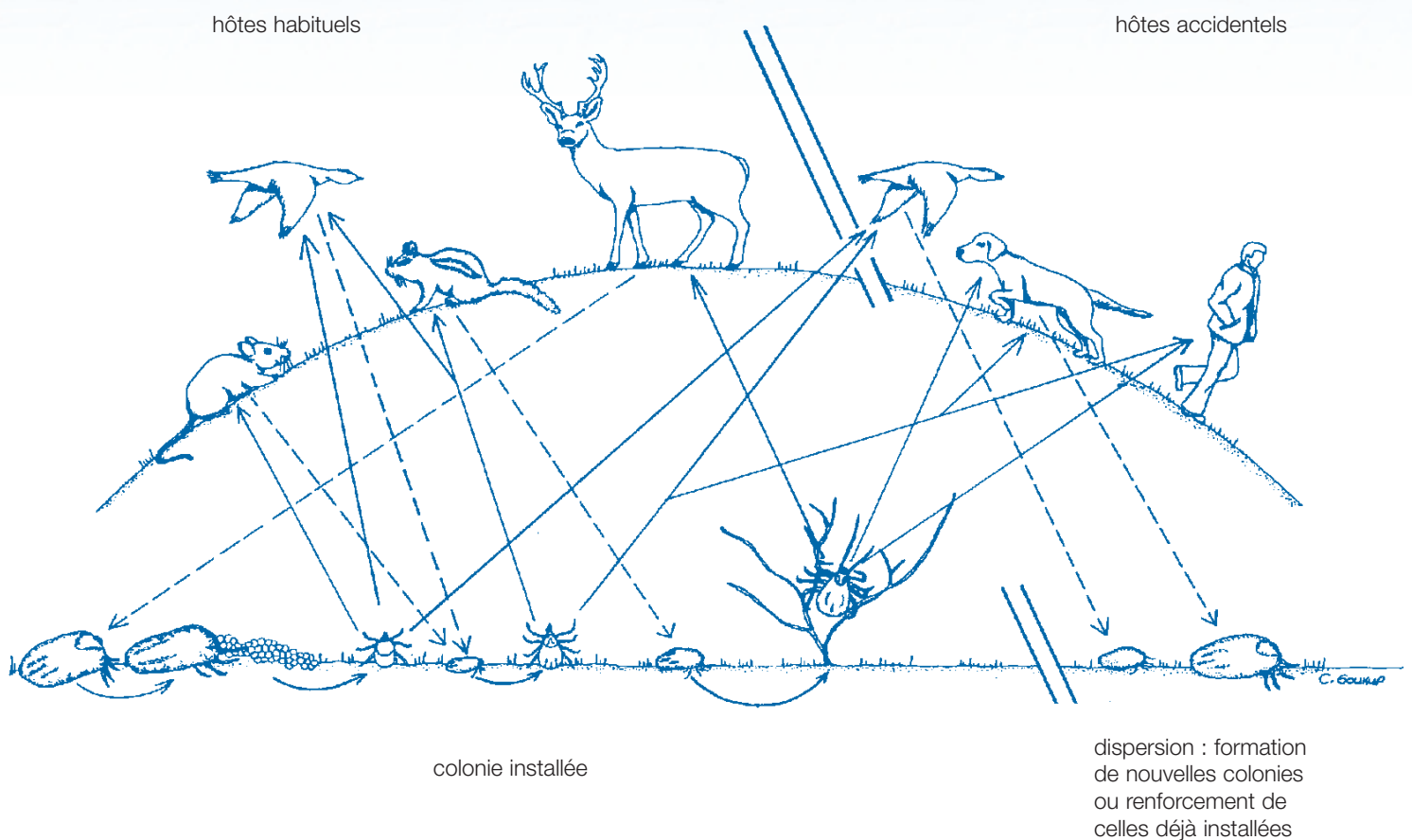


Figure 1 : Circulation de *Borrelia burgdorferi* sensu lato
Adapté d'après Anderson et Magnarelli 1984.

Vecteurs

Bien qu'il existe des publications rapportant la capacité d'autres arthropodes à jouer ce rôle (Magnarelli et Anderson 1988), seule la famille des *Ixodidae* est réellement impliquée comme vecteur de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Suivant le lieu géographique, une espèce différente est concernée. Il s'agit : d'*Ixodes dammini* et *scapularis* (qui sont désormais considérés comme une espèce unique) pour la côte Est des États-Unis, d'*I. pacificus* pour la côte Ouest, d'*I. ricinus* en Europe occidentale, d'*I. persulcatus* pour l'Europe centrale et l'Asie et d'*I. ovatus* au Japon (voir [figure 2](#)). Le risque de contamination dépend directement de la densité en tiques et de leur pourcentage d'infestation. Ce pourcentage peut varier dans des proportions importantes allant de 4 à 40% chez les adultes et 5 à 35% chez les nymphes (Anderson et coll. 1983, Doby et coll. 1991, Magnarelli et Anderson 1988, Pelz et coll. 1989, Wittenbrink et coll. 1994). Des études récentes ont été menées en France dans le cadre des missions du Centre National de Référence des *Borrelia* créée en 2002. Un suivi de la densité en tiques et de leur taux d'infestation a été réalisé en Alsace, dans la Meuse et le Puy-de-Dôme. Les résultats varient selon la localisation géographique. La densité en tiques peut atteindre 500/m² pour les nymphes et 60/m² pour les adultes en Alsace avec des taux d'infestation de 36%! Les valeurs sont plus modestes dans la Meuse et le Puy-de-Dôme. Il existe cependant des variations majeures dans une même saison avec un pic en mai juin, mais aussi d'une saison à l'autre et même d'une parcelle à l'autre. Ainsi s'il est vrai qu'il existe des zones de plus ou moins grande endémie, il peut exister des variations très importantes dans une zone donnée.

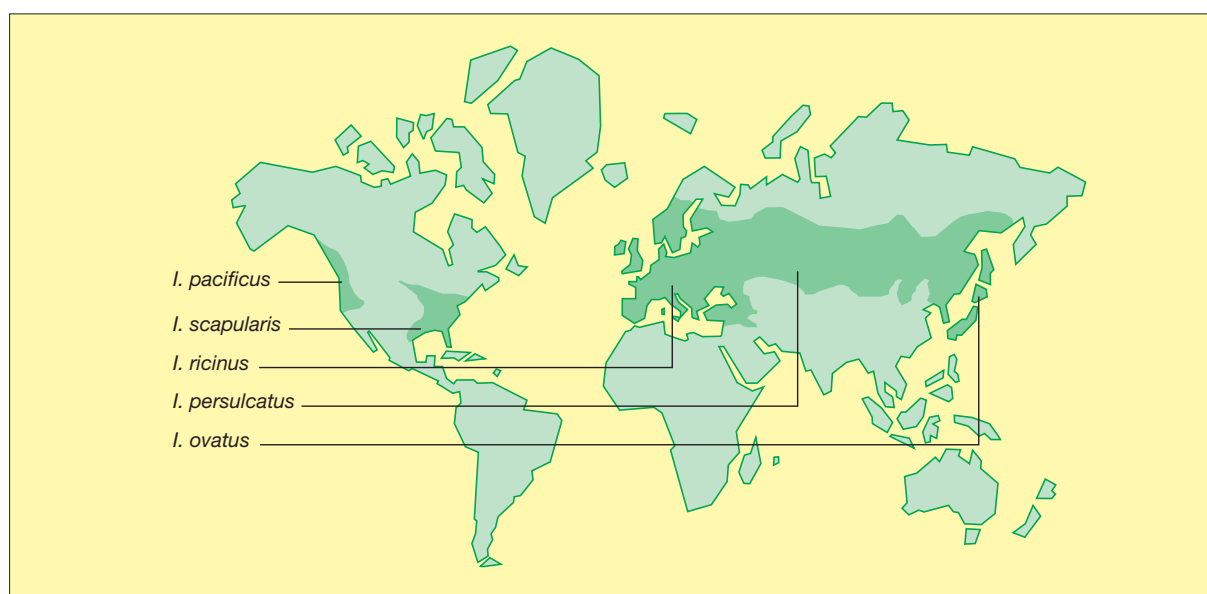


Figure 2 : Répartition géographique des différentes espèces d'*Ixodidae* porteuses de *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Des photos au stéréomicroscope d'*Ixodes ricinus* sont présentées à la [figure 3](#).



Figure 3 : Tiques à différents stades au stéréomicroscope

A : femelle adulte, B : male adulte, C : Femelle gorgée (espacement de traits 1mm),

D : de gauche à droite nymphe , male et femelle adulte (espacement de traits 1mm).

(photos Amos Wilamowski, Laboratoire d'Entomologie Ministère de la Santé, Jerusalem ; Israel)

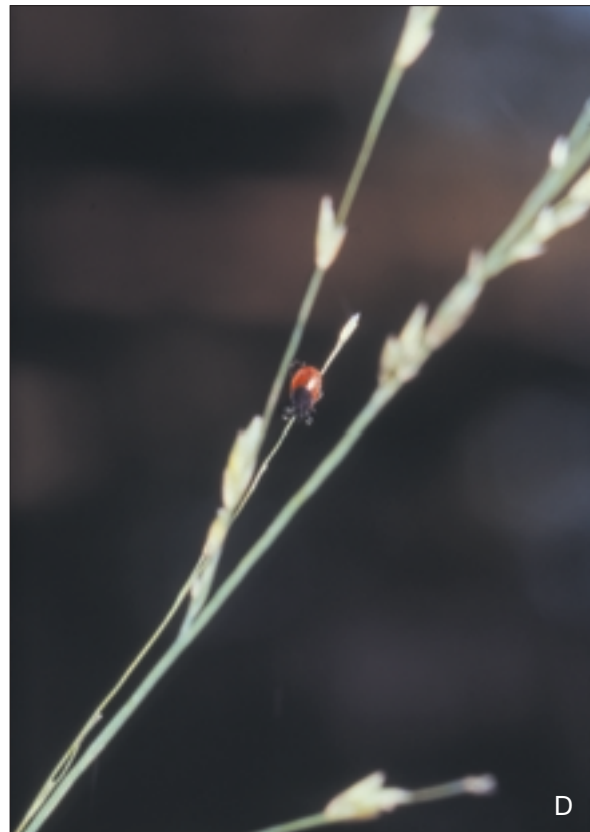
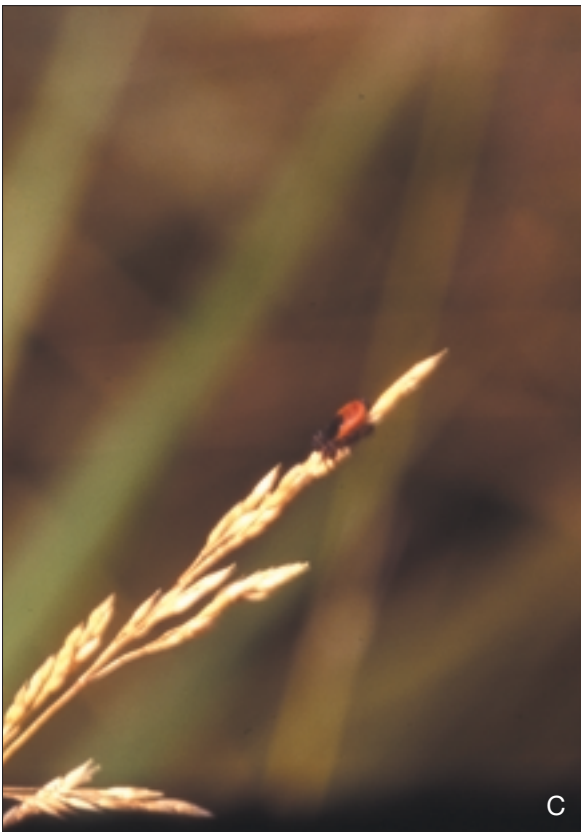


Figure 4 : Tiques en forêt à l'affût
A : adulte male. B, C, D : adultes femelles.
(Photos Dr Marc V. Assous)

Cycle (figure 5)

Quelle que soit l'espèce d'*Ixodes* concernée, le cycle répond toujours à la même succession d'évènements. Il comprend trois stades : larve, nymphe et tique adulte. Quatre à six semaines après la ponte, des œufs apparaissent qui donnent naissance à des larves hexapodes qui se fixent sur des insectivores ou des petits rongeurs pour effectuer leur repas sanguin nécessaire à la mue. En quatre à six semaines, elles se transforment en nymphes octopodes. Le second hôte vertébré (oiseau, mammifères de taille moyenne) va permettre la dernière mue conduisant en dix à vingt semaines à l'adulte sexué. Finalement, les cervidés, les suidés et les bovidés sont les hôtes de choix pour les adultes femelles, en ce qui concerne ce repas sanguin nécessaire pour la ponte. La durée moyenne du cycle de développement dépend de l'espèce, mais aussi des conditions climatiques et de l'abondance des hôtes potentiels ; il peut durer de un à sept ans. Aux trois stades, l'homme est un hôte accidentel.

Réservoirs / Hôtes (figure 5)

De nombreux petits mammifères, rongeurs essentiellement, constituent classiquement le réservoir. Pour jouer ce rôle, ils ne doivent pas être affectés par le portage de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Le rôle des oiseaux se situe plutôt dans la propagation que dans celui de réservoir (Anderson et coll. 1986b, Olsen et coll. 1994, Olsen et coll. 1993).

Les grands mammifères, cervidés, bovins, ovins, suidés, canidés, sont les hôtes habituels des formes adultes d'*Ixodes*. Le pouvoir pathogène de *Borrelia burgdorferi* pour ces animaux est variable. Tous les intermédiaires existent probablement entre le portage sain et les manifestations pathologiques vraies. Les gros mammifères sauvages (cervidés, sangliers) étant beaucoup moins sensibles à l'infection que les mammifères domestiques (bovins, ovins, chiens) (Euzéby 1989). La plupart des études concluent à une prévalence élevée des anticorps anti-*B. burgdorferi* sensu lato chez les différents hôtes sauvages ou domestiques. Ainsi le gros gibier est un maillon essentiel car indispensable au stade adulte et assure donc la pérennité du cycle et une densité importante en tiques.

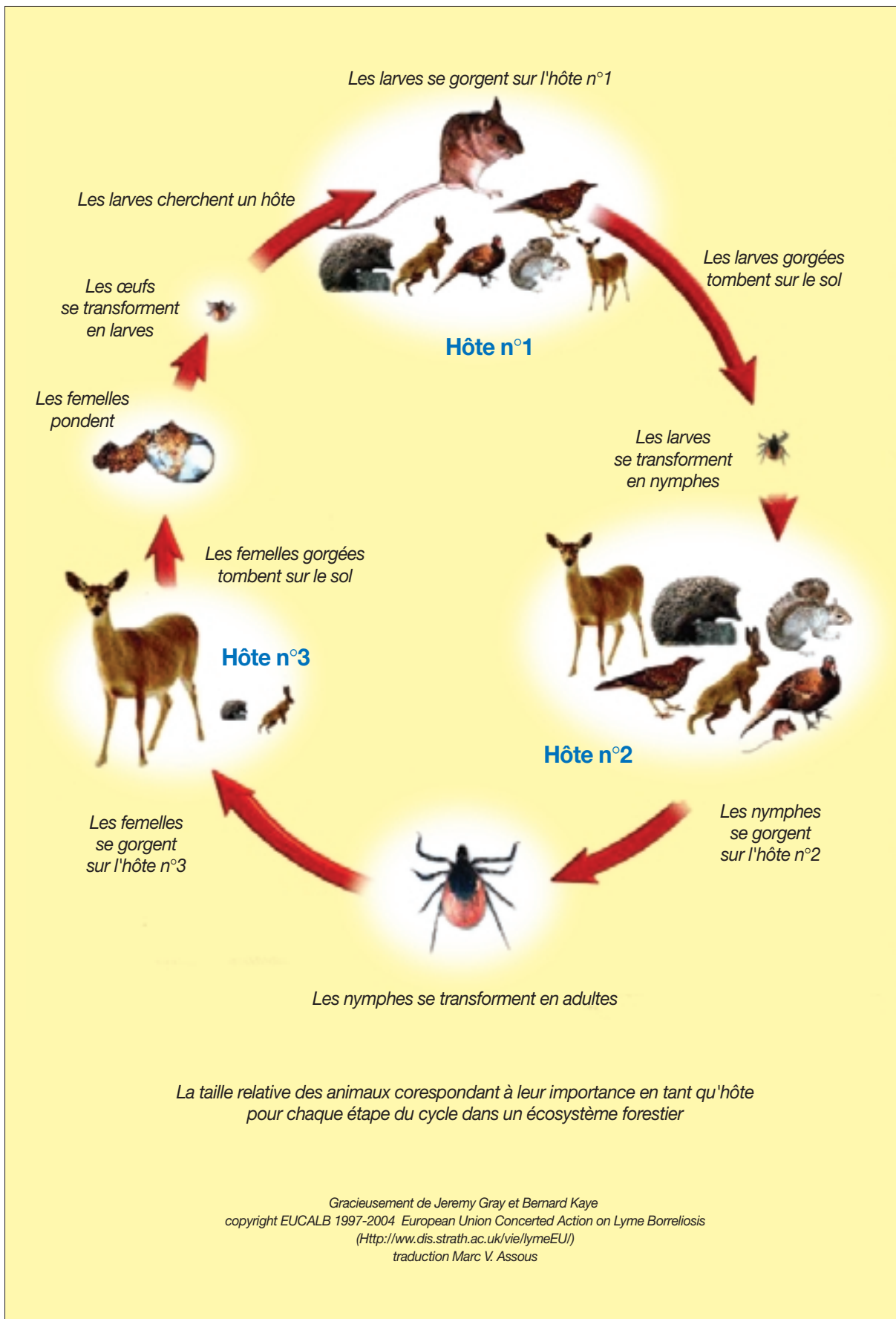


Figure 5 : Hôtes impliqués dans le cycle d'*Ixodes ricinus*

Épidémiologie humaine

La répartition mondiale concerne quasiment tous les pays à climat tempéré du globe, elle se superpose à celle des vecteurs du genre *Ixodes* (voir figure 2). Aux USA, les cartes de répartition publiées par le CDC, montrent une grande hétérogénéité entre les États, la plupart des cas étant localisée dans les États de l'Est, de la côte Ouest et du Mid West ; pour le reste du pays le nombre de cas est beaucoup plus faible. Des cas ont été aussi rapportés en Asie, notamment au Japon (Kawabata et coll. 1987) et en Chine (Ai et coll. 1994). Le cas de l'Australie (Wills 1991) est intéressant d'un point de vue géographique, en tant que continent isolé. Quelques cas ont été suspectés cliniquement, mais le rôle d'*I. holocyclus* en tant que vecteur de l'affection n'a pas été démontré et aucune souche de *Borrelia* n'a été isolée.

Peu de travaux visant à chiffrer l'endémie ou l'incidence sont disponibles, ils sous-entendent des études prospectives contrôlées, lourdes à mettre en oeuvre. Dans la plupart des pays, il existe cependant une centralisation des données qui permet d'avoir, grâce au nombre de cas rapportés, une idée de l'importance de cette affection. Aux États-Unis, le nombre de cas annuels par État est répertorié par le CDC qui définit des critères d'inclusion des cas. Entre 1990 et 1999, le taux d'incidence augmentait régulièrement de 3 à 6 pour 100 000 habitants. En 2002 le nombre de cas atteignait 23 000 ; soit une augmentation de 30%.

En Europe, la situation est très variable suivant les pays. Il n'est pas toujours possible de connaître le nombre de cas annuels dans un certain nombre de pays. Une synthèse (fondée sur des sondages) a été publiée (Stanek et coll. 1989). Elle mettait essentiellement l'accent sur la répartition des formes cliniques entre certains pays d'Europe. Des initiatives dans le cadre d'une "action concertée de la C.E.E" ont été publiées et permettent de mieux appréhender la situation. La France se situerait plutôt dans les pays de faible incidence avec 16 cas pour 100 000 habitants. La Grande Bretagne et l'Irlande auraient moins de 1 cas pour 100 000 et les pays d'Europe centrale et la Suède dépasseraient 50 cas pour 100 000.

Aspects cliniques et physiopathologiques

Le polymorphisme clinique que présente la borréliose de Lyme est une caractéristique marquante de cette affection. Il est cependant apparu comme une source de confusion et un facteur critique dans la définition exacte du spectre clinique. L'absence d'un diagnostic biologique de certitude (gold standard) disponible en routine (cf infra) intervient ici comme un élément aggravant supplémentaire au flou qui entoure certaines formes cliniques généralement rares.

Actuellement, il est admis de distinguer les descriptions cliniques de la forme européenne et américaine de l'affection (Wormser 1998, Stanek 2003).

En Europe

Cette affection se présente comme une entité nosologique constituée de plusieurs formes cliniques dont certaines sont de véritables maladies ([voir figure 6](#)).

■ La lésion d'inoculation pathognomonique est appelée Erythema (Chronicum) Migrans (EM ou ECM) (Afzelius 1910, Lipschütz 1913), elle suit de quelques jours la morsure infestante, qui peut passer inaperçue, et ce d'autant plus que la tique pique parfois dans un lieu caché du tégument. Contrairement aux piqûres des insectes, les morsures de tique sont indolores. L'EM est une tache érythémateuse de quelques cm de diamètre qui s'étend régulièrement ; il peut persister plus de 3 semaines et disparaît spontanément même sans traitement antibiotique. Il est considéré comme la phase primaire et peut s'accompagner de quelques signes généraux : fébricule, douleurs diffuses et malaise général ([voir figure 7](#) photo d'EM de la face interne de la cuisse).

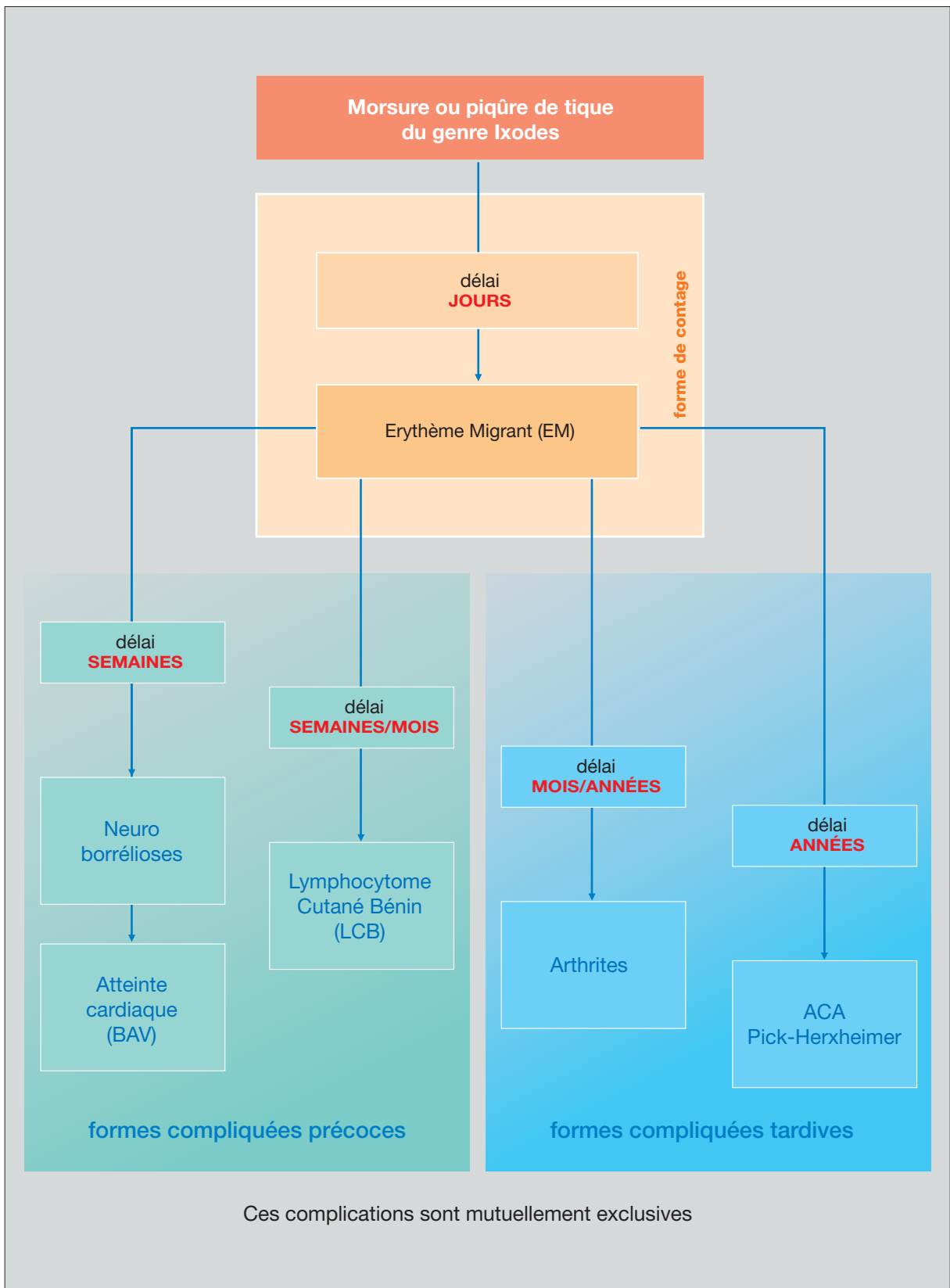


Figure 6 : La borréliose de Lyme en Europe : Une entité nosologique constituée de plusieurs maladies

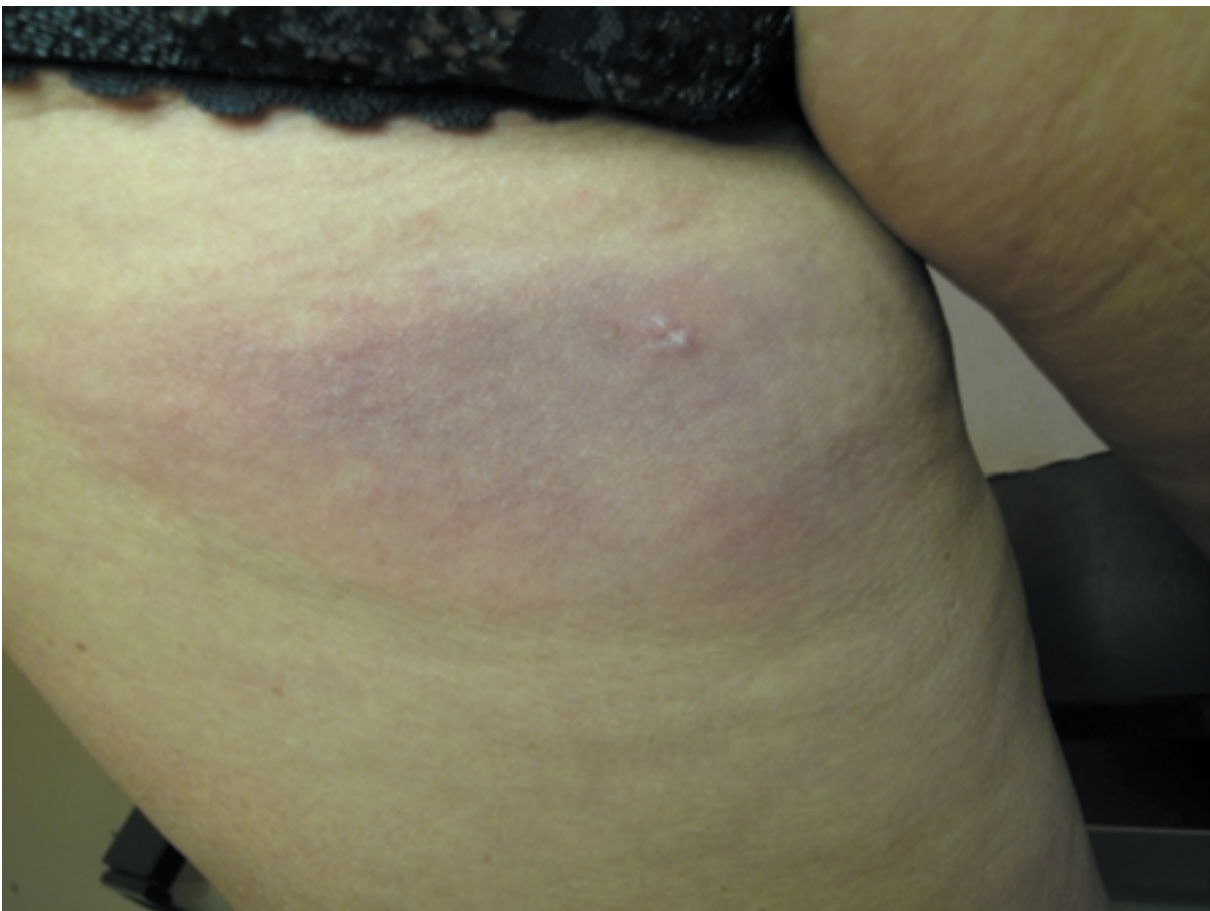
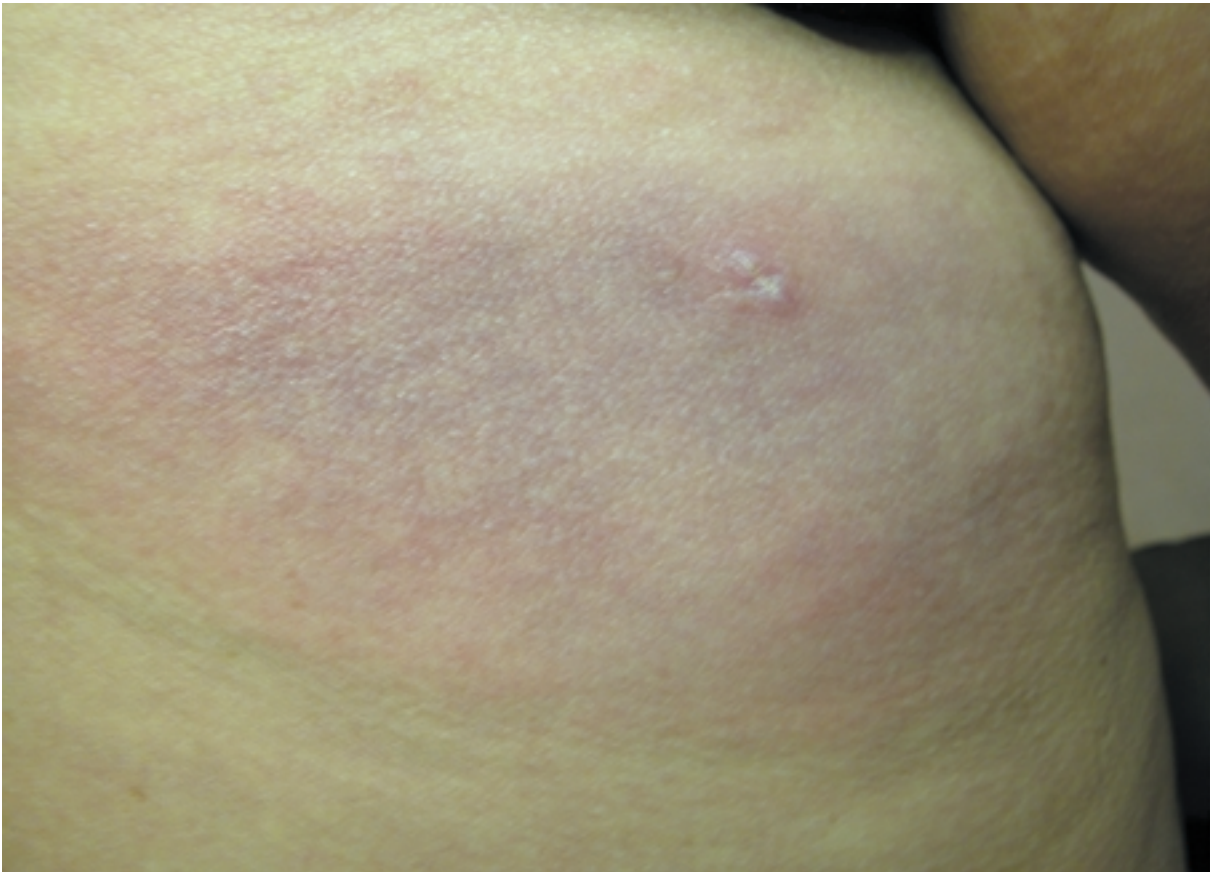


Figure 7 : Photo d'un Erythema Migrans face interne de la cuisse (Photos Pr Nicolas Dupin)

■ Cet érythème migrant est parfois suivi à quelques semaines par une phase dite secondaire correspondant à d'autres localisations de la bactérie, le plus souvent neurologique. Il s'agit d'abord d'une atteinte radiculaire pure (radiculite hyperalgique parfois à recrudescence nocturne) qui s'accompagne en général d'une méningite lymphocytaire sans syndrome méningé c'est la méningoradiculite lymphocytaire. Plus tard, une paralysie faciale (uni ou bilatérale) peut survenir : c'est la classique triade neurologique aussi appelée syndrome de Bannwarth (Bannwarth 1941, Bannwarth 1944). Cette forme clinique est, elle aussi, d'évolution auto-limitée sans traitement, mais durera plusieurs mois avec rémissions et rechutes. Chez 187 patients étudiés (Hansen et Lebech 1992) ce syndrome rend compte de 96,6% des cas de neuroborrélioses. En France, d'après les séries publiées (Hirsch et coll. 1987, Vieyres et coll. 1987) cette forme clinique serait largement prédominante. Chez l'enfant deux travaux indépendants (Christen et coll. 1993, Hansen and Lebech 1992) confirment les différences suivantes : moins de radiculites, plus d'atteintes faciales volontiers bilatérales, la méningite lymphocytaire est souvent "accompagnée" (fébricule, céphalées).

■ L'atteinte cardiaque semble rare en Europe et en France, elle se caractérise par des troubles de la conduction auriculo-ventriculaire, elle est souvent associée à la forme neurologique.

■ L'atteinte rhumatologique peut être de deux types. Soit un syndrome de type arthralgies migratrices, qui survient dans les jours ou semaines qui suivent le contage et rentre dans le cadre d'une phase primo-secondaire. Soit un syndrome de type arthrite, localisé à une grosse articulation (9 fois sur 10 le genou), qui est plutôt considéré comme une phase secondaire ou tertiaire puisqu'elle survient des mois voire des années après le contage. L'EM dans ce cas peut avoir été oublié ou être passé inaperçu ; ce qui le plus souvent empêche d'évoquer une borréliose de Lyme. La plupart du temps en France, ces formes rhumatologiques n'ont pas été précédées par une forme neurologique (Dhôte, 2000).

■ Le Lymphocytome Cutané Bénin (LCB) ou Lymphadenosis benigna cutis est une affection cutanée caractérisée par un infiltrat lympho-histiocytaire. L'étiologie borrélienne de cette lésion n'est probablement pas exclusive.

■ La maladie de Pick-Herxheimer ou Acrodermatitis Chronica Atrophicans (ACA) (Hansen et Asbrink 1989) est considérée comme une forme tertiaire qui survient des années après le contage, elle est rare en France. Elle consiste en une lésion érythémateuse et atrophique de la peau prédominant aux membres inférieurs associée à une infiltration lymphocytaire. Elle peut évoluer sur des années en s'aggravant progressivement. Son diagnostic clinique et anatomo-pathologique est délicat surtout dans les formes débutantes. (voir [figure 8](#), [photos A, B, C, D, E](#)).



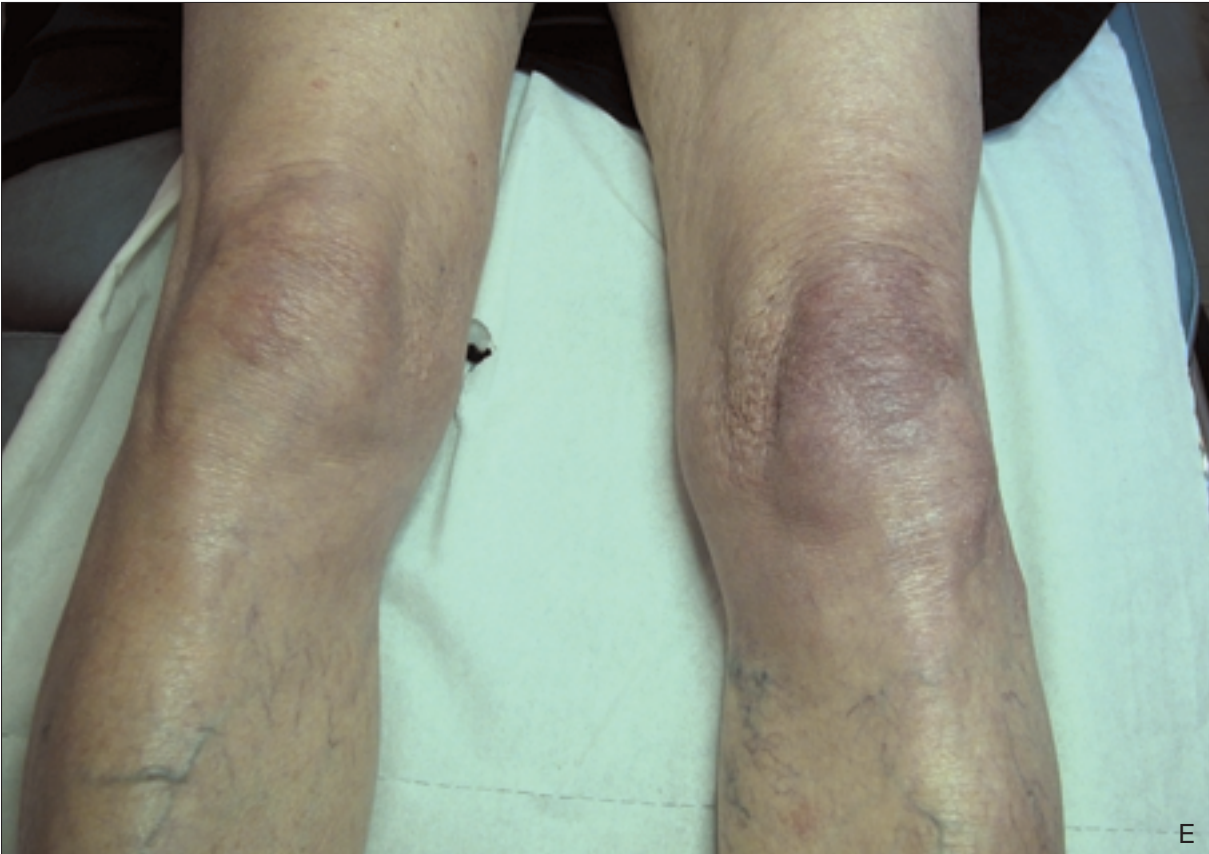


Figure 8 : Photos de cas d'Acrodermatite Chronique Atrophinante (ACA)
photos A, B, C, D et E (suite page suivante)

Photo Pr Nicolas Dupin



Photo Pr Nicolas Dupin



Aux États-Unis d'Amérique

L'aspect clinique de la borréliose de Lyme aux USA, "Lyme disease", (Steere 1989) est nettement moins polymorphe mais présente des limites incertaines, bien qu'également constituée de plusieurs stades. Le premier est l'EM suivi par le stade secondaire qui, après quelques jours ou semaines, peut atteindre de nombreux organes (peau, articulations, muscles, sphère neurologique, rate, coeur, oeil, foie, poumons, reins). Enfin lui succède le stade tertiaire qui semblait se limiter aux articulations et au système nerveux, mais s'est enrichi pour, certains auteurs, de la fibromyalgie et de séquelles encéphaliques tardives avec atteinte des fonctions supérieures : dépression, irritabilité, troubles du sommeil. Les arthrites, qui restent les manifestations apparemment les plus fréquentes, sont considérées soit comme des stades secondaires (attaques brèves), soit comme des stades chroniques (attaques prolongées). Pour diverses raisons et notamment l'intense médiatisation dont elle fait l'objet, la maladie de Lyme américaine est un sujet permanent de controverses entre les auteurs (Dressler et Steere 1992, Goodman 1994, Halperin et Golightly 1993, Halperin et coll. 1991, Kaslow 1992, Krupp et coll. 1992, Liegner 1994, Lightman et coll. 1992, Sjovall et coll. 1992, Steere 1993, Szer et Steere 1991, Whitman et coll. 1992).

Spectre clinique en France

Comme dans les autres pays, l'Erythema Migrans représente la forme clinique de loin la plus diagnostiquée ; Une étude publiée en novembre 2000 (Ragon, 2000), basée sur le réseau épidémiologique du "réseau sentinelles" (INSERM U144,) faisait état que 90% des cas correspondaient à cette forme clinique.

Les formes dites compliquées, quant à elles, sont les plus étudiées et font le plus appel à la sérologie. Elles représentent un pourcentage faible, mais la morbidité la plus importante. Une étude rétrospective sur notre activité depuis les années 90 et publiée dans l'European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Dhôte, 2000) sur 170 cas consécutifs permet de définir le spectre clinique et sérologique des formes compliquées.

Il existe une distribution bimodale selon l'âge, toutes formes cliniques confondues (voir [figure 9](#))
La distribution des cas selon la saison fait apparaître une nette prédilection entre mai et septembre (voir [figure 10](#)).

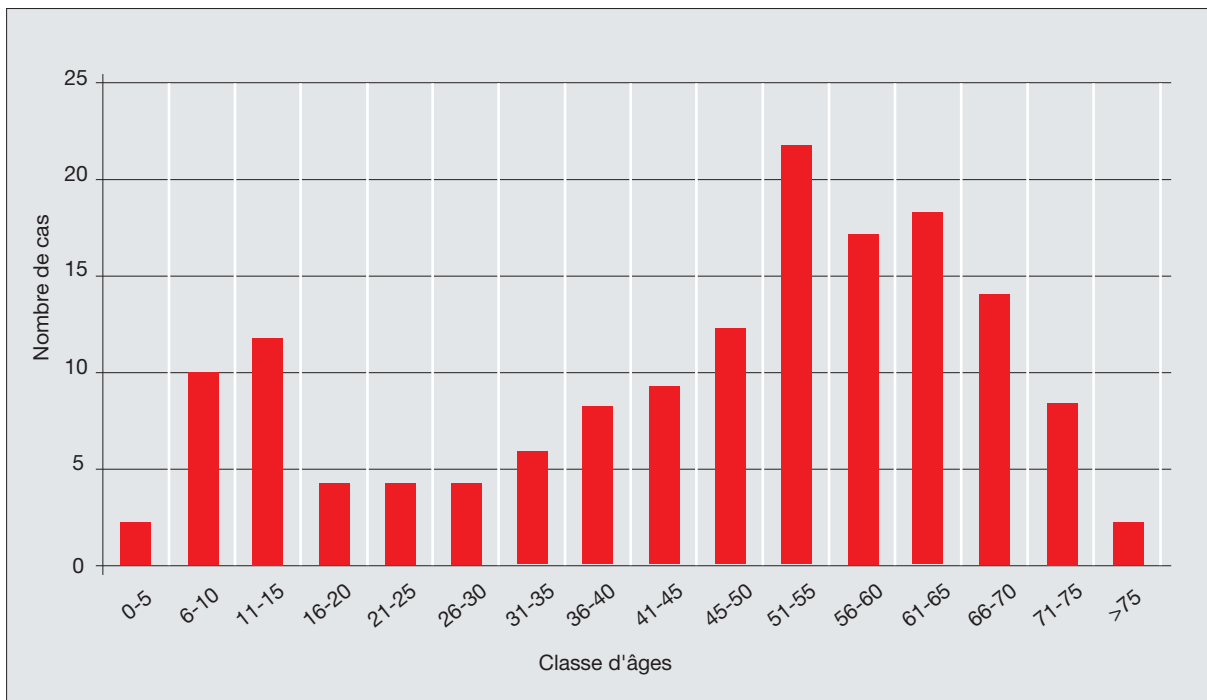


Figure 9 : distribution bimodale de l'âge

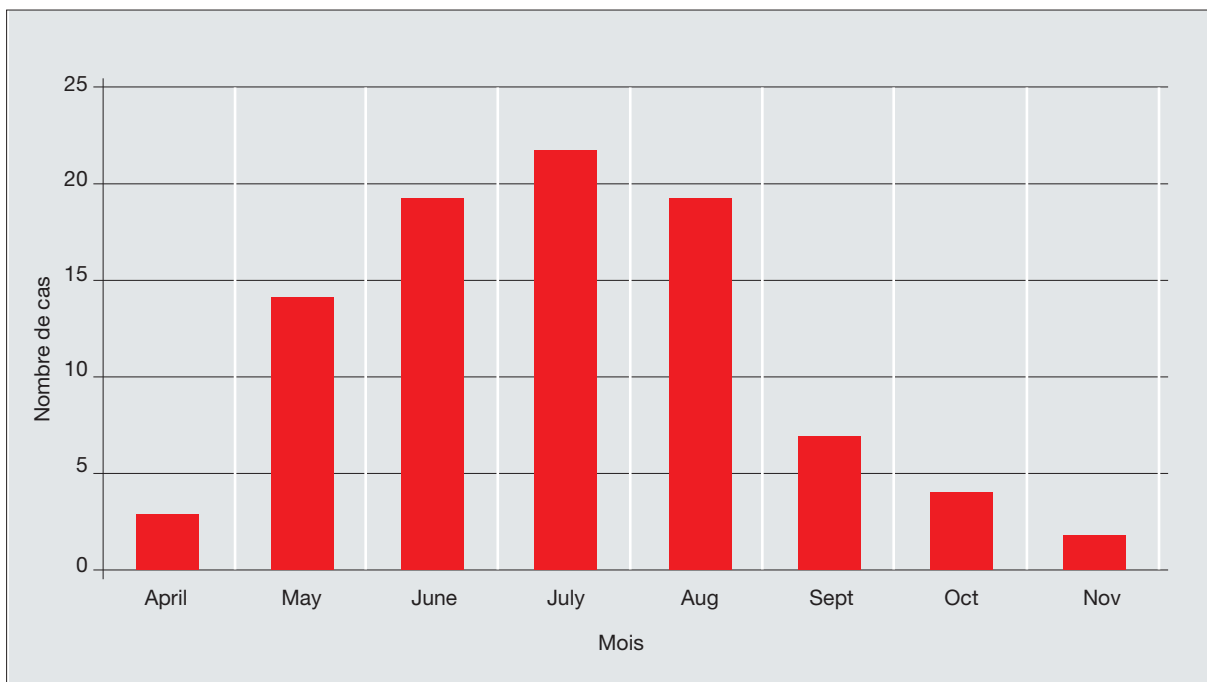


Figure 10 : Répartition saisonnière des cas

La répartition et les caractéristiques des 4 principales formes cliniques sont récapitulées à la **figure 11**. Il existe peu de différences par rapport aux données européennes. L'atteinte neurologique est la complication la plus fréquente avec environ 60% des formes compliquées. La forme cardiaque est très rare ainsi que le LCB. Par contre, le nombre d'arthrites semble plus important qu'attendu avec 27%.

Chez l'enfant, nous confirmons un certain nombre de particularités nosologiques, notamment pour les formes neurologiques. En effet, contrairement à l'adulte, la paralysie faciale est la forme de présentation clinique la plus fréquente chez l'enfant. Si une ponction lombaire est réalisée, elle confirmera l'orientation diagnostique avec la découverte d'une méningite lymphocytaire hyper-protéino-rachique de découverte biologique. Le LCB apparaît aussi plus fréquent. L'ACA est exceptionnel, l'arthrite rare.

En France récemment, grâce à la création du nouveau Centre National de Référence des *Borrelia* il a été possible de préciser ou de confirmer de nombreux aspects de cette épidémiologie. La méthodologie a consisté à obtenir des informations des médecins traitants et des centres hospitaliers afin de se rapprocher au mieux de la réalité épidémiologique.

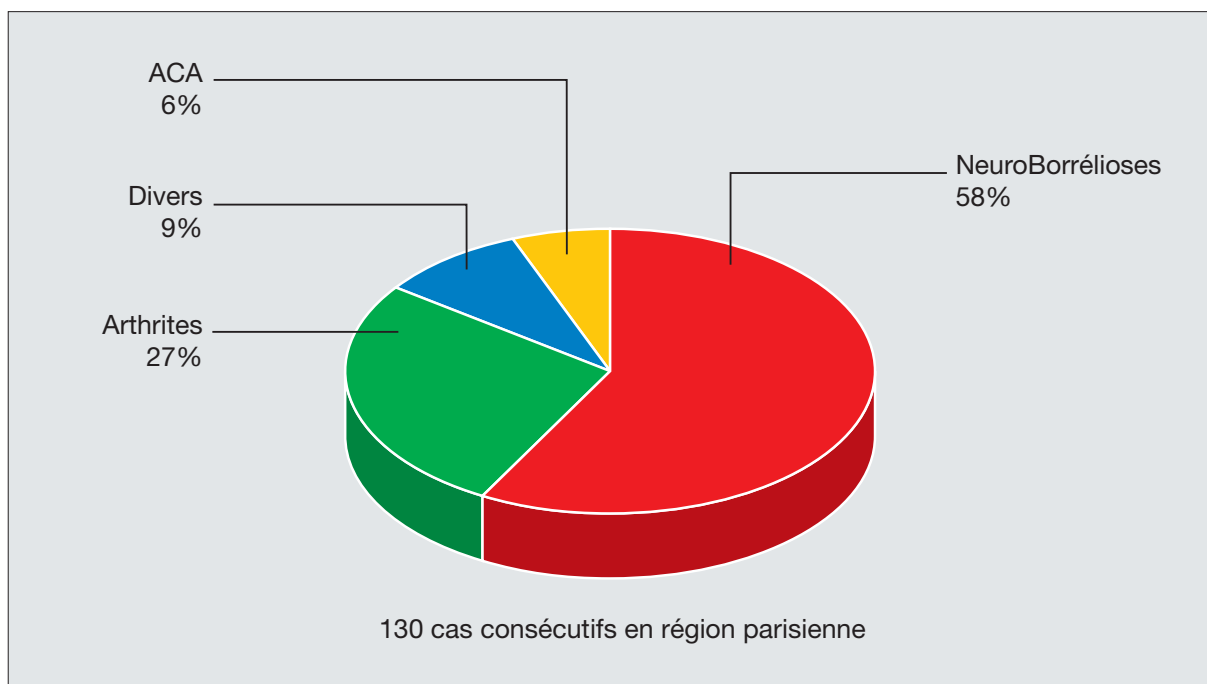


Figure 11 : Spectre clinique des formes compliquées (Erythèmes migrant exclu)

L'erythema migrans est la principale manifestation clinique avec des pourcentages variant de 65 à 77 %.

Les autres manifestations cliniques sont par ordre de fréquence décroissante, les manifestations neurologiques (16 %) qui représentent les formes disséminées les plus fréquentes dans notre pays, puis l'arthrite qui représente 5 % des cas, enfin les manifestations dermatologiques et cardiaques. Nous avons aussi recueilli quelques cas d'atteinte oculaire.

Compte tenu de la référence très fréquente faite à ce qu'il est convenu d'appeler "le consensus européen", nous avons fait figurer en annexe sa traduction. Il est aussi souvent désigné sous le terme EUCALB, pour European Concerted Action on Lyme Borreliosis. La version anglaise et beaucoup d'autres informations de trouvent à l'adresse internet : <http://www.dis.strath.ac.uk/vie/LymeEU/>.

L'AGENT CAUSAL : *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Les spirochètes représentent phylogénétiquement un des 11 phyla des eubactéries (Woese 1987). Les *Borrelia* appartiennent à la famille des Spirochaetaceae.

Jusqu'à la découverte du spirochète responsable de la borréliose de Lyme, la nomenclature du genre *Borrelia* comprenait uniquement les agents des fièvres récurrentes. Leur classification est encore fondée sur l'identité de l'association vecteur-agent causal ; chaque *Borrelia* responsable d'une fièvre récurrente étant définie comme espèce par l'association à un vecteur donné (concept de la co-spéciation) et sévissant en général dans une région définie du globe. Exemple aux USA, *Ornithodoros parkeri* est le vecteur de l'espèce *Borrelia parkeri* et transmet la maladie dans le Sud-Ouest du pays.

Il n'en est pas de même pour les *Borrelia* associées à la borréliose de Lyme qui, plus aisément cultivables, ont bénéficié de méthodes modernes de classification. Au sein de ce complexe, il n'existe pas d'association stricte vecteur-*Borrelia* et la spécificité vecteur-espèce ne s'est pas confirmée.

Caractères morphologiques et culturels.

Dans la première description par Willy Burgdorfer (Burgdorfer et coll. 1982), ces spirochètes sont qualifiées de "*Treponema*-like spirochètes". Ils sont colorables modérément par le Giemsa. Entre lame et lamelle, ils sont lentement mobiles et capables de rotation, translation et flexion. Leur longueur est comprise entre 10 et 20 μm et leur largeur entre 0,18 et 0,25 μm . L'isolement a été possible dans le milieu de Kelly modifié à 35°C. Ce milieu de culture aussi appelé milieu de Kelly enrichi (Stoenner et coll. 1982), fut développé initialement pour la culture et le clonage de *Borrelia hermsii*. Actuellement, le milieu couramment utilisé est le BSK II (Barbour et coll. 1983) qui permet d'atteindre une concentration de 1 à 4 x 10⁸ bactéries par ml à partir de 1 à 2 spirochètes. La croissance y est de type micro-aérophile, avec un

temps de génération variant de 6 à 12 heures (Barbour 1984b, Barbour et Hayes 1986). Afin de mieux appréhender le métabolisme des *Borrelia* associées à la borréliose de Lyme, des milieux à composition définie ont été proposés notamment le BSK-H (Pollack et coll. 1993) commercialisé par Sigma™. L'addition de certains antibiotiques (kanamycine, 5 fluorouracile, acide nalidixique) peut s'avérer utile pour l'isolement à partir des tiques, mais aussi de la peau, afin de prévenir les fréquentes contaminations observées dans ces cas.

Structure et Ultra structure

Les *Borrelia*, au même titre que les autres spirochètes sont caractérisées par une ultra structure très particulière, unique au sein des Eubactéries (Johnson et coll. 1984a). On distingue (voir [figure 12](#)) : une enveloppe ou membrane externe multi-lamellaire qui entoure le cylindre protoplasmique, constitué du peptidoglycane, de la membrane cytoplasmique et du contenu intracytoplasmique ; les flagelles péri plasmiques (filaments axiaux ou fibrilles axiaux) sont localisés entre l'enveloppe externe et le cylindre protoplasmique. Les filaments de flagelline sont eux-mêmes insérés par un système d'ancrage dans la membrane cytoplasmique.

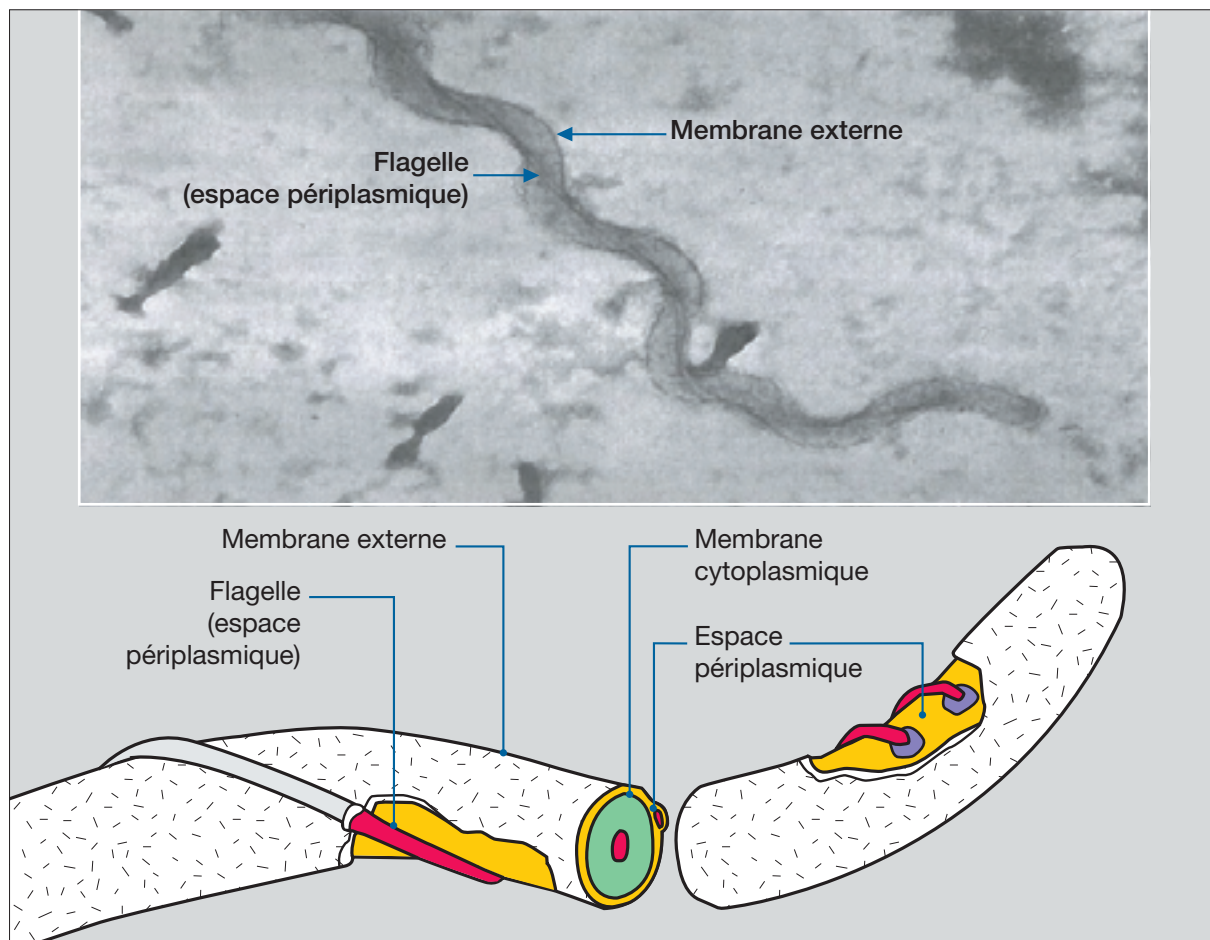


Figure 12 : Ultra structure de *Borrelia*

Organisation du génome

De grandes similitudes existent dans la morphologie, la structure et ultra structure des principaux membres des spirochètes. Par contre, de plus grandes différences apparaissent au niveau génétique. D'une taille d'environ 1 Mb, le chromosome des *Borrelia* est linéaire (Baril et coll. 1989, Ferdows et Barbour 1989). La démonstration de cette linéarité est fournie par sa capacité à migrer sans restriction en électrophorèse en champ pulsé, à l'image des chromosomes eucaryotes. Il n'est toutefois pas définitivement démontré qu'il soit linéaire *in vivo*, et seule la caractérisation des extrémités (télomères) l'affirmerait (Saint Girons et coll. 1992).

Le chromosome a un G+C % de l'ADN faible, compris entre 27,3 et 30,5 mol %, donc inférieur à ceux des tréponèmes ou des leptospires (Hyde et coll. 1989, Johnson et coll. 1984 b).

Le contenu plasmidique est riche (plus de 21), constitué de 9 plasmides circulaires et de 12 linéaires. Le génome a été cloné et séquencé (Fraser, 1997).

Les gènes connus et leurs produits

La connaissance de ces gènes a une double importance : d'abord dans la compréhension des nombreux paramètres du diagnostic moléculaire, ensuite pour la caractérisation des protéines qu'ils produisent. En effet, la plupart d'entre elles sont immunogènes et donc impliquées dans la réponse humorale. Elles interviennent dans toutes les méthodes sérologiques, aussi bien en dépistage qu'en immuno-blot. Un très grand nombre d'entre elles a été cloné dans des vecteurs d'expression et ce pour les trois espèces pathogènes.

Au total, environ 150 gènes de lipoprotéines ont été décrits. Nous insisterons sur ceux qui présentent la plus grande pertinence pour les applications diagnostiques.

ARN ribosomiaux :

Outre la linéarité du chromosome de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, une autre "atypie génétique" a été mise en évidence au niveau de l'organisation de gènes ribosomiaux. En effet, il existe une seule copie du gène *rrs* codant l'ARN 16S alors qu'il y a deux copies des gènes *rrl* et *rrf* codant respectivement les gènes des ARN 23S et 5S (Davidson et coll. 1992, Fukunaga et Sohnaka 1992, Schwartz et coll. 1992b). Cet arrangement génétique diffère de celui de la majorité des bactéries y compris des espèces de *Borrelia* associées aux fièvres

récurrentes (*B. hermsii*, *B. turicatae*, *B. anserina*) qui possèdent un nombre identique de copies de ces trois gènes. Récemment (Gazumyan et coll. 1994), la séquence de cette portion de génome a été complètement déterminée, les gènes ARN^t_{Ala} et ARN^t_{Ile} ont été localisés dans l'espace inter génique 16S-23S. Tous ces gènes possèdent le même sens de lecture à l'exception du gène ARN^t_{Ile} qui est transcrit dans le sens opposé.

Flagelline

Le gène *fla* a été séquencé d'abord pour les souches B31 et GeHo (Gassmann et coll. 1989). La séquence de ce gène de structure comporte 1008pb. La comparaison des séquences *fla* au sein des eubactéries (Wilson et Beveridge 1993) permet de distinguer trois domaines : les domaines N-terminaux et C-terminaux qui sont bien conservés alors que le domaine central est beaucoup plus variable (Gassmann et coll. 1991). La flagelline des *Borrelia burgdorferi* sensu lato est composée d'une seule protéine de 336 acides aminés correspondant à une masse moléculaire de 35.7 kDa (Gassmann et coll. 1991). Le poids moléculaire apparent en gel de polyacrylamide est de 41kDa et pourrait s'expliquer par l'incorporation de différents résidus par exemple glycosylés comme cela a été décrit pour d'autres bactéries. Cette protéine est actuellement désignée FlaB ou flagellar core protein, pour la différencier du produit du gène *flaA* et constitue la majorité du flagelle périplasmique. La protéine FlaA, constitue l'enveloppe externe du flagelle, sa fonction est inconnue.

Protéines de membrane externe

Les protéines de membrane externe représentent pondéralement une partie importante de la constitution protéique de la bactérie et jouent un rôle clé dans la réponse immune. Elles sont appelées Osp pour "Outer Surface Protein" et sont codées par des gènes plasmidiques.

Les gènes *ospA* et *ospB*, localisés sur un plasmide linéaire de taille variable suivant les souches, sont organisés en opéron et co-transcrits (Barbour et Garon 1987, Howe et coll. 1986, Samuels et coll. 1993). Il a été montré que OspA et OspB sont des lipoprotéines (Brandt et coll. 1990) et que les acides gras sont reliés à ces protéines par des liaisons covalentes. Alors que OspA et OspB sont des protéines majeures et qu'elles sont immunogènes lorsqu'elles sont injectées à l'animal, elles n'entraînent qu'exceptionnellement de réponse immune chez l'homme. Il s'avère que ces deux protéines ne sont exprimées que chez la tique et qu'elles font place à OspC dès que la bactérie se trouve chez un mammifère (De Silva et Filkrig, 1997 ; Schwan, 2002). Ainsi ces protéines ont peu d'intérêt pour le diagnostic biologique puisqu'elles ne sont pas exprimées chez l'hôte. Cependant, comme

nous le verrons plus tard, des anticorps de forte intensité sont retrouvés contre OspA et OspB au cours de certaines formes chroniques, notamment des arthrites.

Le gène ospC est localisé sur un plasmide circulaire de 26kbp (Marconi et coll. 1993), et code une protéine initialement dénommée "pC" (Wilske et coll. 1986), puis OspC. Ce gène a été cloné et séquencé (Fuchs et coll. 1992) et peut être présent sans expression de la protéine. Le poids moléculaire apparent d'OspC varie entre 20 et 25 kDa. Enfin, OspC appartiendrait à une famille de protéines exposées à la surface dont feraient partie les VMP décrites chez les *Borrelia* des fièvres récurrentes (Carter et coll. 1994). Cette protéine est exprimée dès la pénétration de la bactérie chez l'hôte mammifère, tout de suite après le repas sanguin (De Silva et Filkrig, 1997 ; Schwan, 2002). C'est qui provoquera chez l'hôte la synthèse des tout premiers anticorps de classe IgM.

Le gène ospD a été proposé comme facteur de virulence puisque sa protéine n'est retrouvée que lors des premiers passages en culture des souches étudiées. Chez B31, la protéine OspD possède un poids moléculaire apparent de 28 kDa codé par un plasmide linéaire (Norris et coll. 1992). Suivant les souches pour lesquelles il a été caractérisé, la taille du plasmide est variable. D'après l'analyse des séquences, il a été proposé (Marconi et coll. 1994) que le gène ospD avait été acquis "récemment" et soit sujet à des transferts latéraux entre les souches du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Le gène de la protéine P39

Le gène de cette protéine immunogène (*BmpA*) a été cloné et séquencé (Simpson et coll. 1991). La comparaison des séquences a permis d'établir une certaine homologie avec le gène tmpC qui code une lipoprotéine de membrane externe ou interne chez *Treponema pallidum*. Elle est considérée comme une protéine associée à la membrane et est interprétée comme spécifique en cas de réactivité en immuno-blot.

Les protéines de choc thermique (Heat shock Protein ou HSP)

Leur synthèse est accrue lors du passage de la bactérie depuis son vecteur à température ambiante vers ses hôtes qui sont tous des homéothermes. La première HSP60 est homologue de GroEL chez *E.coli* et d'autres bactéries (Hansen et coll. 1988), la seconde HSP70 est homologue de DnaK de *E.coli* (Coleman et Benach 1992). Elles sont considérées comme non spécifiques en immuno-blot (Wilske, 2003).

La protéine DbpA

C'est une protéine de membrane externe de 18-20 kDa qui a la propriété de se lier à la décorine du tissu conjonctif des mammifères. Elle est fabriquée par les *Borrelia* in vitro et in vivo, et est régulée par la température. La protéine DbpA provoque la synthèse d'une réponse immunitaire intense en modèle expérimental murin.

La protéine BBK32

Elle est caractérisée par un poids moléculaire de 47 kDa. C'est une protéine de liaison à la fibronectine exprimée par les spirochètes préférentiellement in vivo. Elle est détectable chez la bactérie avant le repas sanguin mais pas chez les tiques non gorgées. En conséquence, BBK32 est exprimée au moment de la transmission de l'hôte mammifère, mais son taux décroît ensuite pour atteindre des taux bas (Probert et Johnson 1998, Fikrig et coll. 2000, Revel et coll. 2002). Des anticorps contre BBK2 ont été observés chez la souris (Akin et coll. 1999) et chez l'homme (Fikrig et al. 1997, Heikkilä 2002b), mais leur implication dans la défense contre les *Borrelia* reste flou.

VisE et (IR)6- peptide C6

La Lipoprotéine VisE, de poids moléculaire 35 kDa, est analogue à la protéine VMP (pour Variable Major Protein) des *Borrelia* des fièvres récurrentes. Les VMP sont des protéines majeures support de la variation antigénique décrite chez ce groupe de bactéries et responsable en grande partie de leur pathogénie. Le gène VisE est situé sur un plasmide linéaire de 28 Kb dont il existe 15 cassettes dites "silencieuses" pour ce même gène. Malgré la variation de séquence de ces gènes, qui reflète la variation antigénique, il existe une zone conservée, partagée par tous les gènes, dénommée "région invariable" ou IR. IR6 est la mieux conservée de ces régions invariables, exposée à la surface de la bactérie. Le peptide de synthèse C6 a été proposé et utilisé seul ou comme supplément pour améliorer les performances de la sérologie.

Caractères antigéniques

L'étude par électrophorèse en gel de polyacrylamide des premières souches isolées permet de localiser les protéines majeures dans un intervalle de poids moléculaire compris entre 10 et 100 kDa. La réactivité en western blot avec un sérum de haut titre, provenant d'un patient atteint d'arthrite de Lyme, permet d'établir une première liste des protéines immunogènes qui étaient les protéines majeures pondéralement : 17, 25, 29, 31, 34, 41, 60, 61, 66, 75, 83 kDa (Barbour 1984a). C'est grâce à l'utilisation de sérums de malades échelonnés sur de nombreux mois et gardés congelés, alors que la cause de l'affection était inconnue, qu'il a été possible pour les auteurs américains (Coleman and Benach 1987, Craft et coll. 1986) de suivre la cinétique des anticorps vis-à-vis des protéines majeures. A la phase initiale (EM), c'est surtout la P41(Flagelline) qui est reconnue par les sérums de patients en IgG et en IgM, la P83 beaucoup moins fréquemment. Chez les souches qui expriment OspC, il existe de plus une réponse de type IgG et IgM précoce et intense vis-à-vis de cette protéine (Wilske et coll. 1986, Wilske et coll. 1989). En cas d'arthrite de Lyme, la cinétique (très lente) est nette et deux à trois ans après le contagé sont nécessaires pour développer un blot "complet" incluant les 10 à 12 antigènes reconnus à ce stade (Craft et coll. 1986). La synthèse d'IgM anti-Flagelline persiste tant que la maladie est évolutive. Il existe tout au long du développement de l'affection une augmentation progressive du nombre des polypeptides reconnus. Cependant les deux protéines reconnues le plus tardivement sont la P34(OspB) et la P31(OspA), ce qui peut sembler paradoxal. En effet, ce sont des protéines majeures localisées au niveau de la membrane externe de la bactérie. Elles devraient par conséquent être reconnues précocément dans l'affection. D'ailleurs, l'immunisation expérimentale avec des extraits antigéniques totaux permet d'obtenir facilement des anticorps en abondance contre OspA/B aussi bien chez la souris que chez le lapin (Wilske et coll. 1986, Wilske et coll. 1989, Wilske et coll. 1988). De même, les premiers anticorps monoclonaux produits à partir d'immunisation par extraits totaux étaient tous dirigés contre OspA (Barbour et coll. 1985, Barbour et coll. 1983). Cette réaction paradoxale chez les malades vis-à-vis de OspA/B a été expliquée dans le paragraphe traitant de ces deux gènes. En effet, ces deux protéines ne sont plus exprimées une fois que la bactérie se trouve chez l'hôte mammifère. Par contre, l'apparition tardive chez certains patients d'anticorps anti-OspA/B reste inexpliquée.

Nous avons récapitulé au [tableau 1](#) (d'après Panelius, 2002), les principales protéines impliquées dans la réponse immune et leur localisation et leur fonction. Il est important de noter que la plupart de ces protéines ont été clonées dans des vecteurs d'expression et sont maintenant disponibles pour les fabricants de réactifs qu'ils peuvent utiliser soit pour l'ELISA soit pour le western blot.

Tableau 1 : Les principales protéines immuno-dominantes de *B. burgdorferi*, leur localisation et leur fonction. D'après Panelius, J. 2002

<i>Dénomination de la protéine</i>	<i>Poids moléculaire</i>	<i>fonction</i>
p83/100	83-100 kDa	Cylindre protoplasmique ou associée à la flagelline
HSP60, HSP75	60-75 kDa	Protéines de choc thermique
P66	66 kDa	Protéines associée à la membrane
BBK32/p35	47 kDa	Protéine de liaison à la fibronectine
P41	41 kDa	Flagelline
BmpA/p39	39 kDa	Protéine associée à la membrane
FlaA	37-38 kDa	Flagellin A
BBK50/p37	37 kDa	Inconnue
VslE	35 kDa	Lipoprotéine de surface
OspB	34 kDa	Protéine de membrane externe
OspA	31 kDa	Protéine de membrane externe
P30	30 kDa	Inconnue
OspF	26,1 kDa	Protéine de membrane externe
OspC	21-24 kDa	Protéine de membrane externe
p22	22 kDa	Inconnue
P21	21 kDa	Inconnue
OspE	19,2 kDa	Protéine de membrane externe
Osp17/DbpA	17-18 kDa	Protéine de membrane externe Protéine de liaison à la décorine

Polymorphisme - Diversité - Taxonomie

Le problème de la diversité des souches n'apparut pas initialement puisque les caractéristiques morphologiques en microscopie électronique, l'adaptation au milieu de culture, le profil protéique et la réactivité immunologique vis-à-vis de sérums de malades européens et américains étaient identiques pour les deux premières souches isolées aux USA et pour la souche européenne (souche suisse IRS) (Barbour et coll. 1983). Mais très vite, l'isolement de nouvelles souches de toutes origines, allait compliquer ce schéma initial, montrant un polymorphisme tout d'abord phénotypique, puis génotypique.

L'étude des souches fut effectuée tout d'abord par analyse de leur profil protéique après électrophorèse (SDS-PAGE) et montra une hétérogénéité des souches européennes par rapport aux souches américaines (Barbour, 1985). Les protéines "majeures" se situent dans un intervalle de poids moléculaires compris entre 10 et 90 kDa. Les bandes protéiques à 60 et 41 kDa apparaissent très conservées entre toutes les souches. Par contre dans les PM inférieurs, on obtient des profils variables, correspondant à l'hétérogénéité des souches ; elle s'avéra difficilement systématisable (Wilske, 1988)

Les trois premiers travaux étudiant l'homologie d'ADN entre les souches avaient conclu à une espèce unique (Schmid, 1984 ; Johnson, 1984 ; Anderson, 1986). Les études ultérieures de D. Postic et G. Baranton à l'institut Pasteur de Paris démontrèrent par une méthode similaire mais plus sensible l'existence de deux (Postic, 1990) puis de trois (Baranton, 1992) espèces génomiques au sein des souches de *Borrelia* associées à la borréliose de Lyme. Ces travaux aboutirent à la description de trois espèces au sein de *B. burgdorferi* devenu *B. burgdorferi* sensu lato : *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garini* sp. nov. et *Borrelia afzelii* sp. Nov (Canica, 1993). Cette classification fut retrouvée par d'autres auteurs utilisant des approches génomiques très diverses (Marconi, 1992 ; Picken, 1992 ; Rosa, 1991 ; Welsh, 1992 ; Boerlin, 1992 ; Adam, 199 ; Péter, 1992 ; Wang, 1999). Cette diversité de la répartition des espèces entre l'Europe et les Etats-Unis a de nombreuses implications que nous évoquerons au fur et à mesure, tant pour l'épidémiologie que pour le diagnostic biologique ou la conception des vaccins.

Régulièrement de nouvelles espèces isolées à partir de tiques sont décrites à travers les différents pays. Elles n'ont en général que peu d'implications pour les biologistes cliniques. En effet, ce nombre sans cesse croissant d'espèces révèle le grand polymorphisme génétique des *Borrelia* associées à la Borréliose de Lyme dans l'environnement par opposition au nombre très limité d'espèces pathogènes pour l'homme. Seules trois espèces sont reconnues comme pathogènes pour l'homme : *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* et *B. afzelii* (voir [figure 13](#)).

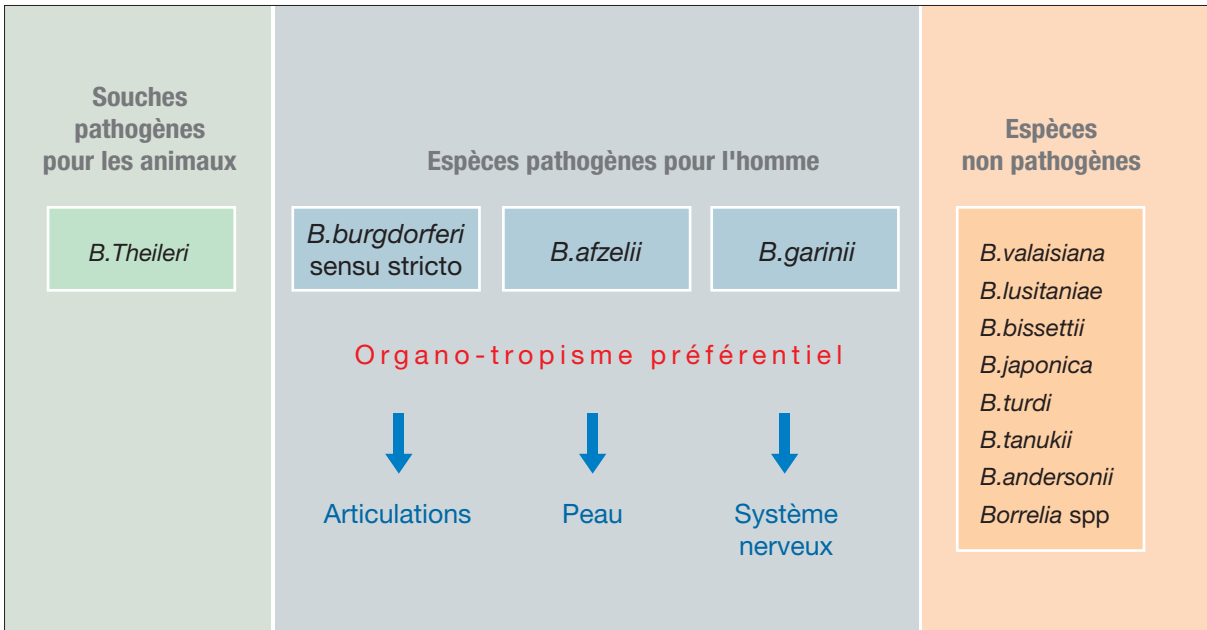


Figure 13 : Classification de *B. burgdorferi* sensu lato, espèces associées à la borréliose de Lyme (d'après Danièle Postic, Institut Pasteur)

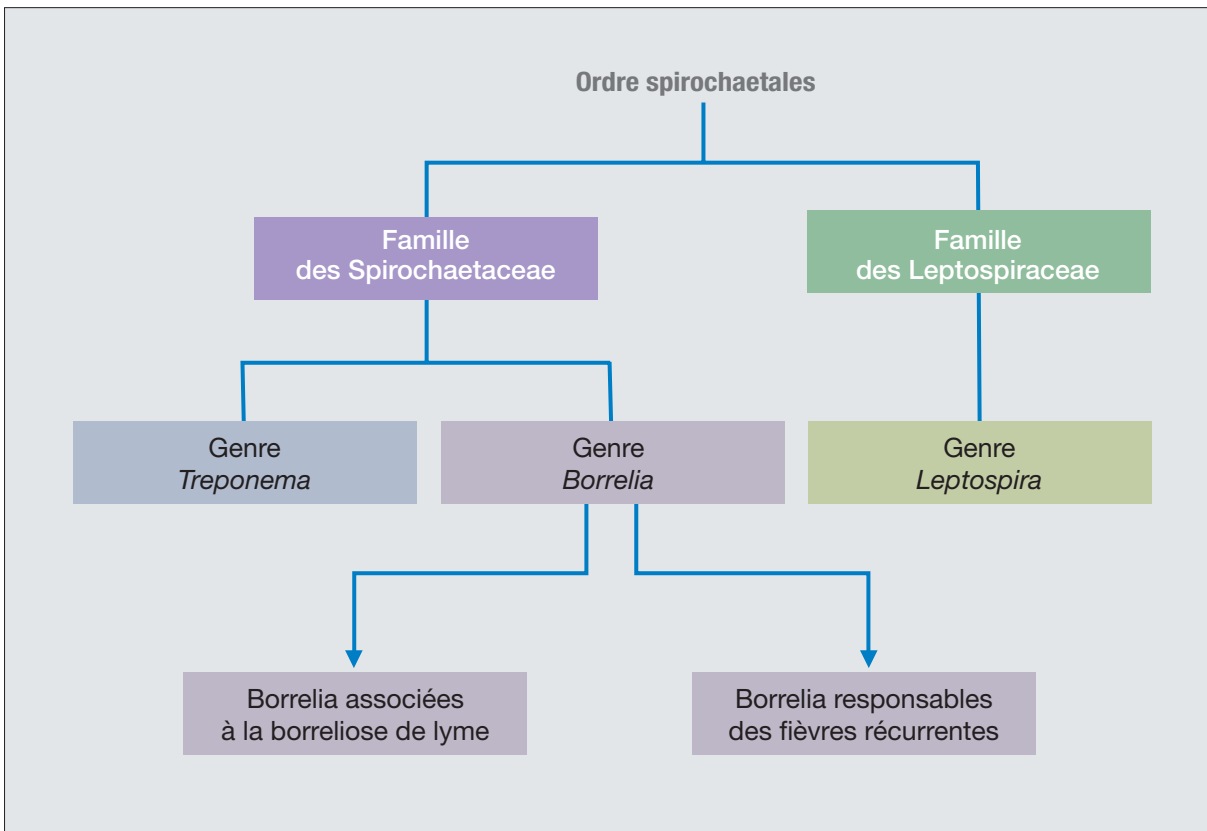


Tableau 2 : Classification actuelle des spirochètes d'importance médicale

Taxonomie actuelle (voir Tableau 2)

Au sein de l'ordre des spirochaetales, les *Borrelia* constituent un genre aux côtés des *Treponema*. Le genre *Borrelia* est divisé en deux groupes de souches, celles associées à la borréliose de Lyme et celles responsables des fièvres récurrentes. Au sein de chaque groupe, les regroupements se font en fonction de la pathogénie comme représenté à la [figure 14](#) (modifiée d'après Danièle Postic) .

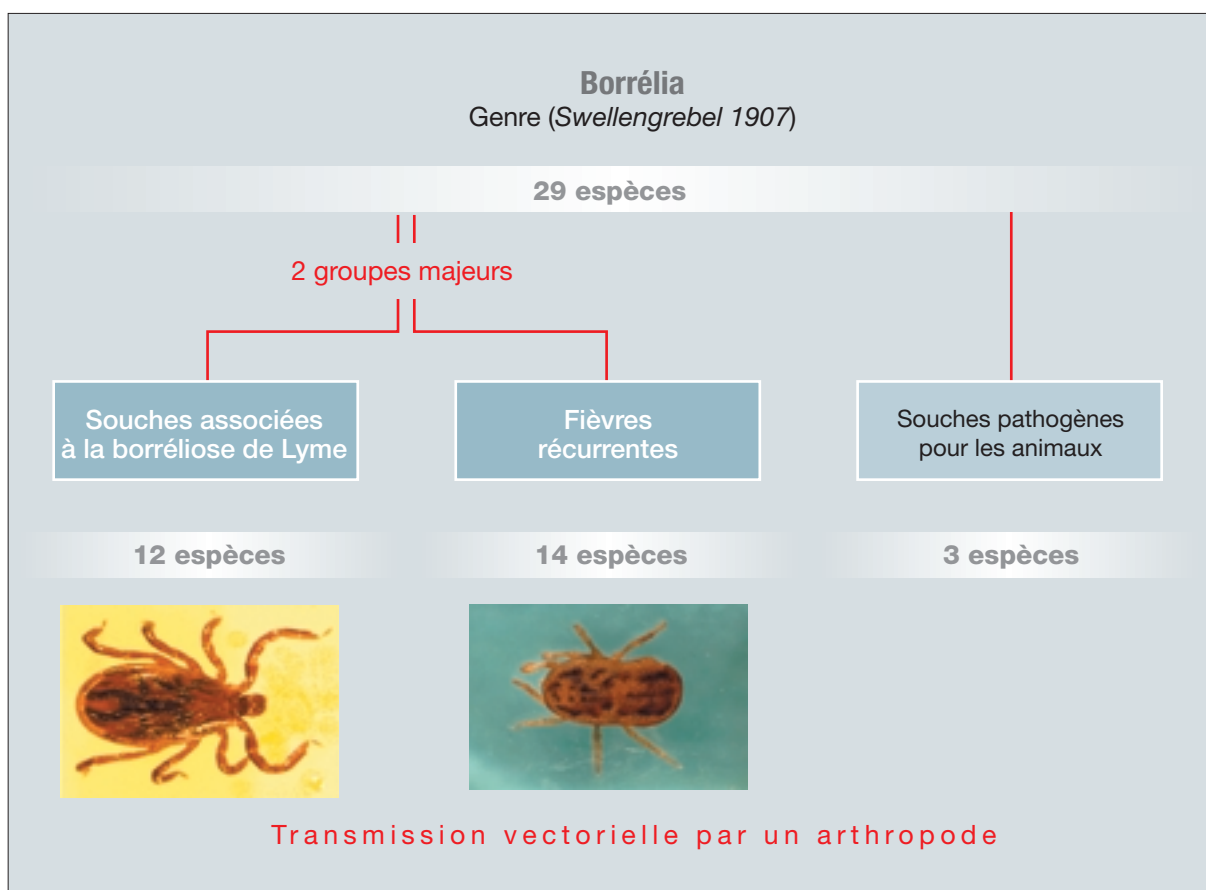


Figure 14 : Classification des *borrelia*

Organotropisme

Comme nous l'avons exposé précédemment, il existe des différences cliniques et épidémiologiques entre l'expression de la borréliose de Lyme entre l'Europe et les USA. Comme cela est représenté à la [figure 15](#) (fournie aimablement par Danièle Postic, Centre National de Référence des *Borrelia*, Institut Pasteur, Paris), la répartition des souches pathogènes montre la présence unique de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto aux USA alors que les trois espèces pathogènes sont représentées en Europe. L'hypothèse d'un lien entre le polymorphisme clinique et génétique entre Europe et les USA a été évoquée entre les années 87 et 90. En effet, il était possible de relier la très grande fréquence des arthrites aux

USA à la seule espèce pathogène retrouvée : *Borrelia burgdorferi* sensu stricto alors qu'en Europe où coexistaient les trois espèces pathogènes coexistaient aussi les trois types de complications : neurologiques, rhumatologiques et dermatologiques tardives. Des arguments indirects en faveur de cette hypothèse furent proposées dans les années 1992 à partir d'études sérologiques (Assous et coll. 1993). Dans les années qui suivirent d'autres auteurs confirmèrent par des méthodes moléculaires ou même par culture cet organotropisme relatif. Une excellente revue de ce sujet fut publiée en 1999 (Wang et coll., 1999).

Polymorphisme géographique et génétique :

La figure 15 représente la répartition géographique des *Borrelia* pathogènes et non pathogènes. Aux USA, il n'existe qu'une seule espèce pathogène *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. En Europe, la situation est beaucoup plus complexe. Il existe trois espèces pathogènes, mais leur répartition n'est pas homogène. Notamment *Borrelia burgdorferi* sensu stricto n'est retrouvée que dans l'Ouest de l'Europe.

Il existe aussi une divergence génétique au sein de chaque espèce, bien appréhendée par les méthodes moléculaires telles que le RAPD (Wang et coll., 1999) qui ont l'avantage

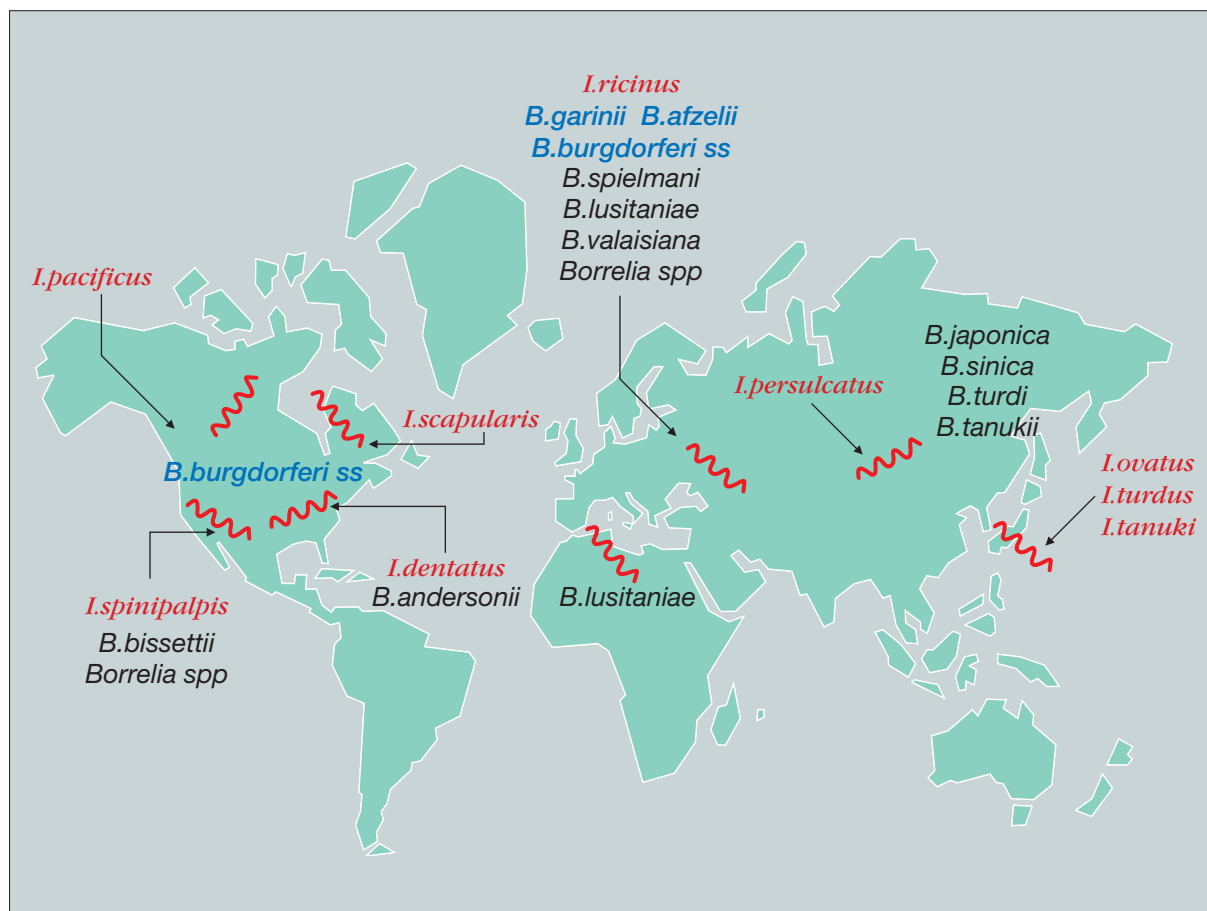


Figure 15 : Classification des *borrelia*

d'étudier l'ensemble du génome, plutôt qu'un nombre limité de gènes. C'est l'espèce *Borrelia afzelii* qui apparaît la plus divergente, suivie par *Borrelia garinii* et enfin *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Cette divergence peut aussi être approchée par l'étude de certains gènes particulièrement pertinents, comme la flagelline ou l'OspC. La diversité a été étudiée pour un même gène au sein d'une même espèce et entre espèces. Ainsi, les protéines de membrane externe telles que OspC ou OspA sont beaucoup plus polymorphes que la flagelline. Mais OspC est beaucoup plus divergent chez *Borrelia afzelii* que chez *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, par exemple. Cette approche est très importante pour le diagnostic biologique, tant pour les moléculaires que immunologiques. En effet, il est indispensable de vérifier la bonne représentativité d'une cible pour la PCR ou d'un peptide de synthèse pour la sérologie au sein de tout le répertoire des souches pathogènes, toutes espèces confondues.

Diagnostic Biologique

Le nombre important des formes cliniques, les différentes spécialités médicales concernées et les nombreuses disparités géographiques, que nous venons d'exposer, justifieraient une grille de critères diagnostiques, cliniques et paracliniques puis sérologiques. Les critères proposés aux USA par le CDC ne paraissent pas parfaitement adaptés à la présentation clinique de l'affection en Europe. Cependant, outre l'épidémiologie, le diagnostic biologique et surtout son interprétation bénéficieraient de tels critères. Depuis les travaux réalisés dans le cadre de l'EUCALB (European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis) des critères européens ont été proposés, qui se sont assez bien imposés avec le temps. Une traduction en est proposée en annexe.

En pratique quotidienne, le diagnostic bactériologique repose essentiellement sur la recherche des anticorps spécifiques. Les résultats de la culture restent décevants et les techniques de biologie moléculaire, demeurent dans le domaine de la recherche appliquée.

Diagnostic biologique direct :

Le problème majeur de cette facette du diagnostic bactériologique ne se situe pas au niveau des performances des méthodes. En effet, le milieu de culture est très performant, comme en attestent les très nombreux isollements de souches réalisés à partir des tiques. Il en est de même des méthodes moléculaires dont on connaît bien la sensibilité dans le cadre d'autres infections. Il semble bien qu'une grande partie de la "responsabilité" en incombe à la physiopathologie de l'infection elle-même. En effet, la majorité des auteurs s'accordent à dire, qu'il existe probablement très peu de *Borrelia* au sein des lésions, notamment dans les formes compliquées, et qu'une partie importante des symptômes cliniques soit due à la réaction du système immunitaire plutôt qu'à la bactérie elle-même. Il semble en outre, que les *Borrelia* associées à la Borréliose de Lyme, tout au moins en Europe, soient essentiellement des pathogènes tissulaires au sens physiopathologique du terme ; ainsi l'infection progresse par contiguïté et non en empruntant le torrent circulatoire ou lymphatique.

Examen direct et culture (Figure 16 et 17)

L'agent étiologique peut cependant être recherché dans différents produits pathologiques (biopsie cutanée, liquide céphalo-rachidien, sang périphérique, liquide articulaire et/ou biopsie synoviale) en fonction de la forme clinique observée.

Théoriquement, l'examen direct au microscope à fond noir est praticable sur le LCR ou le liquide articulaire ; mais en pratique, il n'est pas réalisé compte tenu de son manque total de sensibilité.



Figure 16 : *Borrelia* au microscope à fond noir

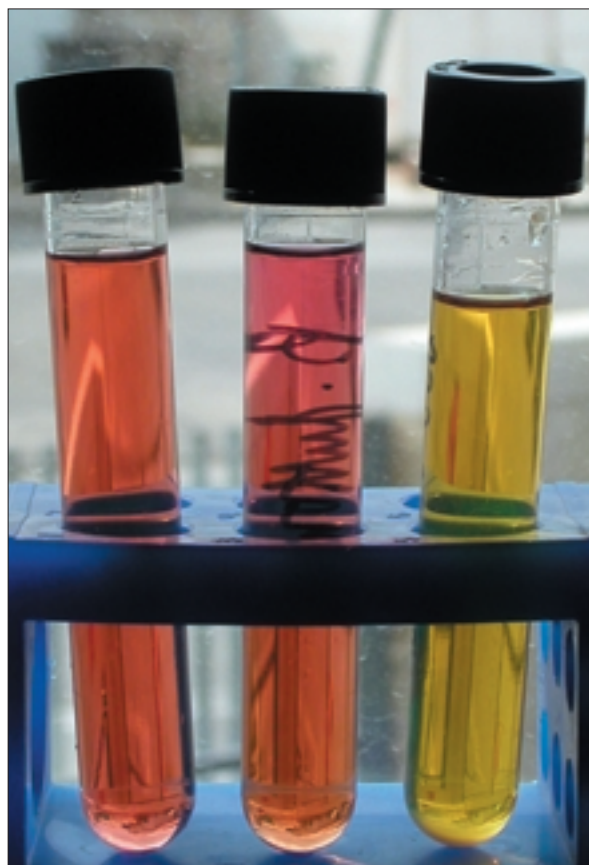


Figure 17 : Culture des *Borrelia* en tubes, milieu BSK →

La mise en culture doit être réalisée le plus vite possible en milieu spécial BSKII (Barbour-Stoenner-Kelly), incubé entre 34 et 37°C (Barbour 1984b) (voir annexes). L'examen au fond noir des cultures est hebdomadaire, elles sont repiquées à l'aveugle les premières semaines. La culture n'est pas de pratique courante, elle est plutôt réservée aux laboratoires spécialisés. Malheureusement son rendement est extrêmement faible, notamment dans les localisations secondaires et tertiaires. Or c'est dans ces cas qu'elle serait le plus contributive. Elle mériterait cependant d'être tentée plus souvent afin d'augmenter le nombre de souches d'origine humaine qui reste limité. Des améliorations dans le rendement des cultures ont été obtenues ces dernières années surtout en cas d'EM. Il intéressant de noter que les résultats

des cultures sont nettement meilleurs avec des prélèvements tissulaires (biopsie cutanée ; synoviale) que dans les prélèvements liquidiens (LCR ; liquide articulaire). Ceci confirme l'hypothèse de la pathogénie tissulaire des *Borrelia* associées à la borréliose de Lyme.

Méthodes moléculaires :

Les connaissances acquises sur le génome de *Borrelia burgdorferi* sensu lato ont été mises à profit pour développer des méthodes de type "biologie moléculaire". Le choix s'est porté sur la "polymerase chain reaction" (PCR) particulièrement adaptée à la détection d'agents infectieux de culture lente et difficile. Potentiellement, sa sensibilité, sa spécificité et la rapidité d'obtention du résultat en font une technique particulièrement adaptée à la borréliose de Lyme. Les cibles choisies sont variables, chromosomiques pour certains (Jaulhac et coll. 1991, Lebech et Hansen 1992, Schwartz et coll. 1992a), plasmidiques pour d'autres (Amouriaux et coll. 1993, Malloy et coll. 1990) et même par clonage au hasard (Rosa et Schwan 1989). Les inconvénients maintenant bien documentés de cette méthode méritent cependant d'être évoqués. Le risque de faux positifs par contamination peut survenir soit à cause du non respect des zones pré et post-PCR soit à cause d'un échantillon très positif dans la série. Les risques de faux négatifs sont dus à la présence d'inhibiteurs ou d'enzymes de dégradation de l'ADN. Le problème lié au traitement des échantillons biopsiques (peau, synoviale, etc....) et le faible nombre de bactéries potentiellement présentes dans ces localisations représentent des difficultés supplémentaires, plus spécifiques à cette affection.

Les résultats des évaluations sont difficiles à comparer suivant les auteurs à cause des nombreux paramètres variant entre les études (cible utilisée, nature et quantité du prélèvement, forme clinique étudiée, nombre et sélection des patients etc....). Les prélèvements les plus utilisés sont la peau, le LCR, le liquide articulaire, la biopsie synoviale.

Dans les EM, le rendement de la PCR a pu être comparé à celui de la culture (Melchers et coll. 1991, Schwartz et coll. 1992a), montrant des rendements de positivité similaires (60 à 80%) ; malheureusement c'est l'indication la moins intéressante. Les neuroborrélioses ont été très étudiées (Debue et coll. 1991, Huppertz et coll. 1993, Jaulhac et coll. 1991, Keller et coll. 1992, Kruger et Pulz 1991, Lebech and Hansen 1992, Luft et coll. 1992), avec parfois des résultats discordants en terme de positivité (variant de 25 à 100%) mais qui s'expliquent par le grand nombre de facteurs de variation impliqués. L'urine a été aussi proposée comme un prélèvement intéressant, notamment par la persistance de la positivité pendant la première semaine de traitement antibiotique (Lebech et Hansen 1992). Des études ultérieures n'ont pas confirmé l'intérêt de ce prélèvement (Wang, 2002).

Nous avons souhaité synthétiser sous forme de tableau (**tableau 3**) le consensus bibliographique autour des méthodes directes.

Tableau 3 : sensibilité comparée des différentes méthodes de diagnostic direct (d'après la littérature)

	<i>Erythème migrant</i>		<i>Méningoradiculites Formes compliquées précoces</i>		<i>Arthrites</i>		<i>Acrodermatite chronique atrophiante ACA</i>	
	<i>Serum</i>	<i>peau</i>	<i>Serum</i>	<i>LCR</i>	<i>Serum</i>	<i>Liquide* articulaire</i>	<i>Serum</i>	<i>Peau</i>
Culture	NR	38-80%	NR	≤10%	NR	<5%	NR	20-60%
PCR	NR	60-90%	NR	25%	NR	50-70%	NR	60-90%
ELISA	20-50%	NR	70-90%	50-90%	90-100%	NR	95-100%	NR

NR : non réalisable * : meilleurs résultats avec les biopsies synoviales

Les méthodes de PCR en temps réel pour le diagnostic clinique sont encore peu nombreuses et d'utilisation récente pour la borréliose de Lyme, leur intérêt réside essentiellement dans la possibilité de quantification et dans la facilité qu'elles offrent de proposer des coffrets commerciaux standardisés.

Les résultats actuels des méthodes moléculaires les placent en bonne position aux côtés de la culture comme méthodes de référence soit pour le diagnostic soit pour des études contrôlées. Ces méthodes sont disponibles auprès du Centre National de Référence des *Borrelia*.

Diagnostic biologique indirect :

Il existe peu de données bibliographiques sur la pratique quotidienne de la sérologie, contrastant avec une bibliographie considérable (plusieurs centaines d'articles), constituée de travaux épidémiologiques ou sérologiques contrôlés par des groupes témoins. Nous nous efforcerons de dresser une synthèse orientée dans le sens du diagnostic biologique.

Les techniques actuellement utilisées ont toutes pour but la mise en évidence d'anticorps ; ainsi les recherches d'antigènes de *B. burgdorferi* sI (Dorward et coll. 1991, Hyde et coll. 1989) ou l'exploration de la réponse immunitaire cellulaire spécifique (Dattwyler et coll. 1988) ont peu d'applications diagnostiques en routine.

Les méthodes

Il faut distinguer les méthodes quantitatives des méthodes qualitatives.

- Les premières ont pour but de mettre en évidence la présence d'Ac à des taux significatifs. Ceci implique comme préalable de déterminer un seuil de spécificité de manière rigoureuse. Les méthodes les plus utilisées sont : l'immunofluorescence indirecte (IFI) et les techniques immuno-enzymatiques (ELISA). D'autres méthodes ont été proposées comme l'hémagglutination et plus récemment l'immunochromatographie, qui a un statut particulier puisqu'elle est une méthode qualitative mais utilisée en dépistage.

Les méthodes qualitatives sont essentiellement représentées par le Western blot. Elles ont pour but d'étudier la nature des antigènes reconnus par le sérum lors de la mise en oeuvre initiale des méthodes quantitatives. Elles doivent être utilisées comme des techniques de confirmation ; c'est à dire uniquement en présence d'un taux d'Anticorps significatif.

Il existe un consensus pour une démarche diagnostique en deux temps ; une première étape dite de dépistage et une seconde dite de confirmation (Wilske, 2003).

Méthodes quantitatives :

- **L'Immunofluorescence indirecte (IFI) (figure 18)**. C'est la méthode qui a été utilisée en premier, pour la recherche des anticorps dans le sérum, le LCR et éventuellement dans le liquide articulaire. Les lames sont préparées le plus souvent à partir de la souche B31 (ATCC 35210) (espèce *B.burgdorferi* sensu stricto) dont la concentration est ajustée à 50 à 100 spirochètes par champ (x400) ([voir Annexes fiche technique](#))

L'IFI est bien adaptée au titrage des Ac totaux (Ig A+G+M) ou des IgG. Elle est moins adaptée à celle des IgM, probablement par manque de sensibilité, et par la nécessité d'une précipitation préalable des IgG qui sinon, entraîneraient des faux positifs par un phénomène classique de "concurrence". Nous avons déterminé les seuils de signification suivants : 1/256 dans le sérum et le liquide articulaire en IgG et en Ig totales (IgT), 1/32 pour les IgM dans le sérum, 1/4 dans le LCR pour les trois isotypes (Assous et coll. 1987, Assous 1989). Ils correspondent tous à au moins 95% des témoins négatifs ($p < 0,05$). Ils sont en accord avec ceux trouvés par la plupart des auteurs (Craft et coll. 1984, Magnarelli et coll. 1984, Russell et coll. 1984, Stiernstedt et coll. 1985, Wilske et coll. 1984) et avec les recommandations des fabricants.

L'IFI est une méthode bien adaptée au diagnostic de routine : elle est peu coûteuse, peut être utilisée pour des petites séries et permet un bon suivi du traitement dans les formes

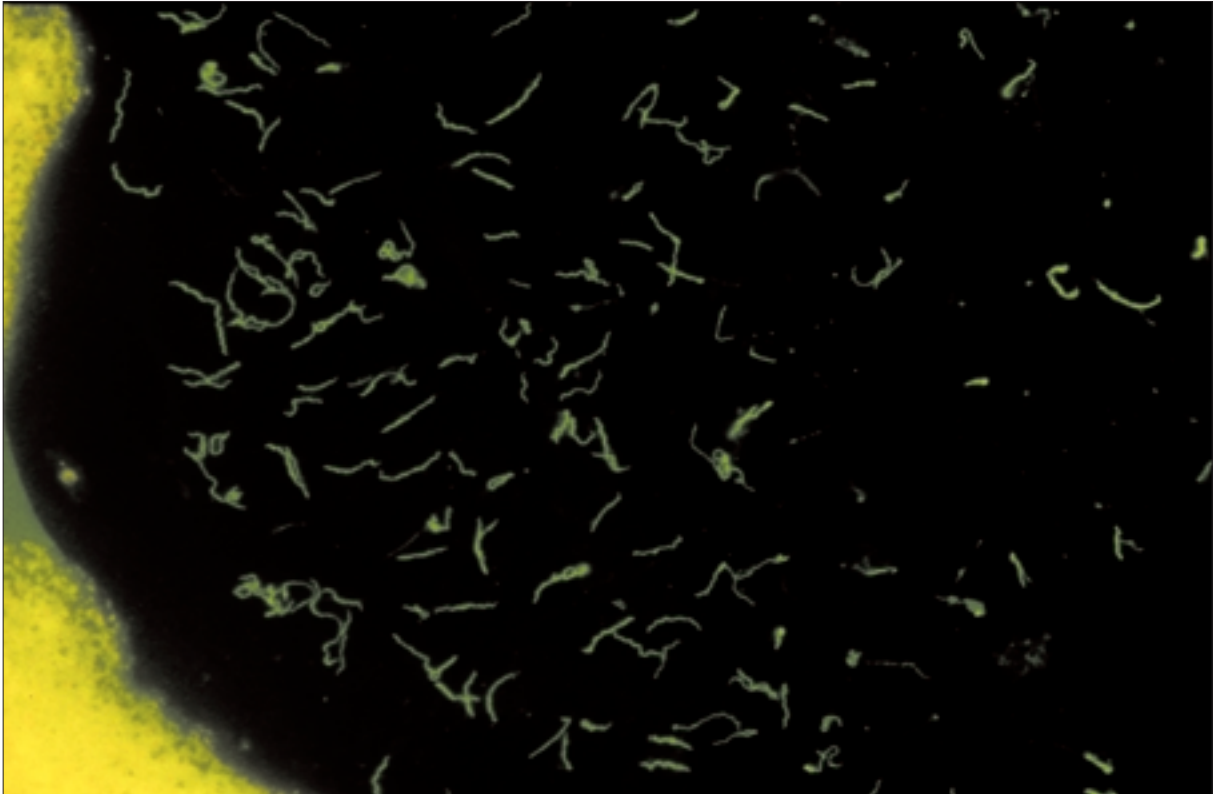


Figure 18 : Immunofluorescence indirecte positive

évolutives. On lui reproche souvent sa subjectivité qui est liée au manque d'entraînement du lecteur à apprécier l'intensité de la fluorescence observée, notamment du fait que les seuils de signification élevés utilisés font prendre en compte, à tort, des fluorescences faibles. En effet, l'extinction complète de la fluorescence nécessite au moins trois dilutions. La présence d'un témoin positif titré est donc indispensable. La lecture des IgM est très délicate car d'intensité faible et d'extinction lente.

Certains auteurs ont proposé de réaliser une adsorption préalable des sérums par *Treponema phagedenis* ou une autre bactérie antigéniquement "proche". Cette procédure est controversée, car si elle permet de diminuer effectivement le "bruit de fond" pour certains, c'est aux dépens des taux d'Ac spécifiques pour les autres (Craft et coll. 1984, Magnarelli et coll. 1984, Wilske et coll. 1984).

- Ces méthodes qui étaient utilisées en France, il y quelques années comme méthode de dépistage, ont été progressivement supplantées par les méthodes ELISA. Elles gardent dans notre expérience un intérêt comme méthode de confirmation et de suivi des taux d'anticorps dans les formes compliquées tardives (Arthrite et ACA). Elles sont moins sensible mais plus spécifique que l'ELISA, mais leur reproductibilité est nettement meilleure d'où leur utilité pour le suivi.

• **Les Techniques immuno-enzymatiques (ELISA ou EIA)**

Elles ont été décrites peu de temps après l'IFI (Magnarelli et coll. 1984, Stiernstedt et coll. 1985). Elles utilisent un antigène soluble protéique fixé au fond des microcupules. (voir Annexes fiche technique). Afin d'améliorer les performances de la sérologie, de très nombreuses équipes ont travaillé sur la nature de cet antigène soit par des procédures de purification, soit par des méthodes de génie génétique (Bergström et coll. 1991, Coleman et Benach 1987, Karlsson et coll. 1990b, Magnarelli et coll. 1989, Robinson et coll. 1993). Il existe actuellement des coffrets proposés sur le marché contenant des protéines recombinantes, voire des peptides de synthèse ou des combinaisons de ces différents types d'antigènes.

L'intérêt des méthodes ELISA réside notamment dans la possibilité qu'elles offrent de tester de grandes séries de prélèvements, avec une lecture finale automatisée et objective. En outre, elles sont plus sensibles que l'IFI, surtout pour la recherche des IgM. Il est, à notre sens, préférable d'utiliser une précipitation préalable des IgG, afin d'éliminer les réactions de concurrence avec les IgG spécifiques et les éventuelles interactions avec un facteur de type rhumatoïde.

Ces méthodes se sont imposées en quelques années et ont remplacé l'IFI dans de nombreux laboratoires. L'existence de tests mono-paramétriques (VIDAS-Lyme Biomérieux Sa et Abbott Lyme sur Imx) permet aussi au laboratoire d'activité modeste de réaliser les analyses à la demande.

Ces méthodes ELISA se sont avérées, dans notre expérience, particulièrement performantes dans la recherche des Ac dans le LCR surtout en début de maladie, en raison de leur seuil de significativité particulièrement bas (environ 10 fois moins que pour le sérum). Il faut cependant vérifier l'absence de contamination du prélèvement par du sang lors de la ponction. C'est à dire vérifier que la ponction lombaire n'a pas été hémorragique, sinon la recherche d'anticorps dans le LCR est ininterprétable. La littérature fait souvent mention du calcul de l'index LCR/sérum dont le but est de démontrer la sécrétion intrathécale des Ac en cas de suspicion de forme neurologique (Wilske, 2003 ; www.dghm.org/red/index.html?cname=MIQ). Dans notre expérience le recours à ce calcul a été exceptionnel si tant est que l'on dispose des commémoratifs cliniques du patient.

Une méthode d'hémagglutination passive a été développée (Laboratoires Diagast) dont le principe est similaire au TPHA pour la syphilis. Elle a l'avantage de pouvoir être utilisée aussi chez l'animal. Sa sensibilité se situerait entre l'IFI et l'ELISA.

Les tests immunochromatographiques ont été proposés sur le marché entre 2001 et 2002 ; Ils ont été développés dans le même esprit que pour les autres pathologies infectieuses ; à savoir des tests d'une sensibilité proche de l'ELISA et réalisable rapidement de manière unitaire " à la demande ". Si l'on rajoute leur coût modéré, ils sont des bons candidats pour les laboratoires de biologie médicale comme test de dépistage de première intention.

Méthodes qualitatives :

- **Le Western-blot ou Immuno-blot ou Immuno-empreinte.** Il a été initialement utilisé (Grodzicki et Steere 1988, Wilske et coll. 1986) pour étudier la réponse immunitaire chez les malades, dans un but physiopathologique. Il a été ensuite proposé comme une aide au diagnostic en tant que technique de confirmation, puis même comme technique de dépistage. Cette dernière application a été décevante et doit, à notre avis, être proscrite pour les raisons suivantes. C'est tout d'abord une méthode coûteuse et techniquement délicate, posant des problèmes de reproductibilité lors de l'électro-transfert. Les variations entre deux lots d'antigènes sont parfois importantes, entraînant ainsi des difficultés dans la production de bandelettes homogènes, bien que d'importantes améliorations aient été apportées dans le cadre des kits fabriqués par des professionnels du réactif. Mais surtout, il est très difficile de fixer des critères de positivité quantitatifs (en nombre de bandes) ; la valeur prédictive de chaque bande étant souvent différente (Zöller et coll. 1991). Par contre, elle a beaucoup d'intérêt en tant que technique de confirmation, pour affirmer ou infirmer la spécificité des Ac retrouvés lors des techniques quantitatives de dépistage. Une étude strasbourgeoise (Nicolini et coll. 1992) a cependant comparé les performances diagnostiques du western blot et de l'IFI pour un groupe de 10 patients atteints de neuroborrélioses, le western blot semblait plus sensible que l'IFI.

De nombreuses études, tout d'abord américaines puis européennes ont tenté de définir des critères de positivité afin de standardiser cet examen, mais il n'existe pas de consensus. Un des problèmes techniques rencontrés est la difficulté d'interprétation du poids moléculaire des bandes, si l'on utilise un immuno-blot fabriqué à partir d'antigènes natifs. En effet, il existe souvent un phénomène de co-migration qui empêche d'identifier précisément des bandes de poids moléculaires proches. Exemple : la p60 et la p59, la p41 et la p39. Dans ce cas, il est recommandé d'identifier les bandes réactives potentielles au niveau du témoin positif par des anticorps monoclonaux. L'arrivée récente sur le marché de bandes constituées uniquement de protéines recombinantes devrait améliorer cette situation (Wilske, 2003).

En France, la nomenclature des actes de biologie médicale, a retenu le western blot comme méthode de confirmation (B180). Le texte n'est pas clair quant aux indications de cette analyse. En tout état de cause, il est logique que ce test soit réalisé lorsqu'on peut en attendre un bénéfice, mais sa réalisation systématique devant toute sérologie positive n'est pas indiquée à notre sens et reviendrait trop cher, avec souvent un bénéfice inexistant.

Les résultats

Nous expliciterons dans des paragraphes séparés les différents paramètres en rapport avec les résultats des différentes techniques existantes dans le contexte du diagnostic biologique de routine.

Spécificité

Le problème évoqué par beaucoup d'auteurs est le "bruit de fond" élevé observé pour la borréliose de Lyme dans la population générale (voir [figure 19](#)). En effet, en IFI Ig totales (sans adsorption) par exemple, le seuil de significativité retenu (1/256) correspond à la dilution pour laquelle, 95 à 97% des témoins sont négatifs (cf. supra). C'est en effet un seuil élevé si l'on le compare avec d'autres sérologies bactériennes utilisant la même technique. En termes épidémiologiques, cela signifie que la prévalence des d'anticorps dans la population dite "générale" est compris entre 3 et 5 %. Pour des populations exposées : bûcherons, forestiers etc..., ce pourcentage peut atteindre 25 et 30% (Assous et coll. 1990, Doby et Couatarmanac'h 1986, Huycke et coll. 1992, Kuiper et coll. 1991, Smith et coll. 1991). Ainsi la spécificité est bien une valeur relative et le seuil de significativité fixe représente un seuil "moyen".

La spécificité dépend aussi du type d'échantillon. Ainsi le bruit de fond dans le LCR est quasiment nul (Assous et coll. 1987) si ce dernier n'a pas été contaminé par du sérum lors de la ponction. En conséquence un LCR hémorragique ne doit pas être testé en sérologie, vu le risque considérable de fausse positivité.

En ELISA, le seuil est déterminé en additionnant à la moyenne des densités optiques (DO) des témoins, 2 (1,96) ou 3 (2,6) écartypes selon les auteurs. Les recommandations européennes (Site Internet de l'EUCALB : <http://www.dis.strath.ac.uk/vie/LymeEU/>) ont proposé de tester au moins cent témoins négatifs de la population normale de la zone géographique et de vérifier qu'au moins 5% de ces témoins sont positifs.

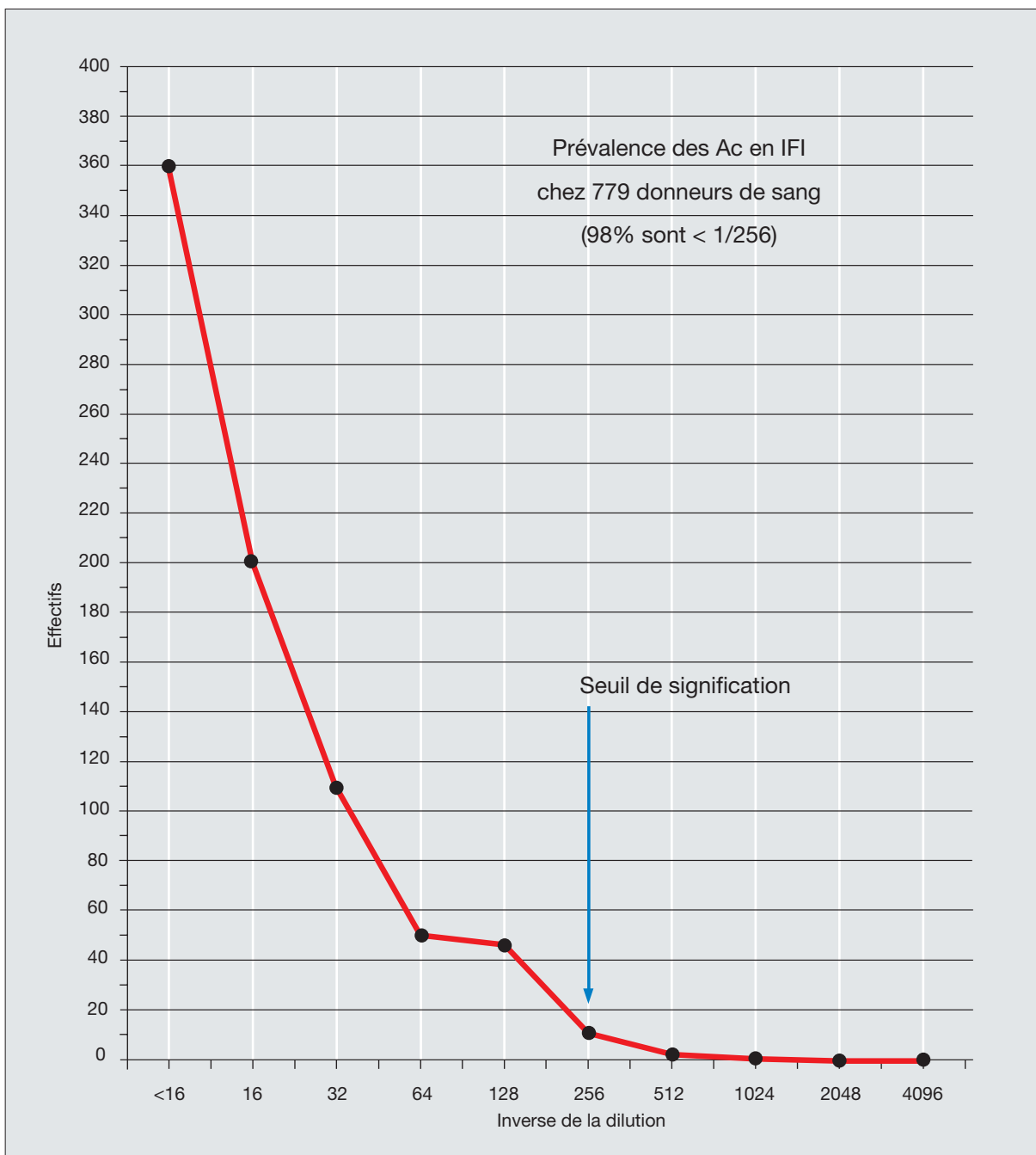


Figure 19 : Bruit de fond dans la population générale / spécificité

La spécificité dépend enfin de l'isotype recherché. Ainsi, la présence d'IgM spécifiques est le plus souvent synonyme d'affection évolutive ou récente alors que les IgG à des taux faibles sont résiduelles ou reflètent une exposition à la bactérie dans les populations à risque.

Enfin et c'est très important, la spécificité augmente avec le taux d'Ac. En effet, la valeur de la spécificité d'un coffret donné est calculée pour la valeur seuil. Si le serum testé atteint des valeurs double ou triple du seuil indiqué, la spécificité elle aussi augmente de manière très importante.

Sensibilité

Compte tenu des différences importantes dans la réponse en Ac selon la forme clinique, il est nécessaire d'évaluer ce paramètre séparément pour chacune d'entre elles. En effet, la borréliose de Lyme en Europe est actuellement considérée comme une entité nosologique constituée de plusieurs formes cliniques dont certaines sont d'authentiques maladies (figure 20).

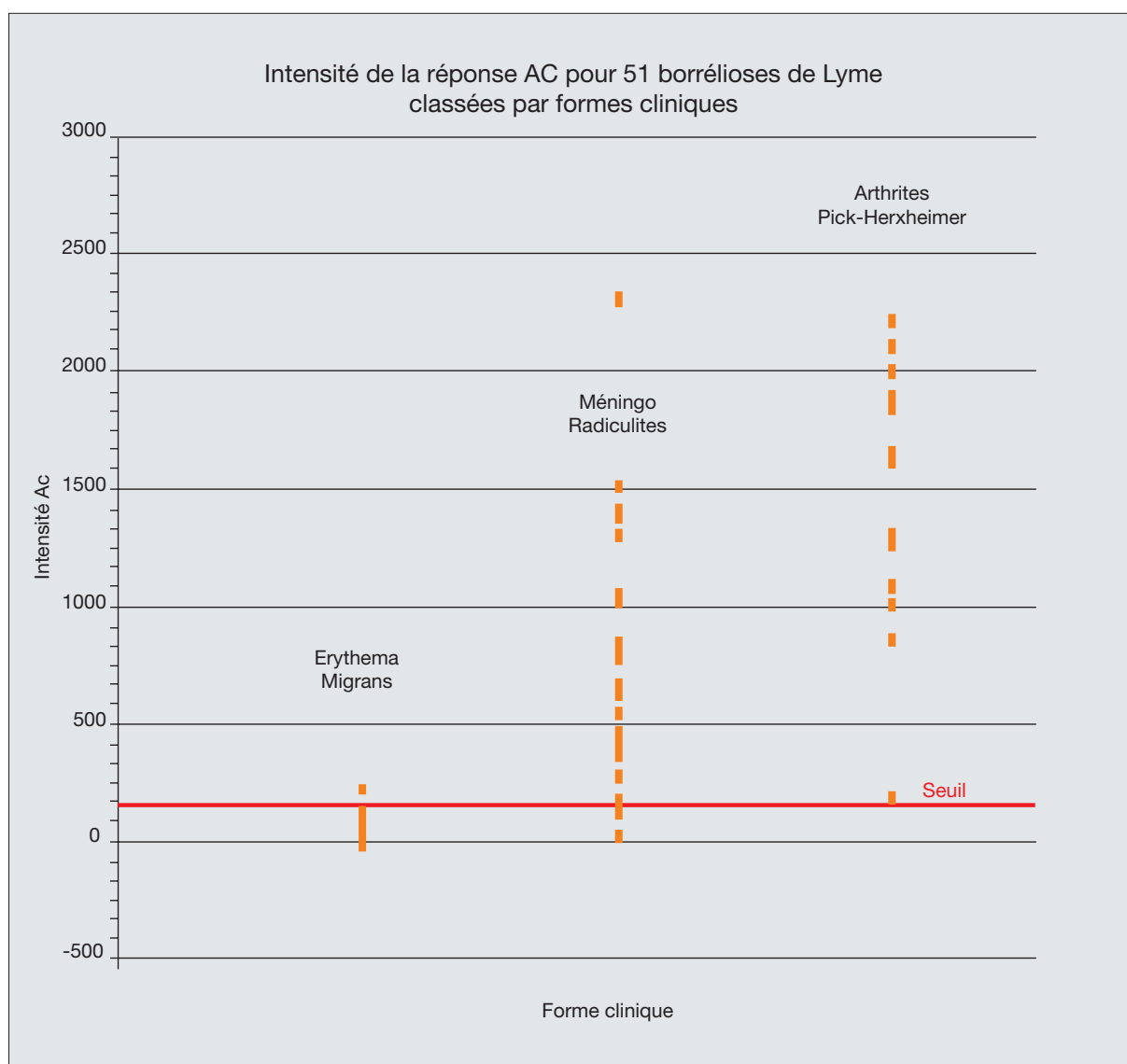


Figure 20 : Intensité de la réponse en anticorps en fonction de la forme clinique

Nous présentons nos résultats au [tableau 4](#) ; notre technique étant plus sensible les pourcentages indiqués sont un peu plus élevés que ceux indiqués dans le texte, qui correspondent à la synthèse de la littérature.

Tableau 4 : Sensibilité des différentes méthodes de dépistage

	<i>Forme contagieuse Erythema Migrans</i>	<i>Formes compliquées</i>				
		<i>précoces</i>			<i>tardives</i>	
		<i>MR/SER</i>	<i>MR/LCR</i>	<i>LCB</i>	<i>ACA</i>	<i>Arthrite</i>
ELISA IgM*	50%	100%	80%	80%	5%	10%
ELISA IgG*	50%	80%	100%	80%	100%	100%
IFI*	20%	50%	80%	50%	100%	100%

* : techniques développées au laboratoire de bactériologie de l'hôpital Cochin, Dr Marc V. Assous.

Pour l' *Erythema Migrans*, la réponse Ac est de faible intensité, elle n'est détectée, suivant les techniques et les auteurs, que chez 20 à 50% des patients.

Pour les formes cliniques dites secondaires, essentiellement les méningoradiculites, la sérologie est plus fréquemment positive mais les taux d'Ac sériques restent modérés. La sensibilité varie suivant les techniques de 70% à 90%. Dans ces formes cliniques, la recherche des anticorps dans le LCR est d'une très grande utilité (Assous et coll. 1987, Stiernstedt et coll. 1985). En effet, elle peut s'avérer positive alors que la recherche dans le sérum est négative, la production intrathécale de ces Ac ayant été démontrée (Wilske et coll. 1986). Ceci est encore plus vrai en technique ELISA où la sensibilité est supérieure à celle de l'IFI et où l'on observe des ratio élevés, très précocement dans l'affection. Il existe cependant de très rares méningoradiculites borréliennes totalement sero-négatives (environ 1%). Dans les formes plus tardives la réponse en Ac est encore plus intense, et d'autant plus que l'affection évolue depuis longtemps.

Dans les arthrites, les taux d'Ac sont particulièrement élevés, atteignant des valeurs supérieures à 1/1024 en IFI, avec une sensibilité de proche de 100%. Le liquide articulaire peut être étudié parallèlement, et montre parfois un taux supérieur d'une ou deux dilutions à celui du sérum.

Il en est de même pour les ACA, où la sensibilité est également très élevée, mais il a fallu plusieurs années d'évolution sans traitement pour atteindre ces valeurs.

Cinétique des anticorps - isotypes (figure 21)

Dans les EM, la lésion étant très localisée, la cinétique d'apparition des Ac est lente et justifie deux sérums à trois semaines d'intervalle. Lorsque la sérologie est démonstrative, on retrouvera généralement de faibles taux d' IgG et/ou d' IgM, souvent proches des taux seuils en IFI, ou des ratios (DO malade/DO seuil) compris entre 1 et 1,5 en ELISA.

Des valeurs à peine plus élevées sont retrouvées en début d'atteinte neurologique (radiculite isolée et débutante) mais de manière plus constante. En l'absence de diagnostic et de traitement à ce stade de début, le taux d'IgM va augmenter suivi par l'ascension des IgG. La méningite lymphocytaire se constitue de manière concomitante (voir figure 21).

Dans les arthrites et les ACA, on retrouve habituellement des taux fortement positifs (> 2 fois le seuil) et le plus souvent seulement en IgG.

Après traitement antibiotique la diminution des taux d'Ac est d'autant plus lente qu'ils étaient élevés. Après parfois une augmentation transitoire, survient une diminution significative des taux à 3 mois ou 6 mois suivant les cas ; l'IFI est la meilleure méthode pour le suivi des patients car les taux d'Ac diminuent déjà au bout de trois mois (Zöller et coll. 1989).

Chez les patients traités et guéris, il peut subsister des taux d' Ac dits "cicatriciels" faiblement positifs en IgG pendant des années.

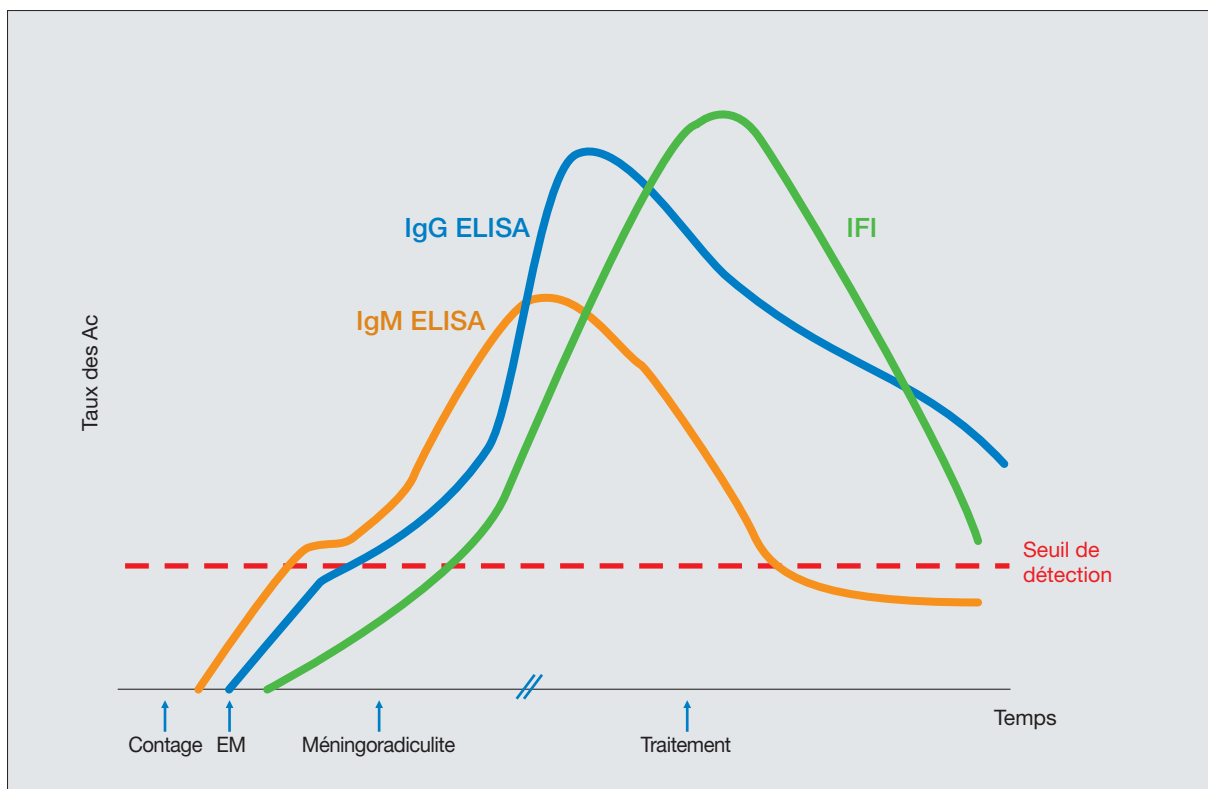


Figure 21 : cinétique des anticorps en fonction de la méthode (méningoradiculite)

Réactions croisées (tableau 5)

Les travaux déjà publiés ont permis de cerner les différents contextes dans lesquels des réactions croisées étaient impliquées. On peut ainsi distinguer deux grands groupes i) celui de la syphilis et des tréponématoses (Le Flohic et coll. 1986, Magnarelli et coll. 1987, Magnarelli et coll. 1990, Raoult et coll. 1989) où il s'agit d'une authentique réaction croisée au sens immunologique du terme : communauté antigénique vraie entre ces deux espèces bactériennes ; ii) le cas des autres réactions décrites, où il s'agit plutôt de phénomènes d'interférence technique et/ou immunologique (Barka et coll. 1990, Fawcett et coll. 1992, Lovece et coll. 1991).

Tableau 5 : Réactions croisées en fonction de la méthode sérologique

	<i>Populations étudiées</i>		
	<i>Syphilis</i>	<i>Maladies auto-immunes</i>	<i>Leptospirose</i>
IFI	95%	100%	100%
ELISA IgM	89%	91%	99%
ELISA IgG	59%	80%	14%

Syphilis : 100 sérums consécutifs positifs non redondants

Mai : 33 FAN, 13 AT, 25 ACL, 31 FR consécutifs positifs non redondants

Leptospirose : 100 sérums consécutifs positifs non redondants

Nous avons comparé la fréquence des difficultés d'interprétation des résultats en IFI et en ELISA, pour des populations de sérums appartenant aux trois groupes régulièrement décrits pour leurs éventuelles "réactions croisées" (Dufour et coll. 1993).

- Pour la syphilis, sur 100 sérums consécutifs positifs en TPHA et/ou VDRL, seulement 5% étaient positifs en IFI, contre 11% en ELISA IgM et 41% en ELISA IgG. De plus, les taux vis-à-vis des deux antigènes sont assez bien corrélés. Notre expérience nous a montré que ces réactions croisées avec la syphilis étaient "unidirectionnelles" ce qui signifie que les sérums de patients atteints de borréliose de Lyme étaient toujours négatifs en TPHA et VDRL (pas toujours en FTA). En conséquence, l'attitude la plus efficace en termes de rapidité, de coût et de certitude diagnostique consistera à contrôler en TPHA tous les sérums positifs en sérologie de Lyme. Cette attitude n'est pas prônée par les auteurs internationaux qui sont le plus souvent des spécialistes qui ne disposent pas facilement de ce test en routine. C'est cependant la méthode la plus simple et la plus fiable. En effet, seuls les Ac tréponémiques donneront une réaction positive et TPHA et jamais les Ac anti-*Borrelia*.
- Les maladies auto-immunes représentent une autre circonstance de "réactions croisées" régulièrement décrite (Fawcett et coll. 1992, Lovece et coll. 1991). En étudiant 100 sérums

consécutifs positifs en Facteurs antinucléaires, ou en Ac anti-tissus, ou en Ac anti-cardiolipine, ou en Facteur rhumatoïde, nous avons montré l'absence de positivité en IFI (IgT) contre 9% en ELISA IgM et 18% en ELISA IgG, avec toutefois des Ratios modérés compris entre 1 et 1,5.

- Les leptospires représentent un genre bactérien phylogénétiquement apparenté qu'il était donc aussi intéressant d'étudier. Cent sérums consécutifs positifs en ELISA IgM et/ou Micro Agglutination Test ont été testés vis-à-vis de *B. burgdorferi* sl. Aucun ne croisait en IFI, 99% étaient négatifs en IgM ELISA. Par contre, en IgG ELISA 86% des sérum étaient positifs, mais l'analyse de la distribution des ratios obtenus montrait l'absence de distribution gaussienne des taux d'Ac, ce qui est plutôt en faveur d'un phénomène d'interférence non proportionnel à de la dilution. En pratique, ce type de réaction est exceptionnel vu la fréquence relative de chaque affection. Il est possible que la décomplémentation des sérums obligatoire pour réaliser le test de Martin et Pettit, soit en partie responsable de ce phénomène.

En IgM, un problème fréquemment rencontré est les réactions croisées rencontrées avec le virus EBV et les *Herpesviridae* en général. Cette réaction est bien documentée et peut être de forte intensité (ratios élevés). Elle est d'autant plus gênante que ces virus entraînent des troubles neurologiques qui rentrent dans le cadre du diagnostic différentiel de la borréliose de Lyme. Pour faire la différence, on pourra s'aider du taux des IgG, qui est normalement positif dans les formes neurologiques de borréliose. Si nécessaire, des sérologies des *Herpesviridae* pourront être réalisées.

A propos de la notion d'exposition (figure 22A, 22B, 22C)

Les Ac retrouvés chez les patients dits "exposés" (professions avec activité forestière, chasseurs, randonneurs etc...) ne sont pas à interpréter comme des réactions croisées. L'origine des ces Ac peut s'expliquer de différentes façons. L'explication la plus classique dans la littérature, et à notre sens la moins fréquente, est celle d'une infection antérieure inapparente. Cette éventualité nous paraît en effet survenir selon une fréquence faible même s'il est vrai qu'un EM peut passer inaperçu. Une hypothèse plus probable nous semble l'exposition répétée à des morsures de tiques. Ces tiques peuvent être infestés par des quantités faibles de *Borrelia* et/ou par des espèces de *Borrelia* non pathogènes. Dans ce cas, les bactéries seront reconnues par le système immunitaire de l'hôte comme "étrangères" et une réponse immunitaire sera donc enclenchée avec le recrutement de clones spécifiques. Mais il n'y aura pas de maladie clinique, parce que : la souche n'est pas pathogène et/ou la quantité de bactéries est insuffisante pour entraîner une infection et/ou le système immunitaire du sujet contrôle détruit l'agent infectieux. Ainsi il y aura eu Ac sans infection au sens clinique

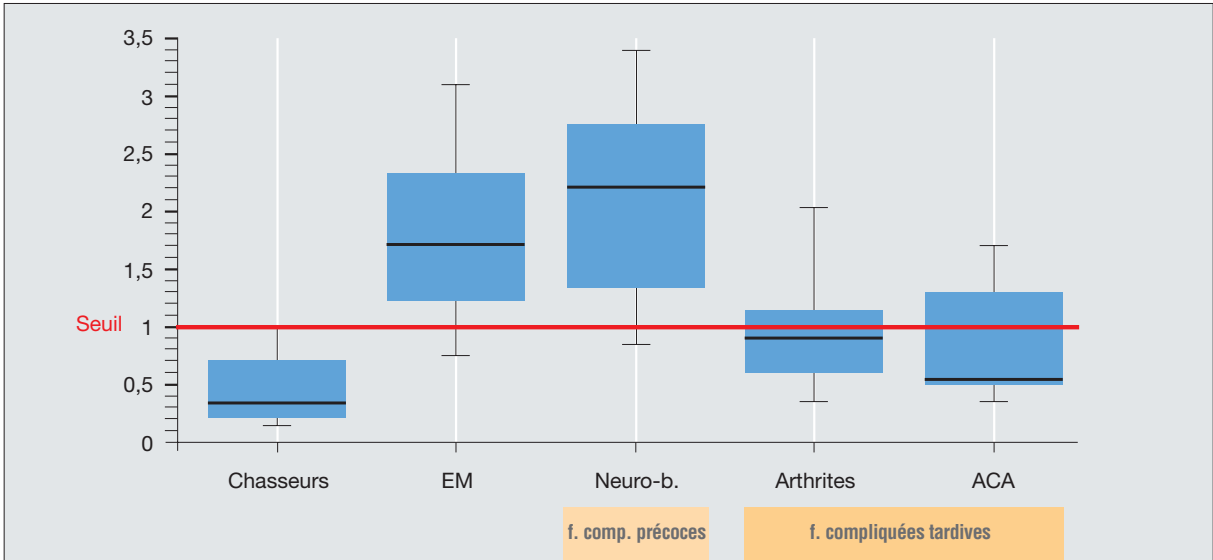


Figure 22A : Distribution des ratios en ELISA IgG pour chaque population

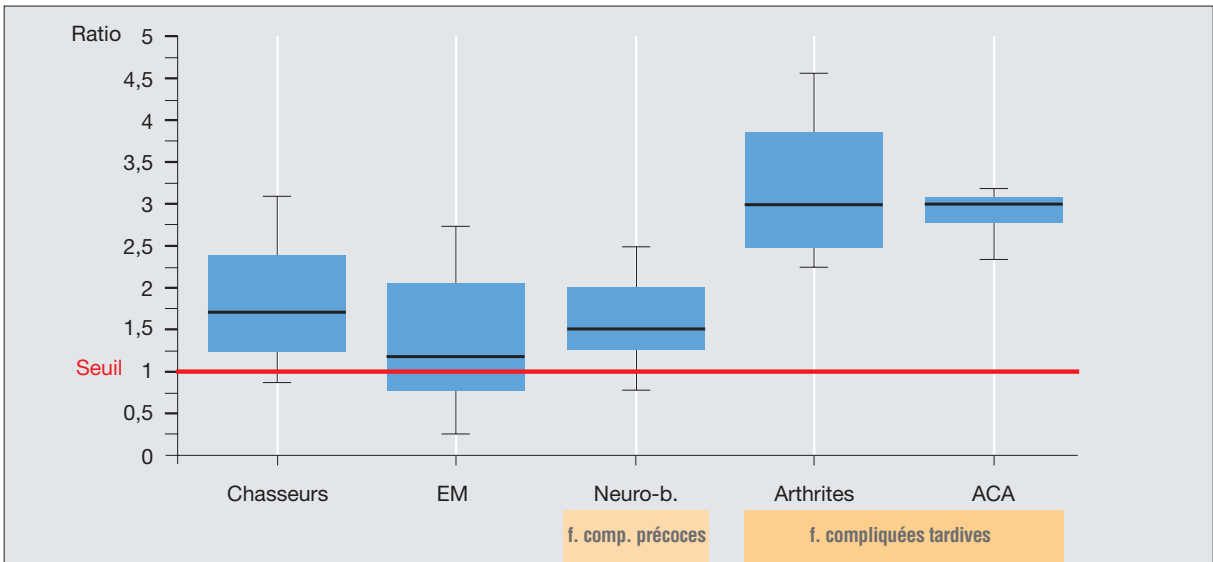


Figure 22B : Distribution des ratios en ELISA IgM pour chaque population

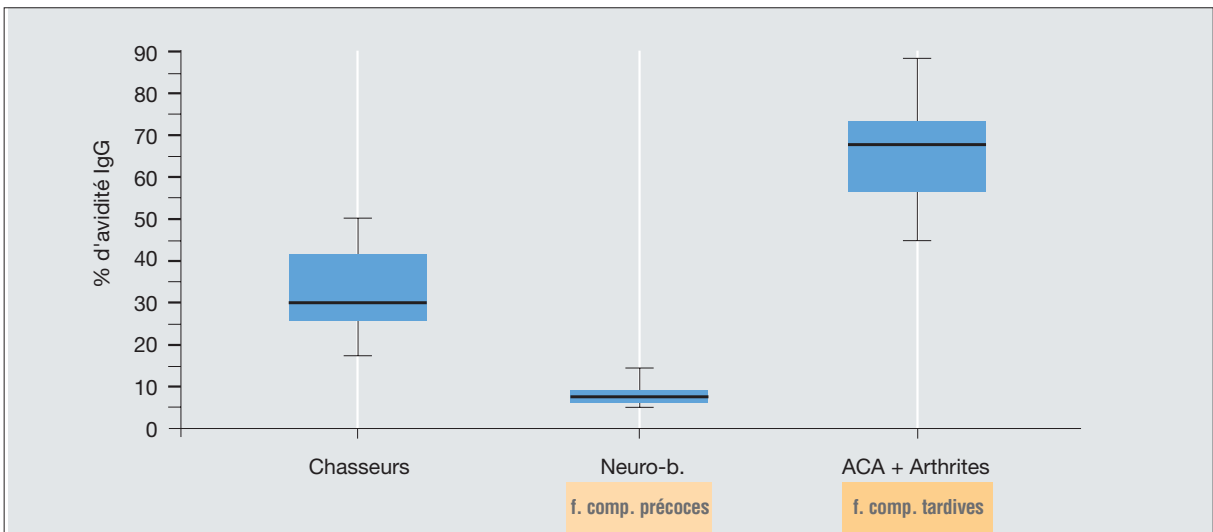


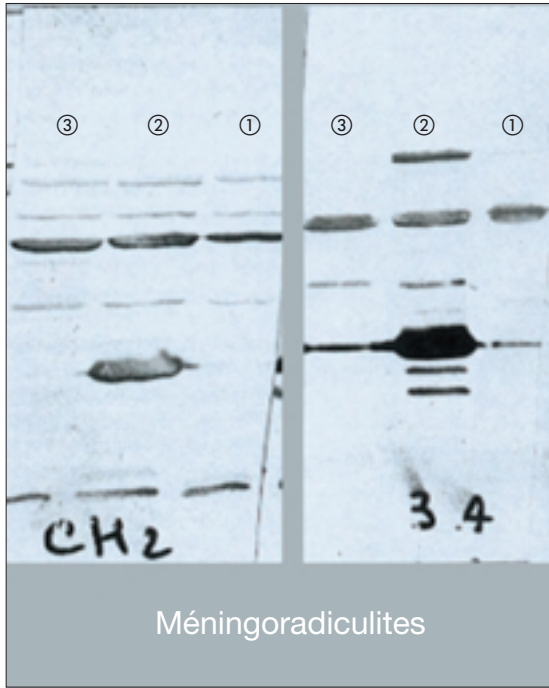
Figure 22C : Avidité des anticorps en fonction de chaque population

du terme. Les expositions répétées pourront entraîner le recrutement de nombreux clones entraînant dans certains cas des taux d'Ac très élevés. En conclusion, cette réponse anticorps au sens immunologique est "spécifique", mais elle n'est pas le témoin d'une infection évolutive.

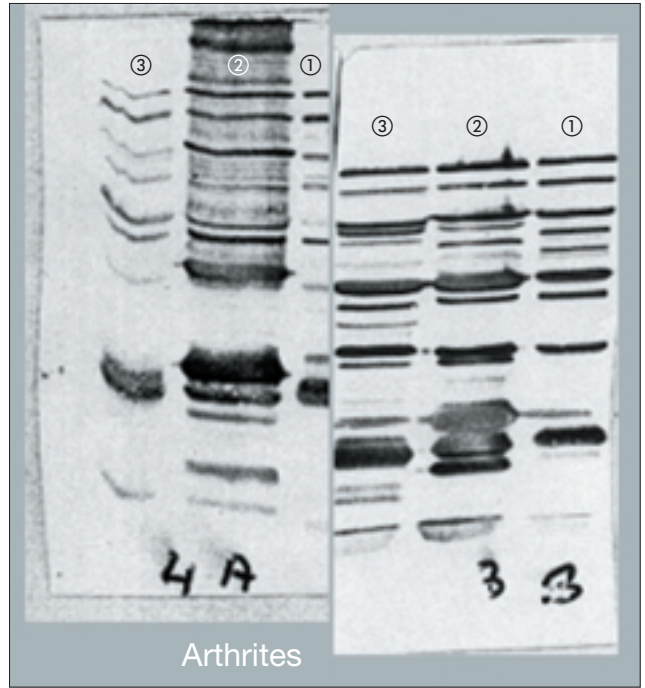
Nous avons étudié en collaboration avec l'Observatoire Rural de la Châtre (Dr Christiann, Dr Rayet) une cohorte de chasseurs à la fois par ELISA et par western blot. Le taux de positif était de 15% en ELISA de dépistage soit 3 à 4 fois plus que la population générale. Des immuno-blots ont été réalisés qui montraient un grand nombre de bandes pour la majorité des patients mais avec une intensité faible. Pour bien illustrer ce phénomène nous avons regroupé à la [figure 23](#), des membranes d'immuno-blot représentatives de ce groupe de patients ainsi que des deux formes cliniques compliquées les plus fréquente de borréliose de Lyme ; à savoir les formes neurologiques (méningoradiculites) et les formes rhumatologiques (arthrites). Comme on le constate les patients exposés présentent un grand nombre de bandes, mais de faible intensité, alors que les formes compliquées précoces présentent peu de bandes mais de forte intensité et que les formes compliquées tardives, de nombreuses bandes de forte intensité.

Apport de l'avidité

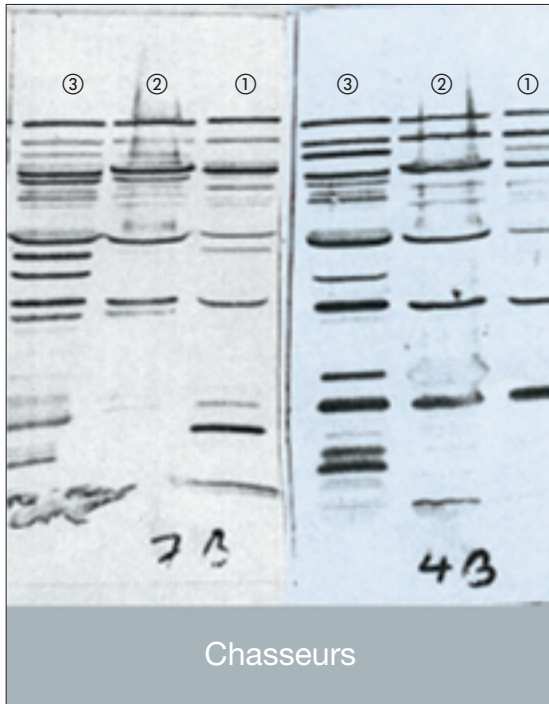
L'avidité des anticorps est utilisée dans plusieurs infections afin de dater leur l'ancienneté. En effet, il a été démontré que l'avidité des anticorps IgG augmente au fur et à mesure de l'évolution à condition qu'elle soit testée sur un antigène natif afin de pouvoir évaluer l'ensemble du répertoire immunologique potentiel de l'agent infectieux. Le principe technique est simple et consiste à rajouter une étape d'incubation courte en présence d'une solution d'urée à la fin de l'incubation et de comparer la DO par rapport à un témoin sans urée. Nous avons étudié les mêmes trois populations déjà citées (Chasseurs, méningoradiculites et formes tardives) dans l'hypothèse que l'avidité aiderait au diagnostic différentiel (Basse Guérineau et coll, 1999). Comme cela est illustré à la figure 22C, les patients exposés ont un pourcentage d'avidité intermédiaire entre celui des méningoradiculite (inférieur à 20%) et celui des formes compliquées tardives (supérieur à 60%). Ainsi, la combinaison des différents marqueurs IgG, IgM et avidité permettrait notamment de distinguer une borréliose récente évolutive (IgM positifs, avidité basse) d'une exposition (absence d'IgM, avidité modérée).



Méningoradiculites



Arthrites



Chasseurs

Chaque membrane est sensibilisée avec la souche type de chaque espèce : B31 ①, 20047 ②, VS46 ③

Figure 23 : Réactivité du western blot en fonction du groupe clinique

Evaluations

Il existe dans la bibliographie internationale de nombreux articles d'évaluation ou de comparaison de coffrets commercialisés ELISA ou Immunoblots. Ce type d'étude présente un intérêt limité en pratique courante car elles font toujours appel à des populations bien définies de sérums qui ne prédisent pas toujours le comportement de ces coffrets en routine.

Dans un travail en cours de publication (Zachary, P et coll et RICAI 2001) une étude comparative exhaustive a été réalisée afin de comparer les différents ELISA proposés en France (tableau 6). Malgré la mise sur le marché de nouveaux coffrets ; les résultats sont encore très actuels. Ils ne montraient pas de supériorité significative des nouveaux tests utilisant des protéines recombinantes. Les coffrets proposant des peptides de synthèse, qui

Tableau 6 : Liste des coffrets ELISA Lyme et de leurs caractéristiques

Tests	Fabricants	Ig	Méthode	Antigènes
• Elilyme	Diagast	G/M	ELISA	<i>B. burgdorferi ss</i> (B31)
• Borrelia burgdorferi	Virotech GmbH	G/M	ELISA	<i>B. burgdorferi ss</i> (2591)
VIR-ELISAtest	Biotest AG	G/M	ELISA	<i>B. afzelii</i> (Pko)
• Enzygnost Borreliosis	Dade-Behring	G/M	ELISA	<i>B. afzelii</i> (Pko)
• IDEIABorrelia burgdorferi	Dako	G/M	ELISA	p41 purified (<i>B. burgdorferi ss</i> DK)
Lyme ELIT IgG/IgM	MRL	G/M	ELISA	<i>B. garinii</i> (20047) + <i>B. burgdorferi ss</i> (CB)
Borrelia IgG, IgM ELISA	Meridian	G/M	ELISA	<i>B. afzelii</i> (VS461) + <i>B. burgdorferi ss</i> (IRS)
Serion ELISAclassic	Serion GmbH	G/M M	ELISA ELISA	<i>B. afzelii</i> (Pko) + <i>B. burgdorferi ss</i> (B31), p41 rec OspC and p41 rec (Pko) + p41 rec (Pbi)
ImmunoWELL Borrelia	Genbio	Totales	ELISA	B31 + p39 rec
Borrelia burgdorferi IgG/IgM	Sigma	Totales	ELISA	B31
ELISALyme	Bio-Rad	Totales	ELISA	B31
VIDASLyme	BioMerieux	Totales	ELFA	B31
RapidScope (Microbe Scope)	Virion	Totales	Immuno- chromato	IRS
Lymetop	Alldiag	Totales	Immuno- chromato	<i>B. burgdorferi ss</i> (B31)
Borréliose de Lyme IgG/IgM	Abbott	G/M M	MEIA	IRS + P41 rec (B31) + OspC rec pour IgM
Borrelie-ELISA	Biotest AG	G	ELISA	p100, OspC, p18 and p41 rec (Pko) + p41 rec (<i>B. garinii</i> Pbi)
Borrelia burgdorferi EIA	Bioadvance	Totales	ELISA	Peptide C6 (IR 6 de VisE de B31)
Borrelia Liaison	DiaSorin	G/M	Chemilumi- nescence	IgG : VisE de Pbi IgM : OspC de Pko
Enzygnost Borreliosis II	Dade-Behring	G/M	ELISA	???

Document aimablement fourni par le docteur Benoît Jaulhac, Laboratoire Associé au CNR des Borrelia, Strasbourg.

étaient en développement lors cette étude notamment le peptide C6, montrent des résultats intéressants (Mogilyansky et coll. 2004). D'autres formulations sont en développement tant en ELISA qu'en Immunoblots, qui utiliseront des combinaisons optimisées d'antigènes natifs et/ou de protéines recombinantes et/ou de peptides de synthèse.

Diagnostic biologique : conclusions

Le cas de la borréliose de Lyme est un excellent exemple de la difficulté d'interprétation du diagnostic biologique indirect. Tous les éléments que nous avons décrit interviennent pour compliquer l'analyse : bruit de fond élevé dans la population générale, variation de la prévalence suivant les populations, existence de réactions croisées, variabilité des résultats suivant la forme clinique de l'affection, grand nombre des spécialités médicales concernées par cette affection, éventail de cas reportés recouvrant un très grand nombre de pathologies (fibromyalgie, dépression, irritabilité, troubles du sommeil, démences etc...) vulgarisation des "connaissances" par médiatisation grand public, fréquence trop faible de l'affection pour que chaque praticien dispose d'une expérience personnelle.

Insistons sur un dernier point, valable pour toutes les sérologies infectieuses : "la présence d'anticorps même spécifiques n'est pas synonyme de maladie évolutive".

Pour récapituler les points clés de ce chapitre, nous présentons au [tableau 7](#), à la [figure 24](#) et au [tableau 8](#), une synthèse pratique pour le biologiste fruit de 15 ans d'expérience dans le diagnostic de cette affection.

Tableau 7 : Indications pour la prescription d'une sérologie de Lyme

Indications certaines
- Méningo-radiculite et/ou paralysie faciale
- Arthrite(s) (du genou)
- Acrodermatite Chronique Atrophiante (ACA) = Pick Herxheimer
- Lymphocytome Cutané Bénin (LCB)
- BAV sur cœur sain
Autres indications
- Erythème migrant
- Arthralgies
- Att. neurologiques diverses
- Syndrome après morsure de tiques

Figure 24 : Arbre décisionnel et interprétatif d'une sérologie de Lyme

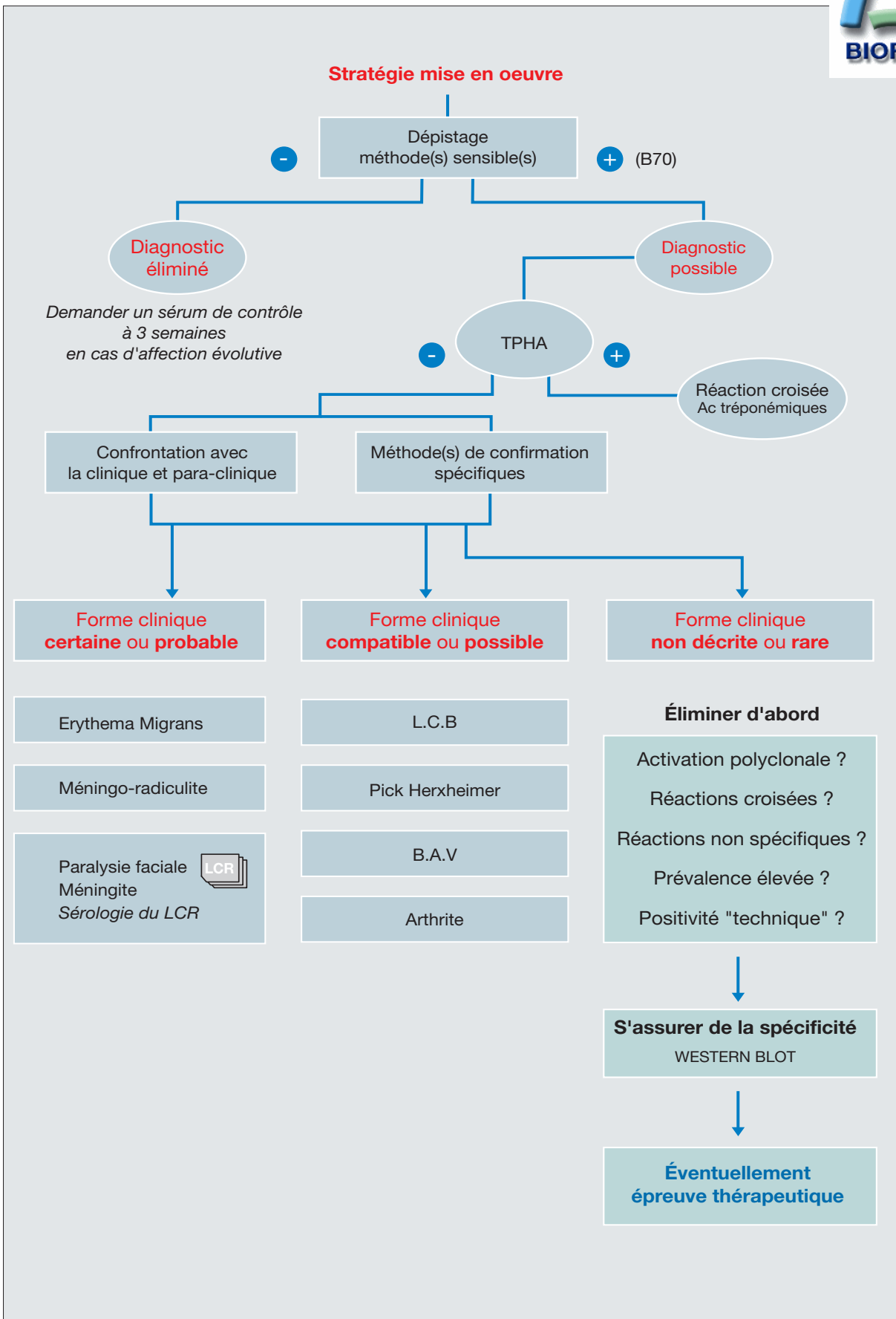


Tableau 8 : Suivi sérologique d'un cas de Lyme positif

C'est l'évolution clinique qui doit être favorable
La sérologie montre une diminution progressive des taux d'Ac, parfois lente.
Si IgM positifs, ils doivent disparaître en 1 à 2 mois
Pas de LCR de contrôle
Un sérum à 1 mois, 3 ou 6 mois et un an

Aspects thérapeutiques

Les traitements antibiotiques institués initialement ont tenu compte de l'appartenance de l'agent causal à la famille des Spirochaetaceae. Les trois grandes familles les plus utilisées sont donc les Beta-lactamines, les tétracyclines et les macrolides.

In vitro, *Borrelia burgdorferi* sensu lato est extrêmement sensible à un large spectre d'antibiotiques avec des CMI très basses (Agger et coll. 1992, Johnson et coll. 1987, Johnson et coll. 1984, Preac-Mursic et coll. 1986, Preac-Mursic et coll. 1987). L'efficacité in vivo a été également étudiée sur les différents modèles animaux disponibles.

Tableau 6 : Traitement antibiotique de la borréliose de Lyme selon de la forme clinique

(D'après la littérature et notre expérience)

Forme clinique	Antibiotiques Voie d'administration*	Posologie	Durée du traitement
Forme de contagé			
Erythema migrans	Amoxicilline PO	2g/j	10 à 21 jours
	Doxycycline PO	200mg/j	
Formes compliquées précoces			
Neuroborréliose	Ceftriaxone IM	1g/j	14 à 30 jours
	Penicilline IV	12MU/j	
	Doxycycline PO	200mg/j	
Lymphocytome cutané bénin (LCB)	Amoxicilline PO	2g/j	21 jours
	Doxycycline PO	200mg/j	
Atteinte cardiaque	Amoxicilline PO Doxycycline PO	2g/j 200mg/j	14 à 30 jours
Formes compliquées tardives			
Arthrite	Amoxicilline PO	2g/j	14 à 30 jours
	Doxycycline PO	200mg/j	
Acrodermatite Chronique Atrophiante (ACA)	Amoxicilline PO Doxycycline PO	2g/j 200mg/j	30 jours

* : L'azithromycine a été proposée comme traitement de seconde intention, mais semble moins efficace.

Les schémas thérapeutiques ne sont pas définitivement établis en raison de la difficulté à mener des études en double aveugle sur un nombre suffisant de cas. Dans la conduite du traitement, on tient compte de la forme clinique et du délai d'évolution de l'affection. Plus le diagnostic est tardif, plus le traitement sera prolongé. Dans les formes tardives (arthrites chroniques ou Pick-Herxheimer), il est classique de considérer qu'une partie des lésions est séquellaire ou "cicatricielle" et réagira de manière modérée au traitement antibiotique. Notre collaboration avec les cliniciens (Bisagni Faure A. et coll. 1993, Havard et coll. 1992) va contre cet avis et a montré très fréquemment une évolution favorable, si le traitement est poursuivi suffisamment longtemps (plusieurs mois).

Après tout séjour en forêt, une prévention efficace consiste à rechercher le soir même, sur tout le revêtement cutané, la présence de tiques en s'intéressant aux zones électives de piqûre. Dans les jours qui suivent, il peut être utile de renouveler cette opération, les nymphes non gorgées étant minuscules elles seront plus facilement détectables en cours de gorgement. La tique peut être anesthésiée avec de l'éther ou un composé aromatique et retirée aisément, puis identifiée. La conduite à tenir en cas de piqûre de tique ne fait pas l'unanimité. Faut-il traiter préventivement par des antibiotiques ou pas? Un consensus se dégage en Europe pour surveiller la piqûre de tique et traiter dès l'apparition d'un EM. Aux États Unis, la tendance est de réaliser une sérologie à j0 et à j15 ou j21 et le patient sera systématiquement traité s'il existe une ascension du taux des Ac.

La demande pour un vaccin est renforcée par l'impossibilité d'intervenir "en amont" de l'infection, à cause de l'étendue et de la complexité des systèmes réservoirs-hôtes-vecteurs-bactéries (cf. supra). En raison de leur forte immunogénicité, les candidats les plus souvent retenus comme constituants d'un futur vaccin sont les protéines de membrane externe (OspA ou OspC particulièrement). Mais la variabilité de ces protéines chez les différentes souches de *Borrelia burgdorferi* sensu lato empêche le plus souvent une protection suffisamment large et, au moins en Europe, il semble nécessaire de faire appel à un mélange de protéines (Lovrich et coll. 1994).

Bibliographie

- Lyme Disease. *First International Symposium*, 1984. The Yale Journal of Biology and Medicine.
- Lyme Borreliosis. *Second International Symposium on Lyme Disease and Related Disorders*, 1985. Vienna. Gustav Fischer verlag.
- Lyme Disease surveillance - United States, 1989-1990 (Reprinted from Morbidity and Mortality Weekly Report, Vol 40, Pg 417-421, 1991). JAMA, 1991, **266**, 470-471.
- Lyme disease - united states, 1991-1992 (Reprinted from MMWR, vol 42, pg 345, 1993). JAMA, 1993b, **269**, 2724.
- Adam, T., Gassmann, G.S., Rasiah, C. & Göbel, U.B., Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from various sources. *Infect. Immun.*, 1991, **59**, 2579-2585.
- Afzelius, A., Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. *Arch. Dermatol. Syph.*, 1910, **110**, 404.
- Agger, W.A., Callister, S.M. & Jobe, D.A., In vitro Susceptibilities of *Borrelia burgdorferi* to 5 Oral Cephalosporins and Ceftriaxone. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1992, **36**, 1788-1790.
- Ai, C.X., Zhang, W.F. & Zhao, J.H., Sero-epidemiology of lyme disease in an endemic area in china. *Microbiol Immunol*, 1994, **38**, 505-509.
- Amouriaux, P., Assous, M., Margarita, D., Baranton, G. & Saint Girons, I., Polymerase chain reaction with the 30-kb circular plasmid of *Borrelia burgdorferi* B31 as a target for detection of the Lyme borreliosis agents in the cerebrospinal fluid. *Res. Microbiol.*, 1993, **144**, 211-219.
- Anderson, J.F., Doby, J.M., Courtarmanac'h, A., Hyde, F.W. & Johnson, R.C., Différences antigéniques entre des souches de *Borrelia burgdorferi* isolées d'*Ixodes ricinus* en Bretagne. *Méd. Mal. Infect.*, 1986a, **3**, 171-175.
- Anderson, J.F., Johnson, R.C., Magnarelli, L.A. & F.W., H., Involvement of birds in the epidemiology of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.*, 1986b, **51**, 394-396.
- Anderson, J.F., Magnarelli, L.A., Burgdorfer, W. & Barbour, A.G., Spirochetes in *Ixodes dammini* and mammals from Connecticut. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1983, **32**, 818-824.
- Assous, M., Candalot, B. & Dournon, E., Maladie de Lyme : Intérêt diagnostique du titrage des anticorps dans le liquide céphalo-rachidien. *Presse Méd.*, 1987, **16**, 310-311.
- Assous, M.V., A propos du diagnostic biologique de la Borréliose de Lyme. *Med. Mal. Infect.*, 1989, **19**, 734-740.

- Assous, M.V., Benhamou, C.L., Gauvain, J.B., Conte, P., Vinzia, C. & Soufflet, L., Prevalence of Antibodies against *Borrelia burgdorferi* in the area of Orléans (France). IV *international Conference On Lyme Borreliosis.*, 1990. Stockholm, Sweden, June 18-21. W/TH-P-26, p62.
- Assous, M. V., D. Postic, G. Paul, P. Nénot, and G. Baranton 1993. Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**:261-268.
- Bannwarth, A., Chronische lymphocytare meningitis, entzündliche polyneuritis and "rheumtismus". *Arch. Psychiatr. Nervenkr.*, 1941, **113**, 284-376.
- Bannwarth, A., Zur Klinik und Pathogenese der "chronischen lymphocytaren Meningitis". *Arch. Psychiatr. Nervenkr.*, 1944, **117**, 161-185.
- Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J.C., Assous, M. & Grimont, P.A.D., Delineation of *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and Group VS461 Associated with Lyme Borreliosis. *Int. J. Syst. Bact.*, 1992, **42**, 378-383.
- Barbour, A.G., Immunochemical analysis of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.*, 1984a, **57**, 581-586.
- Barbour, A.G., Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.*, 1984b, **57**, 521-525.
- Barbour, A.G., Burgdorfer, W., Hayes, S.F., Peter, O. & Aeschlimann, A., Isolation of cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of switzerland. *Curr. Microbiol.*, 1983, **8**, 123-126.
- Barbour, A.G. & Garon, C.F., Linear plasmids of the bacterium *Borrelia burgdorferi* have covalently closed ends. *Science*, 1987, **237**, 409-411.
- Barbour, A.G. & Hayes, S.F., Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Reviews*, 1986, **50**, 381-400.
- Barbour, A.G., Heiland, R.A. & Howe, T.R., Heterogeneity of major proteins in Lyme disease *Borreliae* : A molecular analysis of North American and European isolates. *J. Infect. Dis.*, 1985, **152**, 478-484.
- Barbour, A.G., Tessier, S.L. & Todd, W.J., Lyme disease spirochetes and *Ixodid* tick spirochetes share a common surface antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Infect. Immun.*, 1983, **41**, 795-804.
- Baril, C., Richaud, C., Baranton, G. & Saint Girons, I., Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. *Res. Microbiol.*, 1989, **140**, 507-516.
- Barka, N.E., Agopian, M.S. & Peter, J.B., False positive IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi* in indirect ELISA as a result of IgM Rheumatoid factor. *J. Infect. dis.*, 1990, **161**, 1312.
- Basse Guérineau, A. L., R. Dhôte, F. Christiann, P. Rayet, and M. V. Assous 1999. Differentiation between early and late complicated Lyme borreliosis by specific IgG avidity *The Lancet*. **354** :1096-97.
- Bergström, S., Sjöstedt, A., Dotevall, L., Kaijser, B., Ekstrand-Hammarström, B., Wallberg, C.,

Skogman, G. & Barbour, A.G., Diagnosis of Lyme Borreliosis by Enzyme Immunoassay detecting Immunoglobulin G reactive to purified *Borrelia burgdorferi* cell components. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1991, **10**, 422-427.

Bisagni Faure A., Job Deslandre C., Assous, M. & J., M.C., Arthrite de Lyme : étude de la réponse immunitaire de 3 souches différentes de *Borrelia burgdorferi* à propos de 12 malades. *3^{ème} Journées d'Actualités en physiopathologie et Pharmacologie articulaires*, 1993. Nancy (France).

Boerlin, P., Péter, O., Bretz, A.G., Postic, D., Baranton, G. & Piffaretti, J.C., Population Genetic Analysis of *Borrelia-Burgdorferi* Isolates by Multilocus Enzyme Electrophoresis. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 1677-1683.

Buchwald, A., Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut-Atrophie. *Arch. Dermatol Syph.*, 1883, **10**, 553-556.

Burckhardt, J.L., Zu Frage der Follikel und Keimzentrenbildung in der Haut. *Frankf. Z. Pathol.*, 1911, **6**, 352-359.

Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Benach, J.L., Grundwald, E. & Davis, J.P., Lyme disease: A tick-Borne Spirochetosis? *Science*, 1982, **216**, 1317-1319.

Canica, M.M., Nato, F., du Merle, L., Mazie, J.C., Baranton, G. & Postic, D., Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1993, **25**, 441-448.

Carter, C.J., Bergstrom, S., Norris, S.J. & Barbour, A.G., A family of surface-exposed proteins of 20 kilodaltons in the genus *Borrelia*. *Infect Immun*, 1994, **62**, 2792-2799.

Christen, H.J., Hanefeld, F., Eiffert, H. & Thomssen, R., Epidemiology and clinical manifestations of lyme borreliosis in childhood - a prospective multicentre study with special regard to neuroborreliosis. *Acta Paediat*, 1993, **82**, 1-76.

Coleman, J.L. & Benach, J.L., Isolation of antigenic components from the Lyme disease spirochete: their role in early diagnosis. *J. Infect. Dis.*, 1987, **155**, 756-765.

Coleman, J.L. & Benach, J.L., Characterization of Antigenic Determinants of *Borrelia-Burgdorferi* Shared by Other Bacteria. *J Infect Dis*, 1992, **165**, 658-666.

Craft, J.E., Fisher, D.K., Shimamoto, G.T. & Steere, A.C., Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G response in the illness. *J. clin. Invest.*, 1986, **78**, 934-939.

Craft, J.E., Grodzicki, G.R. & Steere, A.C., Antibody response in Lyme disease: Evaluation of diagnostic tests. *J. Infect. Dis.*, 1984, **149**, 789-95.

Dattwyler, R.J., Volkman, D.J., Luft, B.J., Halperin, J.J., Thomas, J. & Golightly, M.G., Seronegative Lyme disease ; Dissociation of specific T and B-lymphocyte responses to *Borrelia burgdorferi*. *N. Engl. J. Med.*, 1988, **319**, 1441-1446.

Davidson, B.E., Macdougall, J. & Saint Girons, I., Physical Map of the Linear Chromosome of the Bacterium *Borrelia-Burgdorferi*-212, a Causative Agent of Lyme Disease, and Localization of rRNA Genes. *J Bacteriol*, 1992, **174**, 3766-3774.

Debue, M., Gautier, P., Hackel, C., Vanelsen, A., Herzog, A., Bigaignon, G. & Bollen, A., Detection of *Borrelia burgdorferi* in biological samples using the Polymerase Chain Reaction assay. *Res Microbiol*, 1991, **142**, 565-572.

Doby, J.M., Bigaignon, G., Lorvelec, O. & Imbert, G., Suivi pendant quatre ans du niveau d'infestation de la tique *Ixodes ricinus* (Acarien ixodidae) par *Borrelia burgdorferi*, agent de la borréliose de Lyme, dans deux massifs forestiers de Bretagne. *Bull. Soc. Path. Ex.*, 1991, **84**, 398-402.

Doby, J.M. & Couatarmanac'h, A., Populations à risques dans les Spirochétoses à tiques ? Premiers résultats d'une enquête sérologique chez des professionnels de la forêt. *Med. Mal. Infect.*, 1986, **12**, 759-761.

Dorward, D.W., Schwan, T.G. & Garon, C.F., Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood, or tissues from infected ticks, mice, dogs, and humans. *J Clin Microbiol*, 1991, **29**, 1162-1170.

Dressler, F. & Steere, A.C., Diagnosing Lyme Disease - Reply. *Ann Intern Med*, 1992, **116**, 603.

Dufour, A.S., Assous, M.V., Paul, G. & Névot, P., A comparative study of cross reactivity in Lyme borreliosis serology (IFA and ELISA). *Second European Symposium on Lyme Borreliosis.*, 1993. London -19 & 20 may.

Euzeby, J.P., L'infection des animaux par *Borrelia burgdorferi* (agent de la maladie de Lyme) - Consequences hygieniques. *Assoc. Anc. El. Inst. Pasteur*, 1989, **31**, 7-21.

Fawcett, P.T., Gibney, K.M., Rose, C.D., Dubbs, S.B. & Doughty, R.A., Frequency and Specificity of Antibodies That Crossreact with *Borrelia Burgdorferi* Antigens. *J. Rheumatol.*, 1992, **19**, 582-587.

Ferdows, M.S. & Barbour, A.G., Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86**.

Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J. Gocayne, J. Weidman, T. Utterback, L. Watthey, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, S. Garland, C. Fujii, M. D. Cotton, K. Horst, K. Roberts, B. Hatch, H. O. Smith, and J. C. Venter 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*. **390**:580-6.

Fuchs, H., Wallich, R., Simon, M.M. & Kramer, D., The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin (ogen) receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**, 12594-12598.

Fuchs, R., Jauris, S., Lottspeich, F., Preacmursic, V., Wilske, B. & Soutschek, E., Molecular Analysis and Expression of a *Borrelia-Burgdorferi* Gene Encoding a 22kDa Protein (pC) in *Escherichia-Coli*. *Mol Microbiol*, 1992, **6**, 503-509.

Fukunaga, M. & Sohnaka, M., Tandem Repeat of the 23S and 5S Ribosomal RNA Genes in *Borrelia burgdorferi*, the Etiological Agent of Lyme Disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1992, **183**, 952-957.

Garin, C. & Bujadoux, Paralyse par les tiques. *J. Méd. Lyon*, 1922, **3**, 765-767.

Gassmann, G.S., Jacobs, E., Deutzmann, R. & Gögel U., Analysis of the *Borrelia burgdorferi* GeHo *fla* gene and antigenic characterization of its gene product. *J. Bacteriol.*, 1991, **173**, 1452-1459.

Gassmann, G.S., Kramer, M., Göbel, U.B. & Wallich, R., Nucleotide sequence of a gene encoding the *Borrelia burgdorferi* flagellin. *Nucleic Acids Res.*, 1989, **17**, 3590.

Gazumyan, A., Schwartz, J.J., Liveris, D. & Schwartz, I., Sequence analysis of the ribosomal RNA operon of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Gene*, 1994, **146**, 57-65.

Goodman, J.L., Persistence of organisms for lyme arthritis - reply. *Ann Intern Med*, 1994, **121**, 383-384.

Götz, H., Die *Acrodermatitis chronica atrophicans* Herxheimer als infektionskrankheit. *Hautartz*, 1954, **5**, 491-504.

Grodzicki, R.L. & Steere, A., Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosis of early lyme disease. *J. Infect. Dis.*, 1988, **157**, 790-797.

Halperin, J.J. & Golightly, M., Lyme disease - reply. *Neurology*, 1993, **43**, 1866.

Halperin, J.J., Krupp, L.B., Golightly, M.G. & Volkman, D.J., Lyme Encephalopathy - Reply. *Neurology*, 1991, **41**, 952-953.

Hansen, K. & Asbrink, E., Serodiagnosis of Erythema Migrans and Acrodermatitis Chronica Atrophicans by the *Borrelia burgdorferi* flagellum Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, **27**, 545-551.

Hansen, K., Bangsberg, J.M., Fjordvang, H., Pedersen, N.S. & Hindersson, P., Immunochemical characterization of and isolation of the gene for a *Borrelia burgdorferi* immunodominant 60-kilodalton antigen common to a wide range of bacteria. *Infect.Immun.*, 1988, **56**, 2047-2053.

Hansen, K. & Lebech, A.M., The Clinical and Epidemiological Profile of Lyme Neuroborreliosis in Denmark 1985-1990 - A Prospective Study of 187 Patients with *Borrelia burgdorferi* Specific Intrathecal Antibody Production. *Brain*, 1992, **115**, 399-423.

Hirsch, E., Sellal, F., Christmann, D., Steinmetz, G., Monteil, H., Jesel, M., Warter, J.M. & Collard, M., Les méningo-radiculites après morsures de tique. etude de 31 cas. *Rev. Neurol (Paris)*, 1987, **143**, 182-188.

Hollström, E., Successful treatment of *erythema migrans* Afzelius. *Acta Derm. Venerol.*, 1951, **31**, 235-243.

Howe, T.R., Laquier, F.W. & Barbour, A.G., Organization of genes encoding two outer membrane proteins of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* within a single transcriptional unit. *Infect. Immun.*, 1986, **54**, 207-212.

- Huppertz, H.I., Schmidt, H. & Karch, H., Detection of borrelia-burgdorferi by nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid and urine of children with neuroborreliosis. *Eur J Pediatr*, 1993, **152**, 414-417.
- Huycke, M.M., Dalessio, D.D. & Marx, J.J., Prevalence of Antibody to Borrelia-Burgdorferi by Indirect Fluorescent Antibody Assay, ELISA, and Western Immunoblot in Healthy Adults in Wisconsin and Arizona. *J Infect Dis*, 1992, **165**, 1133-1137.
- Hyde, F.W., Johnson, R.C., White, T.J. & Shelburne, C.E., Detection of antigens in urine of mice and humans infected with *borrelia burgdorferi*, etiologic agent of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, **27**, 58-61.
- Jaulhac, B., Nicolini, P., Piemont, Y. & Monteil, H., Detection of *Borrelia burgdorferi* in cerebrospinal fluid of patients with Lyme Borreliosis. *N Engl J Med*, 1991, **324**, 1440.
- Johnson, R.C., Fred, W., Hyde, B.S. & Rumpel, C., Taxonomy of the Lyme disease spirochetes. *Lyme Disease-First International Symposium*, 1984a. 79-87. The Yale J. Biol. Med.
- Johnson, R.C., Hyde, F.W., Schmid, G.P. & Brenner, D.J., *Borrelia burgdorferi* sp. nov. : etiological agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol*, 1984b, **34**, 496-497.
- Johnson, R.C., Kodner, C. & Russell, M., In vitro and in vivo susceptibility of the Lyme disease spirochete to four antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 1987, **31**, 164-167.
- Johnson, S.E., Klein, G.C., Schmid, G.P. & Feeley, J.C., Susceptibility of the Lyme disease spirochete to seven antimicrobial agents. *Yale J. Biol. Med.*, 1984, **57**, 549-553.
- Karlsson, M., Stiernstedt, G., Granström, M., Asbrink, E. & Wretling, B., Comparison of flagellum and sonicate antigens for serological diagnosis of Lyme Borreliosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1990b, **9**, 169-177.
- Kaslow, R.A., Erythema migrans in lyme disease - a correction - reply. *JAMA*, 1992, **268**, 874.
- Kawabata, M., Baba, S., Iguchi, K., Yagamuti, N. & Russel, H., Lyme disease in Japan and its possible incriminated tick vector, *Ixodes persulcatus*. *J. Infect. Dis.*, 1987, **156**, 854.
- Keller, T.L., Halperin, J.J. & Whitman, M., PCR Detection of Borrelia-Burgdorferi DNA in Cerebrospinal Fluid of Lyme Neuroborreliosis Patients. *Neurology*, 1992, **42**, 32-42.
- Kruger, W.H. & Pulz, M., Detection of *Borrelia burgdorferi* in Cerebrospinal Fluid by the Polymerase Chain Reaction. *J Med Microbiol*, 1991, **35**, 98-102.
- Krupp, L.B., Coyle, P.K. & Halperin, J.J., Cognitive function in late lyme borreliosis - reply. *Arch Neurol*, 1992, **49**, 1011.
- Kuiper, H., Dejongh, B.M., Nauta, A.P., Houweling, H., Wiessing, L.G., Vancharante, A.W.M. & Spanjaard, L., Lyme Borreliosis in Dutch Forestry Workers. *J Infect*, 1991, **23**, 279-286.
- Le Flohic, A.M., L'Huissier, C., Muzelec, Y., L'Emeillat, M., Prigent, Y., Kerdraon, G., Boudon, A. & Chastel, C., Syphilis vénérienne et maladie de Lyme. *Med. Mal. Infect.*, 1986, **10**, 566-567.

Lebech, A.M. & Hansen, K., Detection of *Borrelia-burgdorferi* DNA in Urine Samples and Cerebrospinal Fluid Samples from Patients with Early and Late Lyme Neuroborreliosis by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*, 1992, **30**, 1646-1653.

Liegner, K.B., Lyme disease - the sensible pursuit of answers - reply. *J Clin Microbiol*, 1994, **32**, 581-582.

Lightman, D.A., Brod, R.D. & Gordon, G., Lyme Disease - Reply. *Arch Ophthalmol*, 1992, **110**, 749-750.

Lipschütz, B., Über eine seltene Erythemform (Erythema Chronicum Migrans). *Arch. Dermatol.*, 1913, **118**, 349-356.

Lovece, S., Stern, R. & J. Kagen, L., Effects of Rheumatoid Factor, Antinuclear Antibodies and Plasma Reagin on the Serologic Assay for Lyme Disease. *J. Rheumatol.*, 1991, **18**, 1813 - 1818.

Lovrich, S.D., Callister, S.M., Lim, L.C.L., Duchateau, B.K. & Schell, R.F., Seroprotective groups of Lyme borreliosis spirochetes from North America and Europe. *J Infect Dis*, 1994, **170**, 115-121.

Luft, B.J., Steinman, C.R., Neimark, H.C., Muralidhar, B., Rush, T., Finkel, M.F., Kunkel, M. & Dattwyler, R.J., Invasion of the Central Nervous System by *Borrelia-Burgdorferi* in Acute Disseminated Infection. *JAMA*, 1992, **267**, 1364-1367.

Magnarelli, A.L., Meegan, J.M., Anderson, J.F. & Chappell, W.A., Comparison of an Indirect Fluorescent-Antibody Test with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for serological study of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.*, 1984, **20**, 181-4.

Magnarelli, L.A. & Anderson, J.F., Ticks and Biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, **26**, 1482-1486.

Magnarelli, L.A., Anderson, J.F. & Barbour, A.G., Enzyme-linked immunosorbent assays for Lyme disease: reactivity of subunits of *Borrelia burgdorferi*. *J. Infect. Dis.*, 1989, **159**, 43-49.

Magnarelli, L.A., Anderson, J.F. & Johnson, R.C., Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. *J. Infect. Dis.*, 1987, **156**, 183-188.

Magnarelli, L.A., Miller, J.N., Anderson, J.F. & Riviere, G.R., Cross-Reactivity of Nonspecific Treponemal Antibody in Serologic Tests for Lyme Disease. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, **28**, 1276-1279.

Malloy, D.C., Nauman, R.K. & Paxton, H., Detection of *Borrelia burgdorferi* Using the Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, **28**, 1089-1093.

Marconi, R.T. & Garon, C.F., Development of polymerase chain reaction primer sets for diagnosis of Lyme disease and for species-specific identification of Lyme disease Isolates by 16S rRNA signature nucleotide analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, **30**, 2830-2834.

Marconi, R.T., Samuels, D.S. & Garon, C.F., Transcriptional analyses and mapping of the *ospC* gene in Lyme disease spirochetes. *J Bacteriol*, 1993, **175**, 926-932.

- Marconi, R.T., Samuels, D.S., Landry, R.K. & Garon, C.F., Analysis of the distribution and molecular heterogeneity of the OspD gene among the Lyme disease spirochetes: evidence for lateral gene exchange. *J Bacteriol*, 1994, **176**, 4572-4582.
- Melchers, W., Meis, J., Rosa, P., Claas, E., Nohlmans, L., Koopman, R., Horrevorts, A. & Galama, J., Amplification of *Borrelia-Burgdorferi* DNA in Skin Biopsies from Patients with Lyme Disease. *J Clin Microbiol*, 1991, **29**, 2401-2406.
- Mogilyansky, E., C. C. Loa, M. E. Adelson, E. Mordechai, and R. C. Tilton 2004. Comparison of Western immunoblotting and the C6 Lyme antibody test for laboratory detection of Lyme disease *Clin Diagn Lab Immunol*. **11**:924-9.
- Nicolini, P., Imbs, P., Jaulhac, B., Piemont, Y., Warter, J.M. & Monteil, H., Comparaison de l'immunofluorescence indirecte et du western blot pour le sérodiagnostic des infections neurologiques à *Borrelia burgdorferi*. *Méd. Mal. Infect*, 1992, **22**, 722-726.
- Norris, S.J., Carter, C.J., Howell, J.K. & Barbour, A.G., Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31 - characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect Immun*, 1992, **60**, 4662-4672.
- Olsen, B., Jaenson, T.G.T., Duffy, D. & Bergström, S. Lyme disease *Borreliae* in *Ixodes uriae* from the Northern and Southern hemispheres. *International Conference on Lyme Borreliosis*, 1994. Bologna, Italia. P064W. Esculapio.
- Olsen, B., Jaenson, T.G.T., Noppa, L., Bunikis, J. & Bergstrom, S. A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. *Nature*, 1993, **362**, 340-342.
- Panelius J, New recombinant and conventional antigens in the laboratory diagnosis of Lyme borreliosis. *Academic dissertation. University of Helsinki*, Finland. 2002.
- Paschoud, J.M., Die *Lymphadenosis benigna cutis* als übertragbare infektionskrankheit. *Hautartz*, 1958, **8**, 197-211.
- Pelz, K., Wagner, W. & Vogt, A., *Ixodes ricinus* Ticks as vectors of *Borrelia burgdorferi* in the Freiburg area. *Zbl. Bakt. Hyg*, 1989, **suppl 18**, 35-38.
- Perolat, P., Grimont, F., Regnault, B., Grimont, P.A.D., Fournie, E., Thevenet, H. & Baranton, G., rRNA gene restriction patterns of *Leptospira* : A molecular typing system. *Res. Microbiol.*, 1990, **141**, 159-171.
- Péter, O. & Bretz, A.G., Polymorphism of Outer Surface Proteins of *Borrelia-Burgdorferi* as a Tool for Classification. *Zbl Bakt.*, 1992, **277**, 28-33.
- Picken, R.N., Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of the agents of lyme disease and north american relapsing fever. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, **30**, 99-114.
- Pollack, R.J., Telford, S.R. & Spielman, A., Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol*, 1993, **31**, 1251-1255.

- Postic, D., Belfaiza, J., Isogai, E., Saint Girons, I., Grimont, P.A.D. & Baranton, G., A new genomic species in *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated from Japanese ticks. *Res. Microbiol.*, 1993, **144**, 467-473.
- Postic, D., Edlinger, C., Richaud, C., Grimont, F., Dufresne, Y., Perolat, P., Baranton, G. & Grimont, P.A.D., Two genomic species in *Borrelia burgdorferi*. *Res. Microbiol.*, 1990, **141**, 465-475.
- Preac-Mursic, V., Wilske, B. & Schierz, G., European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zbl. Bakt. Hyg.*, 1986, **A 263**, 112-118.
- Preac-Mursic, V., Wilske, B., Schierz, G., Holmberger, M. & Süss, E., In vitro and in vivo susceptibility of *Borrelia burgdorferi*. *Eur. J. Clin. Microbiol*, 1987, **6**, 424-426.
- Raoult, D., Hechemy, K.E. & Baranton, G., Cross-reaction with *Borrelia burgdorferi* antigen of sera from patients with human immunodeficiency virus infection, syphilis and Leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, **27**, 2152-2155.
- Ragon, B., Hanslik, T., Letrilliart, L. Maladie de Lyme en France : 5500 nouveaux cas par an diagnostiqués en médecine générale. *Le Quotidien du Médecin*. 2000, N°6792, 8.
- Robinson, J.M., Pilotmatias, T.J., Pratt, S.D., Patel, C.B., Bevirt, T.S. & Hunt, J.C., Analysis of the humoral response to the flagellin protein of borrelia-burgdorferi - cloning of regions capable of differentiating lyme disease from syphilis. *J clin Microbiol*, 1993, **31**, 629-635.
- Rosa, P.A. & Schwan, T.G., A specific and sensitive assay for the Lyme Disease spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.*, 1989, **160**, 1018-1029.
- Russell, H., Sampson, J.S., Schmid, G.P., Wilkinson, H.W. & Plikaytis, B., Enzyme-linked Immunoabsorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. *J. Infect. Dis.*, 1984, **149**, 465-470.
- Saint Girons, I., Norris, S.J., Gobel, U., Meyer, J., Walker, E.M. & Zuerner, R., Genome structure of spirochetes. *Res Microbiol*, 1992, **143**, 615-621.
- Samuels, D.S., Marconi, R.T. & Garon, C.F., Variation in the size of the ospA-Containing linear plasmid, but not the linear chromosome, among the three *Borrelia* species associated with Lyme disease. *J Gen Microbiol*, 1993, **139**, 2445-2449.
- Schwartz, I., Wormser, G.P., Schwartz, J.J., Cooper, D., Weissensee, P., Gazumyan, A., Zimmermann, E., Goldberg, N.S., Bittker, S., Campbell, G.L. & Pavia, C.S., Diagnosis of Early Lyme Disease by Polymerase Chain Reaction Amplification and Culture of Skin Biopsies from Erythema Migrans Lesions. *J Clin Microbiol*, 1992a, **30**, 3082-3088.
- Schwartz, J.J., Gazumyan, A. & Schwartz, I., rRNA Gene Organization in the Lyme Disease Spirochete, *Borrelia-Burgdorferi*. *J Bacteriol.*, 1992b, **174**, 3757-3765.
- Simpson, W.J., Schrupf, M.E., Hayes, S.F. & Schwan, T.G., Molecular and immunological analysis of a polymorphic periplasmic protein of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol*, 1991, **29**, 1940-1948.

- Sjovall, P., Flamholz, L., Kroon, B.M. & Bredberg, A., HIV Infection and Loss of Treponemal Test Reactivity - Reply. *Acta Derm Venereol*, 1992, **72**, 313.
- Smith, H.V., Gray, J.S. & McKenzie, G., A Lyme Borreliosis Human Serosurvey of Asymptomatic Adults in Ireland. *Zbl Bakt*, 1991, **275**, 382-389.
- Stanek, G., and F. Strle 2003. Lyme borreliosis *Lancet*. **362**:1639-47.
- Steere, A., Lyme disease. *N. Engl. J. Med.*, 1989, **321**, 586-596.
- Steere, A.C., The overdiagnosis of lyme disease - reply. *JAMA*, 1993, **270**, 2683.
- Steere, A.C., Grodzicki, R.L., Kornblatt, A.N., Craft, J.E., Barbour, A.G., Burgdorfer, W., Schmid, G.P., Johnson, E. & Malawista, S.E., The spirochetal etiology of Lyme disease. *N. Engl. J. Med.*, 1983, **308**, 733-740.
- Steere, A.C., Malawista, S.E., Hardin, J.A., Ruddy, S., Askenase, W. & Andiman, W.A., Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: the enlarging clinical spectrum. *Ann. Intern. Med.*, 1977a, **86**, 685-698.
- Steere, A.C., Malawista, S.E., Snyderman, D.R., Shope, R.E., Andiman, W.A., Ross, M.R. & Steele, F.M., Lyme arthritis: An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum.*, 1977b, **20**, 7-17.
- Stiernstedt, G., Granström, M., Hederstedt, B. & Sköldenberg, B., Diagnosis of spirochetal meningitis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Indirect Immunofluorescence Assay in serum and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.*, 1985, **21**, 819-25.
- Stoenner, H.G., Dodd, T. & Larsen, C., Antigenic variation of *Borrelia hermsii*. *J. Exp. Med.*, 1982, **156**, 1297-1311.
- Szer, I.S. & Steere, A.C., Long-Term Course of Lyme Arthritis - Reply. *N Engl J Med*, 1991, **325**, 1886.
- Vieyres, C., Allal, J., Coisne, D., Thomas, P., Neau, J.P. & Breux, J.P., Aspects européens de la maladie de Lyme. *Presse Méd*, 1987, **16**, 59-62.
- Wang, G., A. P. van Dam, I. Schwartz, and J. Dankert 1999. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. **12**:633-53.
- Wang, G. 2002. Direct detection methods for Lyme *Borrelia*, including the use of quantitative assays. *Vector Borne Zoonotic Dis*. **2**:223-31.
- Welsh, J., Pretzman, C., Postic, D., Saint Girons, I., Baranton, G. & McClelland, M., Genomic Fingerprinting by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction Resolves *Borrelia-Burgdorferi* into 3 Distinct Phyletic Groups. *Int J Syst Bacteriol*, 1992, **42**, 370-377.
- Whitman, M., Keller, T. & Halperin, J., CNS lyme disease - reply. *Neurology*, 1992, **42**, 1849-1850.
- Wills, M.C., Detecting the cause of Lyme Disease in Australia. *Med J Aust*, 1991, **155**, 275.

- Wilske, B., Preac-Mursic, V. & Schierz, G., Antigenic heterogeneity of European *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients and ticks. *Lancet*, 1985, **i**, 2099.
- Wilske, B., Preac-Mursic, V., Schierz, G. & Busch, K.V., Immunochemical and Immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. *Zbl. Bakt. Hyg.*, 1986, **263**, 92-102.
- Wilske, B., Preac-Mursic, V., Schierz, G., Gueye, W., Herzer, P. & Weber, K., Immunochemische analyse der immunantwort bei spätmanifestationen des Lyme borreliose. *Zbl. Bakt. Hyg.*, 1988, **A 267**, 549-558.
- Wilske, B., Preac-Mursic, V., Schierz, G., Liegl, G. & Gueye, W., Detection of IgM and IgG antibodies to *Borrelia burgdorferi* using different strains as antigen. *Zbl. Bakt. Hyg.*, 1989, **supplement 18**, 299-309.
- Wilske, B., PreacMursic, V., Schierz, G., Kühbeck, R., Barbour, A. & Kramer, M., Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1988, **539**, 126-143.
- Wilske, B., Schierz, G., Preac-Mursic, V., Von Busch, K., Kuhbeck, R., Pfister, H.W. & Einhaupl, K., Intrathecal production of specific antibodies against *Borrelia burgdorferi* in patients with lymphocytic meningoradiculitis (Bannwarth's syndrome). *J. Infect. Dis.*, 1986, **153**, 304-314.
- Wilske, B., Schierz, G., Preac-Mursic, V., Weber, K., Pfister, H.W. & Einhäüpl, K., Serological diagnosis of Erythema migrans disease and related disorders. *Infection*, 1984, **12**, 331-337.
- Wilske, B. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2003 ; **3**, 215-27.
- Wilson, D.R. & Beveridge, T.J., Bacterial flagellar filaments and their component flagellins. *Can J Microbiol*, 1993, **39**, 451-472.
- Wittenbrink, M.M., Thiele, D. & Krauss, H., Comparison of dark-field microscopy, culture, and polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Borrelia burgdorferi* in field-collected *Ixodes ricinus* ticks. *Zbl Bakt*, 1994, **281**, 183-191.
- Woese, C.R., Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, 1987, **51**, 221-271.
- Nadelman, R. B., and G. P. Wormser 1998. Lyme borreliosis *Lancet*. **352**:557-65.
- Zachary, P., M. Assous, et al. (2000). Evaluation des coffrets commerciaux de serodiagnostic de la borrélie de Lyme. 20e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse, Paris.
- Zachary, P. Evaluation of fourteen commercial enzyme immuno-assays for Lyme borreliosis serological diagnosis testing. *J Clin. Microbiol* submitted for publication.
- Zöller, L., Burkgard, S. & Schäfer, H., Validity of Western Immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, **29**, 174-182.
- Zöller, L., Haude, M., Hassler, D., Burkard, S. & Sonntag, H.G., Spontaneous and post-treatment antibody kinetics in late Lyme borreliosis. *Serodiag. Immunotherapy Inf. Dis.*, 1989, **3**, 345-353.

ANNEXES

Consensus européen sur l'évaluation du risque dans la borréliose de Lyme : définitions de formes cliniques

Traduction et adaptation Anne Lise BASSE GUÉRINEAU & Marc V. ASSOUS

Laboratoire de Recherche en Microbiologie, Faculté de Médecine Cochin,

24 rue du Faubourg Saint-Jacques, Paris 75014.

Introduction à la traduction française

A la demande de l'Association des Anciens Elèves de l'Institut Pasteur, nous avons voulu faire connaître le fruit d'un important travail consensuel auquel nous avons pu participer. En effet, parmi les actions les plus importantes et les plus utiles du projet dénommé EUCALB (European Union concerted action ; Lyme borreliosis) a été de proposer un document précis sur les caractéristiques cliniques, biologiques d'une affection complexe et souvent de diagnostic difficile.

Ce document est bien adapté à la situation française de cette affection, où malgré des équipes de renom international, peu de projet d'envergure ont pu être menés, surtout dans ce domaine.

Notre expérience depuis plus de 10 ans dans le diagnostic biologique et l'épidémiologie clinique de la borréliose de Lyme nous conduit à des conclusions très proches¹.

Le document original publié en Anglais dans la revue allemande "Wiener klinische wochenschrift" est illustré de nombreuses photographies qu'il n'a pas été possible de reproduire. Nous disposons d'un assez grand nombre de tirés à parts qui nous permettra d'adresser un original aux collègues qui le souhaiterons. En outre, l'EUCALB s'est doté d'un serveur INTERNET, dans lequel on trouvera toute cette iconographie ainsi qu'un grand nombre de données sur la borréliose de Lyme (<http://www.dis.strath.ac.uk/vie/LymeEU/>)

Nous espérons que ce texte, qui a été rédigé sur la base d'un très grand nombre de patients européens parfaitement documentés, aidera tous les intéressés, microbiologistes, cliniciens, chercheurs, épidémiologistes, français ou francophones, à travailler sur ce passionnant sujet qu'est la borréliose de Lyme. A l'heure où il est question de standardisation des réactifs sérologiques et d'évaluer en diagnostic les méthodes moléculaires, ce document vient au bon moment, il possède tous les atouts pour fournir à tous les acteurs une trame précise et réelle pour la définition des différentes formes cliniques de cette affection.

Action Concertée de L'Union Européenne ; borreliose de Lyme

¹ **Assous, M. V.** Borréliose de Lyme en 1995. *feuil. Biol.* 1995. 36: 15-25.

Assous, M. V. Biologie moléculaire appliquée au diagnostic moléculaire de la borréliose de Lyme. *L'Eurobiologiste.* 1997. **31** : 189-194.

Assous, M. V., Postic, D., Paul, G., Névoit, P. et Baranton, G. Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1993. **12**: 261-268

Consensus européen sur l'évaluation du risque dans la borréliose de Lyme : définitions de formes cliniques

Traduit de l'Anglais par Anne Lise Basse Guérineau et Marc V. Assous.

Laboratoire de Recherche en Microbiologie, Faculté de Médecine Cochin,

24 rue du Fg St Jacques. Paris, 75014.

Gerold Stanek¹, Susan O'Connell², Marco Cimmino³, Elisabeth Aberer⁴, Wolfgang Kristoferitsch⁵, Marta Granström⁶, Edward Guy⁷, et Jeremy Gray⁸

¹Institut d'hygiène, Université de Vienne

²Département de Microbiologie, Hôpital Général de Southampton, Southampton. U.K.

³Département de Médecine interne, Université de Gènes, Italie

⁴Département de Dermatologie, Université de Graz

⁵Département de Neurologie, Hôpital du Danube, Vienne

⁶Département de Microbiologie Clinique, Hôpital Karolinska, Stockholm, Suède

⁷Laboratoire de Santé Publique, Swansea. U.K.

⁸Département des Ressources Environnementales, Université de Dublin, Ireland

Les auteurs remercient vivement les experts qui ont collaboré à la définition des formes cliniques : Drs Friedrich Breier, Dermatology, Vienna, Austria, Lise Gern, Zoology, Neuchatel, Switzerland ; Winfried Graninger, Rheumatology, Vienna, Austria ; Klaus Hansen, Neurology, Copenhagen, Denmark, Jiri Havlik, Neurology, Prague, Czech Republic ; Jana Hercogova, Dermatology, Prague, Czech Republic ; Lenka Krbkova, Paediatrics, Brno,, Czech Republic ; Elena Laikovskaya, Infecious Diseases, Yekaterinburg, Russia ; Andras Iakos, infectious diseases, Budapest, Hungary ; Olga Lesniak, Rheumatology, Yekaterinburg, Russia ; Gabriele Mezzinger, Dermatology, Vienna, Austria ; Michael M. Millner, Neuro-Paediatrics, Graz, Austria ; Robert R. Müllegger, Dermatology, Graz, Austria ; Jarmo Oksi, Microbiology, Turku, Finland ; Vera Preac-Mursic, Microbiology, Munich, Germany ; Hana Rohacova, Neurology, Prague, Czech Republic ; Franc Strle, Infectious Diseases, Slovenia ; Giusto Trevisan, Dermatology, Trieste, Italy ; Marie Valesova, Rheumatology, Czech Republic ; Klaus Weber, Dermatology, Munich, Germany, John White, Dermatology, Southampton, United Kingdom, Bettina Wilske, Micrbiology, Munich, Germany ; Gary P. Wormser, Infectious Diseases, New York, U.S.A.; Martina H. Zischka, Neurology, Boston, U.S.A.

Résumé. Le Consensus européen sur l'évaluation du risque dans la borréliose de Lyme (EUCALB) a consulté des cliniciens et scientifiques européens définir les principales manifestations cliniques de la borréliose de Lyme en Europe. Ces définitions ne sont pas seulement utiles dans le cadre de la recherche sur la borréliose de Lyme, mais elles sont également destinées à aider les cliniciens et à soutenir des travaux portant sur le spectre clinique de la maladie. Les définitions de cas ont été données après des réunions organisées par l'EUCALB avec des cliniciens spécialisés et des scientifiques de douze pays européens. Les définitions et les critères de diagnostic présentés sont le consensus atteint lors de ces réunions. Les définitions de cas proposées concernent la peau, le système nerveux, cardiaque et ostéo-articulaire ainsi que le rôle du laboratoire dans le diagnostic.

Mots-clef : borréliose de Lyme, définitions des formes cliniques, diagnostic biologique.

Introduction

La maladie de Lyme, avec ses manifestations d'arthrite, a d'abord été décrite aux U.S.A., en 1977 (23) et depuis lors, le spectre clinique complet (25) de cette affection a été mis en évidence dans de nombreux pays. Elle est due à une bactérie du genre *Borrelia* qui est transmise par une tique ; elle se manifeste de multiples façons. Il faut aussi noter que bon nombre de manifestations (en particulier dermatologiques et neurologiques) étaient connues depuis plusieurs décennies en Europe (2, 7, 9, 10, 13, 16, 17, 21, 28). Cependant, ces manifestations n'ont été reconnues comme une entité étiologique que depuis les années 80, après la découverte des *Borrelia* chez des tiques aux U.S.A. (11,18). La borréliose de Lyme définit maintenant un cadre nosologique plus précis qui inclut l'ensemble des manifestations cliniques provoquées par différentes espèces de *Borrelia* transmises par certaines tiques du genre Ixodes (8).

Bien que la forme clinique majeure - l'erythème migrant soit identique dans les diverses zones géographiques où elle survient, il semble qu'il y ait des différences dans la sévérité ainsi que dans la fréquence de ses manifestations, ce qui peut être le reflet des variations régionales que l'on observe dans la prévalence d'espèces différentes de *Borrelia burgdorferi*. En général, on note en Europe une plus grande variété de manifestations cliniques par rapport à l'Amérique du Nord, ce qui peut être corrélé avec le plus grand nombre d'espèces de *Borrelia* rencontré en Europe. Presque toutes les souches identifiées aux U.S.A. sont des *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, alors que les souches isolées en Europe montrent une plus grande hétérogénéité, la majorité d'entre elles étant composée de *B. afzelii*, qui semble être fortement associée à l'acrodermatite, et *B. garinii*, qui semble être particulièrement associée aux manifestations du système nerveux. Toutes les espèces pathogènes peuvent provoquer un erythème migrant.

Le consensus européen sur l'évaluation du risque dans la borréliose de Lyme (EUCALB ; coordonné par le Dr Jeremy Gray) est un réseau de cliniciens et scientifiques de 17 pays en Europe, coopérant dans des projets portant sur des études écologiques, biologiques, épidémiologiques et cliniques. Un des objectifs clef de l'EUCALB a été de fournir des définitions reflétant la plus grande importance du spectre de la maladie en Europe par rapport à celui décrit dans les définitions de cas du Centers for Disease Control (CDC), à Atlanta, U.S.A. (3). Le but de l'EUCALB est à la fois d'aider les cliniciens et d'apporter un support aux études concernant le spectre clinique de la maladie.

Un ensemble de réunions a été organisé par l'EUCALB pour discuter du problème. Des cliniciens (dont le nom et l'adresse sont donné dans la liste ci-dessus) ont d'abord rempli un

questionnaire de surveillance puis se sont ensuite réunis deux fois pour établir les critères requis. Quatre groupes de manifestations ont été définis: cutanées, nerveuses, musculo-squelettiques, et cardiaques. Les auteurs ont convenu que le spectre des manifestations connues de la borréliose de Lyme ne serait étendu qu'à la lumière d'autres travaux de recherche et d'une plus grande expérience. Dans de prochaines versions des définitions de cas cliniques européens, des manifestations rares comme la myosite et les atteintes oculaires pourront être incluses.

Définitions des formes cliniques de la borréliose de Lyme

Dans tous les cas, le patient doit avoir été exposé préalablement à une tique.

La peau

Erythema migrans

L'*erythema migrans* (anciennement *erythema chronicum migrans*) débute habituellement par une macule ou une papule et s'étend pendant une période de quelques jours ou semaines pour former une tache rouge ou violacée, souvent à centre clair. La bordure migrante de la lésion est typique, elle est souvent colorée intensément mais elle n'est pas particulièrement surélevée. La plupart des *erythema migrans* vus par les cliniciens ont plus de 5 cm de diamètre mais ils peuvent être diagnostiqués avant d'atteindre ce diamètre. Des lésions secondaires peuvent parfois survenir. Les patients atteints d'un *erythema migrans* peuvent aussi présenter des symptômes non spécifiques, le plus souvent intermittents tels que fatigue, fièvre, maux de tête, légère raideur de la nuque, arthralgies, et myalgies. Toutes ces manifestations peuvent régresser d'elle-même, mais en l'absence de traitement approprié, elles peuvent persister, donner des récurrences, ou s'aggraver.

Les lésions érythémateuses survenant dans les heures suivant la morsure de tique correspondent à des réactions d'hypersensibilité et ne peuvent être appelées *erythema migrans*. Le diagnostic différentiel peut comporter une réaction à une morsure d'insecte, de l'urticaire, un eczéma de contact, une folliculite, une cellulite, un granulome annulaire, un teigne de la peau glabre, une éruption d'origine iatrogène ou un pseudolymphome.

Une sérologie négative n'exclut pas un *erythema migrans*. De plus, un traitement antibiotique précoce peut supprimer la réponse anticorps.

Lymphocytome cutané bénin

Le lymphocytome de la borréliose (*lymphadenosis benigna cutis*) est rare. C'est un nodule ou une plaque violacée habituellement situé sur le lobe ou sur le pavillon de l'oreille, le bout du sein ou le scrotum, et il survient plus souvent chez les enfants (surtout au niveau de l'oreille) que chez les adultes. L'histologie est typique, avec un infiltrat intense de lymphocytes B. Les lésions survenant dans d'autres sites que ceux énumérés ci-dessus doivent être examinées histologiquement pour exclure d'autres atteintes comme le lymphome cutané qui peut avoir superficiellement la même apparence. La sérologie montre habituellement une variation significative du taux des anticorps spécifiques entre 2 sérums successifs. Cette manifestation peut régresser spontanément, mais en l'absence de traitement, elle peut persister, donner des récurrences ou laisser des séquelles (26).

Acrodermatidis chronica atrophicans ou maladie de Pick Herxheimer

Cette manifestation chronique, persistente, et habituellement progressive de la borréliose de Lyme, est caractérisée par des lésions rouges ou violacées, situées le plus souvent sur les surfaces d'extension des extrémités. Initialement, il y a une décoloration violacée s'accompagnant souvent d'un gonflement en galette. Eventuellement, la peau touchée peut devenir atrophique de façon permanente et indurée au niveau des proéminences osseuses, et des modifications de type sclérodermiforme peuvent survenir. La participation des os et des nerfs périphériques n'est pas rare (4-6, 19). Des anticorps spécifiques de type IgG sont présents à des taux élevés. La lésion a aussi un aspect histologique caractéristique. L'acrodermite chronique atrophique est presque exclusivement vue chez les adultes et de façon prédominante chez les femmes.

Le système nerveux

Les manifestations d'atteinte neurologique "précoce" comportent une méningite, une paralysie faciale isolée, unilatérale (quelquefois bilatérale), une atteinte des autres nerfs crâniens, et une radiculonévrite douloureuse (méningo-radiculonévrite, syndrome de Garin-Bujadoux-Bannwarth), qui peut survenir plusieurs semaines après l'infection. Le dernier signe est rare chez les enfants. Chez les enfants, les manifestations cliniques les plus fréquentes sont la méningite et la paralysie faciale (12). Dans les cas non traités, ces manifestations peuvent persister pendant des mois, et peuvent laisser des séquelles (20). Des maux de tête, une fatigue, une paresthésie, ou une légère raideur de la nuque ne sont pas des critères d'atteinte neurologique.

Dans le LCR, on note une pléiocytose lymphocytaire, la présence de plasmocytes (20), et des anticorps spécifiques produits in situ. Les IgM et/ou les IgG spécifiques peuvent être

absents au début, mais les IgG peuvent être détectables dans la phase de convalescence chez tous les patients, 6 à 8 semaines après le début de la maladie (14). Dans le serum, les IgG spécifiques peuvent aussi être absents au début, mais devraient être détectables durant la période de convalescence.

L'atteinte chronique du système nerveux central, bien que rare, comporte des manifestations chroniques telles que l'encéphalomyélite, la radiculomyélite et la méningite chronique (1, 15). Le diagnostic ne devrait pas être porté en l'absence de pléiocytose et de synthèse intrathécale d'IgG spécifique (1).

Le système ostéo-articulaire

Arthrite de Lyme

La définition de cas de l'arthrite de Lyme (MMWR 1990) du Centers for Disease Control and Prevention (CDC) est valable en Europe. Ces manifestations sont des crises brèves et récurrentes de gonflement objectif des articulations (synovite), quelquefois suivies de synovite chronique au niveau d'une ou plusieurs articulations. Une arthralgie, une myalgie ou une fibromyalgie isolée ne sont pas des critères d'atteinte musculaire ou osseuse. Un taux élevé d'IgG spécifiques est retrouvé dans le sérum et le liquide synovial de patients atteints d'arthrite de Lyme. Les autres causes d'arthrite doivent être exclues.

L'atteinte cardiaque

Les manifestations cardiaques sont rares. Cependant, les manifestations décrites dans les définitions de cas du CDC (MMWR 1990) c'est-à-dire le début aigu, un défaut de conduction auriculoventriculaire de haut niveau (II-III), ont aussi été rapportées en Europe. De plus, des perturbations du rythme, une endomyocardite et une péricardite peuvent aussi être vues (24, 27). Des manifestations cliniques typiques de la borréliose de Lyme ainsi que la présence d'anticorps spécifiques dans le sérum sont requises pour affirmer une atteinte cardiaque due à la borréliose de Lyme. Les autres raisons de l'atteinte cardiaque doivent être exclues. Des palpitations, une bradycardie, un bloc de branche ou une myocardite isolées ne sont pas des critères de diagnostic.

Les atteintes cardiaques chroniques, telles qu'une cardiomyopathie dilatée de longue durée, peuvent être associées à une borréliose mais la relation causale n'a pas été prouvée en dépit de l'isolement de *Borrelia* à partir d'une biopsie de l'endomyocarde. On sait en effet, que les cardiomyopathies de longue durée peuvent prédisposer à la colonisation par des pathogènes (22).

Les recommandations pour le diagnostic de la borréliose de Lyme, basées sur les définitions des cas cliniques et les résultats de laboratoire sont données dans le Tableau 1.

Discussion

Les définitions de formes cliniques sont des outils importants pour les études cliniques et épidémiologiques. De telles définitions constituent un soutien pour la collecte et l'analyse d'informations cliniques et biologiques appropriées. De plus, elles facilitent la comparaison des résultats de différentes études. Par exemple, les études qui évaluent la précision diagnostique des tests de laboratoire ou des protocoles thérapeutiques, nécessitent souvent une identification très précise des patients qui sont dans des étapes particulières de la maladie. Ces définitions peuvent aussi être d'un grand secours dans la clinique en clarifiant les critères de diagnostic.

Lorsque l'on constitue des définitions de cas, il est important de savoir dans quel but on va les utiliser. Par exemple, les études épidémiologiques demandent en général une très grande spécificité de manière à éliminer le maximum de faux positifs, alors que par ailleurs on sait que l'augmentation de la spécificité entraîne généralement une perte de sensibilité. Les définitions de cas présentées ici pour la borréliose de Lyme en Europe ne sont pas conçues dans un but épidémiologique puisqu'un de leurs buts majeurs est de soutenir des travaux éventuels portant sur la description du spectre clinique de la maladie. On peut cependant, si on les modifie sensiblement, les utiliser dans un but épidémiologique.

Les définitions de cas décrites comportent des résultats de laboratoire, comme support ou comme confirmation, obtenus à partir de techniques de diagnostic de la borréliose de Lyme couramment utilisées en routine. D'autres méthodes de laboratoire, décrites comme étant particulièrement utiles, n'ont pas été incluses, étant donné que les protocoles ne sont pas standardisés ou que leur utilisation dans un contexte clinique n'a pas été complètement évalué. C'est le cas de la détection directe des séquences nucléiques de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, par PCR (polymerase chain reaction) ; il n'y a pas de consensus sur les cibles génomiques les plus appropriées qui doivent être amplifiées et sur la signification clinique de la présence ou de l'absence d'ADN de *Borrelia* dans certaines manifestations de la borréliose de Lyme. De même, il n'y a, à l'heure actuelle, pas de consensus sur l'importance de l'immunoblot dans les critères de diagnostic sérologique, que ce soit pour le dépistage, pour différencier entre infection précoce et infection tardive, ou pour la confirmation.

L'une des stratégies pour déterminer des critères appropriés d'immunoblot est de faire une

évaluation multicentrique comportant les différentes espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato et incluant des sérums de régions géographiquement différentes où la distribution relative des espèces diffère. EUCALB est en train d'entreprendre une telle étude pour déterminer la capacité diagnostique de l'immunoblot dans la borréliose de Lyme en Europe. Aussi, dans le but de garantir de bons standards pour les tests sérologiques qualifiés de tests de confirmation dans la définition de cas, l'EUCALB met au point un plan de contrôle de qualité incluant 46 laboratoires dans 17 pays européens. Ce plan a pour but d'aider les laboratoires participants et de les encourager à mettre en oeuvre des programmes similaires dans leurs pays respectifs. Les résultats de cet effort seront le sujet de communications ultérieures de l'EUCALB.

Addendum

Ce texte est fourni comme un service d'éducation de l'EUCALB. Il est basé sur une évaluation de l'information scientifique et clinique. Il n'a pas pour but d'inclure toutes les méthodes possibles de soin pour un problème particulier de la borréliose de Lyme, ni d'inclure toutes les méthodologies. L'EUCALB reconnaît que les décisions concernant les soins spécifiques des patients sont la prérogative des patients et des médecins traitant, et sont fonction des circonstances.

Références

1. Ackerman R, Rhese-Küpper B, Goolmer E, Schmidt R (1988) Chronic neurologic manifestations of erythema migrans borreliosis. *Ann NY Acad Sci* 539: 16-23
2. Afzelius A (1910) Verhandlungen des Dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm, 28 Oct 1909. *Arch Dermatol Syph* 101: 404
3. Anonymous (1990) *Morbidity Mortality Weekly Report* 39: 19-21
4. Asbrink E (1985) Erythema migrans Afzelius and acrodermatitis chronica atrophicans. *Acta Derm Venereol (Stockh) [Suppl]* 118: 1-63
5. Asbrink E (1987) Erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans: association with joint manifestations. In: *Eurorheumatology*, Tagas, Athens, pp 246-248
6. Asbrink E, Hovmark A (1988) Early and late cutaneous manifestations in Ixodes-borne borreliosis. *Ann NY Acad Sci* 539: 4-15
7. Bannwarth A (1941) Chronische lymphozytäre Meningitis, entzündliche Polyneritis und "Rheumatismus". *Arch Psychiatr Nervenkr* 117: 161-185
8. Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PAD (1992) Delineation of *Borrelia burgdoferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and groupVS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* 42: 378-383
9. Bäverstedt B (1943) Über Lymphadenosis benigna cutis. *Acta Derm Venereol (Stockh) [Suppl]* 24: 1-202
10. Buchwald A (1883) Ein Fall von diffuser idiopathischer Hautatrophie. *Vjschr Derm* 15: 553-556
11. Burgdofer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grünwald E, Davis JP (1982) Lyme disease-a tick-borne spirochetosis ? *Science* 216: 1317-1319
12. Christen HJ, Hanefeld F, Eiffert H, Thomssen R (1993) epidemiology and clinical manifestations of Lyme borreolosis in childhood. *Acta Paediatr Scand [Suppl]* 386: 1-76
13. Garin C, Bujadoux (1922) Paralysie par les tiques. *J Med Lyon* 71: 765-767
14. Hansen K, Lebech Am (1991) Lyme neuroborreliosis: a nes sensitive diagnostic assay for intrathecal synthesis of *Borrelia burgdoferi* specific immunoglobulin G, A, M. *Ann Neurol* 30: 197-205
15. Hansen K, Lebech AM (1992) The clinical and epidemiological profile of Lyme neuroborreliosis in Denmark 1985-1990: a prospective study of 187 patients with *Borrelia burgdoferi* specific intrathecal antibody production. *Brain* 115: 398-423

16. Herxheimer K, Hartmann K (1902) Über Acrodermatitis chronica atrophicans. Arch Dermatol Syph 61: 57-76
17. Hövelborn C (1931) Gelenkveränderungen bei Acrodermatitis chronica atrophicans. Arch dermatol Syph 164: 349-356
18. Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ (1984) *Borrelia burgdoferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. Int J Syst Bacteriol 34: 496-497
19. Kristoferitsch W, Sluga E, Graf M, Partsch H, Neumann R, Stanek G, Budka H (1988) Neuropathy associated with acrodermatitis chronica atrophicans: clinical and morphological features. Ann NY Acad Sci 539: 35-45
20. Kristoferitsch W (1989) Neuropathien bei Lyme-Borreliose. Springer, Wien New York
21. Lipschütz B (1913) Über eine seltene Erythemform (Erythema chronicum migrans). Arch Dermatol Syph 143: 365-374
22. Stanek G, Klein J, Bittner R, Glogar D (1990) Isolation of *Borrelia burgdoferi* from the myocardium of a patient with long-standing cardiomyopathy. N Engl J Med 322: 249-252
23. Steere AC, Malawista SE, Hardin JA, Ruddy S, Askenase PW, Andiman WA (1977) Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis ; the enlarging clinical spectrum. Ann Intern Med 86: 685-698
24. Steere AC, Batsford WP, Weinberg M, Alexander J, Berger HJ, Wolfson S, Malawista SE (1980) Lyme carditis: cardiac abnormalities of Lyme disease. Ann Intern Med 93: 8-16
25. Steere AC, Grodzicki RL, Kornblatt AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdofer W, Schmid GP, Johnson E, Malawista SE (1983) The spirochetal etiology of Lyme disease. N Engl J Med 308:733-740
26. Strle F, Pleterski-Rigler D, Stanek G, Pejovnik-Pustinek A, Ruzic E, Cimperman J (1992) Solitary borrelial lymphocytoma: report of 36 cases. Infection 20: 201-206
27. Van Der Linde MR (1990) Lyme carditis: clinical characteristics of 105 cases. Scand J Infect Dis 77: 81-84
28. Weber K (1974) Erythema chronicum migrans-Meningitidis - eine bakterielle Infektionskrankheit? Münch Med Wochenschr 116: 1993-1998

Résumé des définitions de formes cliniques et des résultats biologiques

Forme clinique

Définition des cas cliniques

Erythema (chronicum) migrans

Tache migrante rouge ou violette, souvent à centre clair. Bord migrant typique, souvent intensément coloré, peu surélevé.

Lymphocytome cutané bénin

Rare, nodule ou plaque violacé, indolore, habituellement sur le lobe ou le pavillon de l'oreille, le bout de sein ou le scrotum ; plus fréquent chez les enfants (surtout au niveau de l'oreille) que chez les adultes.

Acrodermatite chronique atrophiante

Lésions rouges ou violacées persistentes, habituellement au niveau des surfaces d'extensions des extrémités. Gonflement initial possible en forme de galette. Les lésions peuvent éventuellement devenir atrophiques. Induration cutanée possible sur les proéminences osseuses .

Neuroborréliose précoce

Méningo-radiculonévrite douloureuse avec ou sans paralysie faciale ou autre névrite crânienne (Syndrome de Garin-Bujadoux-Bannwarth). Chez les enfants, le plus souvent méningite, paralysie faciale isolée unilatérale (parfois bilatérale), autre névrite crânienne.

Neuroborréliose chronique

Très rare. Encéphalite persistente, encéphalomyélite, méningo-encéphalite, radiculomyélite.

Arthrite de Lyme

Crises récurrentes brèves de gonflement des articulations au niveau d'une ou plusieurs grosses articulations, évoluant occasionnellement vers l'arthrite chronique.

Atteinte cardiaque de la borréliose de Lyme

Déclenchement aigu de troubles de la conduction auriculo-ventriculaire (II-III), troubles du rythme, parfois myocardite ou pancardite.

* Les taux d'anticorps spécifiques dans le sérum peuvent augmenter en réponse à une progression de l'infection ou au traitement, ou peuvent décroître à la suite de l'arrêt du processus infectieux. Des prélèvements distants d'au moins 3 mois peuvent être nécessaires pour détecter une baisse du taux des IgG.

dans la borréliose de Lyme.

Critères biologiques essentiels	Autres critères biologiques
Aucune	Culture de biopsie cutanée * Augmentation significative du taux des anticorps spécifiques ou présence d'IgM spécifiques
* Augmentation significative du taux des anticorps spécifiques	Histologie Culture de biopsie cutanée
Taux élevé d'IgG spécifiques dans le sérum	Histologie Culture de biopsie cutanée
Pléiocytose lymphocytaire dans le LCR § Synthèse intra-thécale d'anticorps spécifiques **	Bandes oligoclonales spécifiques dans le LCR * Augmentation significative du taux des anticorps spécifiques Culture à partir du LCR
Pléiocytose lymphocytaire dans le LCR § Synthèse intra-thécale d'anticorps spécifiques	Bandes oligoclonales spécifiques dans le LCR
IgG spécifiques dans le sérum Taux élevé d'IgG spécifiques dans le sérum	Culture à partir du liquide synovial et/ou d'autres tissus
* Augmentation significative du taux des IgG spécifiques	Culture à partir d'une biopsie de l'endomyocarde

** Dans les cas très précoces, il peut ne pas exister de synthèse intra-thécale d'anticorps spécifiques.

§ La synthèse intra-thécale d'anticorps spécifiques est déterminée en testant simultanément le LCR et le sérum du patient.

FICHE TECHNIQUE N°1

Milieu BSK II

❶ Beaucoup de laboratoires ne fabriquent plus leur milieu. Il existe actuellement du milieu commercialisé de très bonne qualité.

Celui de la société Sigma-Aldrich existe sous deux références :

B 8291 qui est le milieu complet standard.

B 3528 qui est fourni sans sérum de lapin et peut être utile comme base pour des variantes du milieu BSK.

Nous communiquons ici la préparation que nous avons utilisée pendant des années avec succès.

❷ **Fabrication du milieu de culture de *B.burgdorferi* sensu lato (Borréliose de LYME)**

A - Matériel nécessaire :

- agitateur magnétique
- verrerie propre rincée à l'eau distillée
- petits tubes en verre ou en plastique à vis stériles (environ 10 cm de hauteur 1 cm de diamètre).
- dispositif de filtration à 0.22µM

B - Produits :

DIFCO :

NEOPEPTONE : 0119 17 9

(TC) YEASTOLATE : 5577 15 5

GELATINE : 0143 15 1

GIBCO :

CMRL 1066 sans glutamine et sans bicarbonate 10X : 21540 018

FLOW :

SERUM DE LAPIN : 29 411 49

SIGMA :

HEPES : H 3375

GLUCOSE D (+) : G 5000

SODIUM PYRUVATE : P 2256

N ACETYL GLUCOSAMINE : A 8625

SODIUM BICARBONATE : S 8875

ALBUMIN BOVINE : A 4503

PROLABO :

CITRATE DE SODIUM : 27 833 237

COMPOSITION DU MILIEU : pour 1.2 litre.

1. 900 ml d'eau bi-distillée stérile
2. 100 ml de CMRL 1066/10X
3. 5 g Néopeptone
4. 2g YEASTOLATE
5. 50g d'Albumine bovine
6. 6 g HEPES
7. 0.7g CITRATE DE SODIUM
8. 5 g GLUCOSE
9. 0.8g PYRUVATE DE SODIUM
10. 0.4g N-ACETYL GLUCOSAMINE
11. 2.2g BICARBONATE DE SODIUM
12. 200 ml DE GELATINE à 7%
13. SERUM DE LAPIN à une concentration finale de 6%.

C.Fabrication du milieu (pour 1.2 litre) :

- 1 Peser les quantités indiquées des produits 3 à 11.
- 2 Préparer séparément dans la bouteille destinée à recevoir le milieu après filtration, 200 ml de gélatine à 7% (poids/poids), soit 14g pour 200 ml d'eau bi-distillée, sur un agitateur magnétique à chaud (environ 80°C), pour obtenir une bonne dissolution ; Autoclaver. garder à part.
- 3 Puis, sur l'agitateur magnétique, à froid, verser dans un becher :
500 ml d'eau bidistillée pour préparation injectable
100 ml de CMRL 1066 10X
Ajouter les autres constituants dans l'ordre suivant:
3 4 6 7 8 9 10 11
Rajouter les 400 ml d'eau restant
Puis l'albumine (50g), dont la dissolution est très longue (environ 2 heures) pour un litre de milieu.
- 4 Il faut ajuster le PH à 7.6 avec de la soude molaire (1N). Environ 15 à 20 ml sont nécessaires pour 1.2 litre de milieu.
- 5 Rajouter le sérum de lapin à une concentration finale de 6%(vol/vol).
- 6 La stérilisation ne peut se faire que par filtration:
Soit par pression, avec un système de filtre à usage unique à 0.22µM monté sur seringue. Dans ce cas, on filtre directement dans les tubes en verre entre 7 et 8 ml de milieu, sous la hotte. Laisser au moins 1 à 2cm d'air jusqu'au bouchon.
Soit par un système de pompe à vide branché sur un filtre à 0.22µM. Dans ce cas, on récupère le milieu dans des bouteilles stériles et on le distribue ensuite dans les petits tubes.
L'idéal est de disposer d'un trépied spécial pour filtration de milieu liquide qui se monte sur une pompe péristaltique, type millipore.

D.Conservation :

Les petits tubes ou les flacons seront gardés à +4°C pendant plusieurs semaines. Cependant, en cas de conservation prolongée il serait préférable de rajouter le sérum de lapin avant l'utilisation. Il est aussi possible de congeler à -20°C, mais ne pas procéder à des décongélations congélations répétées.

E.Utilisation :

Habituellement, à +4°C le milieu est semi-liquide et liquide à 35°C. Il doit être parfaitement limpide et de couleur rose saumonée.

FICHE TECHNIQUE N°2

Préparation des lames pour la sérologie en immunofluorescence indirecte (IFI)

1 Préparation de la suspension

A partir d'un tube de BSKII ensemencé avec la souche B31, surveiller la densité en *Borrelia* au fond noir.

Environ à J+2 ou J+3, le milieu est encore rose limpide sans culot. Vérifier entre lame et lamelle une densité >100 bactéries/champs x 25.

- Centrifuger 3000 t/min 20 min à 4°C (culot léger)
- Jeter le surnageant, ajouter 1 ml de PBS filtré
- Transvaser dans un tube eppendorf
- Vortexer et centrifuger 10000 t/min à 4°C 20 min
- Jeter le surnageant, ajouter 1 ml de PBS filtré et vortexer
- Centrifuger 10000 t/min à 4°C 20 min
- Jeter le surnageant
- Le culot sec est dilué de façon à obtenir environ 10 bactéries par champs au 25 dans 10 ml

1/20= 50 µl + 950 µl PBS filtré

1/50= 20 µl + 980 µl PBS filtré

2 Fixation des *Borrelia* sur lames

A partir des culots bactériens dilués convenablement (comme précédemment)

- Déposer 10 µl de chaque dilution sur un puit de la lame
- Sécher 30 min à l'étuve à 37°C
- Plonger les lames 20 min dans l'acétone
- Placer les lames annotées à -80°C

La vérification de la densité en *Borrelia* sur la lame sera vérifiée pour le lot donné en utilisant un serum positif témoin titré. Un antigène trop ou pas assez dilué pourra rendre la lecture plus difficile et modifier le titre d'Ac.

3 Révélation des lames après fixation

-Déposer 10 µl du serum du malade de la dilution à étudier (1/256 en dépistage).

BIEN NOTER LE PLAN DE LA LAME

- Laisser 1/2 h à 37°C dans une boîte humide
- Laver 2 x 10 min en PBS avec une légère agitation
- Sécher les lames à l'air
- Déposer 10 µl de Immunoglobuline anti-humaine marquée à la fluoresceine diluée selon les recommandations du fabricant.
- Laisser 1/2 h à 37°C dans une boîte humide
- Laver 2 x 10 min en PBS avec une légère agitation
- Sécher les lames et immédiatement fixer avec la glycérine tamponnée et recouvrir d'une lamelle
- Observer au microscope à épifluorescence x40
- L'intensité est évaluée par rapport à celle du témoin titré présent sur chaque lame.
- Vérifier la négativité du témoin négatif.
- Les sérums positifs en dépistage sont titrés selon une dilution géométrique de raison 2.

FICHE TECHNIQUE N°3

Méthode Elisa

1 Réalisation du test

a. Fixation de l'antigène sur les microplaques.

- Diluer l'antigène dans du tampon coating (carbonate-bicarbonate) à pH 9,6 de façon à obtenir une concentration finale comprise entre 1 et 15 µg/ml (actuellement titre utilisé 4µg/ml)
 - Distribuer 100 µl d'antigène dilué par puits et incuber la plaque 2 heures à 37°C puis toute la nuit à + 4°C (la fixation de l'antigène est faite au minimum 18 heures avant le dépôt des sérums).

b. Saturation des sites non spécifiques

5 lavages en PBS-Tween puis incuber 1 heure à température ambiante avec 120 µl de tampon PBS- BSA Tween (1‰).

c. Distribution des échantillons (Sérum ou LCR)

Effectuer une série de 5 lavages dans du PBS-Tween

Déposer dans chaque puits 100 µl du sérum (ou du LCR) dilué au 1/100e dans du tampon PBS-BSA, et incuber 2 heures à 37°C.

Pour le dosage d'IgM, diluer les sérums au 1/50e dans du PBS-BSA puis au 1/2 dans de l'Absorbant RF-Behring et laisser une nuit à + 4°C pour obtenir une bonne précipitation des IgG.

Centrifuger les tubes le lendemain avant de prélever les 100 µl à déposer.

Chaque échantillon (sérum ou LCR) doit être étudié en double.

d. Conjugaison

Effectuer une série de 5 lavages dans du PBS-Tween

Ajouter 100 µl par puits, d'antiglobuline anti-IgG marquée à la phosphatase alcaline (dilution indicative au 1/1000 ou anti-IgM diluée au 1/500) dans du PBS-BSA.

Incuber la plaque 1 heure à température ambiante.

e. Révélation

Effectuer une série de 5 lavages dans du PBS-Tween

Ajouter 100 µl de substrat reconstitué (1 gélule de substrat phosphatase alcaline dans 40 ml de diéthanol-amine).

Le développement d'une coloration jaune traduit la présence d'anticorps.

f. Lecture

Effectuer la lecture au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 405 nm (référence à 630 nm). Il s'agit d'une lecture en point final.

Le temps de révélation est d'environ 20 à 30 min pour IgG et de 30 à 40 min à pour IgM. Mais le mieux est de lire, au début de la mise au point, les plaques toutes les 10 min pour déterminer le meilleur temps de lecture (rapport signal spécifique /bruit de fond).

g. Interprétation des résultats

Pour la mise au point de la technique, il faut tester au moins 100 sérums différents de sujets sains les plus représentatifs de la population générale. Ensuite, on prendra seulement 10 sérums choisis tels que leur moyenne soit la même que celle des 100 sérums tests, qui seront passés à chaque série pour déterminer la moyenne des négatifs. L'écartype utilisée pour le calcul des seuils sera celui obtenu à partir des 100 sérums témoins initiaux. Un témoin positif IgG et IgM sera choisi pour avoir un ratio parmi les plus élevés Il sera aliquoté à -80°C et utilisé à chaque série. On réalise une série de dilutions de 2 en 2 (du 1/100 au 1/6400).

Un sérum est considéré comme positif quand la densité optique est au moins égale à 3 écartypes au-dessus de la DO moyenne obtenue pour les 10 sérums témoins négatifs. Le seuil "douteux" correspond à la moyenne des DO des sérums témoins négatifs plus 2 écartypes.

Les résultats sont exprimés sous forme d'un ratio : DO du sérum divisée par la DO du seuil (moyenne témoins négatifs + 3 SD). Ce qui correspond à 99 % de témoins négatifs ($p < 0,01$). Les ratios supérieurs à 1 sont considérés positifs.

2 Réactifs pour ELISA

Tampon coating carbonate/bicarbonate:

préparer

NaHCO₃ 8,4 g qsp 1000ml

ensuite

soit Na₂CO₃, 10 H₂O 14,3 g qsp 500ml

soit Na₂CO₃ anhydre 7,95 g qsp 750ml

Dans le de NaHCO₃ ajouter Na₂CO₃ jusqu'a obtenir PH de 9,6

Conserver à 4°C.

PBS-ELISA (Phosphate Buffer Saline) actuellement, notre PBS est acheté en poudre chez Biomérieux ref 75521

PBS-ELISA - Tween 20 :

ajouter 1% de Tween 20 (Sigma) au PBS-ELISA.

PBS-BSA à 1%

BSA (Bovine Serum Albumine) 1g

PBS 100 ml

Bien homogénéiser avec un barreau magnétique. Cette solution est à préparer le jour même.

RF Absorbant (Behring OUGC 14/15) : pour la détermination des IgM. Lyophilysat à reconstituer avec 10 ml d'eau distillée, conserver à -80°C.

Réactif Diéthanolamine (référence Sigma D2286)

DEA 10 ml

H₂O 87,5 ml

HCl (10N) 1 à 1,5 ml

Ajuster le pH à 9,8.

Ensuite seulement, ajouter 1 ml de solution mère de MgCl₂ à 50mM (5,10 g de MgCl₂ dans 500 ml H₂O).

Ce réactif peut être congelé sous un volume de 40 ml, prêt à l'emploi.

Anti-immunoglobulines G et M marquées à la Phosphatase Alcaline, d'origine animale (lapin), Dakko références D 336 et D337.

Substrat Phosphatase Alcaline :

"Phosphatase Substrate" Sigma substrat 104 phosphatase (p-Nitrophényl phosphate disodium), à conserver à l'abri de la lumière en dessous de 0°C.

Nota : Cette méthode est utilisée pour le diagnostic de routine depuis le 1.1.93 à raison d'environ 80 à 100 échantillons par semaine au laboratoire de bactériologie de l'hôpital Cochin.

ABRÉVIATIONS

Ac : anticorps

ACA : Acrodermatitis chronica atrophicans ou maladie de Pick-Herheimer

ACL : Ac Anti-cardiolipine

ACM : Anticorps monoclonal

AT : Anticorps anti-tissus

BAV : Bloc auriculo-ventriculaire; trouble de la conduction cardiaque retrouvé dans la borréliose de Lyme

Borrelia burgdorferi sensu lato : *B. burgdorferi* sl

Borrelia burgdorferi sensu stricto : *B.burgdorferi* ss

CDC : Center for Diseases Control, Atlanta, USA.

EIA : Enzyme Immuno Assay

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EM : Erythema Migrans

FAN : facteur anti-nucléaire c.a.d Ac anticorps antinucléaires

FR : Facteur rhumatoïde

IFI : Immunofluorescence indirecte

Ig : Immunoglobuline(s)

LCR : liquide céphalo-rachidien

MAI : Maladies auto-immunes

Osp : Outer Surface Protein (protéine de membrane externe)

PCR : Polymerase Chain Reaction

PBS : Phosphate Buffer Saline

SD : Déviation standard

ISSN : 1293-2892

ISBN : 2-913633-45-5

EGOPRIM

45, rue de la Glacière 75013 Paris

Dépôt légal : Septembre 2005



CAHIER DE **Formation** Biologie médicale

Cahiers de formation déjà parus

- | | |
|--|--|
| N° 1 : Hématologie | N° 19 : Vaginites et vaginoses |
| N° 2 : Immunoanalyse | N° 20 : Hémostasie et thrombose |
| N° 3 : Parasitologie | N° 21 : Virus des hépatites B (VHB), Delta (VDH), C (VHC), autres |
| N° 4 : Bactériologie | N° 22 : Syndrome des anti-phospholipides |
| N° 5 : Hormonologie - Gazométrie | N° 23 : Parasites sanguins |
| N° 6 : G.B.E.A | N° 24 : Biochimie pédiatrique |
| N° 7 : Immuno-allergie (1) | N° 25 : Les moisissures d'intérêt médical |
| N° 8 : Hémoglobines glyquées - Lipides | N° 26 : Immuno-hématologie et groupes sanguins |
| N° 9 : Dosage des médicaments Tome I | N° 27 : Les marqueurs cardiaques |
| N° 10 : Hématologie Cas illustrés | N° 28 : Immunoglobulines monoclonales |
| N° 11 : Amibes et flagellés intestinaux | N° 29 : Mycobactéries - Mycobactérioses |
| N° 12 : Les maladies à Prions | N° 30 : Exploration de la fonction de reproduction - versant féminin |
| N° 13 : Autoimmunité et autoanticorps | N° 31 : Les dermatophytes |
| N° 14 : L'exploration de la thyroïde | N° 32 : Les marqueurs tumoraux sériques des tumeurs solides |
| N° 15 : Dépistage de la trisomie 21 | N° 33 : Sport et Biologie |
| N° 16 : Immuno-allergie (2) | |
| N° 17 : Virus des hépatites A (VHA) et E (VHE) | |
| N° 18 : Dosage des médicaments Tome II | |

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A. et C.A.N.A.M.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes (S.d.B., S.N.M.B. et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privé ou hospitalier, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros sont disponibles à la consultation sur le site Internet www.bioforma.net.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6500 exemplaires.

ISSN : 1293-2892
ISBN : 2-913633-45-5
Dépôt légal : SEPTEMBRE 2005