

Epidémiologie et diagnostic biologique des maladies vectorielles à tiques

Pr Benoît Jaulhac

**CNR des *Borrelia* - EA 7290
Laboratoire de Bactériologie**

CHU & Université de Strasbourg

Déclaration publique d'intérêt

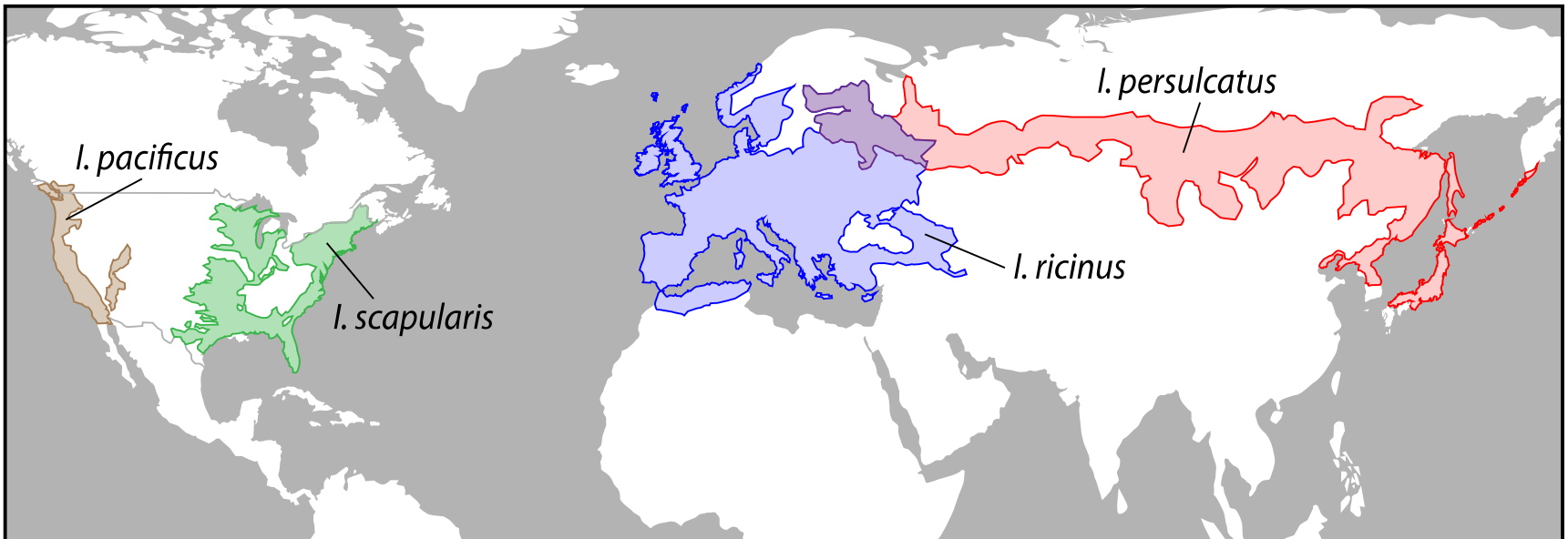
en rapport avec le thème de la présentation

- | | | | | | |
|--|---|-------------------------------------|-----|-------------------------------------|-----|
|  | Consultant ou membre d'un conseil scientifique | ☐ | OUI | ☒ | NON |
|  | Conférencier ou auteur/rédacteur rémunéré d'articles ou documents | ☐ | OUI | ☒ | NON |
|  | Prise en charge de frais de voyage, d'hébergement ou d'inscription à des congrès ou autres manifestations | ☒ | OUI | ☐ | NON |
| | • Janssen-Cilag, EFS, Bioaster | | | | |
|  | Investigateur principal d'une recherche ou d'une étude clinique | ☐ | OUI | ☒ | NON |

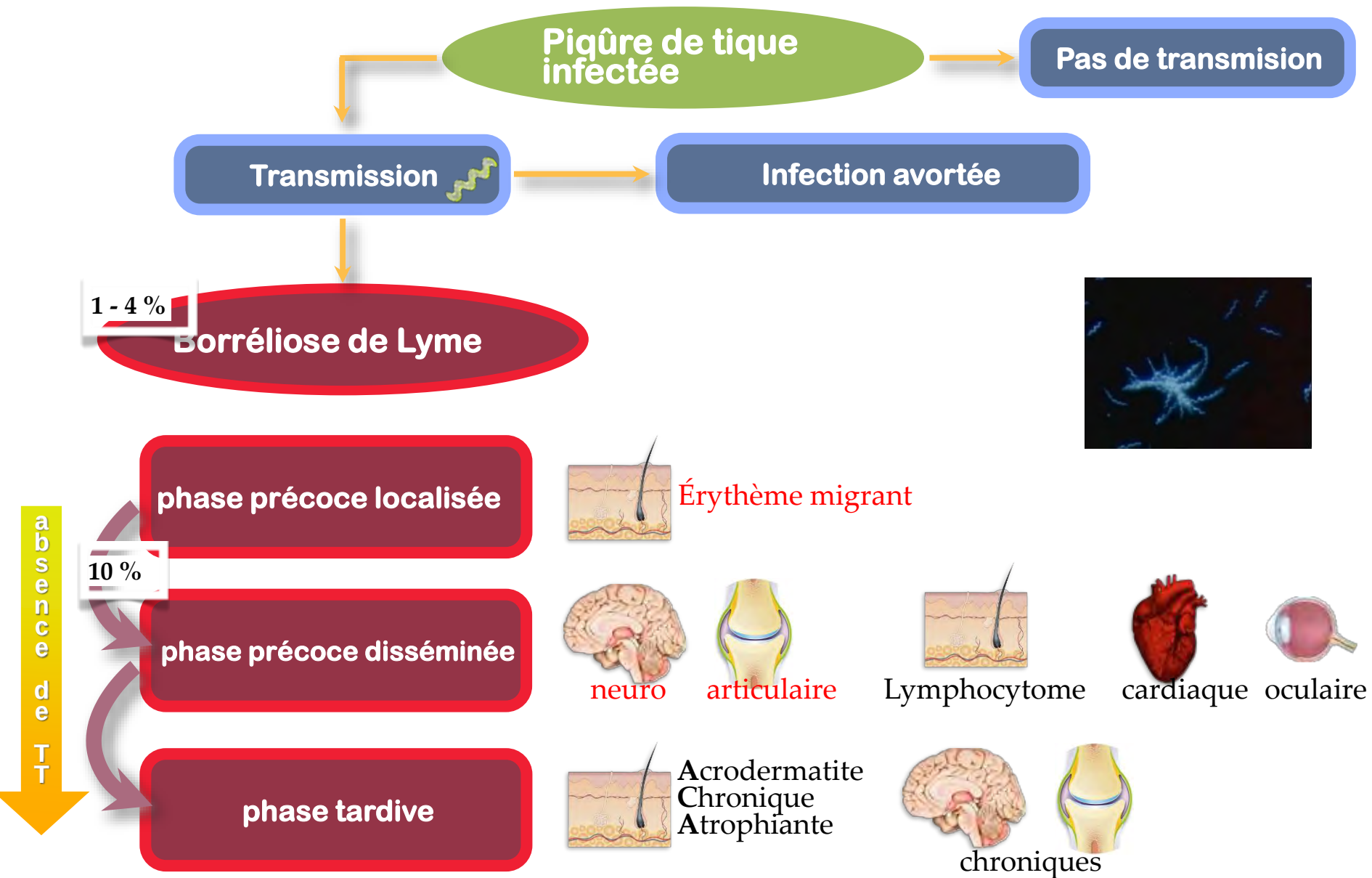
Maladies à tiques en Europe

Vecteur	Pathogène	Maladie
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Rickettsia conorii</i> complex	Fièvre boutonneuse méditerranéenne
<i>Dermacentor</i> sp.	<i>Rickettsia slovaca</i>	TIBOLA-DEBONEL-SENLAT
<i>Ixodes ricinus</i>	TBE virus	TBE
	<i>Babesia</i> (<i>divergens</i> , <i>microti</i> , <i>venatorum</i>)	Babésiose
	<i>Borrelia burgdorferi</i> sl	Lyme
	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Anaplasmosse humaine granulocytaire
	<i>Neoehrlichia mikurensis</i>	Fièvre + thromboses
	<i>Francisella tularensis</i> <i>Rickettsia helvetica</i>	Tularémie ?

Où est présente la maladie de Lyme ?



Vecteur = Ixodes

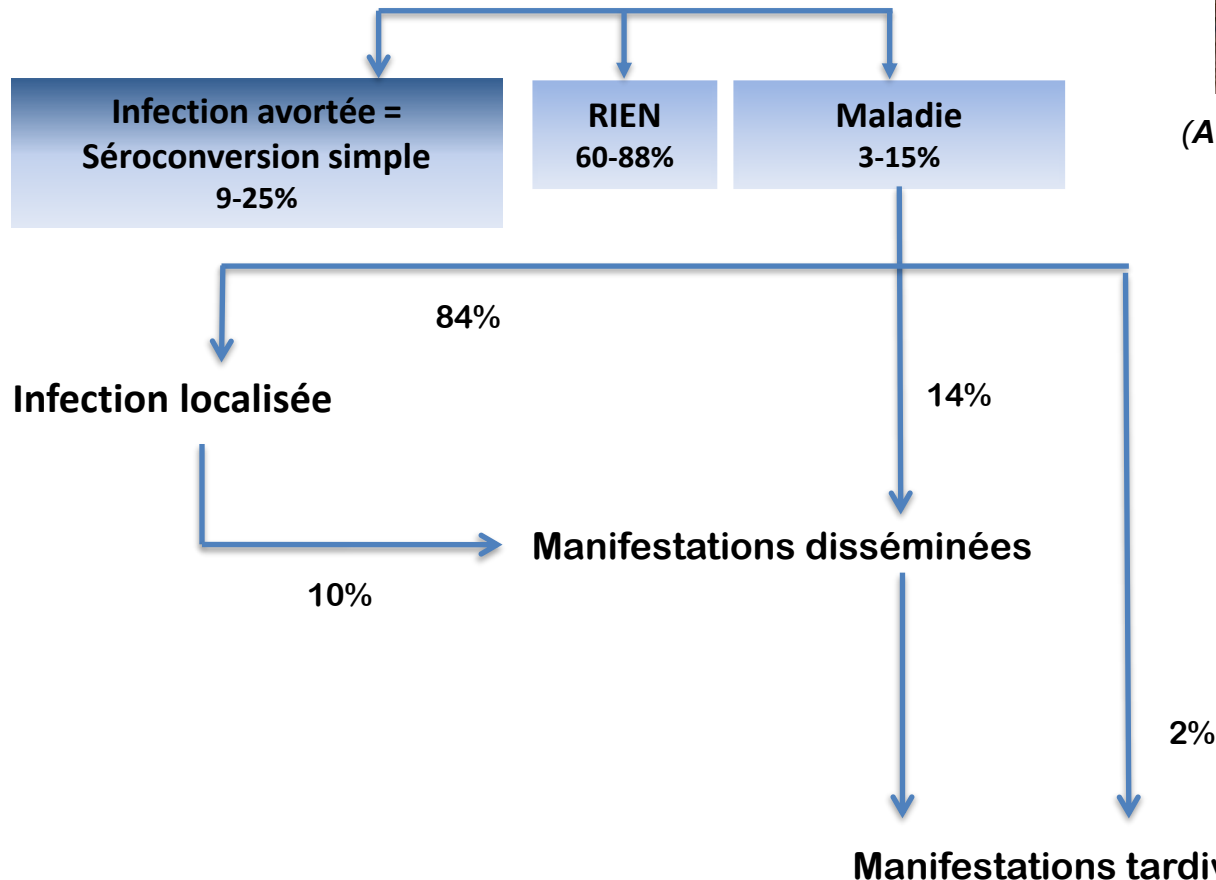


D'après F. Schramm

J'ai été piqué par une tique...

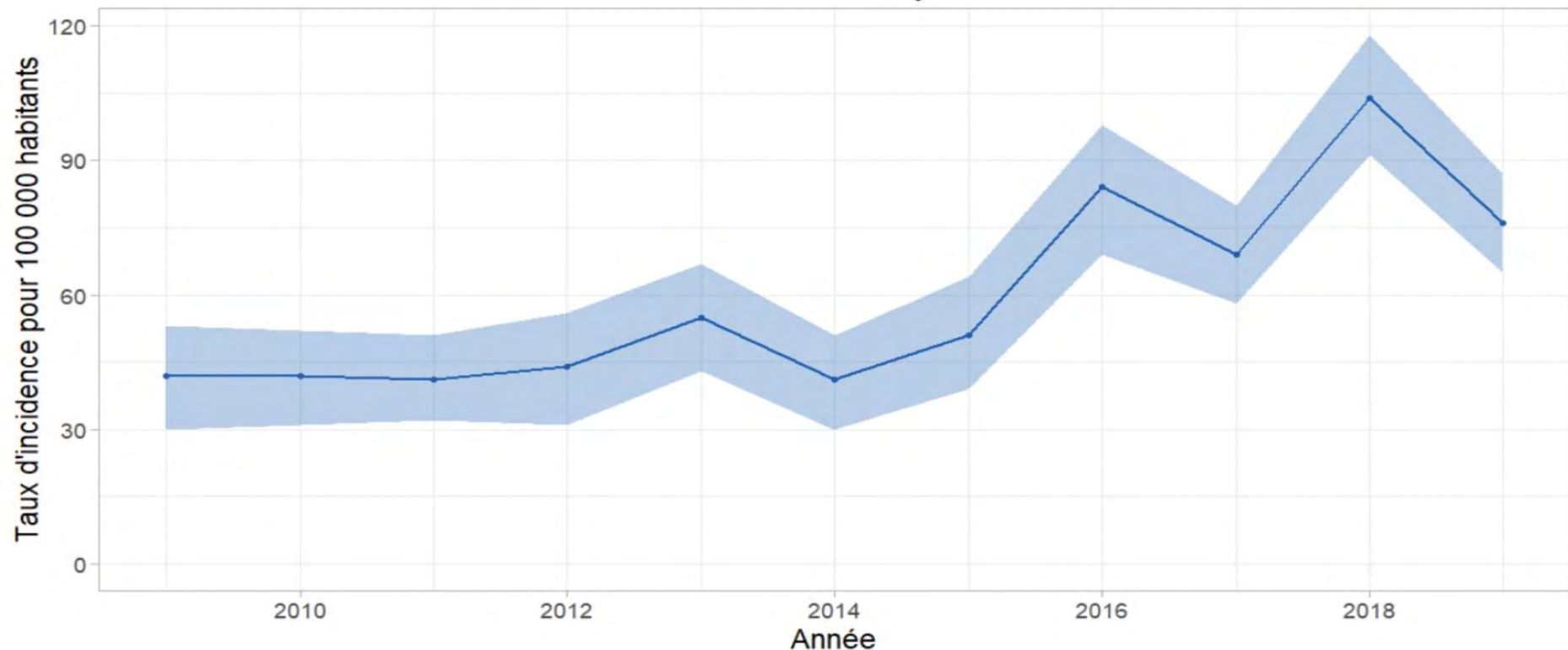
Taux d'infection par *Borrelia* en Europe : 1 – 30% (nymphes : 10% en France)

Si piqûre par une tique infectée ?



(A. Hofhuis et al., 2013)

Incidence de la borréliose de Lyme en France



- ▶ Nombre de cas déclarés par les médecins Sentinelles et validés : **230**, dont **230** (100%) individuellement décrits
 - Cas correspondant à un ou plusieurs érythèmes migrants : 228 (99,1%)
 - Cas correspondant à une manifestation disséminée : 2 (0,9%)
- ▶ Taux d'incidence annuel des cas vus en consultation de médecine générale : **76 cas / 100 000 hts** (IC95% : 65 - 87)
- ▶ Incidence annuelle des cas vus en consultation de médecine générale : **50 133 cas** (IC95% : 43 029 – 57 237)

Incidence de la borréliose de Lyme : France - Allemagne

- ▶ Nombre de cas validés : 204, dont 204 (100%) individuellement décrits
 - 197 érythèmes migrants (96,6%) et 7 formes disséminées (3,4%)
- ▶ Taux d'incidence annuel estimé : **69 cas / 100 000 habitants** (IC95% : 58 - 80)
- ▶ Incidence annuelle estimée : **44 679 cas** (IC95% : 37 540 - 51 818)

*Vandenesch et al, Eurosurveillance, 2016
Réseau Sentinelles, 2017*

SCIENTIFIC REPORTS

Received: 22 May 2018
Accepted: 17 September 2018

OPEN

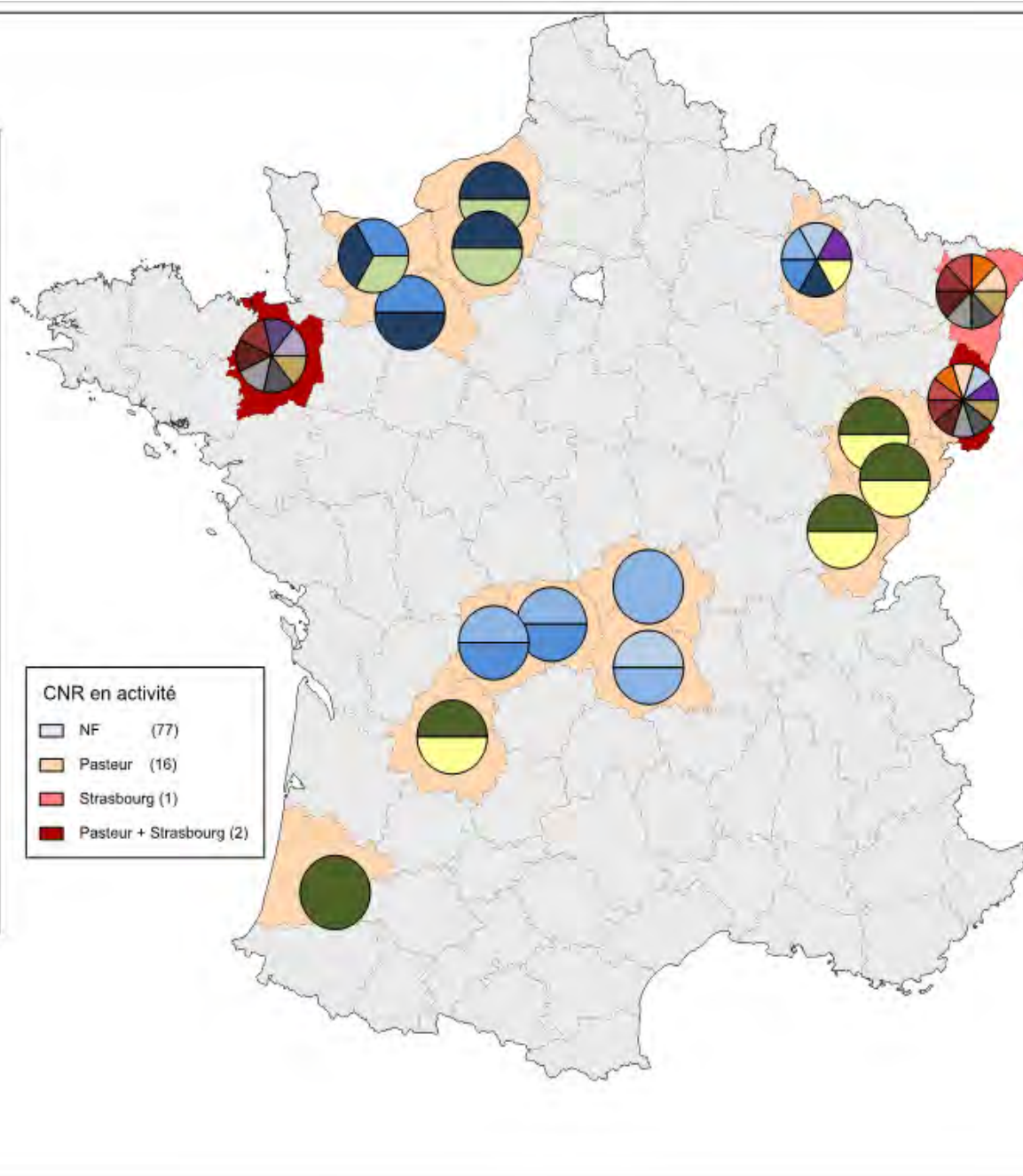
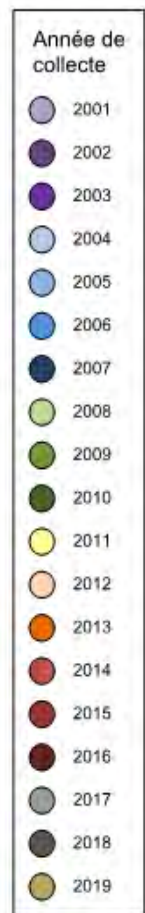
Incidence of notified Lyme borreliosis in Germany, 2013–2017

Julia Enkelmann^{1,2}, Merle Böhmer³, Volker Fingerle³, Claudia Sifczyk⁴, Dirk Werber⁵,
Martina Littmann⁶, Sophie-Susann Merbecks⁷, Carina Helmeke⁸, Sabine Schroeder⁹,
Stefan Hell¹⁰, Uwe Schlotthauer¹¹, Florian Burckhardt¹², Klaus Stark³, Anika Schielke² &
Hendrik Wilking²

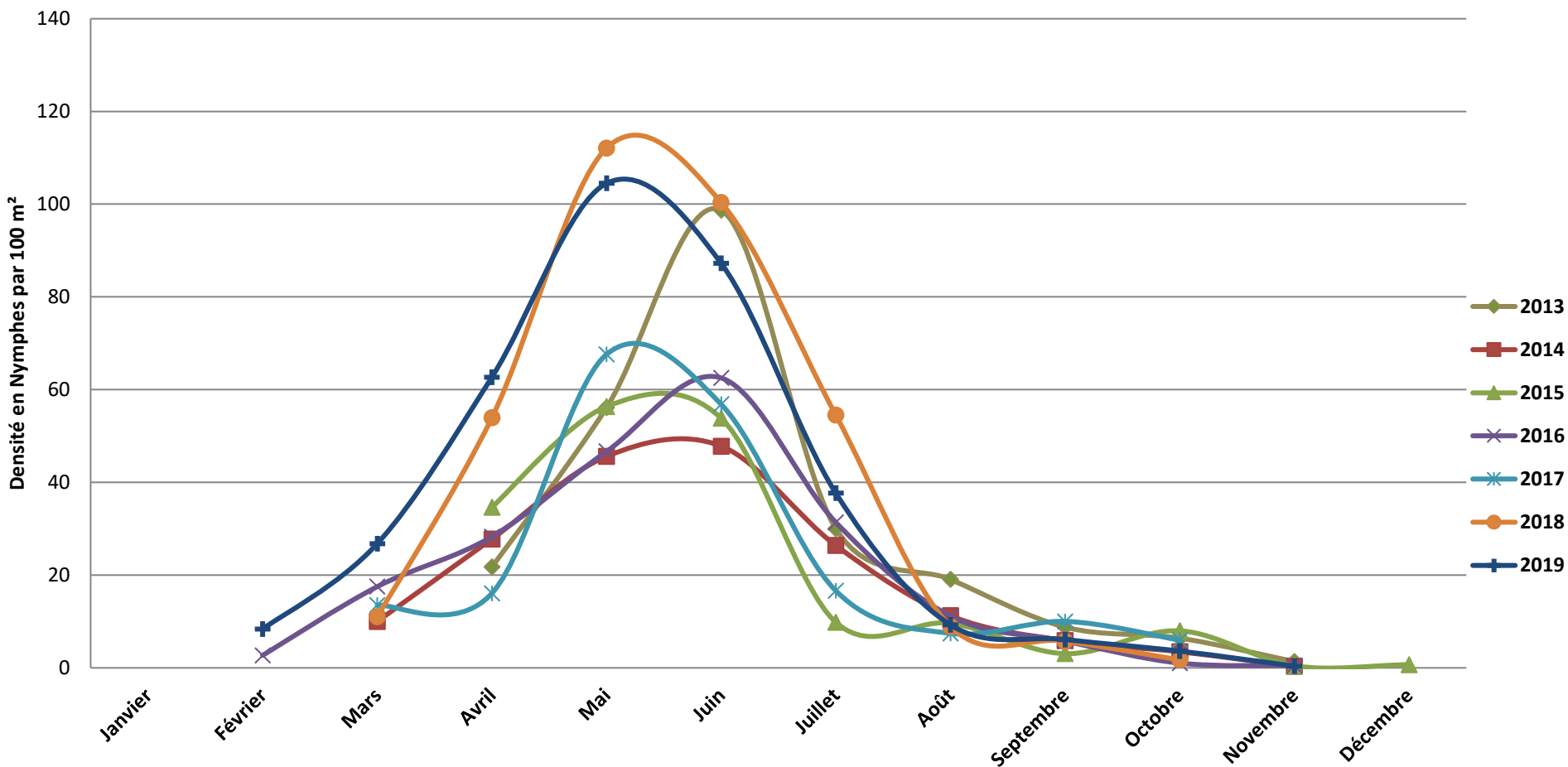
Allemagne (2018) : 9 « landers » :

- * 95 % érythèmes migrants et 4,8 % formes disséminées
- * Taux Incidence annuel estimé 2013-2017 : 26 à 41 cas/100 000 Habitants
- * Incidence annuelle estimée 2013-2017 : **56 446 cas**

(Robert Koch Institute, 2018)

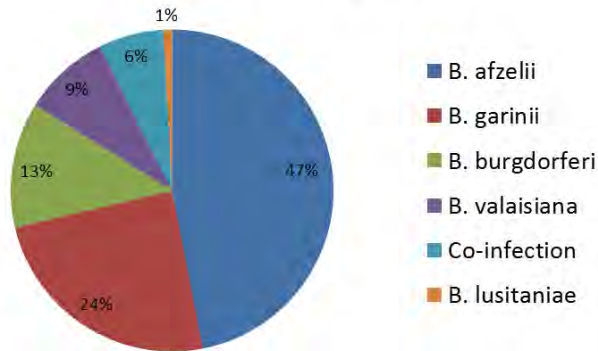


Densité mensuelle moyenne en nymphes *Ixodes ricinus* en Alsace depuis 2013

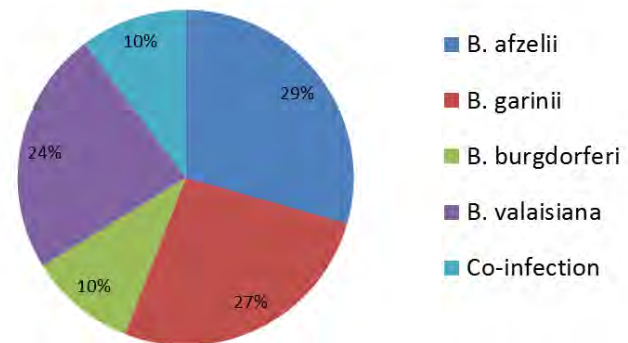


Répartition des différentes espèces de *Borrelia* en Alsace et en Bretagne (2018-2019)

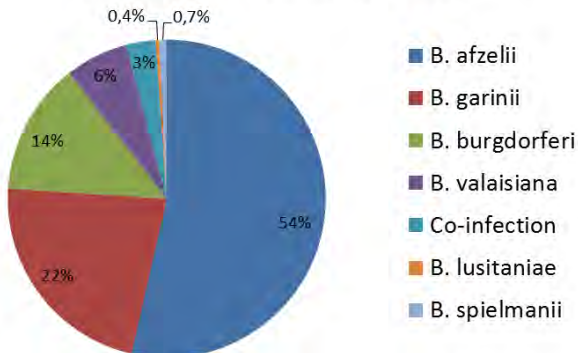
Répartition (en %) des différentes espèces de *Borrelia* en Alsace en 2018



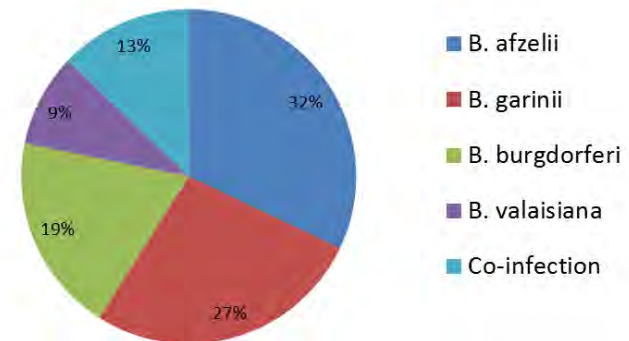
Répartition (en %) des différentes espèces de *Borrelia* en Bretagne en 2018



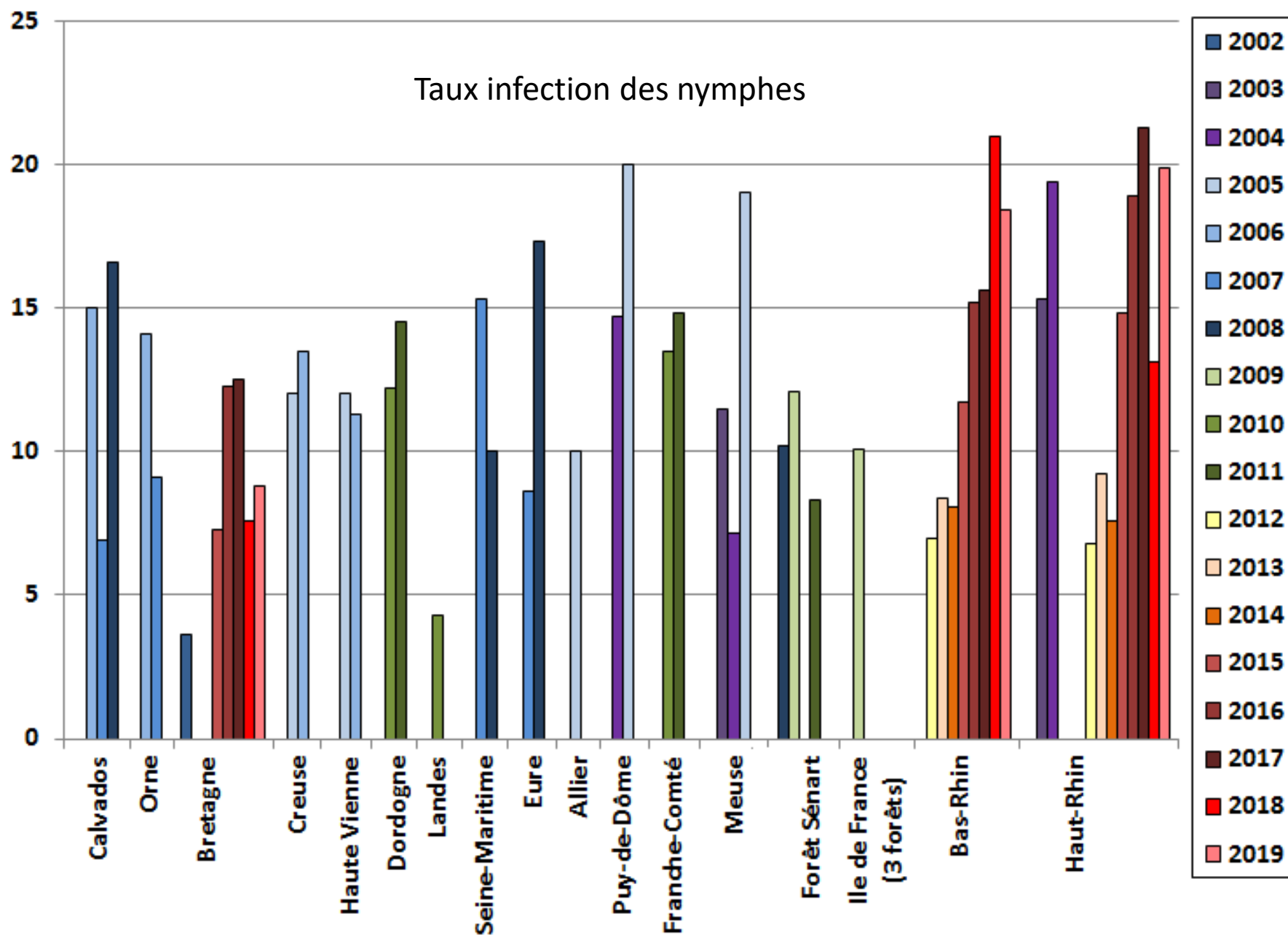
Répartition (en %) des différentes espèces de *Borrelia* en Alsace en 2019



Répartition (en %) des différentes espèces de *Borrelia* en Bretagne en 2019

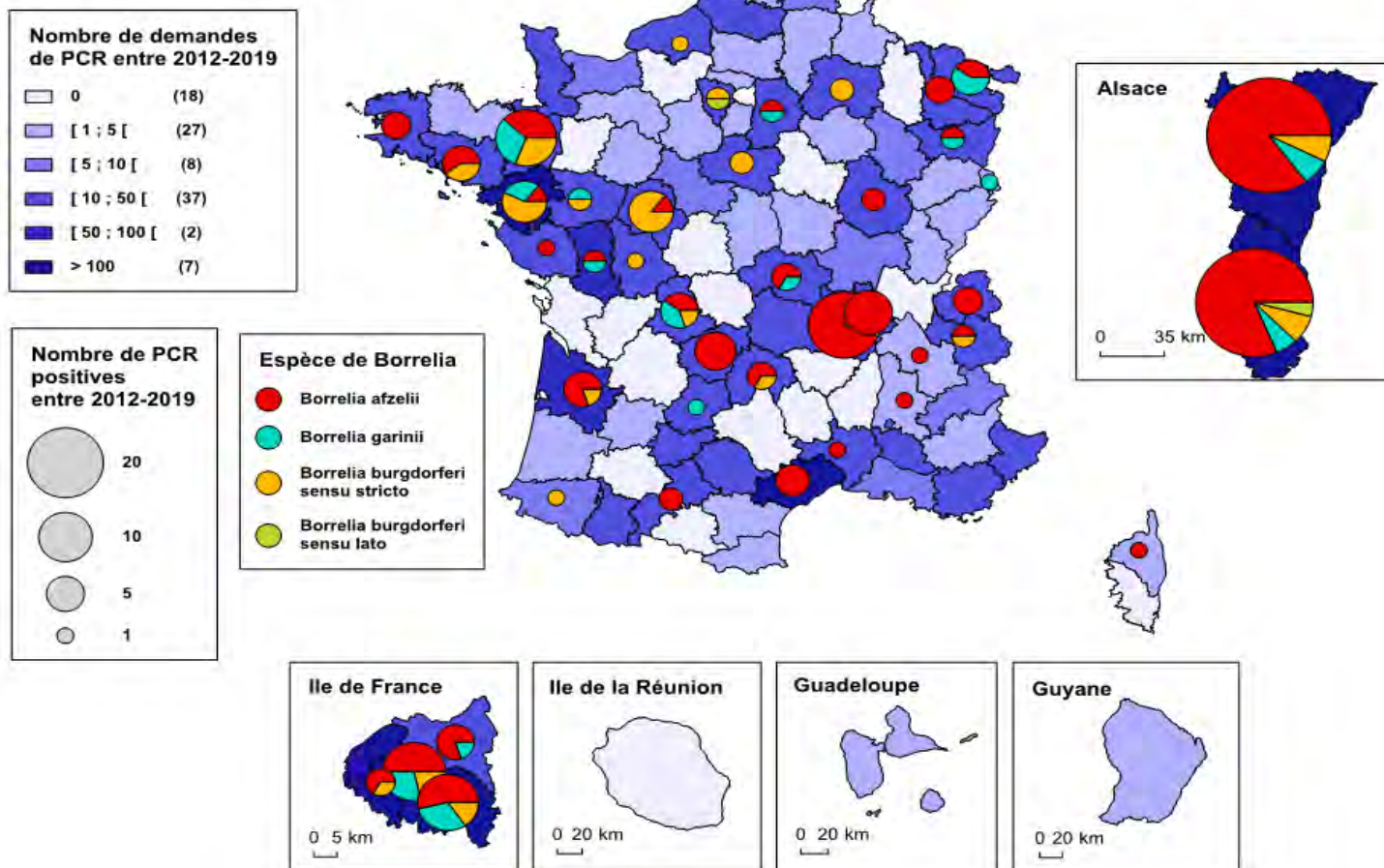


Taux infection des nymphes



Espèces de *Borrelia* détectées chez l'Homme en France (n = 263)

Répartition des prélèvements analysés
en PCR entre 2012 - 2019

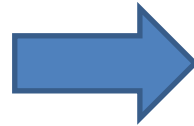


Infections humaines : autres pathogènes ?

Tique *Ixodes*



**TRANSMISSION ?
INFECTION ?**



Maladie ?

B. burgdorferi sl : oui

Anaplasmose : oui

TBEV : oui

Francisella : parfois

B. myiamotoi : oui si ID

Babesiose : oui si ID

Neorlichia mikurensis :
oui si ID

Rickettsia helvetica ?

Autres ??

Détection **ADN** : 25 bactéries, 12 parasites et virus
(*Borrelia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*,
Bartonella,
Candidatus Neorlichia, *Coxiella*, *Francisella*,
Babesia, *Theileria* ...)

Tests diagnostiques borréliose de Lyme européenne

- *Tests directs :*
 - **Culture** : lente – réservé aux labos spécialisés - sensibilité variable selon le site anatomique
 - **PCR** : *sensibilité mauvaise sur LCS +++*, *quasi nulle sur le sang +++*
 - **Utile sur biopsies et sur liquides articulaires**
 - **PCR « animal »**
- *Sérologie :*
 - En 2 temps (EIA ± WB) : pour conjuguer sensibilité et spécificité
 - **N'est pas un test de dépistage** -> sérologie positive ≠ maladie
 - **A prescrire et à interpréter en fonction de la clinique +++**
 - Ne permet pas de **écarter** cicatrice sérologique et infection active
 - Attention aux IgM (+) isolées persistantes ++
 - Neuroborréliose : intérêt de la PL associée ++ :
 - Lymphocytose
 - Synthèse intrathécale spécifique anti *Borrelia*

Sociétés savantes ayant participé et validé ces recommandations



Société Française
de Microbiologie



SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE
MÉDECINE DU TRAVAIL



Société Nationale Française
de Médecine Interne

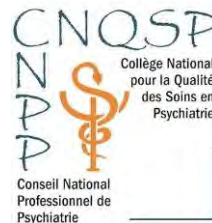


FÉDÉRATION
FRANÇAISE DE
NEUROLOGIE



Société
Française
de Cardiologie

de la
COLLÈGE
MÉDECINE
GÉNÉRALE



Société de
psychologie
médicale et de
psychiatrie de liaison
de langue française

Société française de
rhumatologie et
médecine interne
pédiatrique

Tests diagnostiques borréliose de Lyme européenne

Suspicion clinique	Sérologie ELISA	Sensibilité sérologie	Spécificité sérologie	PCR	Autres examens utiles
Piqûre de tique	Pas d'intérêt	/	/	/	Non
Erythème migrant	Non recommandé	IgG : 36% IgM : 42%	IgG : 96% IgM : 95%	PCR biopsie cutanée : Sensibilité 35-81%	PCR biopsie cutanée

Tests diagnostiques borréliose de Lyme européenne

Suspicion clinique	Sérologie ELISA	Sensibilité sérologie	Spécificité sérologie	PCR	Autres examens utiles
Piqûre de tique	Pas d'intérêt	/	/	/	Non
Erythème migrant	Non recommandé	IgG : 36% IgM : 42%	IgG : 96% IgM : 95%	PCR biopsie cutanée : Sensibilité 35-81%	PCR biopsie cutanée
Neuroborréliose précoce < 6 semaines	IgG + IgM	67-85%	92-97%	PCR LCS : Sensibilité variable	Synthèse intrathécale (index Ac) Cytologie du LCS (lymphocytose)
Neuroborréliose semi-précoce 6 semaines - 6 mois	IgG + IgM	90-99%	92-97%	PCR LCS : Pas d'intérêt	Synthèse intra-thécale Cytologie du LCS (lymphocytose)
Neuroborréliose tardive > 6 mois	IgG	99%	92-97%	PCR LCS : Pas d'intérêt	/

Tests diagnostiques borréliose de Lyme européenne

Suspicion clinique	Sérologie ELISA	Sensibilité sérologie	Spécificité sérologie	PCR	Autres examens utiles
Piqûre de tique	Pas d'intérêt	/	/	/	Non
Erythème migrant	Non recommandé	IgG : 36% IgM : 42%	IgG : 96% IgM : 95%	PCR biopsie cutanée : Sensibilité 35-81%	PCR biopsie cutanée
Neuroborréliose précoce < 6 semaines	IgG + IgM	67-85%	92-97%	PCR LCS : Sensibilité variable	Synthèse intra-thécale (index Ac) Cytologie du LCS (lymphocytose)
Neuroborréliose semi-précoce 6 semaines - 6 mois	IgG + IgM	90-99%	92-97%	PCR LCS: Pas d'intérêt	Synthèse intra-thécale Cytologie du LCS (lymphocytose)
Neuroborréliose tardive > 6 mois	IgG	99%	92-97%	PCR LCS: Pas d'intérêt	/
Arthrite de Lyme	IgG	IgG : 94% IgM : 39%	IgG : 97% IgM : 95%	PCR liquide articulaire: Sensibilité 36-85%	PCR biopsie synoviale

Tests diagnostiques borréliose de Lyme européenne

Suspicion clinique	Sérologie ELISA	Sensibilité sérologie	Spécificité sérologie	PCR	Autres examens utiles
Piqûre de tique	Pas d'intérêt	/	/	/	Non
Erythème migrant	Non recommandé	IgG : 36% IgM : 42%	IgG : 96% IgM : 95%	PCR biopsie cutanée : Sensibilité 35-81%	PCR biopsie cutanée
Neuroborréliose précoce < 6 semaines	IgG + IgM	67-85%	92-97%	PCR LCS : Sensibilité variable	Synthèse intra-thécale (index Ac) Cytologie du LCS (lymphocytose)
Neuroborréliose semi-précoce 6 semaines - 6 mois	IgG + IgM	90-99%	92-97%	PCR LCS: Pas d'intérêt	Synthèse intra-thécale Cytologie du LCS (lymphocytose)
Neuroborréliose tardive > 6 mois	IgG	99%	92-97%	PCR LCS: Pas d'intérêt	/
Arthrite de Lyme	IgG	IgG : 94% IgM : 39%	IgG : 97% IgM : 95%	PCR liquide articulaire: Sensibilité 36-85%	PCR biopsie synoviale
Acrodermatite chronique atrophante	IgG	IgG : 99% IgM : 18%	IgG : 97% IgM : 97%	PCR biopsie cutanée : Sensibilité 16-92%	Histologie

Tests diagnostiques autres MVT

Suspicion clinique	Sérologie	Critères diagnostiques sérologiques	Spécificité sérologie	PCR	Autres examens utiles
Encéphalite à tiques	IgG + IgM	IgM et IgG Séroconversion ou Augmentation IgG	Réactions croisées : autres arboviroses, vaccin fièvre jaune (IgG)	uniquement à la phase initiale (virémie)	LCS : Cytologie (monocytose) + IgM

Tests diagnostiques autres MVT

Suspicion clinique	Sérologie	Critères diagnostiques sérologiques	Spécificité sérologie	PCR	Autres examens utiles
Encéphalite à tiques	IgG + IgM	IgM et IgG Séroconversion ou Augmentation IgG	Réactions croisées : autres arboviroses, vaccin fièvre jaune (IgG)	uniquement à la phase initiale (virémie)	LCS : Cytologie (monocytose) + IgM
Anaplasmose granulocytaire humaine	IgG, IgM ou IgT	Augmentation Ig T ou Séroconversion, Se: 32% Taux élevé Ig Totales Se : 58%	97%	PCR sur sang total, phase fébrile Se: 74%, Sp : 100%	Frottis sanguin (détection de morulae) Se : 20%

Tests diagnostiques autres MVT

Suspicion clinique	Sérologie	Critères diagnostiques sérologiques	Spécificité sérologie	PCR	Autres examens utiles
Encéphalite à tiques	IgG + IgM	IgM et IgG Séroconversion ou Augmentation IgG	Réactions croisées : autres arboviroses, vaccin fièvre jaune (IgG)	uniquement à la phase initiale (virémie)	LCS : Cytologie (monocytose) + IgM
Anaplasmose granulocytaire humaine	IgG, IgM ou IgT	Augmentation Ig T ou Séroconversion, Se: 32% Taux élevé Ig Totales Se : 58%	97%	PCR sur sang total, phase fébrile Se: 74%, Sp : 100%	Frottis sanguin (détection de morulae) Se : 20%
Babésiose	IgG + IgM ou IgT	Séroconversion ou augmentation des IgT Sensibilité : inconnue	inconnue	PCR sur sang total en phase fébrile	Frottis sanguin (détection de trophozoïtes)

Tests diagnostiques autres MVT

Suspicion clinique	Sérologie	Critères diagnostiques sérologiques	Spécificité sérologie	PCR	Autres examens utiles
Encéphalite à tiques	IgG + IgM	IgM et IgG Séroconversion ou Augmentation IgG	Réactions croisées : autres arboviroses, vaccin fièvre jaune (IgG)	uniquement à la phase initiale (virémie)	LCS : Cytologie (monocytose) + IgM
Anaplasmose granulocytaire humaine	IgG, IgM ou IgT	Augmentation Ig T ou Séroconversion, Se: 32% Taux élevé Ig Totales Se : 58%	97%	PCR sur sang total, phase fébrile Se: 74%, Sp : 100%	Frottis sanguin (détection de morulae) Se : 20%
Babésiose	IgG + IgM ou IgT	Séroconversion ou augmentation des IgT Sensibilité : inconnue	inconnue	PCR sur sang total en phase fébrile	Frottis sanguin (détection de trophozoïtes)
<i>Borrelia miyamotoi</i>	Néant	/	/	PCR sur sang total en phase fébrile	/
(<i>Candidatus</i>) <i>Neorhlichia</i> <i>mikurensis</i>	Néant	/	/	PCR sur sang total en phase fébrile	/
Fièvre boutonneuse méditerranéenne	IgG + IgM	Séroconversion ou augmentation Ig T Sensibilité : 100% après J30	Risque de réactions croisées entre les espèces	PCR sur escarre d'inoculation	Cytopénie
<i>Francisella tularensis</i>	IgG ou IgT	Séroconversion ou augmentation IgG Sensibilité : 100% après J30	Réactions croisées en IgM	PCR ulcération ou ganglion, Se : 75%	/

Autres tests de laboratoire

Le CXCL13 dans les neuroborrélioses

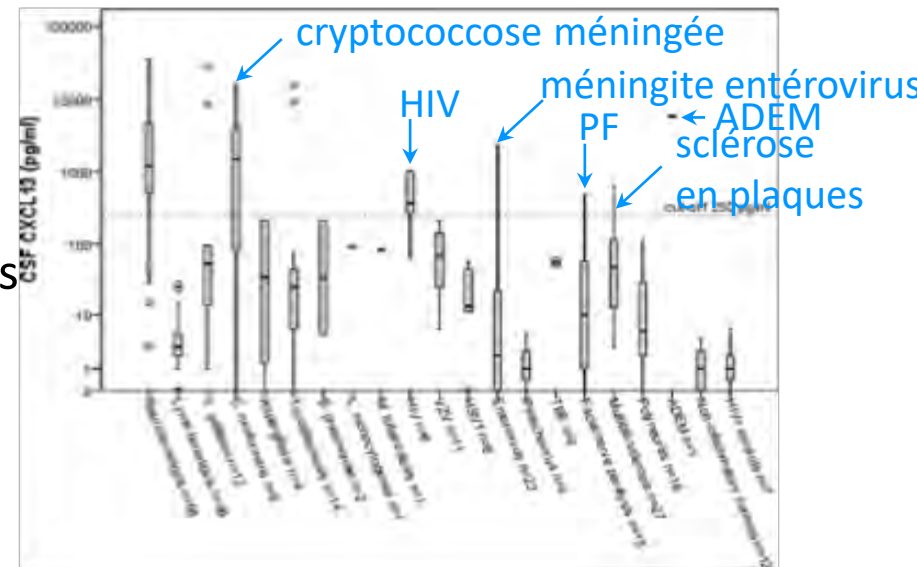
Molécule sécrétée par les cellules dendritiques avec action sur les lymphocytes B

Exprimée à des niveaux élevés **dans le LCS** de patients atteints de neuroborréliose **précoce**

Limitations = spécificité

- * Standardisation
- * Positif en cas de neuro-syphilis, de méningites carcinomateuses, de méningites virales

Intéressant pour sa VPN ?
Marqueur thérapeutique ?



1 Kingwell K., *Infectious diseases : CXCL13 is a potential biomarker for Lyme neuroborreliosis*, Nat Rev Neurol (2011)

2 Wutte N et al., *Discriminating Lyme neuroborreliosis from other neuroinflammatory diseases by levels CXCL13 in cerebrospinal fluid*, J Clin Microbiol (2011)

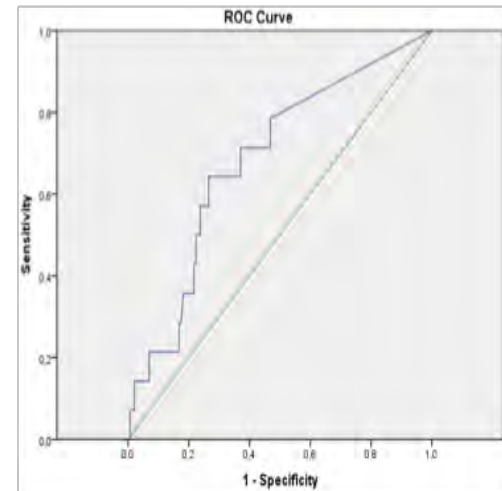
Tests de transformation lymphocytaire (TTL) ?

Technique évaluée et standardisée pour la tuberculose : mise en évidence d'une synthèse d'INF γ après stimulation des lymphocytes T par des protéines de mycobactéries

- Un réactif actuellement commercialisé pour *Borrelia* : Elispot®
- Une étude avec témoins publiée : (3)

- 14 neuroborrélioses : clinique + LCR ≥ 5 MNC/ μ L + SIT IgG
- 103 contrôle symptomatiques non-Lyme (neuro, art, ...séro sg et SIT neg)

Diagnostic groups	ELISPOT cut-off ≥ 5 spots		ELISPOT cut-off ≥ 10 spots	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Lyme neuroborreliosis (n = 14)	5 (36%)	9 (64%)	3 (21%)	11 (79%)
Non-Lyme borreliosis (n = 103)	19 (18%)	84 (82%)	8 (8%)	95 (92%)



- > **Sensibilité 36 % - Spécificité 82 % ! (3)**

1 Von Baehr V et al., The lymphocyte transformation test for *Borrelia* detects active Lyme Borreliosis and verifies effective antibiotic treatment. *The Open Neurology J* (2012)

2 Pury BK et al., Diagnostic use of the lymphocyte transformation test-memory lymphocyte immustimulation assay in confirming active Lyme borreliosis in clinically and serologically ambiguous cases. *Int J Clin Exp Med* (2014)

3 Nordberg M et al., Can ELISPOT be applied to a clinical setting as a diagnostic utility for Neuroborreliosis? *Cells* (2012)

TTL et marqueur d'activité ?



An Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay Measuring *Borrelia burgdorferi* B31-Specific Interferon Gamma-Secreting T Cells Cannot Discriminate Active Lyme Neuroborreliosis from Past Lyme Borreliosis: a Prospective Study in the Netherlands

T. van Gorkom,^{a,f} S. U. C. Sankatsing,^b W. Voet,^c D. M. Ismail,^a R. H. Mulwijk,^a M. Salomons,^a B. J. M. Vlamincx,^a A. W. J. Bossink,^a D. W. Notermans,^f J. J. M. Bouwman,^{a,g} K. Kremer,^f S. F. T. Thijsen^a

April 2018 Volume 56 Issue 4 e01695-17

Journal of Clinical Microbiology

- 33 NB actives : clinique + LCR ≥ 5 MNC/ μ L +/- SIT IgG (n=25)
- 37 NB traitées : idem, mais ≥ 4 mois après arrêt du TT
- 28 sujets sains (asympto), **TT dans le passé pour Lyme** (5/28 séro sg +)
- 145 contrôles sains (asympto), **sans ATCD** de Lyme, non TT (18/145 séro sg +)

-> Pas de distinction infection active versus infection passée versus sujets sains traités

Détection de *Borrelia* au microscope ??

Laane MM et al., A simple method for the detection of live *Borrelia spirochaetes* in human blood using classical microscopy techniques. *Biol Biomed Rep* (2013)

Aase A. et al., *Validate or falsify: Lesson learned from o microscopy method claimed to be useful for detecting Borrelia ans Babesia organisms in human blood. Inf Diseases (2016)*

Table 2. Proportion (%) of subjects positive for *Borrelia* and *Babesia* like structures (95% CI) by microscopy; Lab. 1 using the LM-method and Lab. 2 using conventional protocol of the patient group ($n = 21$) and the control group ($n = 41$).

	Lab. 1 (LM-method)		Lab. 2 (Conventional method)	
	Patient group	Control group	Patient group	Control group
<i>Borrelia</i>	52 (30–74)	61 (45–76)	nd*	nd
<i>Babesia</i>	57 (34–78)	85 (71–94)	0	0
Double infection	43 (22–66)	59 (42–74)	na*	na

nd, not done at this Lab; na, not applicable.



« *Borrelia* » en collier de perles (L-form) chez un sujet « témoin »

-> Nombre de positifs dans le groupe
« contrôle » plus élevé que dans le groupe
« patient »

Intérêt du CD57 des cellules NK ??

Musical hallucinations in patients with Lyme disease.

Stricker RB, Winger EE.

South Med J. 2003;96 :711-5.

Longterm decrease in the CD57 lymphocyte subset in a patient with chronic Lyme disease.

Stricker RB, Burrascano J, Winger E.

Ann Agric Environ Med. 2002;9 :111-3.

Decreased CD57 lymphocyte subset in patients with chronic Lyme disease.

Stricker RB, Winger EE.

Immunol Lett. 2001, 1;76 :43-8.

Natural killer cell counts are not different between patients with post-Lyme disease syndrome and controls.

Marques A, Brown MR, Fleisher TA.

Clin Vaccine Immunol. 2009;16:1249-50.

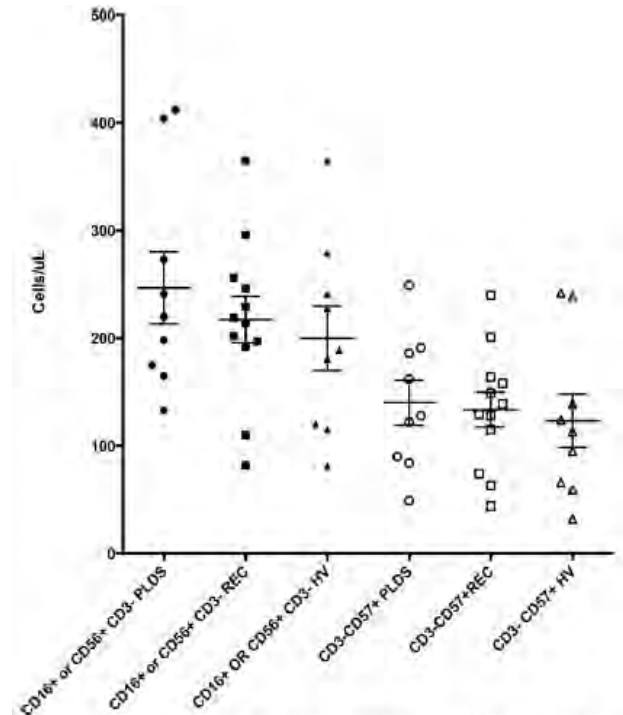
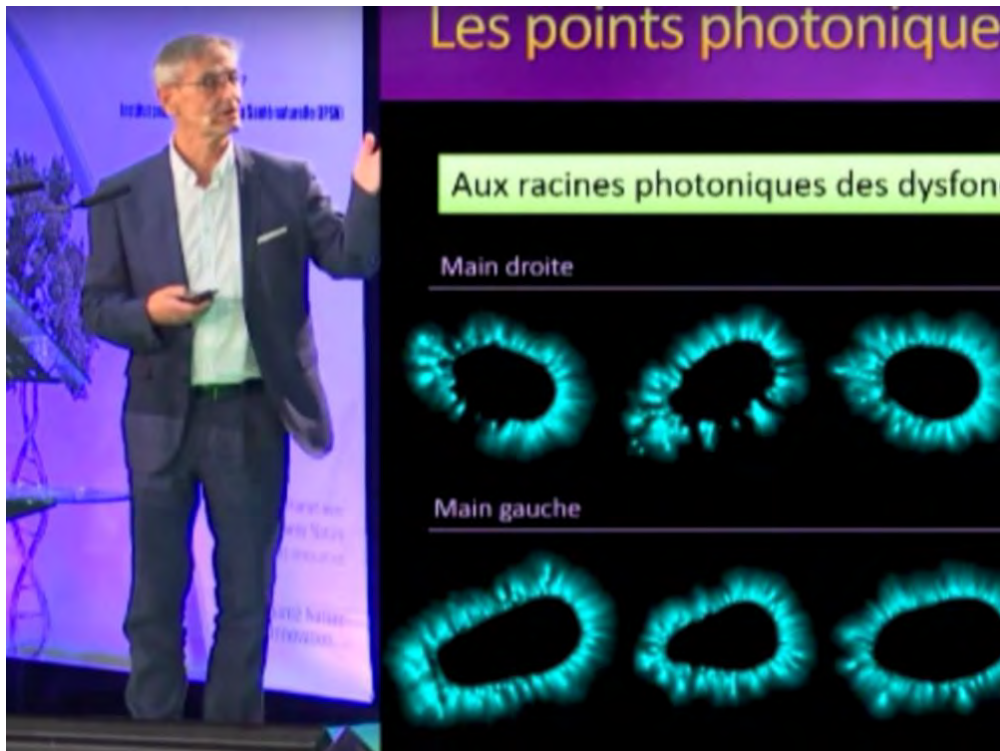


FIG. 1. Natural killer cell numbers (CD16⁺ or CD56⁺ CD3⁻) and CD3⁻ CD57⁺ cell numbers do not differ between PLDS patients, individuals who have recovered from Lyme disease (REC), and healthy volunteers (HV).

-> Aucune différence du taux des cellules NK CD57 entre les 3 groupes



Prétend dépister la maladie de Lyme avec une photographie des doigts du patient.
(Sciences & Avenir)

« la présence ou l'absence de lumière sur certaines zones de ce halo sont révélatrices de la présence de la bactérie dans le corps ».
Ainsi, le pouce signalerait le microbe au niveau du cerveau et l'index serait en relation directe avec le rectum.

Cet examen, facturé 250 € par la société, permettrait, selon ses concepteurs, de dépister presque 100 % des patients atteints de la maladie de Lyme.

De graves dérapages lors de conférences publiques
Les « captations photoniques » dont se rejouit aujourd'hui Nathalie sont l'un des risques auxquels sont exposés les malades. Cette technique repose sur l'analyse d'étranges photos révélant un « halo » entourant le bout des doigts du patient. Selon Georges Vieillefond, le P-DG de la société Electrophotonique (Ingénierie, « la présence ou l'absence de lumière sur certaines zones de ce halo sont révélatrices de la présence de la bactérie dans le corps »). Ainsi, le pouce signalerait le microbe au niveau

du cerveau et l'index serait en relation directe avec le rectum ! Cet examen, facturé 250 € par la société tarnaise, permettrait, selon ses concepteurs, de dépister presque 100 % des patients atteints de la maladie de Lyme ! Il est, en outre, associé à un traitement dit d'électrothérapie délivré par un appareil appelé Vital Harmony, conçu lui aussi par la société de Georges Vieillefond et vendu aux malades près de 700 euros. Il consiste à délivrer des microcourants grâce à

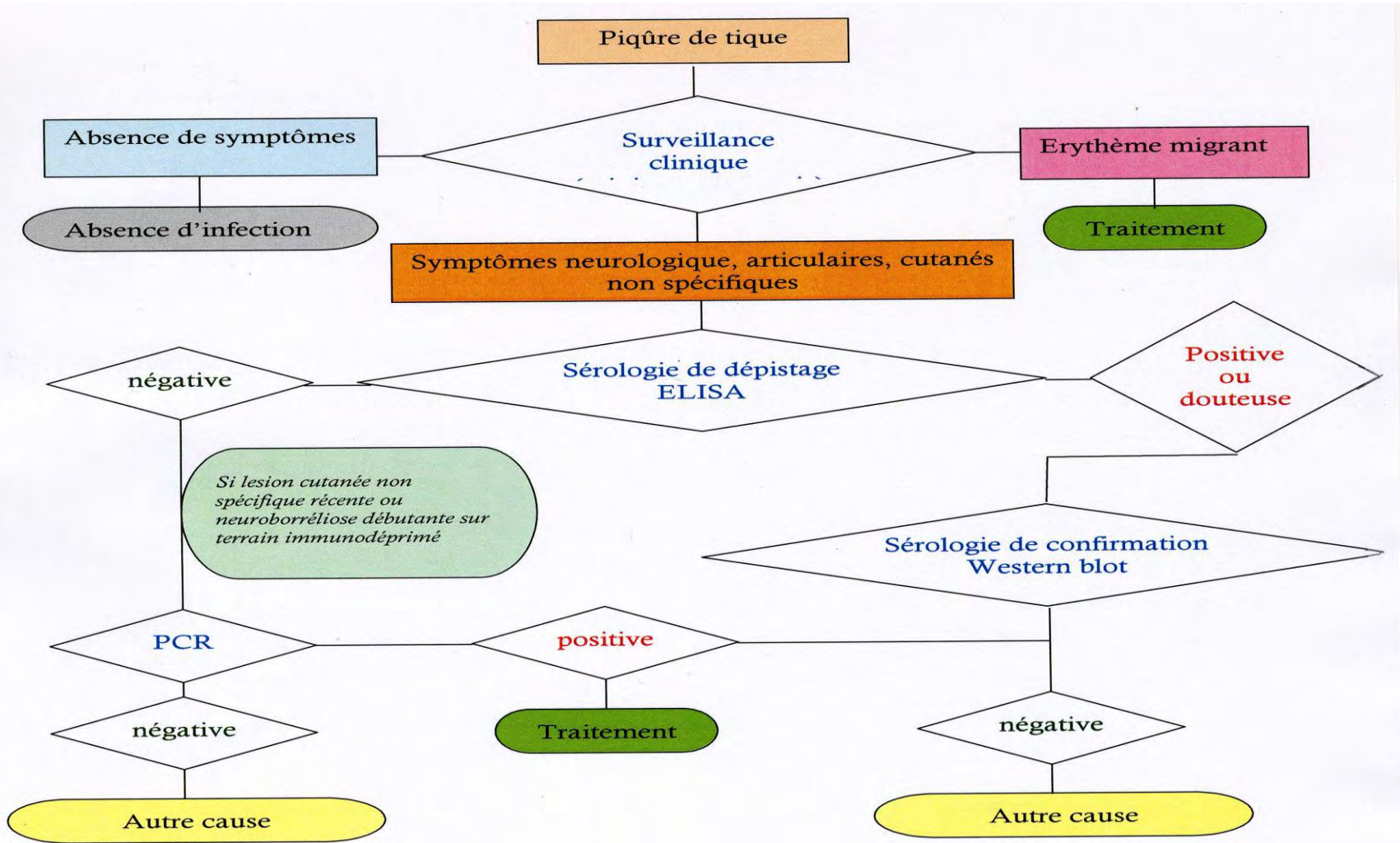
deux électrodes tenues en main par le patient. Pour tenter de prouver l'efficacité de ses deux machines, Georges Vieillefond a réussi à lancer fin 2015 une « étude » (en cours) auprès de quelque 400 malades, supervisée par le Pr Christian Perronne, du CHU de Garches (Hauts-de-Seine), et le Dr Raouf Ghoszi, du centre hospitalier de Lannemezan (Hautes-Pyrénées). Ces deux médecins sont très appréciés des malades de Lyme car ils ont été parmi les premiers hos-

Les captations photoniques des doigts
(ci-dessus) effectuées par la société Electrophotonique. Ingénierie sont censées, selon son P-DG, Georges Vieillefond (ici lors d'une conférence en 2016), dépister la maladie. Pour la suite, celle-ci vend près de 700 € la machine Vital Harmony (ci-contre).



pitaliers à braver les recommandations en ignorant les résultats « négatifs » des tests officiels pour administrer de longues cures d'antibiotiques, traitement don-

Algorithme diagnostique décisionnel en cas de suspicion de borréliose de Lyme



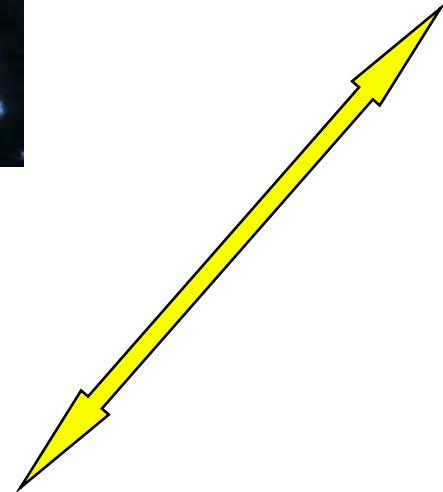
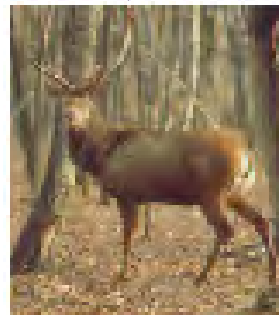
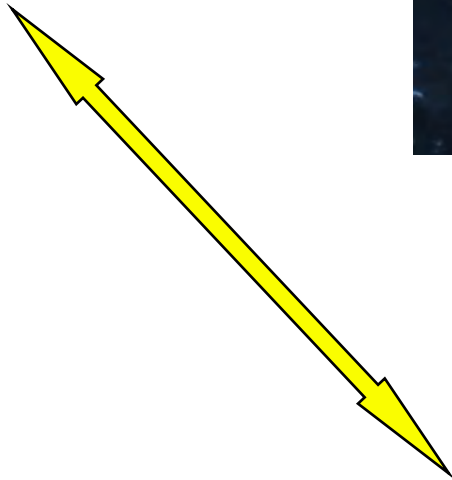
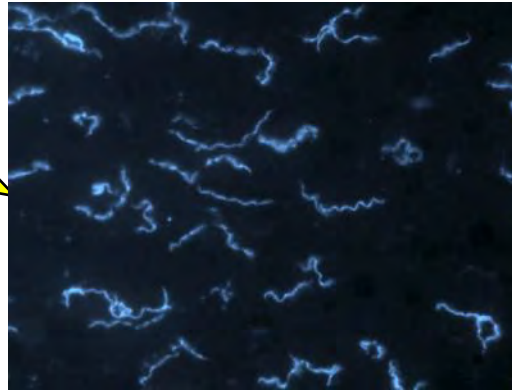
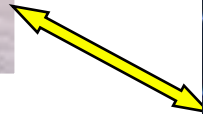
Quels enjeux du diagnostic biologique ?

- Une méthode non invasive de diagnostic biologique des formes neurologiques
- Des marqueurs d'évolutivité et de réponse thérapeutique
- Une méthode non invasive de diagnostic biologique des érythèmes migrants ($\approx 80\%$ des atteintes cliniques)
- Des tests sérologiques encore plus **spécifiques**

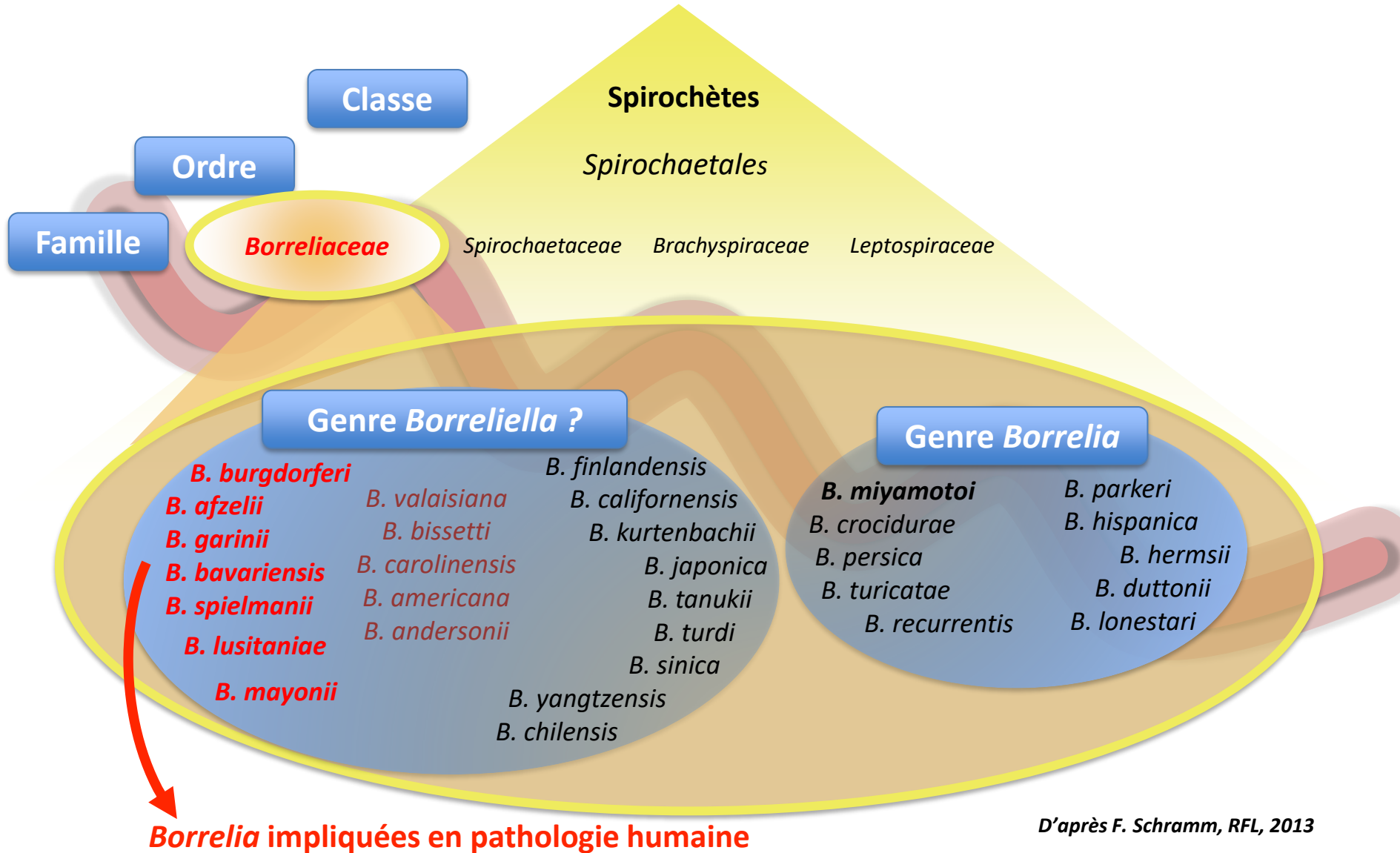
Avenir = Protéomique ? Métabolomique ? Autre méthode ?

Tests diagnostiques borréliose de Lyme européenne

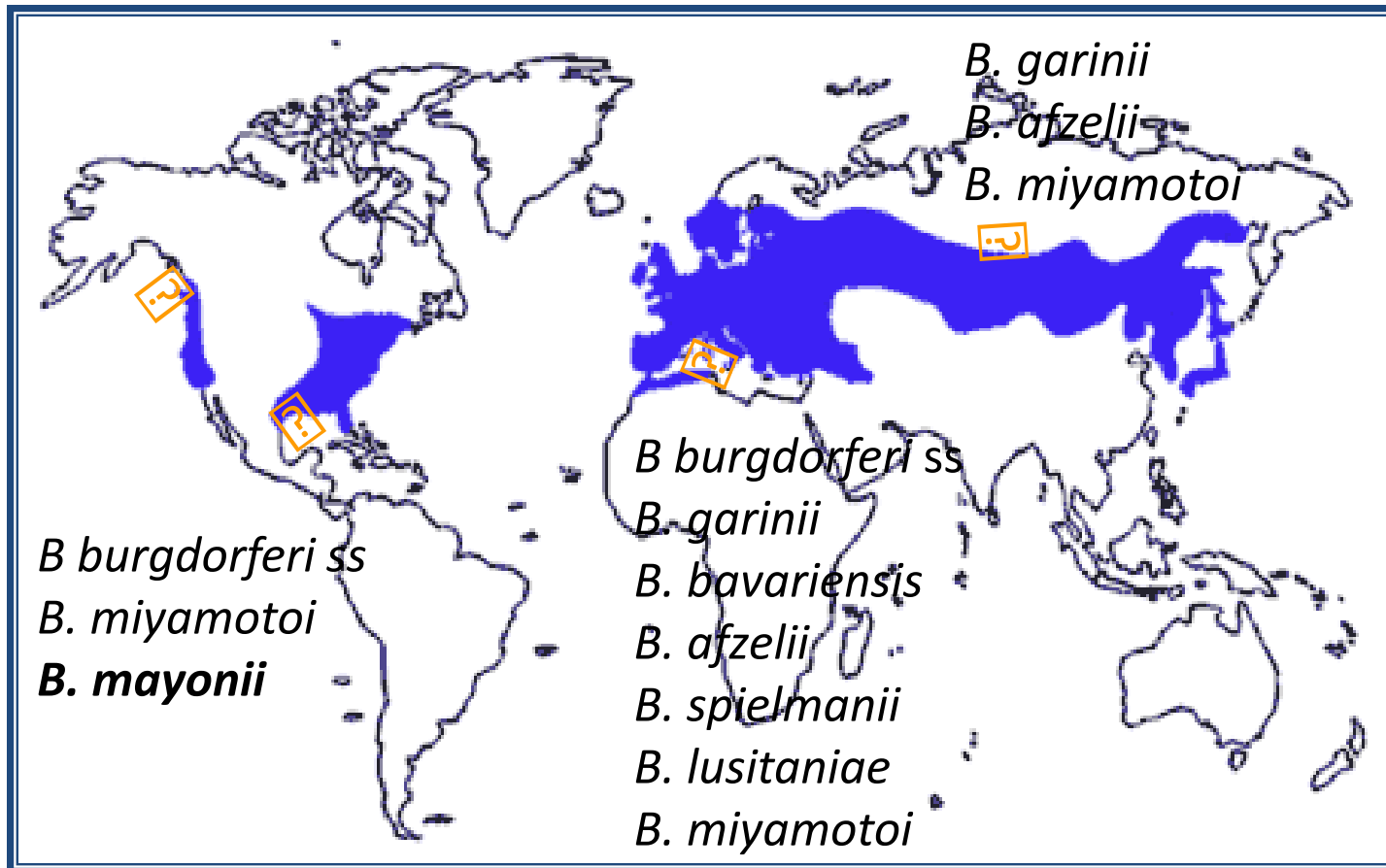
- Tests en évaluation :
 - **CXCL13 (LCR)** : marqueur d'évolutivité? Spécificité $\pm$
- Tests non recommandés :
 - **Frottis et microscopie à fond noir / contraste de phase**
 - **Dosage CD57+/CD3-**
 - **Tests sérologiques unitaires par immunochromatographie (autotests)**
 - **PCR *Borrelia* sur sang – urines**
 - **PCR *Borrelia* sur LCS si signes cliniques > 6 semaines**
- Tests avec données contradictoires/ insuffisantes :
 - **Tests de transformation lymphocytaire**
 - **Xénodiagnostic, dosage protéines membranaires, Apo B-100**



Borrelia - Borreliella ?



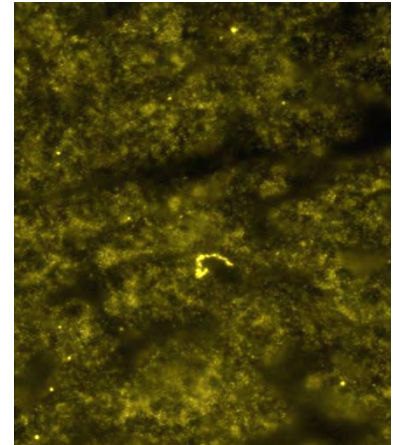
Répartition géographique



***Comment étayer biologiquement
le diagnostic de
borréliose de Lyme ?***

Diagnostic biologique direct

- **Le problème : rareté des spirochètes, intra-tissulaires**
- **Examen direct** : inadapté (sauf fièvres récurrentes)
- **Culture** = référence mais laboratoires spécialisés
 - ✓ Milieu de culture spécifique, culture lente
(2 à 8 semaines...)
 - ✓ Sensibilité culture : $\approx 50\%$ à partir d' EM, $\approx 20\%$ pour ACA,
 $3-17\%$ à partir de LCR, $< 1\%$ pour arthrite



Recherche directe par PCR

- Surtout hospitalière pour l'instant (réactifs « maison ») ;
- Des réactifs commerciaux apparaissent : *peu/pas de données humaines dans la littérature à ce jour ++*

Avantages :

- Bonne sensibilité sur lésions cutanées : EM et **ACA** (50-80 %)
- Bonne sensibilité sur **liquide synovial** (60-80 %)
- Permet de typer l'espèce en cause

Inconvénients :

- **Sensibilité très décevante dans le LCS** (< 10% à 30 %)
- **Sensibilité quasi nulle dans le sang +++**
- Une positivité ne signe pas forcément une infection active

En pratique : sérologie le plus souvent

➤ Sérologie en 2 temps : pourquoi ?

- ✓ Technique de 1^{ère} intention et non de dépistage (ELISA ++)
- ✓ But = avoir une sensibilité « maximale », au « détriment » de la spécificité
- ✓ Si ELISA (+) ou ($\pm$) ➔ technique de **confirmation** (immuno-empreinte) pour améliorer la **spécificité**

➤ **Western-blot/immuno-blot de confirmation** pour sérologie de Lyme car réactions croisées fréquentes :

- ✓ Autres agents infectieux, pathologies dysimmunitaires

Des tests inefficaces ?

Des tests inefficaces ?

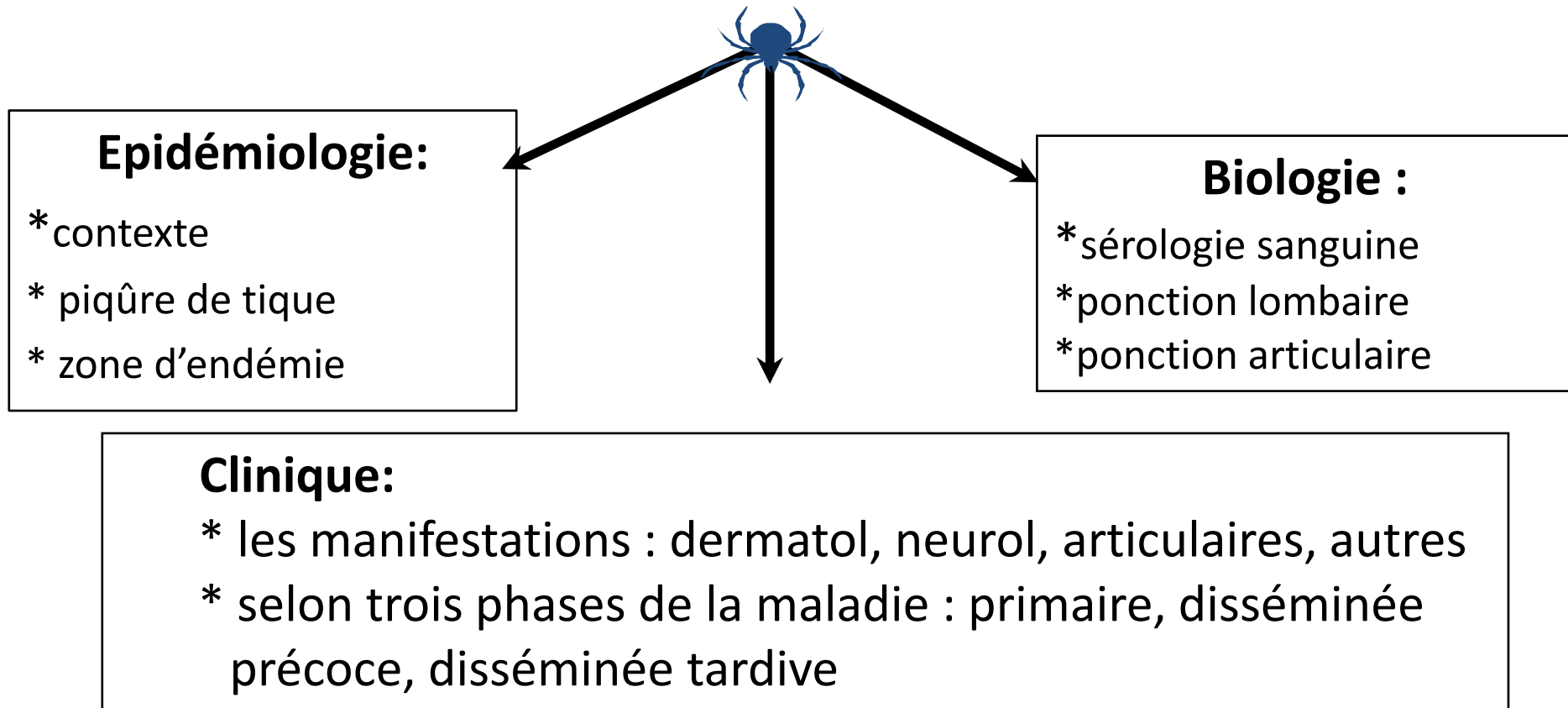
Ou des tests parfois mal utilisés ?

Prescrire la sérologie
SELON la clinique

Prescrire la sérologie
SELON la clinique

Interpréter la sérologie
AVEC des données cliniques

Borréliose de Lyme : triade diagnostique



Examen complémentaire si suspicion neuroborréliose : la ponction lombaire

- * **Réaction cellulaire lymphocytaire** (peut manquer dans les PF isolées)
 - Hyperprotéinorachie modérée
 - **Sérologie *Borrelia* positive dans le LCR** (sauf au stade très précoce de la neuroborréliose) - *Ogrinc et al. , CID, 2016*
- * **Synthèse intrathécale d'IgG anti *Borrelia* +++** - *Blanc F, et al. Neurology, 2007*
 - > **Non (encore) inscrit à la NABM**



Culture et PCR : examens optionnels, peu sensibles si neuroBb

Limites des tests sérologiques de Lyme

IgM et infection active ?

- (+) dans 40 % des arthrites de Lyme : ni marqueur Dc, ni Pc
- (+) dans 10-15% des ACA culture (+) seulement



aux IgM (+) ISOLEES dans formes disséminées++

Sérologie positive ≠ sérodiagnostic (maladie)

- Sérologie positive indique **uniquement** un contact avec *Borrelia* (Stanek G, Lancet 2012)
- Suivi sur 7 ans de sujets infectés asymptomatiquement par *Borrelia* : 95 à 98 %
ne développent rien en rapport avec *Borrelia* (Gern L, 2006)

*2^{ème} principe :
la sérologie de Lyme...*

*2^{ème} principe :
la sérologie de Lyme...
est de la sérologie...*

Limites des tests sérologiques de Lyme

- **Persistance des Ac $\neq$ persistance de l'infection ++**
 - ✓ Persistance des Ac après traitement bien conduit et efficace :
 ≥ 10 ans IgM ou IgG ++ (*Kalish RA, CID 2001*)
= cinétique normale des Ac dans de nombreuses autres infections
 - ➔ **On ne retraite pas sur la base de la sérologie ++**
 - ➔ **se centrer sur le suivi des signes cliniques **objectifs** ++**
 - ➔ **Risque de retraitement par excès ++**

Immuno-empreinte (western-blot)

Méthode qualitative

* Nombreux tests commercialisés :

- But WB = objectiver la spécificité des anticorps (uniquement)
- Souches locales représentées → en Europe occidentale
B. afzelii / *B. garinii* : **93 % des tests sur le marché français**

* Pas de marqueur d'infection active à ce jour ++ :

- ✓ pas de différenciation entre infection asymptomatique, cicatrice sérologique - pas de marqueur de maladie persistante
→ Nécessité d'une recherche dans ce domaine

Distribution dans la population



Sujets séropositifs
pour *Borrelia*

Patients avec
une neuroborréliose

Patients avec des
troubles neurologiques

-> Valeur Prédictive Positive

Problématique des tests diagnostiques

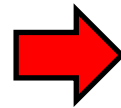
Population à forte séroprévalence (Alsace, Limousin...)

Séroprévalence : 10 %

Prévalence : 1 %

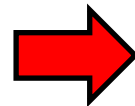
Spécificité analytique : 95 %

Sensibilité : 98 %



$VPN = 99,97$

%



$VPP = 16,5 \%$



Uniquement 16,5 %
de « chance » de
trouver un patient
malade avec un test
positif sur l'ensemble
de la population
ayant un test positif

Problématique des tests diagnostiques

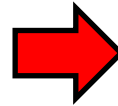
Population avec une séroprévalence moyenne (2 %)

Séroprévalence : 2 %

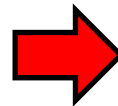
Prévalence : 0,2 %

Spécificité analytique : 95 %

Sensibilité : 98 %



$VPN = 99,99 \%$



$VPP = 3,78 \%$



Uniquement 3,78 % de « chance » de trouver un patient malade avec un test positif sur l'ensemble de la population ayant un test positif.



Merci pour votre attention

Test de transformation lymphocytaire (LTT)

Send Orders of Reprints at reprints@benthamscience.org

104 The Open Neurology Journal, 2012, 6, (Suppl 1-M5) 104-112

Open Access

The Lymphocyte Transformation Test for Borrelia Detects Active Lyme Borreliosis and Verifies Effective Antibiotic Treatment

Volker von Baehr¹, Cornelia Doeblis², Hans-Dieter Volk², Rüdiger von Baehr^{1,2*}

¹Institute for Medical Diagnostics, Immunology Department, Nicolaistrasse 22, 12247 Berlin

²Institute for Medical Immunology, Charité University Medicine Berlin, Campus Mitte, Charitéplatz 1, 10117 Berlin

Abstract: Borrelia-specific antibodies are not detectable until several weeks after infection and even if they are present, they are no proof of an active infection. Since the sensitivity of culture and PCR for the diagnosis or exclusion of borreliosis is too low, a method is required that detects an active Borrelia infection as early as possible. For this purpose, a lymphocyte transformation test (LTT) using lysate antigens of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii* and recombinant OspC was developed and validated through investigations of seronegative and seropositive healthy individuals as well as of seropositive patients with clinically manifested borreliosis. The sensitivity of the LTT in clinical borreliosis before antibiotic treatment was determined as 89.4% while the specificity was 98.7%. In 1480 patients with clinically suspected borreliosis, results from serology and LTT were comparable in 79.8% of cases. 18% were serologically positive and LTT-negative. These were mainly patients with borreliosis after antibiotic therapy. 2.2% showed a negative serology and a positive LTT result. Half of them had an early erythema migrans. Following antibiotic treatment, the LTT became negative or borderline in patients with early manifestations of borreliosis, whereas in patients with late symptoms, it showed a regression while still remaining positive. Therefore, we propose the follow-up monitoring of disseminated Borrelia infections as the main indication for the Borrelia-LTT.

Keywords: Borrelia, serology, borreliosis, diagnostics, immune response, lymphocyte transformation test, T cells.

INTRODUCTION

Lyme borreliosis is the most common disease transmitted by tick bite. Lyme borreliosis first manifests locally on the skin at the site of the tick bite and then systemically, possibly affecting one or more organs such as the skin, joints, muscles, sense organs, nervous system and heart. In the latter case, early (stage I) and late (stage III) manifestations can be distinguished [1]. Lyme borreliosis should be diagnosed by history and clinical symptoms. If the clinical symptoms are clear, laboratory diagnostics are of secondary importance only. The difficulty is, however, that the tick bite often goes unnoticed and the erythema migrans does not necessarily occur or is not noticed. In these cases, the requirement for early antibiotic treatment of borreliosis to prevent the complications of systemic dissemination of the pathogen, particularly of late borreliosis, cannot be met.

The symptoms associated with the systemic phase of Lyme borreliosis can be highly varied and ambiguous. In these cases, the detection of Borrelia-specific antibodies (serological laboratory diagnosis) becomes important for the diagnosis and treatment decision. The necessarily high quality demands cannot yet be completely fulfilled by Borrelia serology due to the following reasons: 1) Borrelia-specific

IgM antibodies, and IgG antibodies in particular, cannot be detected until several weeks after infection [1, 2]. Seronegative cases with late stage Lyme borreliosis have also been recently described [3]. But these are becoming more rare with the increasing quality of the assays following the introduction of recombinant Borrelia antigens. 2) The heterogeneity of Borrelia species and strains within a species requires a polymorphism of the Borrelia-specific protein antigens [4, 5]. This is a difficult problem for the sensitivity of Borrelia serology. 3) IgM antibodies against Borrelia OspC may be of the nonspecific type [4, 5]. 4) A positive serological finding alone is not proof of a current active Borrelia infection [1, 4, 5]. 5) Borrelia serology is not suitable for the monitoring of therapy and evaluation of progress as IgG and IgM antibodies may persist for years after borreliosis has been cured [6].

The direct detection of Borrelia by culture or PCR has a high diagnostic value in the case of a positive result, but a negative result does not rule out Lyme borreliosis [4, 5].

There is currently no method available which, in addition to the serology, answers the question as to whether a specific case is a status post Borrelia infection or active borreliosis. Each humoral immune response to an infection requires a specific cellular immune response with clonal proliferation of various antigen-specific lymphocyte subpopulations. Of central importance here are antigen-specific T helper lymphocytes (CD4⁺ T_H cells). In addition to effector T cells, long-lived T and B memory lymphocytes are formed. In the presence of antigen-presenting cells and protein antigens,

*Address correspondence to this author at the Institut für Medizinische Diagnostik Berlin, Nicolaistrasse 22, 12247 Berlin, Germany; Tel: +49-30-77801220; Fax: +49-30-77801236; E-mail: v.von.baehr@imz-berlin.de

1874-205X/12 2012 Bentham Open

LETTER

The lymphocyte transformation test for the diagnosis of Lyme borreliosis has currently not been shown to be clinically useful

R. B. Dessau¹, V. Fingerle², J. Gray³, K.-P. Hunfeld⁴, B. Jaulhac⁵, O. Kahn⁶, W. Kristoferitsch⁷, G. Stanek⁸ and F. Stele⁹

¹ Department of Clinical Microbiology, Stäglitz Hospital, Stäglitz, Denmark; ² Bavarian Health and Food Safety Authority, Munich, Germany; ³ UCD School of Biology and Environmental Science, University College Dublin, Dublin, Ireland; ⁴ Institute for Laboratory Medicine, Microbiology & Infection Control, Northwest Medical Centre, Academic Teaching Hospital, School of Medicine, The Johann Wolfgang Goethe-University, Frankfurt, Germany; ⁵ National Reference Centre for Borrelia and Group of Etude de la Bactériologie de Lyme, Laboratory of Bacteriology, Hôpital Universitaires de Strasbourg et Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ⁶ Tick radar GmbH, Berlin, Germany; ⁷ Karl Landsteiner Institute for Neuroimmunological and Neurodegenerative Disorders, SMZ-Öst Donauplatz 8, Institute for Hygiene and Applied Immunology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria; ⁸ Department of Infectious Diseases, University Medical Centre Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

Keywords: Borrelia burgdorferi, laboratory diagnosis, Lyme borreliosis, lymphocyte transformation test, sensitivity and specificity

10.1111/1469-0691.12583

Corresponding author: R. Dessau, Department of Clinical Microbiology Stäglitz Hospital, Region Sjælland, Ingemannsvej 18, 4200 Stäglitz, Denmark; E-mail: ramd@regionsejland.dk

The authors of this publication are members of the ESCMID study group for Lyme borreliosis: www.esmid.org/ESGbor

This letter is a comment on a study using the lymphocyte transformation test (LTT) for the diagnosis of active Lyme borreliosis caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato [1]. This LTT study reports the findings derived from a validation panel containing 120 blood donors seronegative for Borrelia, 40 seronegative patients with autoimmune diseases, 48 healthy seropositive controls, and 94 seropositive patients with clinical signs of Lyme borreliosis. Furthermore, 1480 samples

were investigated with both serology (Borrelia IgG and IgM ELISA, and western blot; Mikrogen, Munich, Germany) and the LTT.

The study has several major shortcomings. Concerning inclusion criteria, it was not clearly specified how the 94 patients with clinical Lyme borreliosis were defined. For example, it was not specified whether the six patients with Bannwarth's syndrome had spinal pleocytosis and a positive antibody index, as required by the European case definitions for Lyme borreliosis, and it remains unclear how it was determined that the 34 patients with migratory arthralgias were suffering from Lyme borreliosis [2]. The 160 controls for the LTT were preselected as being seronegative for Borrelia-specific antibodies, and this could introduce a selection bias, because serology and LTT results tend to correlate. The specificity of the LTT could therefore be overestimated. Concerning the selection criteria for the large group of 1480 patients, it is not clear what is meant by 'clinical diagnosis of suspected Lyme borreliosis', among what appears to be a mixture of protean disorders. The clinical spectrum of these patients was not described. Concerning the methods, it is confusing to the reader that a cut-off for a positive stimulation index may be both >5 and >3. In the results section, the selection of subsets in the tables numbered 2-5 was not explained, and the numbers do not add up. For example, 592 of the 1480 patients were reported to be LTT-positive; however, only 340 reappear in Table 3, without an explanation of how this subset was selected. A flow diagram would have been helpful. Forty per cent of the 1480 patients suspected of having Lyme borreliosis were LTT-positive, and 63% were serology-positive. This is a high percentage of positive results as compared with a series of consecutive patients suspected of having Lyme borreliosis in Denmark, where 9.2% were found to be IgM-positive and 3.3% IgG-positive. This indicates either selection bias or specificity problems in the LTT and/or the serology assay.

The main point of the article as taken from the title is the ability of the LTT to detect active infection and the effect of antibiotic treatment. However, owing to the study design, evidence of active infection is lacking. Clinical features, including follow-up and/or detection of the organism by culture or PCR, are absent. Also, the conclusion that the Borrelia LTT may be used for follow-up monitoring of disseminated B. burgdorferi sensu lato infections and provide indications for antibiotic treatment is not supported by the study design, as this would require a prospective trial with a control group. Thus, the LTT paper contains methodological shortcomings with a risk of selection bias, and the study design and the data do not support the content of the title or the

Cells 2012, 1, 153-167; doi:10.3390/cells1020153

OPEN ACCESS

cells

ISSN 2073-4409

www.mdpi.com/journal/cells

Article

Can ELISPOT Be Applied to A Clinical Setting as A Diagnostic Utility for Neuroborreliosis?

Marika Nordberg^{1,2*}, Pia Forsberg^{1,3}, Dag Nyman², Barbro H. Skogman⁴, Clara Nyberg², Jan Ernerudh^{5,6}, Ingvar Eliasson⁷ and Christina Ekerfelt⁵

¹ Department of Clinical and Experimental Medicine, Infectious Medicine Faculty of Health Sciences, Linköping University, 581 83 Linköping, Sweden; E-Mail: pia.forsberg@liu.se

² The Åland Borrelia Group, Åland, 22100 Mariehamn, Åland, Finland; E-Mails: dag.nyman@aland.net (D.N.); clara.nyberg@ahs.ax (C.N.)

³ Department of Infectious Diseases, County Council of Östergötland, 581 85 Linköping, Sweden

⁴ Center for Clinical Research (CKF) Dalarna, 791 36 Falun, Sweden; E-Mail: barbro.hedinskogman@ldalarna.se

⁵ Department of Clinical and Experimental Medicine, Clinical Immunology, Linköping University, S-581 83 Linköping, Sweden; E-Mails: jan.ernerudh@liu.se (J.E.); christina.ekerfelt@liu.se (C.E.)

⁶ Department of Clinical Immunology and Transfusion Medicine, County Council of Östergötland, 581 85 Linköping, Sweden

⁷ Department of Laboratory Medicine, NÄL, 461 85 Trollhättan, Sweden; E-Mail: ingvar.eliasson@vgregion.se

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: marika.karlsson@liu.se; Tel.: +358-457-3424995; Fax: +358-18-16595.

Received: 1 April 2012; in revised form: 7 May 2012 / Accepted: 8 May 2012 /

Published: 8 June 2012

Abstract: The aim of this prospective study was to investigate the diagnostic performance of *Borrelia* (Bb)-induced interferon (IFN)- γ secretion detected by ELISPOT modified to be feasible for clinical laboratories as a supplementary test to the laboratory diagnosis of Lyme neuroborreliosis (LNB) in an endemic setting. Between 2002 and 2004, patients with symptoms of suspected clinical LNB were included in a study conducted on the Åland islands in the Finnish archipelago, which is a hyper-endemic area for Lyme borreliosis (LB). Fourteen patients with confirmed LNB and 103 patients with non-LNB were included, and the numbers of spontaneous and Bb-induced IFN- γ -secreting cells were assayed by the ELISPOT test. The ELISPOT assay showed a weak diagnostic performance

Neuroborrélioses

Se : 36 %
Spé : 82 %

étude contrôlée

Se : 89,4 %
Spé : 98,7 %

Erreurs méthodologiques

Test de transformation lymphocytaire (LTT)

Prévalence : 1%

Forte

Spécificité : 82%

<< Recos EUCALB

Sensibilité : 36%

Très faible

LTT	Test +	Test -	Total
Neuroborréliose confirmée	36 Vrais positifs	64 Faux négatifs	100
Sujet sain	1 782 Faux positifs	8 118 Vrais négatifs	9 900
Total	1 818	8 182	10 000

Performances intrinsèques/extrinsèques des tests

Performances intrinsèques

- **sensibilité (se)** : % de test positif chez sujets malades
- **spécificité (spé)** : % de test négatif chez les sujets sains
- intrinsèques au test (pour une situation clinique donnée : ex arthrite de Lyme)
 - ☆ sont fixées par le seuil de positivité retenu (ne varient pas quand seuil fixé)
 - ☆ sont indépendantes de la prévalence de la maladie

Performances extrinsèques

- **valeur prédictive positive (VPP)** : % de sujets malades parmi les tests +
- **valeur prédictive négative (VPN)** : % de sujets sains parmi les tests -
- extrinsèques au test (pour une situation clinique donnée : ex arthrite de Lyme)
 - ☆ VPN et VPP varient en fonction du niveau de prévalence dans pop testée

Performances intrinsèques/extrinsèques des tests

	Test +	Test -	Total
Malade	Vrais positifs	Faux négatifs	?
Sujet sain	Faux positifs	Vrais négatifs	?
Total	?	?	10 000

Il existe des formes chroniques de LYME....

- Acrodermatite chronique atrophiante
- Arthrite chronique
- Neuroborrélioses tardives

= Tableaux cliniques bien définis, anomalies cliniques objectives
+ Sérologie *Borrelia* invariablement positive
+ Traitements antibiotiques « courts » efficaces

MAIS les tableaux suivants :

- **Fatigue, douleurs migratrices, difficultés de concentration**
 - Syndrome de fatigue chronique, fibromyalgie
 - « Intolérance environnementale »
 - à l'implant Essure®
 - à la nouvelle formule du Lévothyrox®
 - aux éoliennes
 - aux ondes électromagnétiques
 - aux métaux lourds
- **+/- symptômes spécifiques d'organes**
 - Colopathie fonctionnelle
 - Glossodynie, vulvodynie
 - Syndrome de tachycardie posturale
 - Céphalées de tension
- **Vision des psys : « Trouble à symptomatologie somatique » (DSM-V)**
 - **4 à 6 % de la population générale**

Les tableaux suivants :

- **Fatigue, douleurs migratrices, difficultés de concentration**

- Syndrome de fatigue chronique, fibromyalgie
- « Intolérance environnementale »
 - aux éoliennes
 - aux ondes électromagnétiques
 - aux métaux lourds

**Rôle de la médiatisation
alarmiste
Effet « nocebo »**

- **+/- symptômes spécifiques d'organes**

- Colopathie fonctionnelle
- Glossodynie, vulvodynie
- Syndrome de tachycardie posturale
- Céphalées de tension

- Vision des psychiatres : « **Trouble à symptomatologie somatique** » (DSM-V)

- 4 à 6 % de la population générale

**Ces tableaux ne sont pas « LYME »....
mais des « symptômes médicalement inexpliqués »**

Efficacité des antibiothérapies prolongées ?

- « ça marche chez moi... »
 - > « Amélioration » fluctuante...
- MAIS études contrôlées :
 - > pas de supériorité versus placebo !

Berende A et al. *N Engl J Med* 2016;374:1209-20

Kaplan RF et al. *Neurology* 2003;60:1916-22

Klempner MS et al. *N Engl J Med* 2001;345:85-92

- Nombreux traitements « alternatifs » proposés en association aux ATB

Unorthodox Alternative Therapies Marketed to Treat Lyme Disease

Lantos PM et al. *Clin Infect Dis*. 2015;60:1776-82.

Table 1. Examples of Alternative Medical Therapies Marketed to Patients for the Treatment of Lyme Disease

Categories of Therapy	Examples
Oxygen	Hyperbaric oxygen Hydrogen peroxide Ozone
Energy and radiation	Ultraviolet light Photon therapy "Cold" lasers Saunas and steam rooms "Rife" therapy (electromagnetic frequency treatments) Magnets
Metal/chelation	Mercury chelation and removal Dimercaptosuccinic acid (DMSA) 2,3-Dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) Alpha lipoic acid (ALA) Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) Removal of dental amalgam Colloidal silver Bismuth

Nutritional supplements

Vitamins C and B12
Herbs
Garlic, cilantro, Chlorella, Sarsaparilla, Andrographis, Turmeric, Olive leaf, Cat's claw
Burnt mugwort (moxibustion)
Glutathione
Fish oil
Magnesium
Salt

Biological and pharmacologic

Urotherapy (urine ingestion)
Enemas
Bee venom
Hormonal therapy
Dihydroepiandrosterone, Pregnenolone, Cortisone, Hydrocortisone
Synthetic thyroid hormone
Lithium orotate
Olmesartan
Cholestyramine
Naltrexone
Sodium chlorite (bleach)
Intravenous immune globulin (IVIG)
Apheresis
Stem cell transplantation



Long term survival, health, social functioning, and education in patients with European Lyme neuroborreliosis: nationwide population based cohort study

Obel N et al. *BMJ* 2018;361:k1998

- **2067 patients avec NB : Danemark (1986-2016)**
 - Comparés à une **cohorte témoin de 20 670 patients** appariée en âge et sexe
 - **Absence de différence** à 5 ans en terme de :
 - Mortalité
 - Nombre de séjours hospitaliers / jours d'hospitalisation
 - Taux d'emploi et revenu
 - Nombre de jours d'arrêt-maladie
 - Proportion ayant une pension d'invalidité
 - Nombre d'enfants

STRATÉGIE EN 2 TEMPS

Stratégie en 2 temps

Prévalence : 1%

Forte

Spécificité : 95%

> Recos EUCALB

Sensibilité : 98%

Excellente

Séro ELISA	Test +	Test -	Total
Lyme confirmé	98 Vrais positifs	2 Faux négatifs	100
Sujet sain	495 Faux positifs	9 405 Vrais négatifs	9 900
Total	593	9 407	10 000

Stratégie en 2 temps

1

Prévalence : 1%

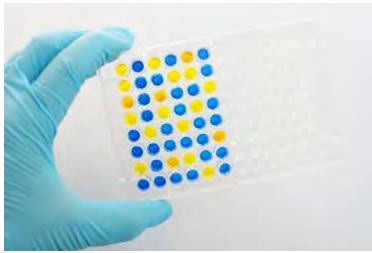
Spécificité : 95%

Sensibilité : 98%

Forte

> Recos EUCALB

Excellente



ELISA	Test +	Test -	Total
Lyme	98	2	100
Sain	495	9 405	9 900
Total	593	9 407	10 000

2

Prévalence : 1%

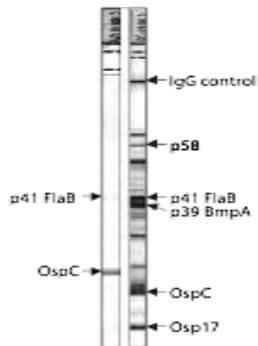
Spécificité : 98%

Sensibilité : 98%

Forte

> Recos EUCALB

Excellente



WB	Test +	Test -	Total
Lyme	?	?	98
Sain	?	?	495
Total			593

Stratégie en 2 temps

1

Prévalence : 1%

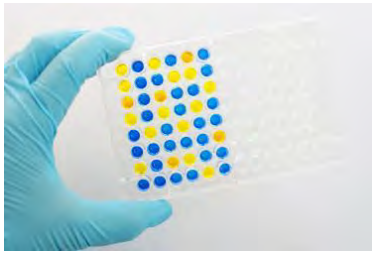
Spécificité : 95%

Sensibilité : 98%

Forte

> Recos EUCALB

Excellente



ELISA	Test +	Test -	Total
Lyme	98	2	100
Sain	495	9 405	9 900
Total	593	9 407	10 000

2

Prévalence : 1%

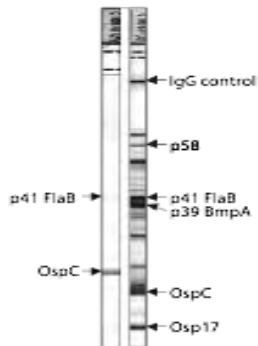
Spécificité : 98%

Sensibilité : 98%

Forte

> Recos EUCALB

Excellente



WB	Test +	Test -	Total
Lyme	96-98	0-2	98
Sain	10	485	495
Total			593

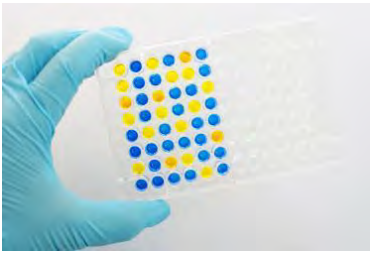
Stratégie en 2 temps

1

Prévalence : 1%

Spécificité : 95%

Sensibilité : 98%



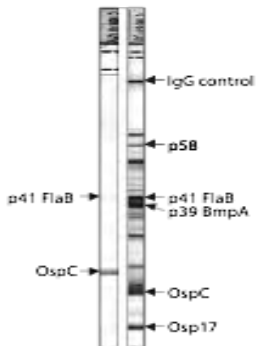
ELISA	Test +	Test -	Total
Lyme	98	2	100
Sain	495	9 405	9 900
Total	593	9 407	10 000

2

Prévalence : 1%

Spécificité : 98%

Sensibilité : 98%



WB	Test +	Test -	Total
Lyme	96-98	0-2	98
Sain	10	485	495
Total			593

Vrais positifs
96-98 % Lyme avérés

Faux positifs
10 / 10 000 tests

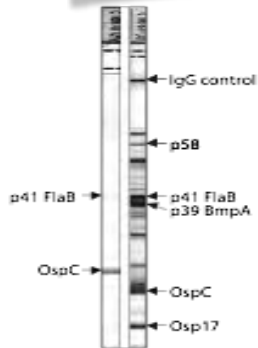
Stratégie en 2 temps vs WB seul ?

1

Prévalence : 1%

Spécificité : 98%

Sensibilité : 98%

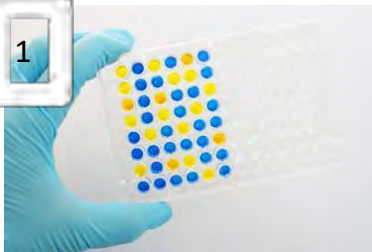


WB	Test +	Test -	Total
Lyme	98	2	100
Sain	198	9 702	9 900
Total			10 000

Vrais positifs
98 % Lyme avérés

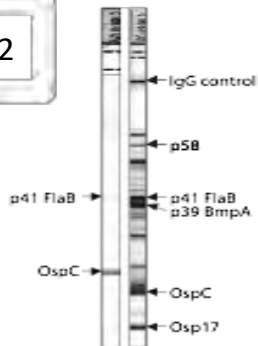
Faux positifs
200 / 10 000 tests

1



ELISA	Test +	Test -	Total
Lyme	98	2	100
Sain	495	9 405	9 900
Total	593	9 407	10 000

2



WB	Test +	Test -	Total
Lyme	96-98	0-2	98
Sain	10	485	495
Total			593

Vrais positifs
96-98 % Lyme avérés

Faux positifs
10 / 10 000 tests

Immuno-empreinte (immunoblot)

- Indication = méthode de confirmation quand technique de première intention (+) ou douteuse
- Western-blot plus sensible que l'ELISA?

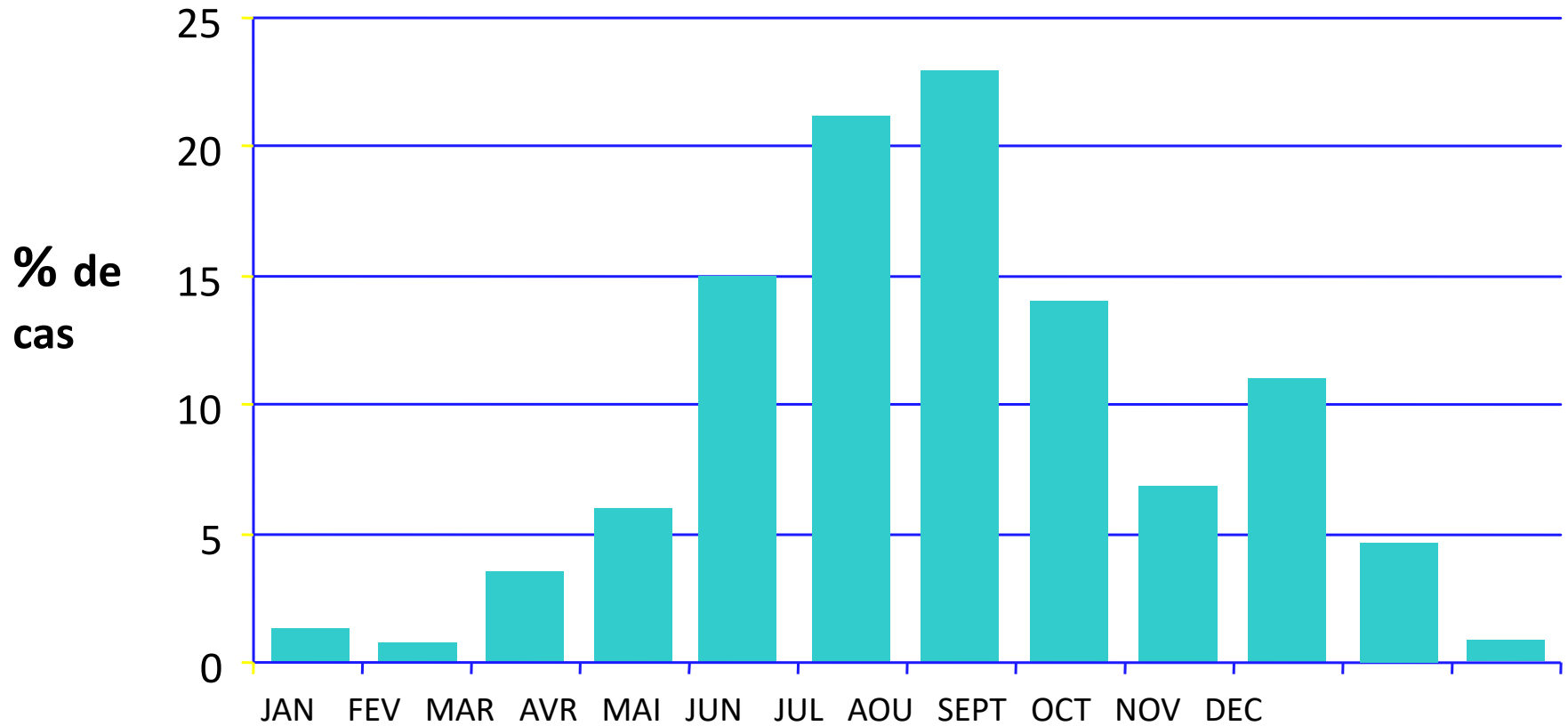
Table 18. Summary estimates of test accuracy for EIAs and IB tests for LA case-control studies with healthy controls

Test type	Diagnostic odds ratio (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
EIA	377.7 (93.7–1522.0)	0.96 (0.89–0.98)	0.94 (0.89–0.97)
IB	191.6 (11.0–3335.9)	0.93 (0.48–0.99)	0.93 (0.89–0.96)

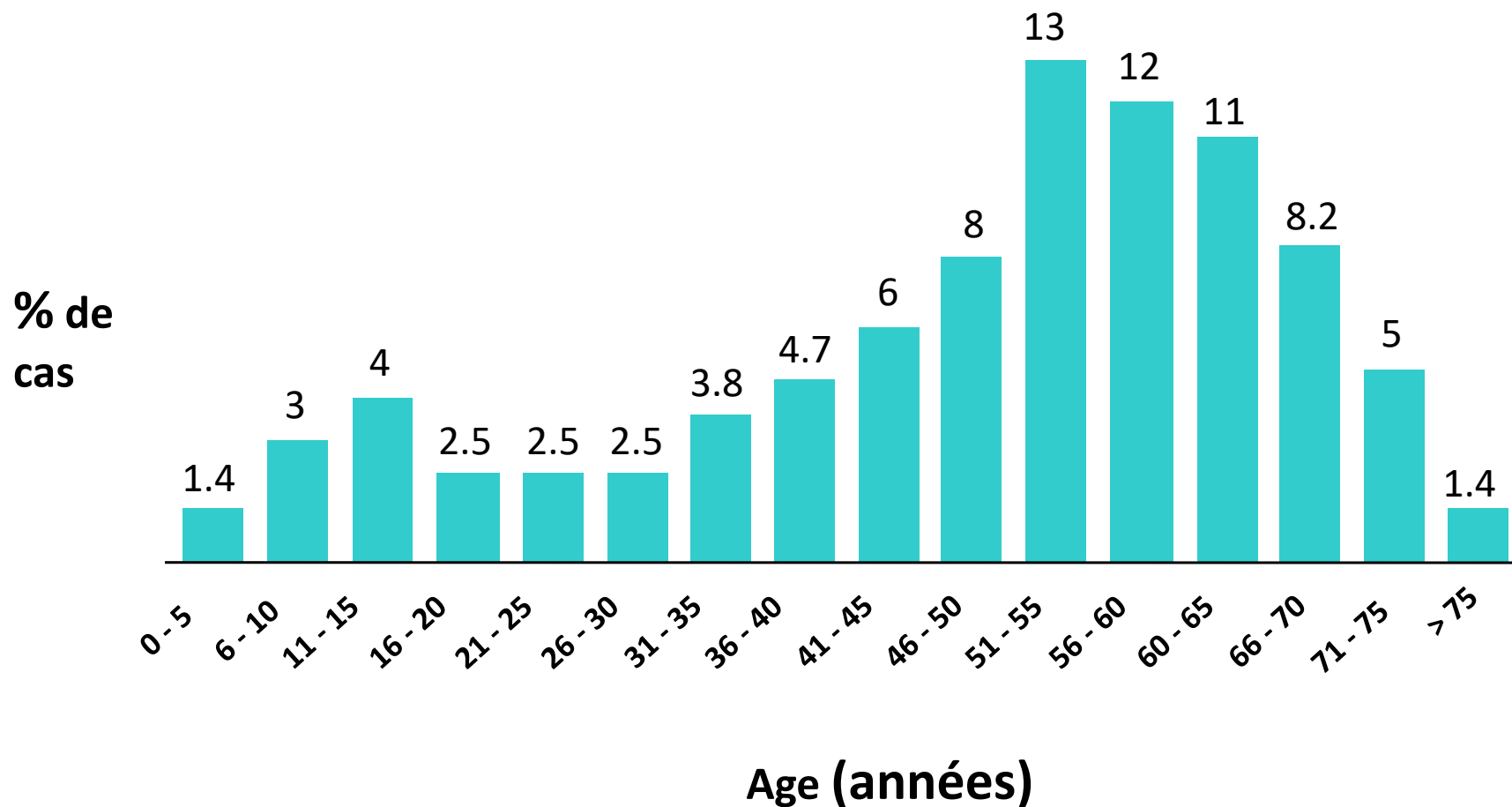
Table 10. Summary estimates of test accuracy for commercial and in-house IBs and EIAs for NB case-control studies with healthy controls

Test type	Diagnostic odds ratio (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Commercial EIA	68.5 (36.5–129.0)	0.81 (0.70–0.89)	0.94 (0.91–0.96)
Commercial IB	51.8 (15.4–174.0)	0.81 (0.57–0.96)	0.92 (0.88–0.95)

Mois de Contamination

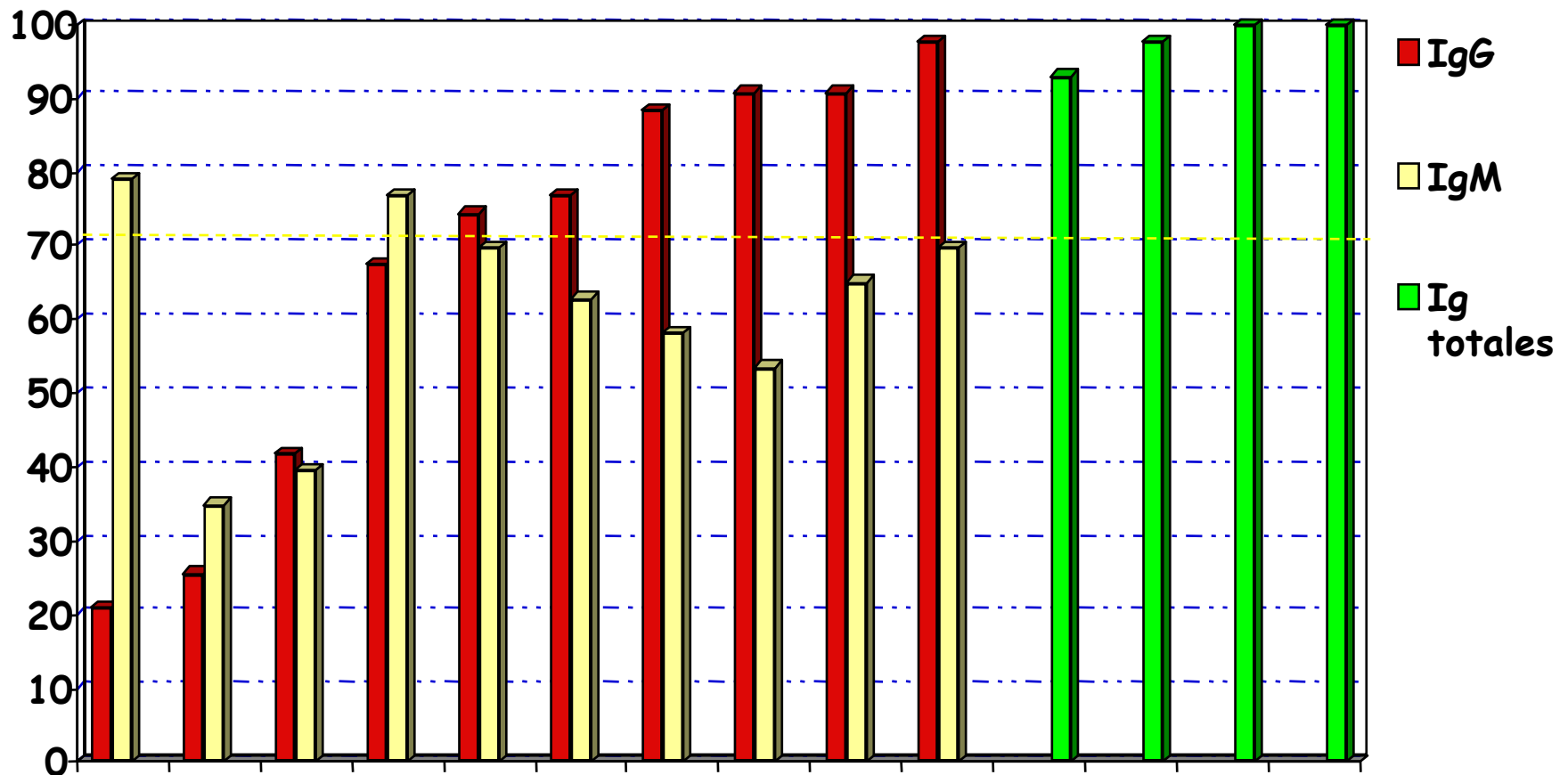


Age de la borreliose de Lyme

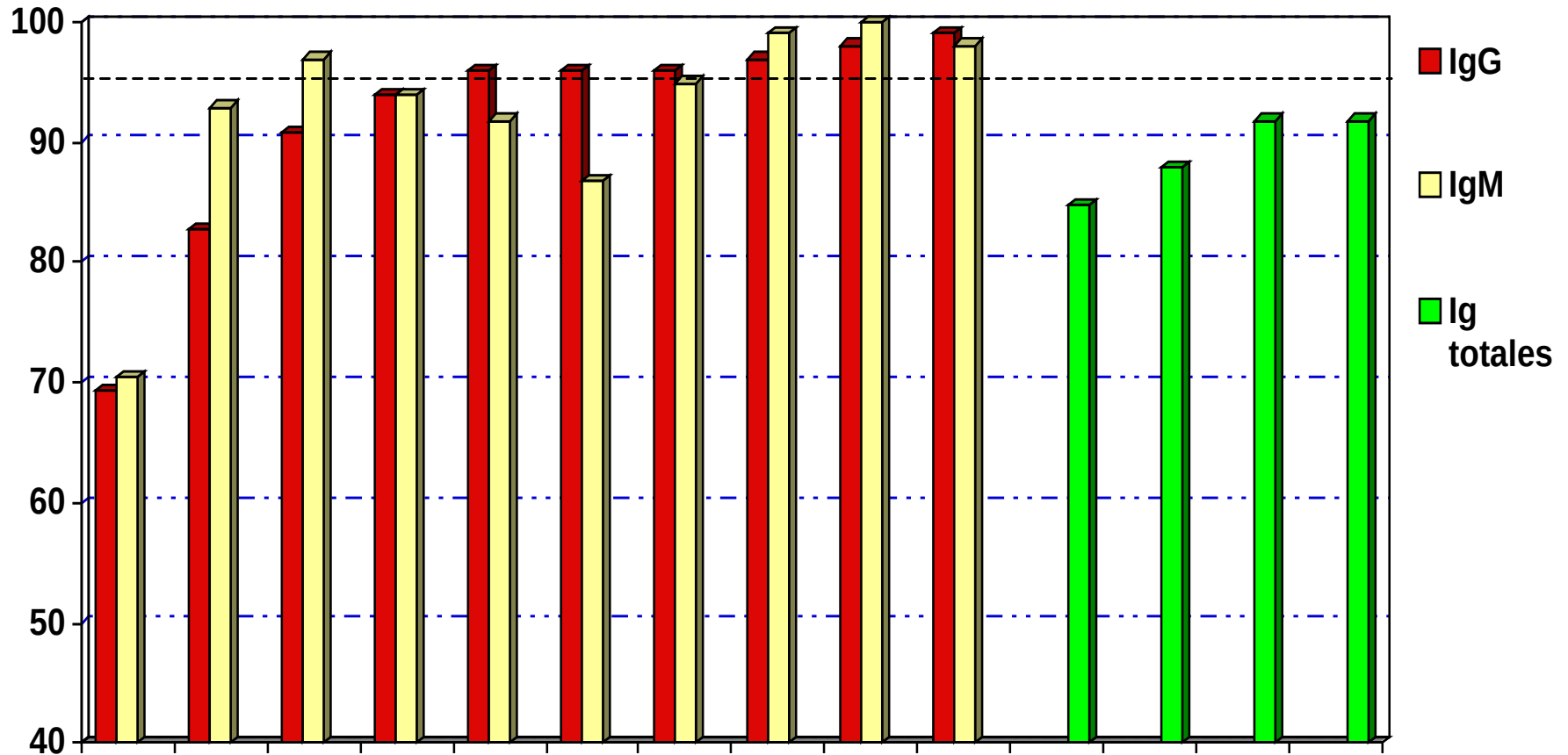


Sensibilité sur sérum

(stade de neuroborréliose)

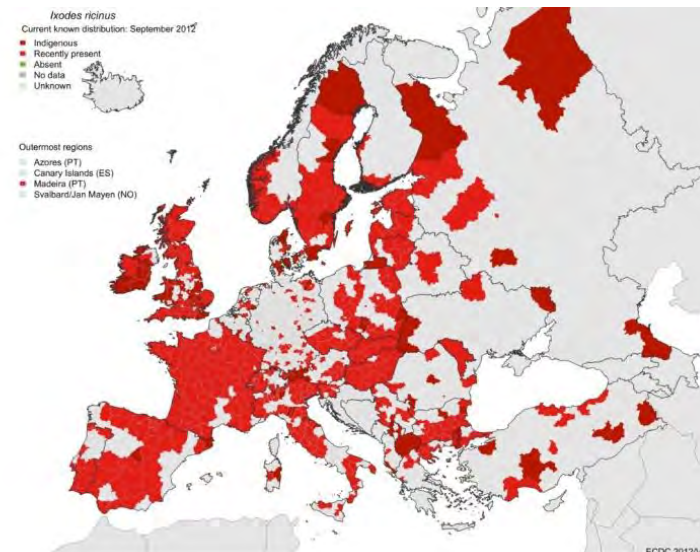


Spécificité des coffrets ELA Borrelia



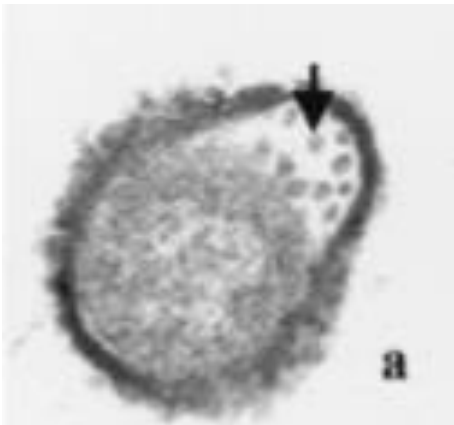
Epidémiologie

- **Hémisphère Nord** : Prédominance en Europe centrale : Autriche, Slovénie, Scandinavie
- Zones boisées et humides, typiquement de Mars à Novembre
- Piqûre indolore, rarement infestante si durée < 24h

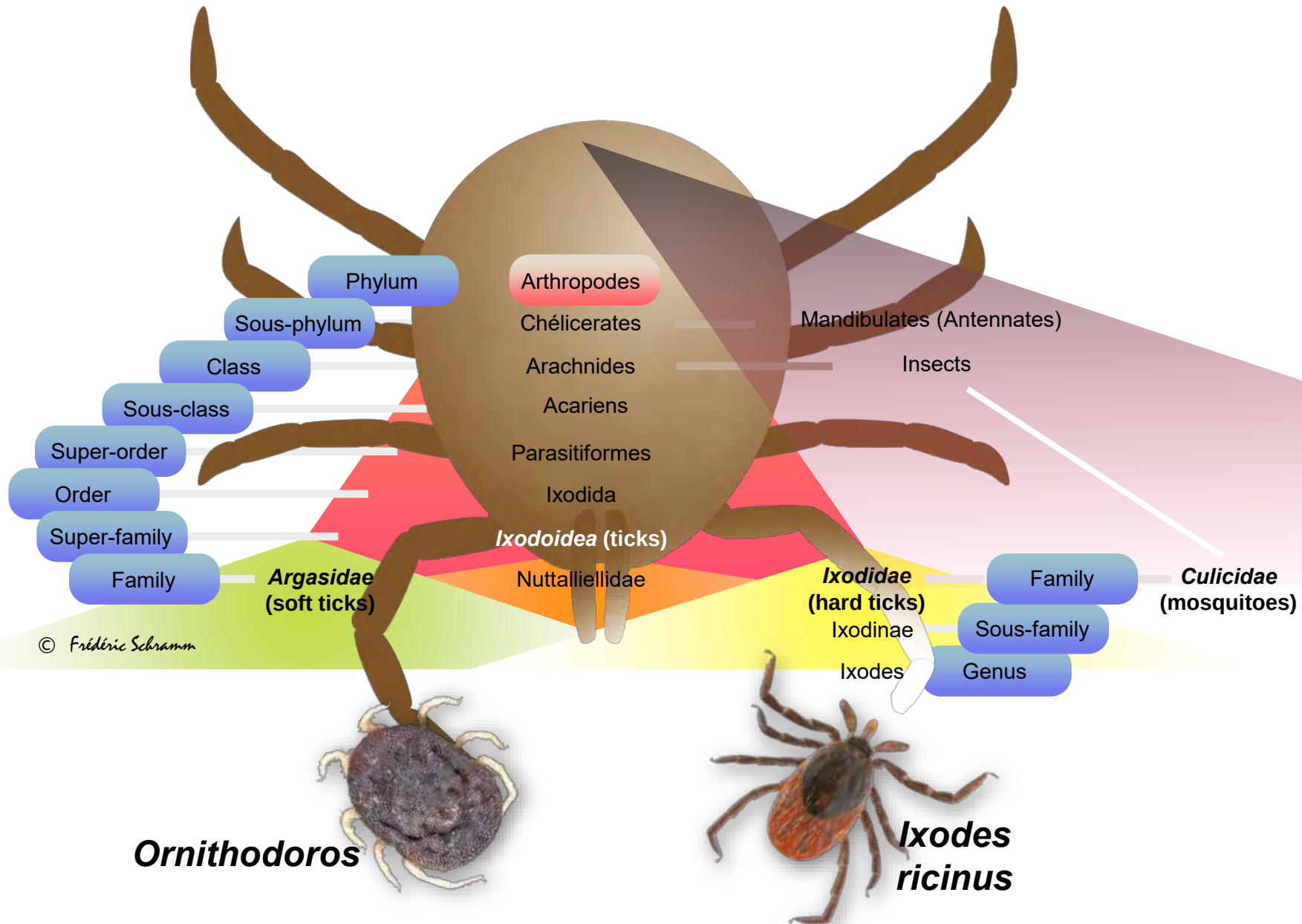


Borrelia-Borreliella

- Bactéries de forme hélicoïdale, flexibles et mobiles (flagelles)
- 15 à 35 μm de long x 0,1 à 0,3 μm de large
- NON visibles à la coloration de Gram, $\pm$ par le Giemsa
- NON visibles en microscopie optique standard -> microscopie à fond noir, à contraste



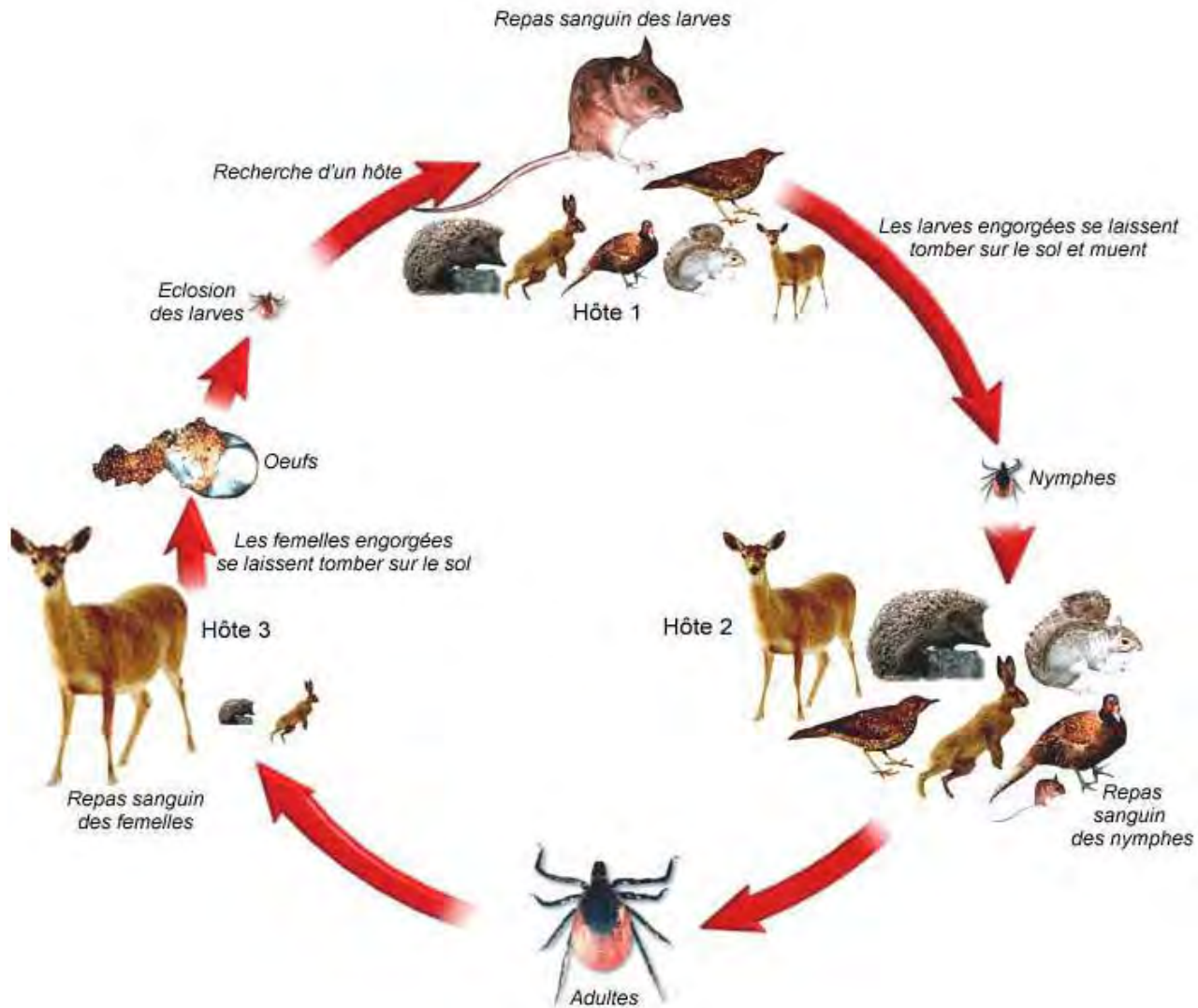
Position taxonomique des tiques du genre *Ixodes*



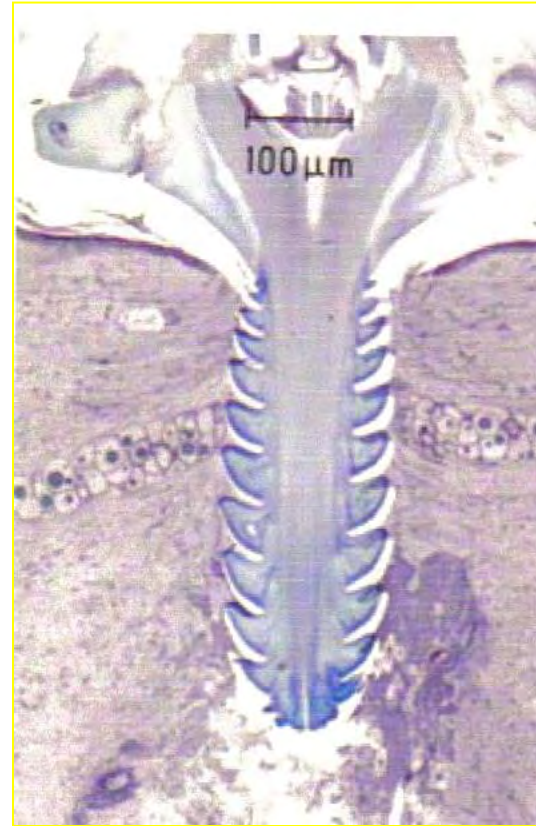
Ixodes ricinus



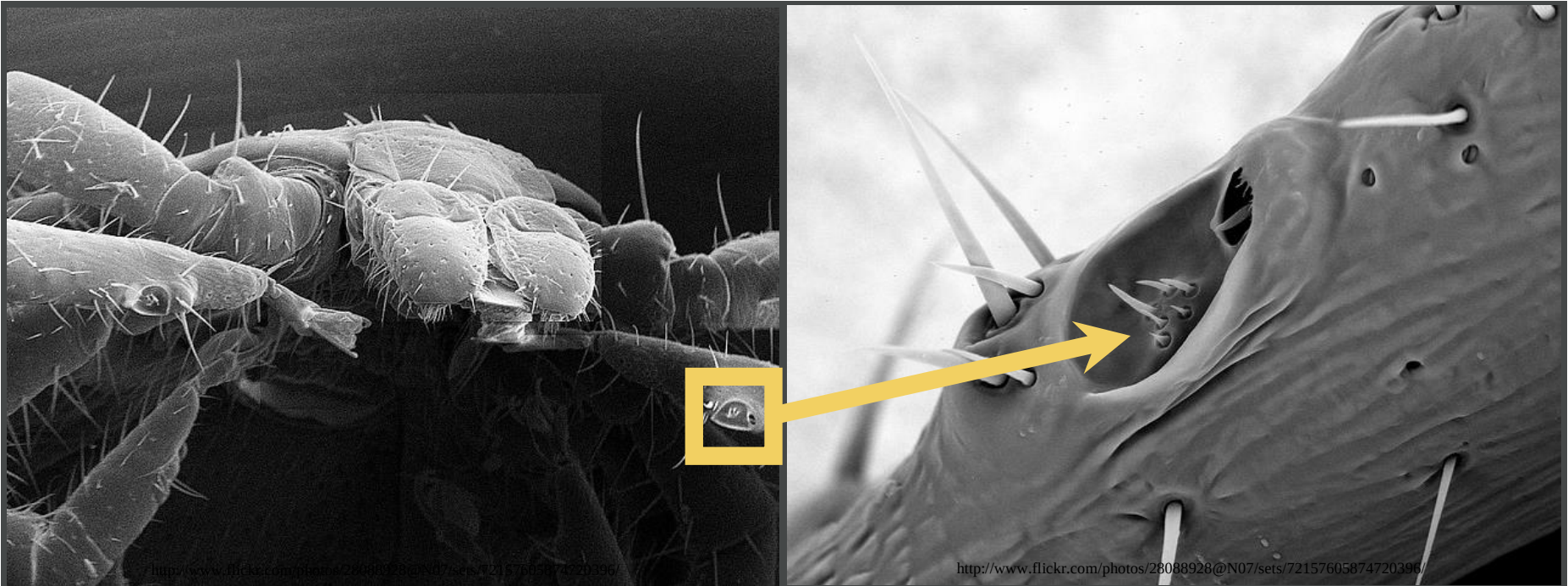
Le cycle des tiques



Les pièces piqueuses et sensorielles



Les pièces sensorielles



repérage des hôtes cibles

- Pédipalpes
- Soies
 - ★ distribuées sur l'ensemble de la surface du tégument
- Organe de Haller
 - ★ Localisé sur partie dorsale du tarse 1^{re} paire de pattes

stimuli

- ★ thermiques
- ★ mécaniques
- ★ chimiques

D'autres vecteurs de Borrelia ?

- *Dermacentor variabilis*, *D. reticulatus* : Europe
 - Transmission transtadiale **sans** transmission lors de la piqûre au mammifère
- Moustiques : Europe
 - *Aedes vexans* (*B. afzelii* , Rep Tchèque),
 - *Cules pipiens* (*B. afzelii* , Rep Tchèque)
 - Présence d'ADN, survie éphémère, aucune transmission (Homme ou modèle animal à ce jour)
- *Amblyomma americanum* : USA

➤ Très difficilement infectable expérimentalement au laboratoire
Magnarelli LA, J Infect Dis 1987; Soares CA, J Med Entomol 2006, Melaun C, T&TBD 2015

Halouzka J, Med Vet Entomol 1987 ; Halouzka J, Infection 1988

D'autres modes de contamination ?

➤ **Transfusion sanguine :**

- Lyme = bactériémie brève et à charge bactérienne très faible
- Mais survie **expérimentale** dans poches de GR : 6 semaines à +4°C
- Risque humain (*Borrelia*) :
 - Banque du sang du Connecticut (haute endémie) ,
972 poches transfusées -> 0 contamination
 - Würzburg (Allemagne, haute endémie) :
472 poches transfusées -> 0 contamination

➤ **Transmission foeto-maternelle :**

- 1988 – 2016 : 14 « case report » d'atteintes tissulaires foetales sévères **probables/possibles** à *Borrelia*
- -> Recos de précaution SPILF bien positionnées

Incidence des tiques et de *Borrelia* en Europe



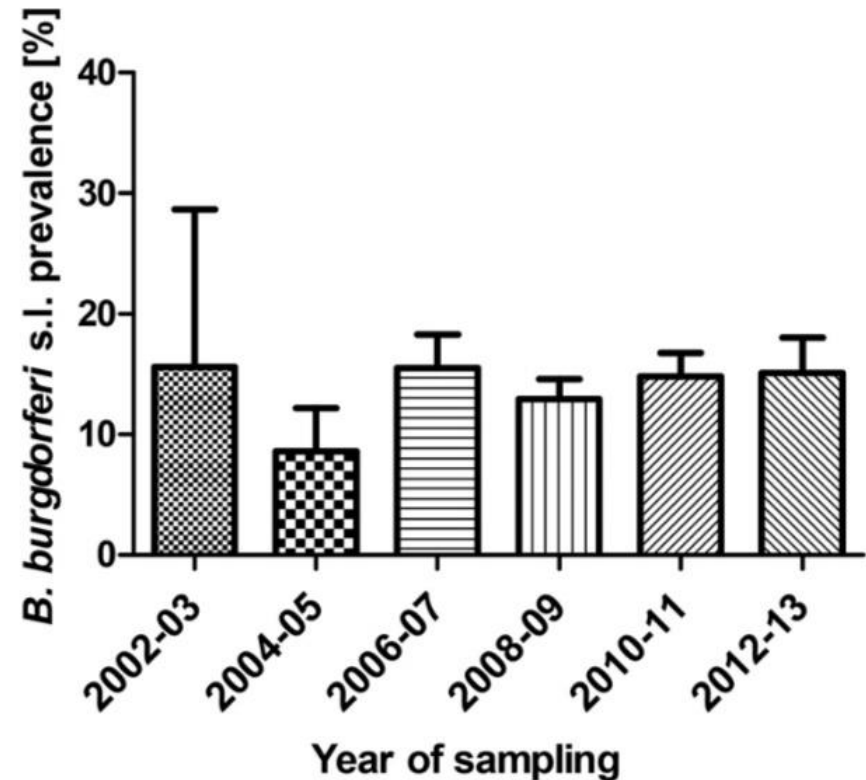
AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Applied and Environmental
Microbiology®

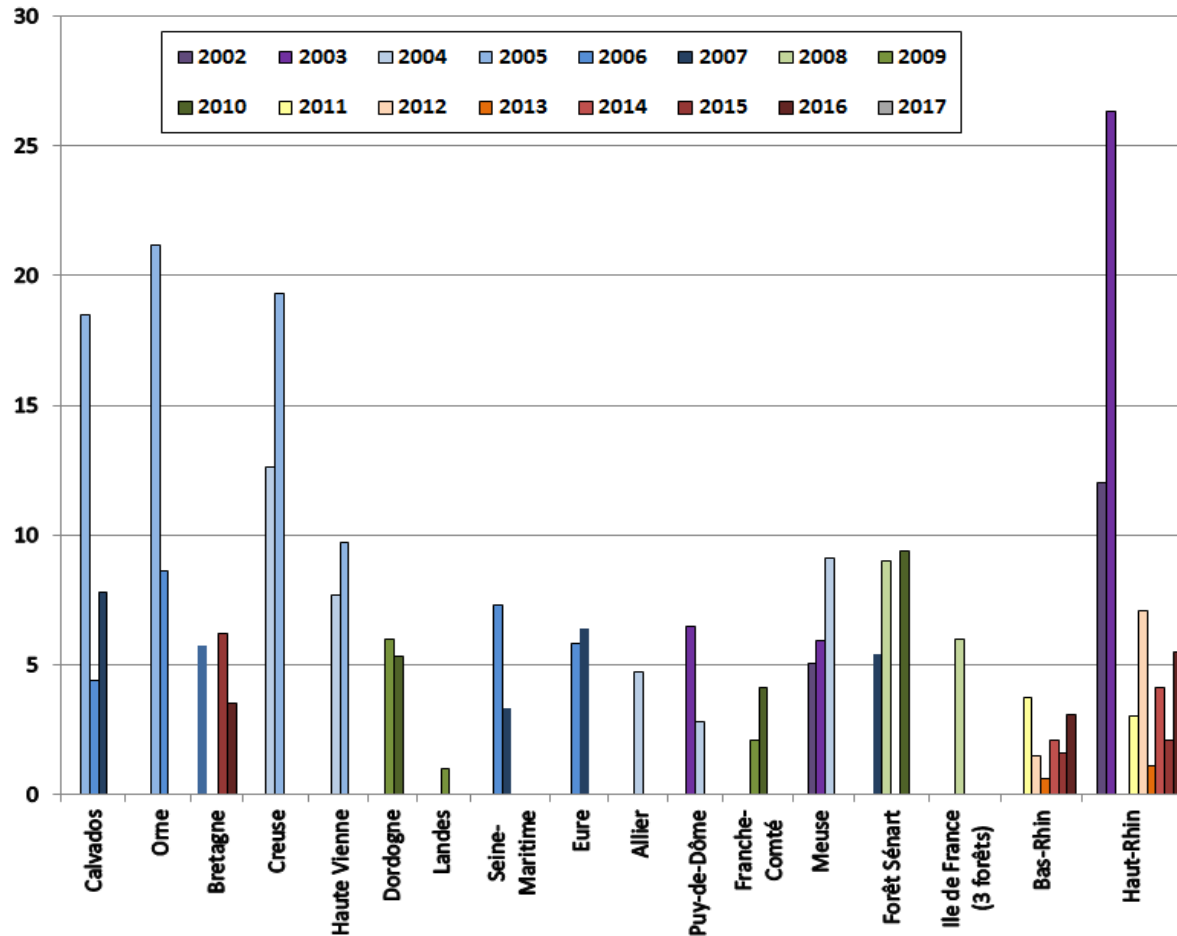
Europe-Wide Meta-Analysis of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Prevalence in Questing *Ixodes ricinus* Ticks

Martin Strnad,^{a,b} Václav Hönig,^{a,c} Daniel Růžek,^{a,c} Libor Grubhoffer,^{a,b}
Ryan O. M. Rego^{a,b}

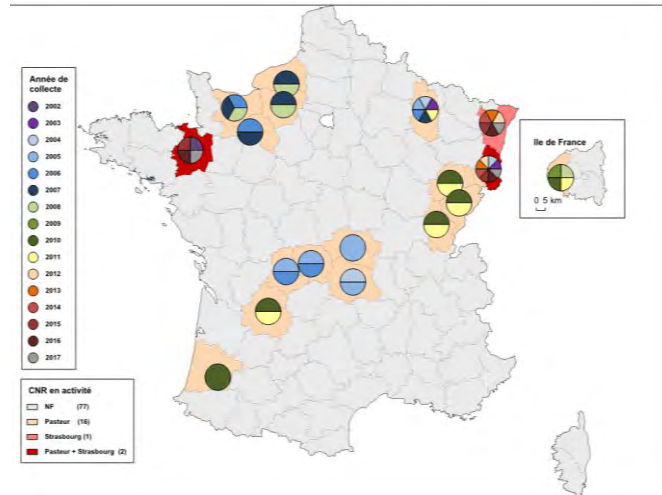
Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, České Budějovice, Czech Republic^a; Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic^b; Department of Virology, Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic^c



Incidence des tiques : des variations annuelles (Données CNR Borrelia 2002-2017)

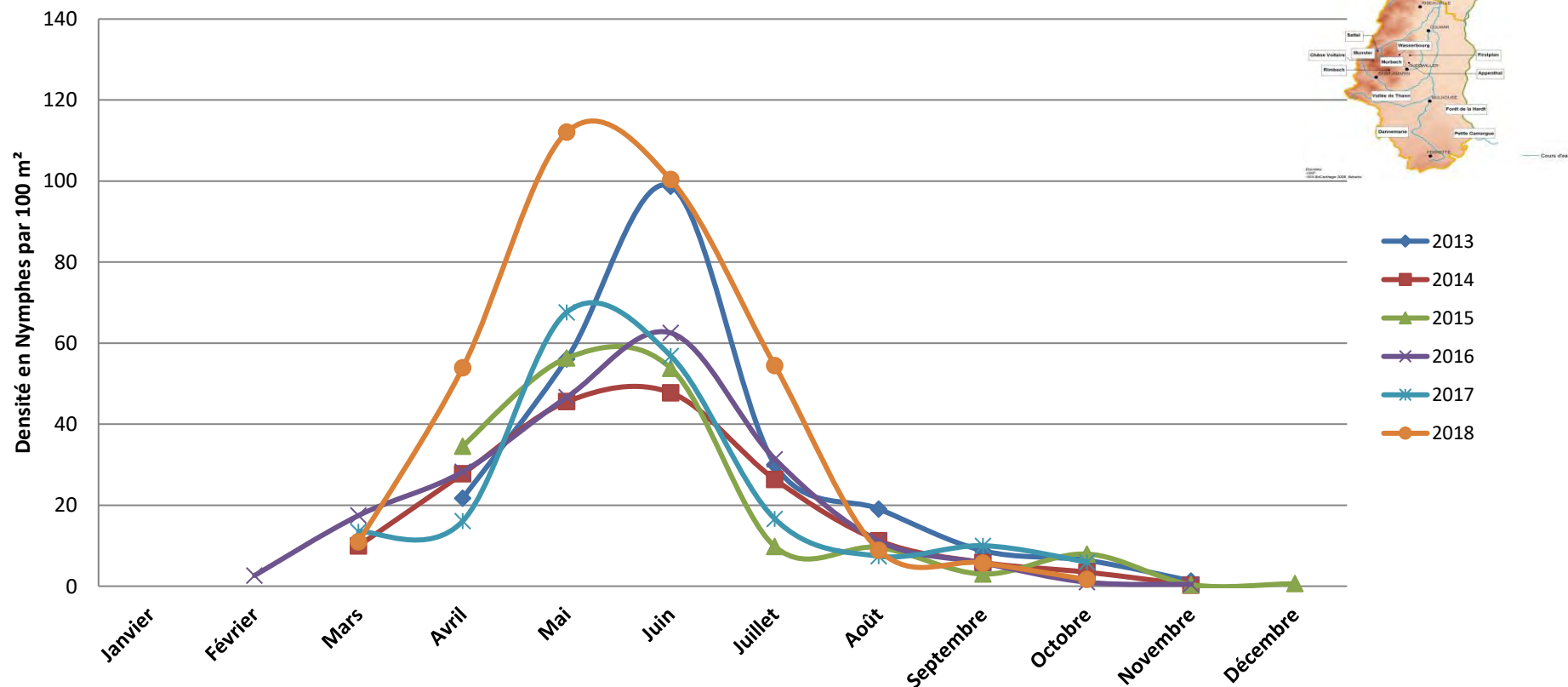


Nymphes infectées /
100 m²

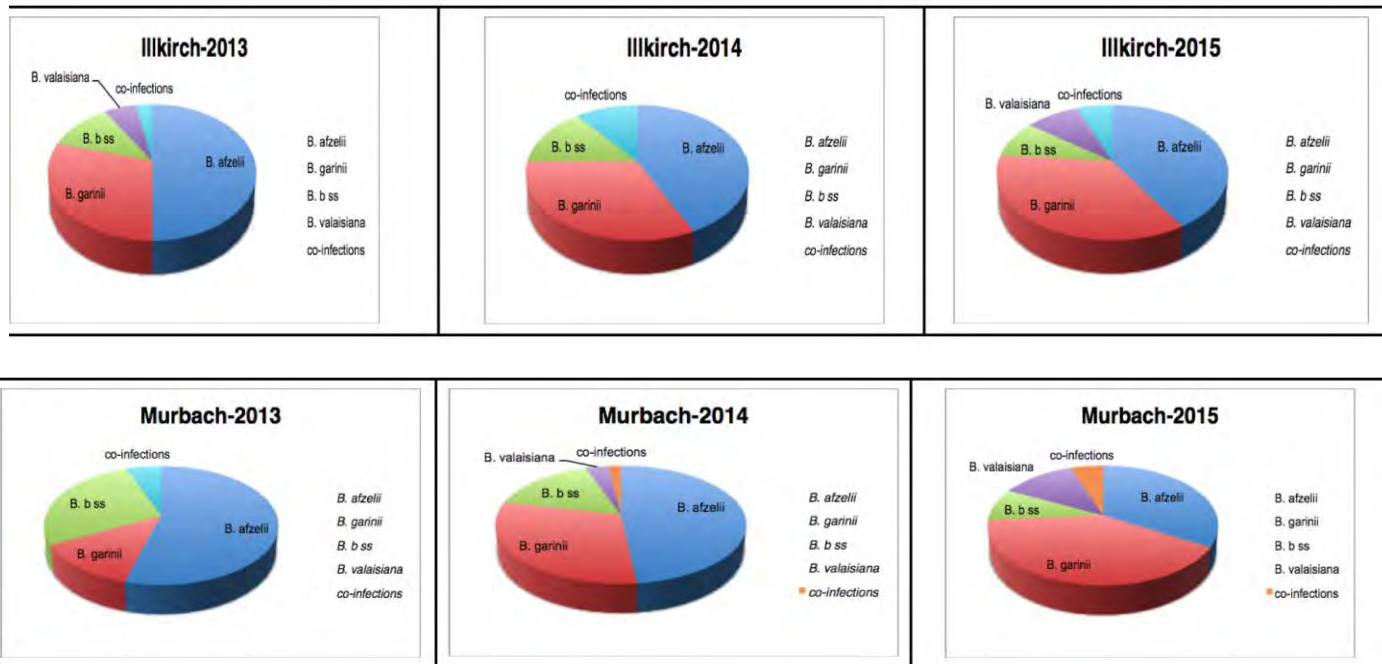


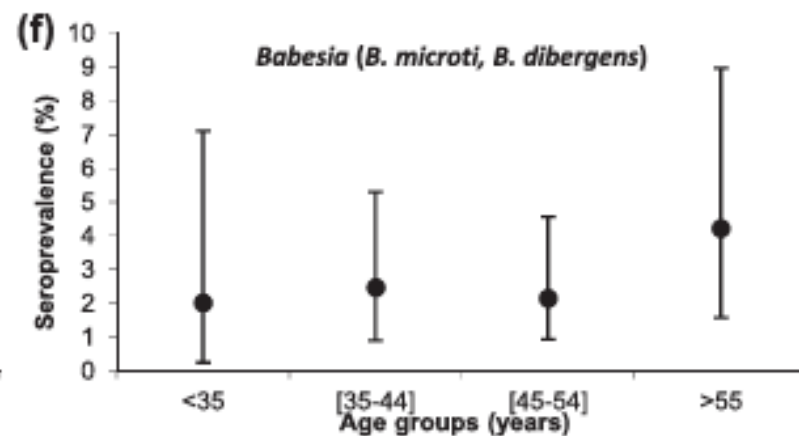
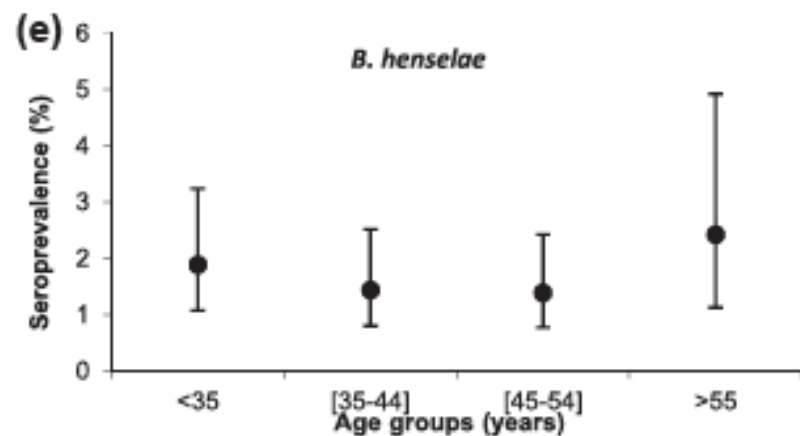
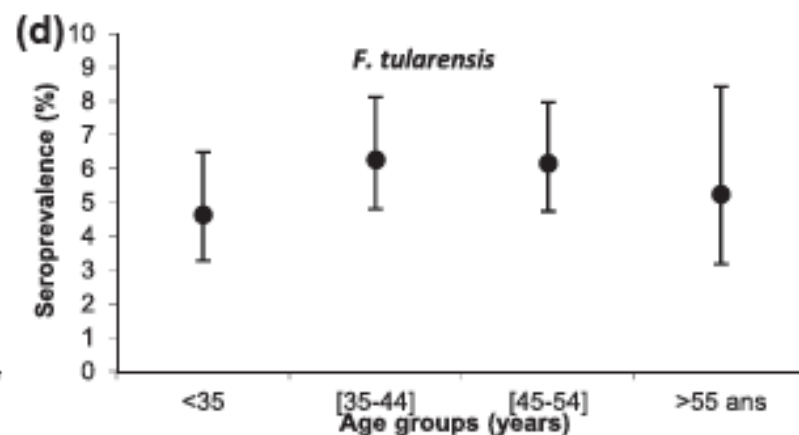
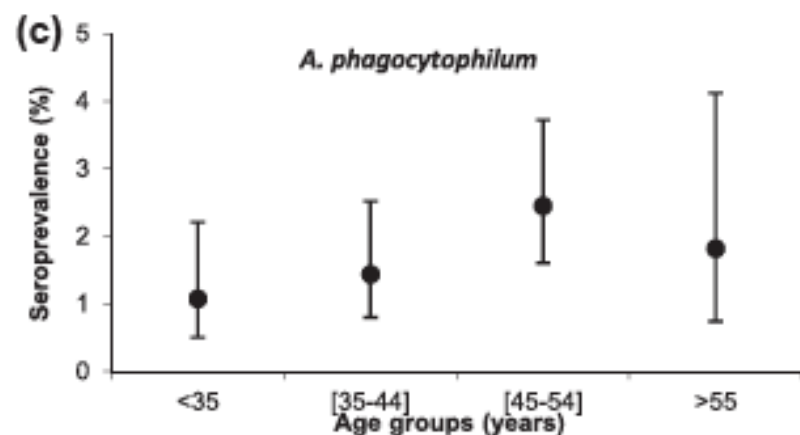
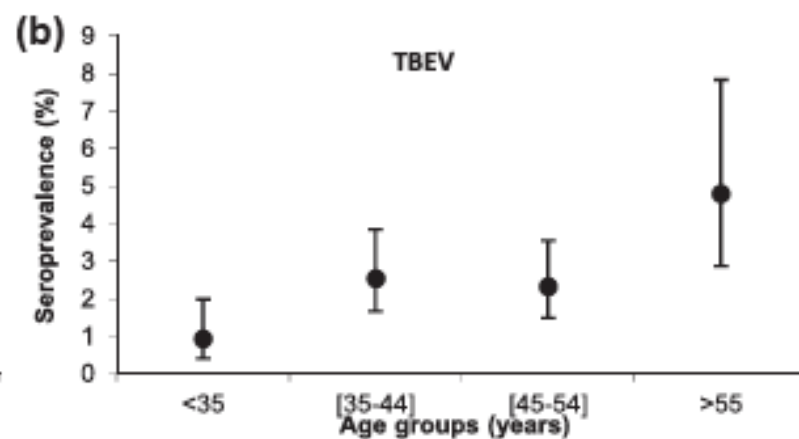
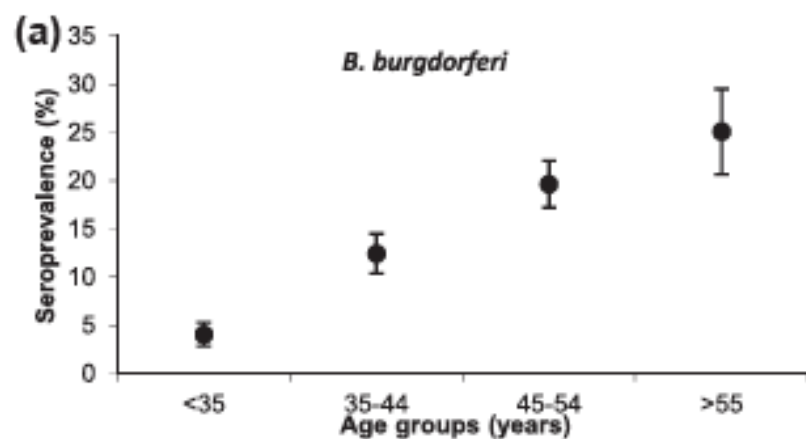
Incidence des tiques : des variations mensuelles (Données CNR Borrelia)

Densité mensuelle moyenne en nymphe *Ixodes ricinus* en Alsace de
2013 à 2018



Quelles espèces de *Borrelia* dans les tiques ?

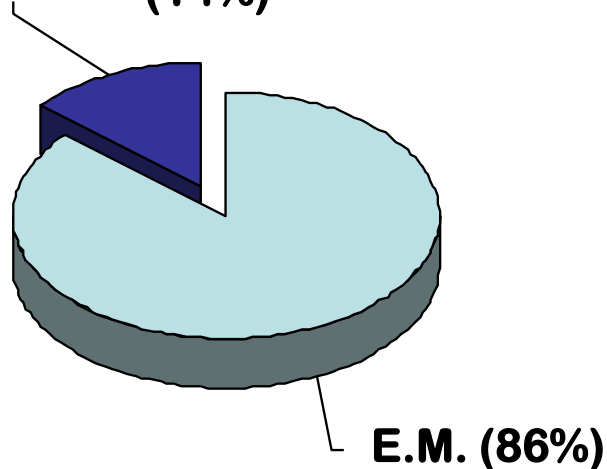




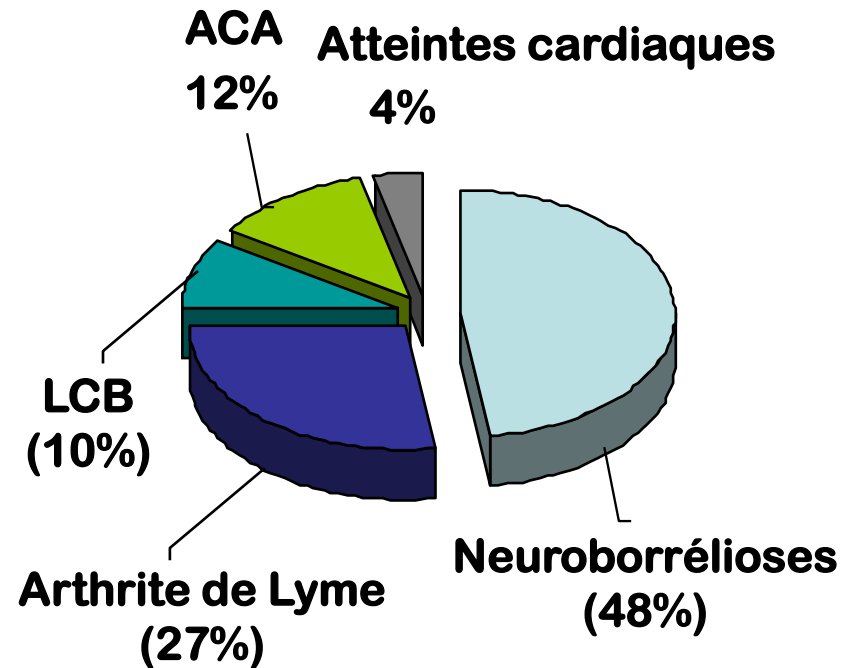
Fréquence des manifestations cliniques

Manifestations cliniques (n = 996)

Manifestations disséminées (14%)



Manifestations disséminées (n = 136)



Etude Alsa(ce)tiques 2014-2015

Tableau clinique	Nb cas	% (n=672)
Erythème migrant	530	78,9
Formes disséminées	142	21,1
Arthrite de Lyme	68	10,1
Neuroborréliose de Lyme	54	8,0
Erythème migrant multiple	9	1,3
ACA*	6	0,9
Lymphocytome borrélien	3	0,4
Atteinte cardiaque	1	0,1
Atteinte oculaire	1	0,1

- **99% (670/672) avec traitement antibiotique avec une molécule adaptée**
- **28% EM (147/530) ont réalisé une sérologie (contrairement aux recommandations en vigueur)**

*ACA: acrodermatite chronique atrophiante

Etude Alsa(ce)tiques 2014-2015

65% des cas avec EM ont rapporté une pique de tique dans le mois précédant les symptômes

Lieu de pique	N*	% (n=297)
Forêt	191	64
Jardin (public/privé)	89	30
Prairie	59	20
Agriculture	11	4

Immuno-empreinte plus sensible que l'ELISA?

Table 18. Summary estimates of test accuracy for EIAs and IB tests for LA case-control studies with healthy controls

Test type	Diagnostic odds ratio (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
EIA	377.7 (93.7–1522.0)	0.96 (0.89–0.98)	0.94 (0.89–0.97)
IB	191.6 (11.0–3335.9)	0.93 (0.48–0.99)	0.93 (0.89–0.96)

Table 10. Summary estimates of test accuracy for commercial and in-house IBs and EIAs for NB case-control studies with healthy controls

Test type	Diagnostic odds ratio (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Commercial EIA	68.5 (36.5–129.0)	0.81 (0.70–0.89)	0.94 (0.91–0.96)
Commercial IB	51.8 (15.4–174.0)	0.81 (0.57–0.96)	0.92 (0.88–0.95)

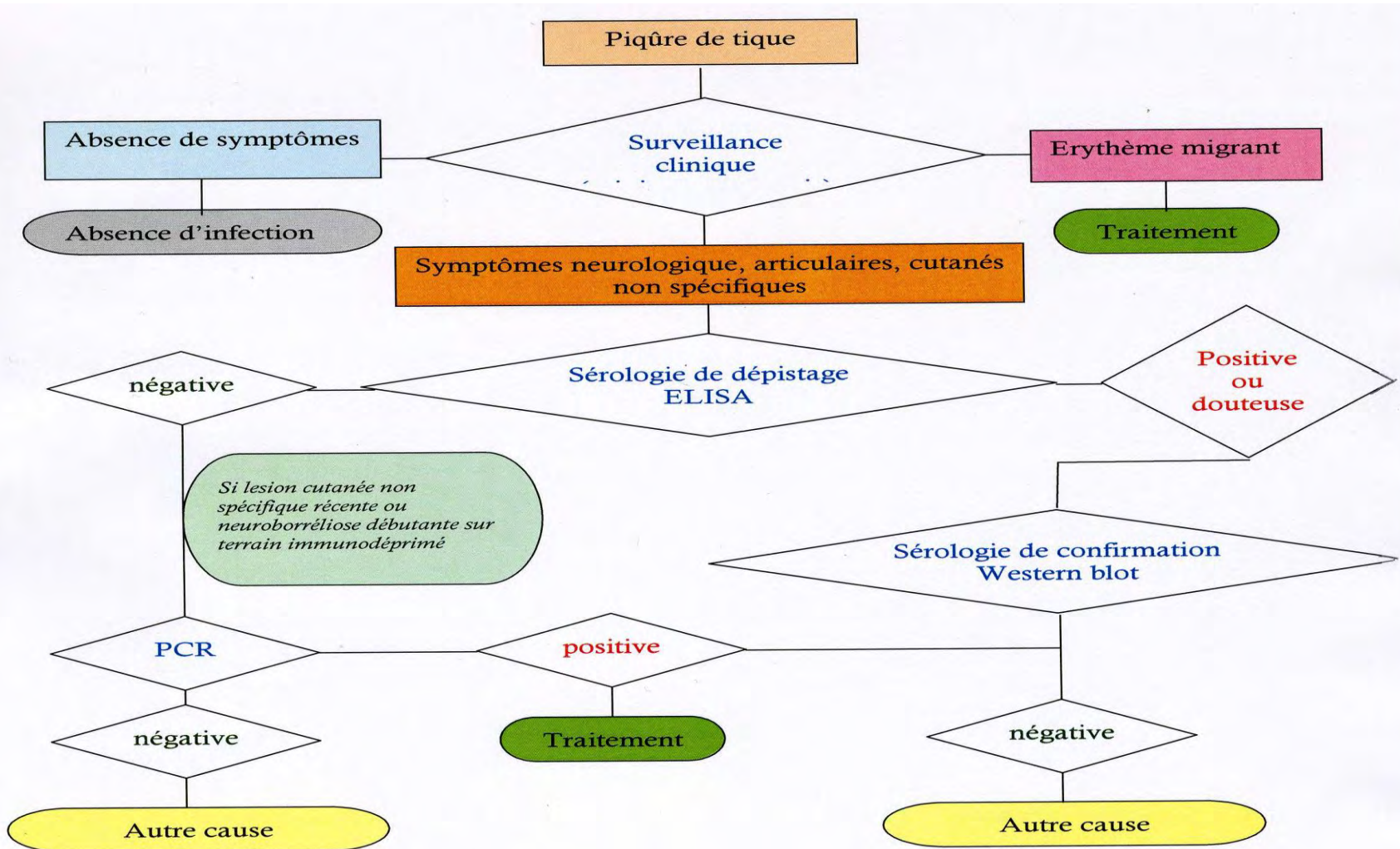
ECDC report, Leeflang et al. 2016

- **WB** : Indication = méthode de confirmation quand technique de première intention (+) ou douteuse

Immuno-empreinte (immunoblot)

- **Le WB n'est pas indiqué si ELISA (-) car :**
 - persistance accrue des anticorps détectables après traitement et lors de cicatrice sérologique (*Kalish, CID, 2001*)
 - ➔ augmentation de la séroprévalence asymptomatique

Algorithme diagnostique décisionnel en cas de suspicion de borréliose de Lyme





Borréliose de Lyme

Diagnostic biologique

La borréliose de Lyme est :

- l'anthropozoonose la plus fréquente de l'hémisphère Nord,
- transmise par piqûre de tique avec un pic de fréquence d'avril à novembre,
- due à des spirochètes du genre *Borrelia* : les espèces pathogènes responsables sont regroupées dans le complexe *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi* s.l.).

En Europe, on trouve essentiellement : *B. burgdorferi sensu stricto* (*B. burgdorferi* ss), *B. garinii* et *B. afzelii*.

Après une piqûre de tique infectante, 95% des sujets font une séroconversion sans signes cliniques. Seuls 5% des sujets développent une infection active qui peut évoluer schématiquement en 3 phases :

Manifestations cliniques de la borréliose de Lyme et diagnostic biologique

→ 1 : Phase précoce localisée : érythème migrant (EM)

- Délai d'apparition : entre 3 et 30 jours après la piqûre
- Seule manifestation de la maladie dans 80% des cas
- **La sérologie n'est pas indiquée à ce stade de la maladie**

→ 2 : Phase précoce disséminée (environ 15% des cas si absence de traitement antibiotique)

Manifestations cliniques principales	Sérologie	Examens complémentaires*
→ neurologique • méningoradiculites • paralysie faciale • syndrome méningé	Sang + LCR le même jour [synthèse intrathécale (SIT) IgG spécifiques] : sensibilité 75 à 95%, spécificité 97% si SIT > 2.	LCR : PCR uniquement si moins de 3 semaines d'évolution
→ articulaire • mono ou oligoartrite • grosse articulation (genou)	Positive IgG +++ (proche de 100%)	liquide articulaire : PCR

→ 3 : Phase tardive (plusieurs mois (> 6 mois) ou années après le début de l'infection non traitée)

Manifestations cliniques principales	Sérologie	Examens optionnels*
→ cutanée • Acrodermatite chronique atrophique (ACA)	Positive (100%) IgG +++	biopsie cutanée : PCR et histologie
→ autres : neurologiques (encéphalomyélites chroniques, polyneuropathies sensitives axonales), articulaires (arthrites chroniques récidivantes) => examens biologiques identiques phase précoce disséminée.		

* diagnostic direct par PCR = > positif ; diagnostic certain ; si négatif : ne permet pas de conclure.



→ Renseignements cliniques à recueillir au moment du prélèvement

- Piqûre connue par une tique ? si oui : date de la dernière piqûre ?
- Signes cutanés : érythème migrant (EM) ? si oui, date début de l'EM ? autres lésions cutanées ? → à préciser et date de début
- Signes neurologiques : méningo-radiculite ? Paralysie faciale ? si oui, date de début ? autres ? → à préciser et date de début
- Signes articulaires : arthrite ? arthralgies ? si oui, date de début ?

Selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012, la prescription doit fournir les informations cliniques pertinentes pour la réalisation de l'examen et l'interprétation des résultats

Situations pour lesquelles la sérologie n'a pas d'indication :

- **Erythème migrant typique** (si EM atypique, ne pas faire de sérologie mais demander un avis dermatologique)
- **Sujet asymptomatique**
- **Piqûre de tique sans signes cliniques**
- **Dépistage des sujets exposés**
- **Contrôle sérologique des patients traités**

→ Limites de la sérologie

A l'exception de l'érythème migrant typique, la positivité d'un test biologique est requise pour confirmer le diagnostic de borréliose de Lyme.

- Pour le réactif de 1^{ère} intention, la spécificité est $\geq 90\%$;
- Pour le réactif immuno-empreinte, la spécificité est $\geq 95\%$;
- L'immuno-empreinte n'étant globalement pas plus sensible que l'EUSA, il n'y a donc pas d'indication à la faire en première intention ;
- Une sérologie positive ne permet pas de distinguer une infection active d'une infection ancienne (traitée ou non) ou asymptomatique ;
- La présence d'IgG isolées (sans IgM) ne signifie pas obligatoirement une « cicatrice sérologique » (par ex. absence d'IgM fréquente dans l'arthrite et l'ACA) ;
- La présence isolée d'IgM ne signifie pas obligatoirement une infection récente active ;
- La sérologie de 1^{ère} intention peut être faussement positive (surtout en IgM) et non confirmée en immuno-empreinte : réactions croisées avec d'autres pathologies infectieuses (EBV, HSV, CMV, syphilis) ou des pathologies auto-immunes ;
- Une sérologie positive ne signifie pas que les symptômes soient en relation avec une maladie de Lyme ;
- La sérologie peut rester positive longtemps après un traitement efficace => la surveillance post thérapeutique est clinique ;
- Les anticorps spécifiques ne protègent pas contre une nouvelle infection à *B. burgdorferi sensu lato*.

Limites des tests sérologiques de Lyme

Patients séronégatifs atteints de la maladie ?

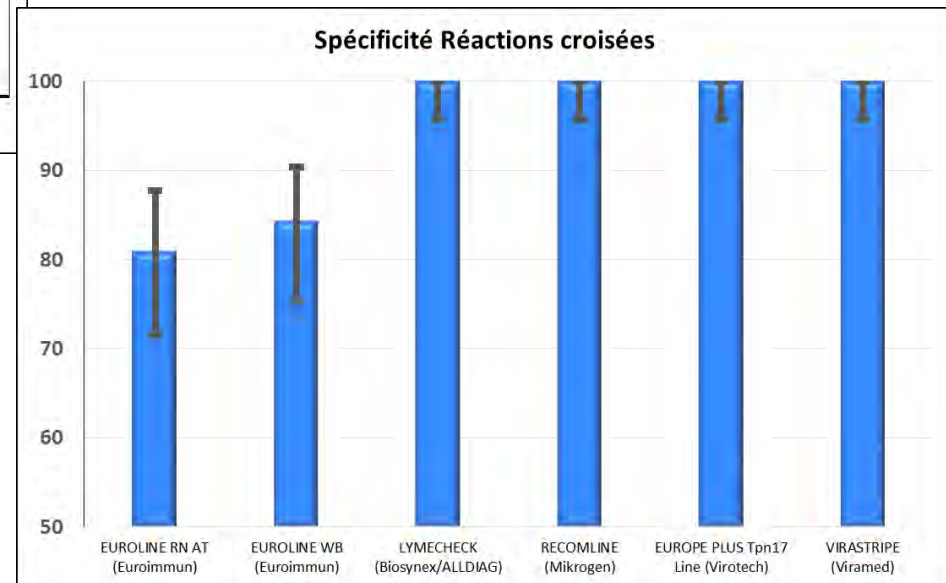
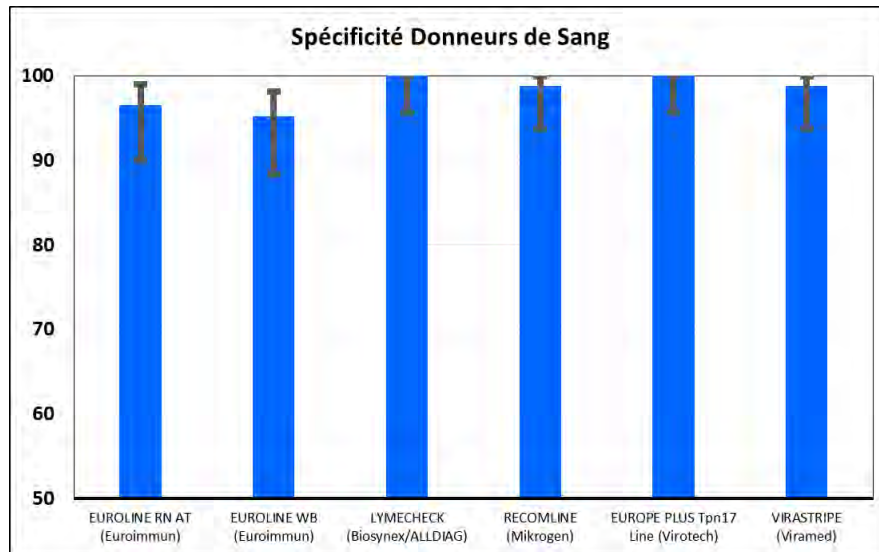
- ✓ Décalage réel entre début de l'infection et apparition des anticorps
- ✓ **Très fréquent (50%) dans l'EM** (EM = 85% des formes cliniques) : infection **locale**

(Aguero-Rosenfeld, J Clin Mic 1996 ; Stanek G, Lancet 2012)

Autres stades ?

- ✓ *Cas publiés de formes tardives séronégatives bien documentées sont exceptionnels*

Evaluation des coffrets western-blot



Sérodiagnostic et érythème migrant

Sérologie = ne pas faire dans l'EM (ni en cas de piqure de tiques) :

- ✓ Apparition tardive des Ac
 - 50 % de formes séro (-) en Europe
 - pas d' Ig M avant 3 semaines = retard diagnostic
 - Ig G (+) = cicatrice ancienne ++ mais possible ré-infection

Si attente d'une séroconversion (6 à 8 semaines) => retard diagnostic ++

- ✓ Traitement précoce = augmentation transitoire des Ig M sans séroconversion

Si doute diagnostique : pas de sérologie ++ ; avis spécialisé ++, recherche directe par PCR ?

Sérologie et Acrodermatite chronique

Table 21. Summary estimates of test accuracy by antibody type for ACA case-control studies with healthy controls

Antibody tested	Diagnostic odds ratio (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
IgM	6.2 (3.0–13.1)	0.18 (0.09–0.34)	0.97 (0.93–0.98)
IgG	2088.0 (149.0–29295.0)	0.99 (0.82–0.99)	0.97 (0.95–0.98)
IgT	609.0 (107.0–3475.0)	0.98 (0.87–0.99)	0.93 (0.88–0.96)

(ECDC report, Leeflang et al. 2016)

Expérience du CNR *Borrelia* (2008-2015)

24 patients avec ACA confirmée clinique + histologie
(i.e. hors sérologie) et positifs en PCR/culture

-> 24 patients avec sérologie disponible
= tous positifs en ELISA IgG

CCL : sérologie Lyme = haute VPN dans l'ACA

Sérologie et Neuroborréliose

Table 10. Summary estimates of test accuracy for commercial and in-house IBs and EIAs for NB case-control studies with healthy controls

Test type	Diagnostic odds ratio (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Commercial EIA	68.5 (36.5–129.0)	0.81 (0.70–0.89)	0.94 (0.91–0.96)
Commercial IB	51.8 (15.4–174.0)	0.81 (0.57–0.96)	0.92 (0.88–0.95)

(ECDC report, Leeflang et al. 2016)

Expérience du CNR

- Séropositivité Ig G dans le **Borrelia** ~~serum~~ si neuroborréliose aigüe débutante : 75 à 95 % des cas selon le kit utilisé (données CNR)
- Si NB aigue => rechercher systématiquement dans le LCS séropositivité Lyme ET lymphocytose → variations séropositivité selon le protocole du fabricant

Manifestations neurologiques

- **Neuroborrélioses précoces**
 - Paralyse des nerfs crâniens
 - Paralyse faciale périphérique (enfant +++)
 - Méningo-radiculonévrite douloureuse (adulte ++)
 - Méningite lymphocytaire (enfant +++)
 - 2/3 des méningites de l'enfant en Norvège
 - 15% aux USA
 - Rares présentations psychiatriques

Manifestations articulaires

- **Arthrite de Lyme :**
 - Mono ou oligo-arthrite subaigüe ou récidivante :
 - Genou +++
 - Rarement fébrile, sans impotence fonctionnelle majeure

Sérologie et Arthrite de Lyme

Table 18. Summary estimates of test accuracy for EIAs and IB tests for LA case-control studies with healthy controls

Test type	Diagnostic odds ratio (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
EIA	377.7 (93.7–1522.0)	0.96 (0.89–0.98)	0.94 (0.89–0.97)
IB	191.6 (11.0–3335.9)	0.93 (0.48–0.99)	0.93 (0.89–0.96)

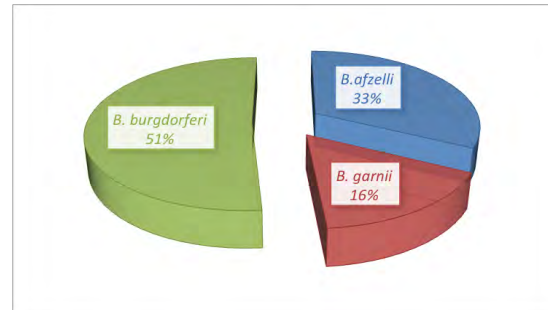
*ECDC report, Leeflang et al.
2016*

Sérologie et Arthrite de Lyme

Expérience du CNR *Borrelia* (2010-2016)

48 patients avec arthrite et positifs en PCR (LA et/ou TS) : PCR faite indépendamment de la sérologie

Geographical repartition of the PCR tested/PCR positive SF during the 2010-2016 period by the NRC for Borrelia



37 cas avec sérologie disponible = 37 cas positifs en ELISA IgG

-> **CCL : sérologie Lyme = haute VPN dans l'Arthrite**









