

MALADIE DE LYME : ÉTAT DES LIEUX

Pr Christian Perronne

Département de maladies infectieuses et tropicales, Hôpital Universitaire Raymond Poincaré, Garches

L'extension rapide de l'épidémie de maladie de Lyme, l'accumulation de données scientifiques publiées et la mise en ligne récente d'un rapport du Ministère de la Santé des Etats-Unis font espérer une reconnaissance mondiale de la forme chronique de la maladie.

Résumé sur l'état des connaissances

La maladie de Lyme est due à une infection par des bactéries *Borrelia* transmises par piqûre de tique. L'infection passe souvent inaperçue et en l'absence de diagnostic et de traitement précoces, les personnes infectées vont développer des manifestations cliniques qui peuvent être très invalidantes. Depuis une vingtaine d'années, les tiques prolifèrent, expliquant l'extension de la maladie rapportée par le Centre de surveillance des maladies américain (CDC), le centre de surveillance européen (ECDC) et pour la France par *Santé Publique France*. [1, 2].

La maladie de Lyme est une maladie complexe qui peut en simuler beaucoup d'autres et son diagnostic est d'autant plus difficile que les tests diagnostiques, basés sur la sérologie, manquent de sensibilité. Dans les formes persistantes, la bactérie de la maladie de Lyme est souvent associée à d'autres infections inapparentes ou co-infections dues à des bactéries, des parasites comme *Babesia* responsables de la piroplasmose chez les animaux et probablement des virus dans certains cas. Pour progresser, une nouvelle approche multidisciplinaire est indispensable avec l'aide de spécialistes de différents domaines, notamment les immunologistes et les biologistes vétérinaires. C'est pourquoi un projet de recherche multicentrique financé par l'Agence Nationale de Recherche, appelé OH-Ticks, conduit dans plusieurs services universitaires de maladies infectieuses, implique des laboratoires vétérinaires, y compris pour les tests humains.

La publication en août 2018 par la Haute Autorité de Santé d'une Recommandation de bonne pratique représente une avancée saluée au niveau international. Le nouveau rapport du Ministère de la santé américain publié en novembre 2018 qui reconnaît la non fiabilité des tests diagnostiques, l'absence d'évaluation correcte des traitements, la non prise en compte des co-infections et l'absence de recherche digne de ce nom est une réelle source d'espoir pour les malades. Ainsi, la France et les Etats-Unis font bouger les lignes vers une reconnaissance mondiale.

La polémique au sujet de la maladie de Lyme continue d'occuper l'actualité [3]. Cette maladie due à différentes espèces de bactéries du genre *Borrelia*, notamment *Borrelia burgdorferi*, et transmise par piqûre de tique est en pleine expansion dans le monde, comme le confirment les statistiques officielles de nombreux pays. Dans bon nombre de cas, le sujet contaminé n'a pas remarqué la piqûre de

tique. La lésion cutanée rouge centrifuge autour du point de piqûre, l'érythème migrant, n'apparaît qu'une fois sur deux. Ainsi ces sujets ne se savent pas infectés et vont développer des troubles divers et variés des jours, des semaines, des mois ou des années après la piqûre. Les entomologistes confirment que les tiques prolifèrent [4, 5]. Plusieurs facteurs sont envisagés : le réchauffement climatique, l'extension des forêts en Europe et en Amérique du Nord, la prolifération du gibier, la disparition de nombreux animaux prédateurs de tiques. Beaucoup de contaminations ont lieu dans les forêts, mais il suffit de marcher ou de s'asseoir dans la nature, surtout dans les hautes herbes. Il existe ainsi de nombreux malades chez les personnes exerçant leur profession dans la nature. Les activités de loisir dans les parcs, forêts, jardins, herbages sont aussi une source importante de contamination.

Le fait que les tests diagnostiques pour la maladie de Lyme basés sur la recherche d'anticorps (sérologie) manquent de sensibilité est maintenant établi et de plus en plus reconnu. Un rapport du Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC), avait montré en avril 2016 qu'il n'était pas possible de calibrer de façon fiable les tests sérologiques car, dans une population, on ne peut savoir avec certitude qui a la maladie ou qui est un témoin en bonne santé non infecté [6]. En effet, sauf quelques exceptions (érythème migrant, lymphocytome borrélien, acrodermatite chronique atrophique), on ne relève aucun critère clinique spécifique, et la culture de la bactérie à partir du sang est trop souvent négative pour pouvoir servir d'étalon-or du diagnostic.

Depuis ce rapport, de nouvelles données ont été publiées, confirmant la sensibilité insuffisante des sérologies de Lyme. Une méta-analyse (c'est-à-dire une analyse de toutes les publications sur le sujet) a été publiée par Cook & Puri en 2016. La sensibilité moyenne (pour tous les tests) est de 59,5% (30,6% à 86,2%) [7]. Les médecins font face à une « maladie caméléon » qui ressemble à beaucoup d'autres pathologies. Dans la forme chronique, la plupart des malades se plaignent d'une grande fatigue les empêchant de mener une vie professionnelle ou sociale normale, des douleurs souvent importantes qui touchent souvent les muscles ou les articulations, des troubles cutanés, cardiaques, neurologiques, psychiques, articulaires, etc. Les troubles de mémoire et de concentration sont fréquents. Dans la majorité des cas, n'arrivant pas à établir la preuve du diagnostic par la biologie, le médecin et la famille se persuadent que c'est un problème purement psychosomatique.

Des millions de malades dans le monde sont ainsi rejetés par le système de soins et se retrouvent en grande souffrance et en errance, rejetés par leurs proches, et perdent leur emploi. Les études cliniques faisant appel à une bonne méthodologie font défaut. A l'heure actuelle, fin 2018, il n'existe pas une seule étude prospective avec tirage au sort chez des malades volontaires (étude randomisée) qui a cherché à évaluer un traitement antibiotique réellement prolongé, d'une durée minimum de 4 mois, pour la maladie de Lyme chronique.

Nécessité d'une approche multidisciplinaire

Hormis le Centre national de référence (CNR) de Strasbourg, pratiquement aucun autre laboratoire de biologie humaine n'a investi dans la recherche sur la borréliose. Ainsi, de nouveaux tests, tels que les amplifications géniques (PCR) permettant d'isoler directement les bactéries ne sont pas reconnus ni même évaluées de façon collégiale sur une base scientifique. Il est vrai que ces tests sont essentiellement développés par des laboratoires de biologie vétérinaire qui utilisent ces PCR pour les animaux. Pour les zoonoses, l'OMS recommande une approche « one health / une seule santé », l'homme et les animaux partageant le même environnement dont l'environnement microbien. L'INRA (Institut national de la recherche agronomique) a pu isoler des bactéries par PCR à partir du sang humain et ces résultats ont été confirmés dans un laboratoire de biologie humaine [8].

Les progrès ne peuvent pas venir d'un seul laboratoire. Des synergies et de la concurrence sont nécessaires pour aller de l'avant, dans une approche multidisciplinaire. Les microbiologistes et les cliniciens devraient travailler plus étroitement avec les immunologistes. Certains d'entre eux travaillent actuellement sur la borréliose et la réponse immunitaire. Il est maintenant établi que *Borrelia* peut induire un affaiblissement des défenses immunitaires, appelé immunodépression. De plus, il existe des co-infections inapparentes, ou crypto-infections, habituellement non diagnostiquées faute d'outils de détection. Les chercheurs développent de nouveaux marqueurs immunologiques qui pourraient aider au diagnostic. Les virus persistants sont probablement impliqués dans de nombreuses maladies chroniques. Certains virus persistent dans le corps. En plus des virus bien connus tels que les virus des hépatites, du VIH, de l'EBV (agent de la mononucléose infectieuse), du CMV (cytomégalovirus), du virus de l'herpès simplex, du virus de la varicelle et du zona, des données récentes montrent que d'autres virus peuvent persister : le virus de l'encéphalite à tique d'Europe centrale (TBEV), le virus Zika, le virus du Nil occidental et le virus Powassan. Aux États-Unis, beaucoup de patients atteints de la maladie de Lyme chronique sont infectés par le virus Powassan. De nouvelles études virologiques sont nécessaires.

La récente avancée française

À la suite de la création de la Fédération française contre les maladies à tiques (FFMVT) en 2015, regroupant trois associations de patients et leurs soutiens, un collège de médecins et de chercheurs et un conseil scientifique, le plaidoyer s'est appuyé sur des arguments solides provenant des publications médicales et scientifiques. La Fédération FFMVT a créé un fonds de dotation Recherche Biotique pour aider à la recherche. En septembre 2016, les autorités sanitaires, la Ministre de la Santé, le Directeur général de la Santé, la Haute Autorité de Santé (HAS) ont reconnu un grave problème de santé publique et ont confirmé que les tests de diagnostic et les stratégies de traitement devaient être révisés. En septembre 2016, la ministre de la Santé, Marisol Touraine, a décidé de lancer un plan national. Cinq axes stratégiques ont été définis. Axe stratégique 1 : Améliorer la surveillance vectorielle et les mesures de lutte contre les tiques dans une démarche « One health - Une seule santé » (démarche OMS). Axe stratégique 2 : Renforcer la surveillance et la prévention des maladies transmissibles par les tiques. Axe stratégique 3 : Améliorer et uniformiser la prise en charge des malades. Axe stratégique 4 : Améliorer les tests diagnostiques. Axe stratégique 5 : Mobiliser la recherche sur les maladies transmissibles par les tiques.

Le professeur Agnès Buzyn, alors présidente de la Haute Autorité de la santé (HAS), a aidé de manière très positive à la mise en place du groupe. Depuis, Agnès Buzyn a été nommée ministre de la Santé. Le groupe de travail de l'axe stratégique 3 s'est particulièrement intéressé à la prise en charge des patients. Il s'agissait d'un groupe d'experts multidisciplinaires, créé au sein de la HAS. Le groupe comprenait des représentants de sociétés médicales de plusieurs spécialités, notamment des représentants de la Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF), des microbiologistes, des médecins généralistes, le Centre national de référence pour la borréliose, un patient et des médecins de Lyme de la Fédération FFMVT.

Le groupe, composé d'experts pro- et anti- Lyme chronique, est parvenu à un consensus final et a rédigé la nouvelle recommandation française intitulée : « Recommandations de bonne pratique pour la maladie de Lyme et les autres maladies vectorielles à tique ». La recommandation est composée de deux parties. Un court texte consensuel (les recommandations elles-mêmes) et un texte long, l'Argumentaire scientifique, comprenant des références médicales. Des opinions divergentes pouvaient être exprimées dans le texte long. Pour les formes cliniques de la maladie de Lyme, la sérologie est recommandée, mais un résultat positif de la sérologie n'est pas obligatoire pour poser le diagnostic. Le

texte reconnaît officiellement un nouveau syndrome appelé SPPT : « Syndrome persistant polymorphe après une possible piqûre de tique ».

Le SPPT peut être dû à la maladie de Lyme, à des co-infections et/ou à d'autres facteurs. La sérologie pour la maladie de Lyme ou les co-infections peut être négative. Le SPPT était déjà mentionné dans le rapport du Haut Conseil de la santé publique (HCSP) en 2014. Ce SPPT est proche du « syndrome post-traitement de la maladie de Lyme » (post-treatment Lyme disease syndrome, PTLDS), reconnu aux Etats-Unis [9].

Le diagnostic de SPPT est essentiellement clinique : fatigue, douleurs, troubles neuro-cognitifs associés à des signes et symptômes touchant plusieurs organes (cutanés, cardiaques, articulaires, neurologiques, etc.). Le médecin doit tout d'abord rechercher un autre diagnostic (comme une maladie auto-immune). En cas de suspicion de SPPT, sans autre diagnostic retenu, chaque médecin généraliste peut prescrire un traitement antibiotique d'épreuve comme test diagnostique, à savoir un mois de doxycycline. Une réponse au traitement confirme l'origine bactérienne. La réponse initiale peut être une aggravation (réaction de Jarisch-Herxheimer correspondant à une inflammation déclenchée par la mort des bactéries). Il est possible de prescrire des médicaments anti-infectieux au-delà d'un mois, sans limitation de durée ni de médicaments. Le médecin généraliste doit définir les soins médicaux avec un centre hospitalier expert (centres de compétences et cinq centres de référence). Les centres seront nommés par le ministère de la santé courant 2019 après un appel national. Les traitements et les résultats doivent être enregistrés afin de collecter des données pour la recherche (recherche observationnelle, cohortes). Certains patients volontaires seront inclus dans les essais cliniques (évaluation de nouveaux tests diagnostiques, essais randomisés, etc.). Les centres de référence recevront des fonds en personnel et en ressources matérielles afin d'enregistrer les données. Les recommandations françaises devraient être régulièrement mises à jour, au moins tous les deux ans. Ces nouvelles recommandations n'ont pas encore éteint les polémiques. Elles ont été officiellement publiées en juillet 2018 par la HAS [10].

En attendant, la science avance

Les formes persistantes de *Borrelia* existent, comme le montre la littérature médicale [11-12]. Plusieurs articles montrent que la persistance des signes et symptômes après un traitement antibiotique « classique » court (souvent de trois semaines) est observée chez 16 à 62% des patients [13-20]. Ces données cliniques sont confortées par des données bactériologiques. La persistance de *Borrelia* est d'abord démontrée chez les animaux, même après plusieurs mois de traitement antibiotique [21-27]. Ces résultats chez les animaux sont confirmés au cours de l'infection humaine.

Voici les principaux résultats en clinique humaine pour les formes persistantes. La persistance de *Borrelia* a été démontrée chez l'homme après le traitement antibiotique de l'érythème migrant [28-30]. À un stade ultérieur de la maladie, la persistance de *Borrelia* est démontrée par son isolement par culture ou PCR chez l'homme après un traitement antibiotique de la maladie de Lyme chronique [15, 18, 31-44]. Ces nombreuses publications montrent la persistance clinique des signes et des symptômes et la persistance microbiologique de *Borrelia*.

Le nouveau rapport du Ministère de la santé américain

Après toutes ces données scientifiques, la situation évolue dans certains pays. Ainsi, le groupe de travail sur les maladies transmises par les tiques organisé aux États-Unis par le ministère de la Santé américain (*US Department of Health and Human Services*) a analysé toutes les données publiées. Suite

à ce travail, des Rapports fédéraux américains sur la maladie de Lyme et les co-infections ont été mis en ligne le 9 mai 2018. Il existe désormais une reconnaissance du manque de tests diagnostiques fiables, de l'absence d'essais cliniques de qualité pour évaluer les traitements et de la persistance des signes et symptômes et la persistance des bactéries. Les rapports insistent sur le fait que les co-infections ont été négligées. Un rapport plus concis destiné au Congrès des Etats-Unis a été publié le 14 novembre 2018 [45].

La France et les Etats-Unis font bouger les lignes

Il existe des similitudes entre les nouvelles recommandations françaises de la HAS et le rapport américain. Ainsi la France et les États-Unis suivent le même chemin pour le bien commun : la reconnaissance mondiale de la maladie de Lyme chronique et des maladies associées. Le Centre européen de contrôle et de prévention des maladies (ECDC), a publié en août 2017 un manuel et un outil intitulés «Outil de l'ECDC pour hiérarchiser les menaces en maladies infectieuses » [46]. La borréliose de Lyme figurait parmi les 30 maladies les plus menaçantes pour la santé publique (il n'y avait pas de classement des 30 maladies). Le 15 novembre 2018, le Parlement européen a voté à l'unanimité une Résolution invitant les États membres à se mobiliser contre la maladie de Lyme et les co-infections.

La conséquence positive de cette reconnaissance progressive est que la recherche dans le domaine décolle, notamment aux Etats-Unis, avec même le retour de l'industrie pharmaceutique, qui avait pourtant ignoré le champ du Lyme pendant trois décennies. L'industrie pharmaceutique revient avec notamment des projets de nouveaux vaccins et de nouveaux tests diagnostiques sur la maladie de Lyme et sur les co-infections.

Liens d'intérêts :

- Essais cliniques (en rapport avec le texte publié) : Étude OHTICKS de l'Agence nationale de recherche.
- Interventions ponctuelles (en rapport avec le texte publié) : membre du groupe de travail de la Haute autorité de santé (HAS) sur la maladie de Lyme. Conférences pour médecins et grand public (non rémunérées).

Références

- [1] WHO-ECDC. Lyme borreliosis in Europe. <https://ecdc.europa.eu/sites/.../factsheet-lyme-borreliosis.pdf>
- [2] Kugeler K. J., Farley G. M., Forrester J. D., Mead P. S. Geographic distribution and expansion of human Lyme disease, United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 2015, 21 (8), 1455-1457.
- [3] Perronne C, ed. *La vérité sur la maladie de Lyme*. Paris : Odile Jacob, 2017.
- [4] Ogden NH, Mechal S, Margos G. Changing geographic ranges of ticks and tick-borne pathogens : drivers, mechanisms and consequences for pathogen diversity. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013. doi.org/10.3389/fcimb.2013.00046
- [5] Sonenshine DE. Range expansion of tick disease vectors in North America : implications for spread of tick-borne disease. *Int J Environ Res Public Health*. 2018, 15, 478. Doi :10.3390/ijerph15030478
- [6] ECDC. Scientific Advice. A systematic literature review on the diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis. 2016. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/lyme-borreliosis-diagnostic-accuracy-serological-tests-systematic-review.pdf>

- [7] Cook MJ, Puri BK. Commercial test kits for detection of Lyme borreliosis: a meta-analysis of test accuracy. *Int J Gen Med* 2016 ; 18 : 427-40.
- [8] Vayssier-Taussat M., Moutailler S., Féménia F., Raymond P., Croce O., La Scola B. et al. Identification of novel zoonotic activity of *Bartonella* spp. *Emerg. Infect. Dis.* 2016, 22 (3): 457-462.
- [9] Rebman AW, Bechtold KT, Yang T et al. The clinical, symptom, and quality-of-life characterization of a well-defined group of patients with posttreatment Lyme disease syndrome. *Frontiers Med* 2017 ; doi: 10.3389/fmed.2017.00224
- [10] Haute Autorité de Santé. Recommandation de bonne pratique. Borréliose de Lyme et autres maladies vectorielles à tiques (MVT). 2018 ; https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2018-06/reco266_rbp_borreliose_de_lyme_cd_2018_06_13__recommandations.pdf
- [11] Meriläinen L., Herranen A., Schwarzbach A., Gilbert L. Morphological and biochemical features of *Borrelia burgdorferi* pleomorphic forms. *Microbiology* 2015 ; 161 : 516-27.
- [12] Sharma B., Brown A. V., Matluck N. E., Hu L. T., Lewis K., *Borrelia burgdorferi*, the causative agent of Lyme disease, forms drug-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2015 ; 59 : 4616-24.
- [13] Shadick NA, Phillips CB, Logigian EL et al. The long-term clinical outcomes of Lyme disease. A population-based retrospective cohort study. *Ann Intern Med* 1994 ; 121 : 905-8.
- [14] Asch ES, Bujak DI, Weiss M et al. Lyme disease: an infectious and postinfectious syndrome. *J Rheumatol* 1994 ; 21 : 454-61.
- [15] Oksi J, Nikoskelainen J, Viljanen MK. Comparison of oral cefixime and intravenous ceftriaxone followed by oral amoxicillin in disseminated Lyme borreliosis. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis* 1998 ; 17 : 715-9.
- [16] Oksi J, Marjamäki M, Nikoskelainen, Viljanen MK. *Borrelia burgdorferi* detected by culture and PCR in clinical relapse of disseminated Lyme borreliosis. *Ann Med* 1999 ; 31 : 225-32.
- [17] Skogman BH, Glimaker K, Nordwall M et al. Long-term clinical outcome after Lyme neuroborreliosis in childhood. *Pediatrics* 2012 ; 130 : 262-9.
- [18] Eikeland R, Mygland A, Herlofson K, Ljostad U. European neuroborreliosis : quality of life 30 months after treatment. *Acta Neurol Scand* 2011 ; 123 : 349-54.
- [19] Cairns V, Godwin J. Post-Lyme borreliosis syndrome: a meta-analysis of reported symptoms. *Int J Epidemiol* 2005 ; 34 : 1340-5.
- [20] Fallon BA, Lipkin RB, Corbera KM et al. Regional cerebral blood flow and metabolic rate in persistent Lyme encephalopathy. *Arch Gen Psychiatry* 2009 ; 66 : 554-63.
- [21] Straubinger RK, Summers BA, Chang YF, Appel MJ. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *J Clin Microbiol* 1997 ; 35 : 111-6.
- [22] Straubinger RK. PCR-based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-day postinfection period. *J Clin Microbiol* 2000; 38 : 2191-9.
- [23] Embers ME, Ramamoorthy R, Philipp MT. Survival strategies of *Borrelia burgdorferi*, the aetiologic agent of Lyme disease. *Microbes Infect* 2004 ; 6: 312-8.
- [24] Hodzic E, Feng S, Holden K, Freet KJ, Barthold SW. Persistence of *Borrelia burgdorferi* following antibiotic treatment in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 ; 52: 1728-36.
- [25] Barthold SW, Hodzic E; Imai DM et al. Ineffectiveness of tigecycline against persistent *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 ; 54 : 643-51.

- [26] Embers ME, Barthold SW, Borda JT et al. « Persistence of *Borrelia burgdorferi* in Rhesus macaques following antibiotic treatment of disseminated infection », *PLoS ONE* 2012 ; 7 : e29914. Erratum : *PLoS ONE* 2012 ; 7 : 10.1371.
- [27] Embers ME, Hasenkampf NR, Jacobs MB et al. Variable manifestations, diverse seroreactivity and post-treatment persistence in non-human primates exposed to *Borrelia burgdorferi* by tick feeding. *PLoS ONE* 2017 ; 12 : doi 10.1371/journal.pone.0189071
- [28] Hunfeld KP, Ruzic-Sabljić E, Norris DE, Kraiczy P, Strle F. *In vitro* susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates cultured from patients with erythema migrans before and after antimicrobial chemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 ; 49 : 1294-301.
- [29] Strle F, Preac-Mursic V, Cimperman J et al. Azithromycin versus doxycycline for treatment of erythema migrans: clinical and microbiological findings. *Infection* 1993 ; 21 : 83-8.
- [30] Weber K, Wilske B, Preac-Mursic V, Thurmayr R. Azithromycin versus penicillin V for the treatment of early Lyme borreliosis. *Infection* 1993; 21: 367-72.
- [31] Haupt T, Hahn G, Rittig M et al. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in ligamentous tissue from a patient with chronic Lyme borreliosis. *Arthritis Rheum* 1993 ; 36 : 1621-6.
- [32] Lawrence C, Lipton RB, Lowy FD, Coyle PK. Seronegative chronic relapsing neuroborreliosis. *Eur Neurol* 1995 ; 35 : 113-7.
- [33] Lee SH, Vigliotti JS, Vigliotti VS, Jones W, Shearer DM. Detection of *Borreliae* in archived sera from patients with clinically suspect Lyme disease. *Int J Mol Sci* 2014 ; 15 : 4284-98. doi: 10.3390/ijms15034284
- [34] Masters E., Lynxwiler P., Rawlings J. Spirochetemia after continuous high-dose oral amoxicillin therapy. *Infect Dis Clin Pract* 1994 ; 3 : 207-8.
- [35] Murgia R, Cinco M. Induction of cystic forms by different stress conditions in *Borrelia burgdorferi*. *APMIS* 2004 ; 112 : 57-62.
- [36] Pfister HW, Preac-Mursic V, Wilske B et al. Randomized comparison of ceftriaxone and cefotaxime in Lyme neuroborreliosis. *J Infect Dis* 1991 ; 163 : 311-8.
- [37] Phillips SE, Mattman LH, Hulinska D, Moayad H. A proposal for the reliable culture of *Borrelia burgdorferi* from patients with chronic Lyme disease, even from those previously aggressively treated. *Infection* 1998 ; 26 : 364-7.
- [38] Preac-Mursic V, Pfister HW, Spiegel H, et al. Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast-L-form variants. *Infection* 1996 ; 24 : 218-26.
- [39] Preac-Mursic V, Pfister HW, Spiegel H et al. First isolation of *Borrelia burgdorferi* from an iris biopsy. *J Clin Neuroophthalmol* 1993 , 13 : 155-61.
- [40] Preac-Mursic V, Weber K, Pfister HW. Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibioticly treated patients with Lyme borreliosis. *Infection* 1989 ; 17 : 355-9.
- [41] Schmidli J, Hunziker T, Moesli P, Schaad UB. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from joint fluid three months after treatment of facial palsy due to Lyme borreliosis. *J Infect Dis* 1988 ; 158 : 905-6.
- [42] Middlevee MJ, Sapi E, Burke J et al. Persistent *Borrelia* infection in patients with ongoing symptoms of Lyme disease. *Healthcare* 2018 ; doi: 10.3390/healthcare6020033.
- [43] Garg K, Meriläinen L, Franz O et al. Evaluating polymicrobial immune responses in patients suffering from tick-borne diseases. *Nature.com/Scientific Reports* 2018 ; 8 : 15932

- [44] Hokynar K, Sormunen JJ, Vesterinen EJ *et al.* *Chlamydia*-like organisms (CLO) in Finnish *Ixodes ricinus* and human skin. *Microorganisms* 2016 ; doi: 10.3390/microorganisms4030028
- [45] US Department of Health and Human Services. Tick-Borne Disease Working Group. 2018 Report to Congress. 2018 ; <https://www.hhs.gov/sites/default/files/tbdwg-report-to-congress-2018.pdf?fbclid=IwAR1u5BTMGMUMCldMOFudGAqChW1psJL421I76FXWW44NY4HWW4HWy>
- [46] ECDC. ECDC tool for the prioritisation of infectious disease threats. Technical Document. Handbook and manual. 2017 ; <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/ecdc-tool-prioritisation-infectious-disease-threats>