

Borrelia Spirochete Morphology in Peripheral Blood

Morphologie du spirochète *Borrelia* dans le sang périphérique

Sommaire

Différentes formes morphologiques de spirochètes peuvent être observées dans le sang. Cette expérience vise à documenter certaines de ces formes observées dans les 5 jours suivant la préparation d'une « mini-culture » sur une lame de microscope. Onze sujets atteints de borréliose de Lyme et / ou d'encéphalomyélite myalgique ont donné une goutte de sang au bout du doigt mélangée à un milieu de culture BSK-H. Les formes spirochètales ont été observées chez chaque donneur, principalement dans les 48 à 72 heures. Des preuves à l'appui de la nature spirochètelle des agents sont fournies, y compris des micrographies d'expériences de culture à long terme incluant 5 des donneurs actuels; et en outre, les résultats de la mise en évidence à l'aide d'anticorps fluorescents polyclonaux spécifiques des espèces de *Borrelia* et de *Borrelia garinii* de 3 donneurs.

Introduction

Il existe une controverse autour de certains aspects de la borréliose de Lyme, une infection à spirochètes transmise par la piqûre d'une tique et causée par *Borrelia burgdorferi* et des souches apparentées.

Les points de désaccord incluent

- les tests: qui reposent souvent sur un Western Blot détectant des anticorps dont la présence pourrait être variable (1),
- *traitement*: on considère que la doxycycline à 100 mg deux fois par jour élimine l'infection en un mois (traitements alternatifs, intraveineux et plus longs) sont parfois donnés (2);
- *persistance*: il est allégué que les symptômes persistants après le traitement ne sont pas dus à une infection continue, mais sont liés à des lésions tissulaires, à une réinfection ou à d'autres raisons (3);
- *localisation des spirochètes*: certains considèrent que les spirochètes à *Borrelia* sont rarement retrouvés dans le sang (4).

La détection directe des spirochètes est possible en utilisant la microscopie à fond noir, une méthode qui utilise une illumination oblique parfois décrite comme une "coloration à la lumière" et dans laquelle le sujet apparaît brillamment sur un fond sombre. La microscopie à fond noir est utilisée pour le diagnostic de la syphilis qui est causée par un autre spirochète, *Treponema pallidum*, en observant les très fins spirochètes dans des échantillons de tissus (5).

Bien que la microscopie seule ne puisse pas identifier les espèces exactes d'un spirochète, elle peut localiser leur présence et permet d'observer des espèces ou des variants inhabituels.

Dans une étude de 90 patients comparant les méthodes de test, Tylewska-Wierzbanska et Chmielewski (6) ont conclu que: "Il n'existe aucune corrélation entre le niveau d'anticorps (ELISA), le nombre de bandes de protéines (Western blot) et la présence de spirochètes dans les fluides corporels (culture et PCR), indiquant qu'en plus des tests sérologiques, l'utilisation de la PCR et de la culture pour le diagnostic de la borréliose de Lyme devraient être recommandées.

" Les patients atteints de la maladie de Lyme (LB) et de l'encéphalomyélite myalgique (M.E.) ont des communautés actives qui partagent leurs connaissances et leur soutien par le biais de groupes en ligne. Des amis issus de ces ressources ont été invités à participer en fournissant quelques gouttes de sang de bout des doigts pour voir si les formes spirochètales pouvaient être cultivées et observées à l'aide d'une microscopie à fond noir.

Deux kits différents ont été conçus pour être envoyés par courrier, permettant ainsi aux donateurs de fournir des échantillons avec un minimum d'inconvénients.

Les dimensions indiquées pour les spirochètes de *Borrelia burgdorferi* varient considérablement. Les chercheurs russes ont constaté que la longueur variait de 3 à 74 microns et la taille moyenne de 10,7 à 24,8 microns (7). Les bactéries sont généralement trop minces pour l'observation en microscopie optique classique (8). Les spirochètes sont souvent considérés comme de longues bactéries ayant un aspect hélicoïdal ou en forme d'onde, bien que d'autres formes aient été identifiées. Il existe différentes formes de sphéroplastiques dont la taille et la forme peuvent varier considérablement. Mursic et al. Affirment: "En microbiologie, le rôle des différentes formes bactériennes, sphéroplastiques et formes L atypiques dans les maladies infectieuses est considéré comme un problème important. Les sphéroplastiques et la croissance en formes L se produisent dans de nombreuses espèces bactériennes sous forme liquide ou sur un support solide. Ces formes sont des produits d'élimination partielle ou complète de la paroi cellulaire par digestion enzymatique (...) et d'inhibition partielle ou incomplète de la synthèse de la paroi cellulaire ..." (9)

Outre les formes en L avec une paroi cellulaire réduite ou absente, il existe des types «mutants» de spirochètes de *Borrelia*. Certains ont perdu leur flagelle et leur motilité et sont considérés comme plus droits que les types sauvages et peuvent avoir une activité métabolique plus faible (10).

Les formes atypiques de *Borrelia* comprennent les corps allongés comparativement épais (11), ils peuvent apparaître comme des bacilles, peuvent être longs et minces avec une région plus épaisse, peuvent être bouclés ou tordus ou avoir une extrémité bouclée (12).

Les spirochètes peuvent se transformer en une chaîne de corps ronds, parfois appelée «collier de perles». Avant de se transformer en cette forme distinctive, on peut parfois constater que les spirochètes présentent des signes de segmentation sur toute leur longueur. Lyme Info (www.lymeinfo.net) cite Hindle, E. (1912), qui écrivait sur «*Spirochaeta gallinarum*» (13): "Le spirochète prend progressivement l'aspect d'une chaîne de perles (...) contenue dans la paroi transparente de la cellule" Et cite encore Ewing (1907) dans *Spirochaeta pallida*: (14): "L'organisme peut apparaître sous la forme d'une chaîne de granules décrivant un spirochète complet."

Ces variations possibles ne signifient pas que tout ce qui est long et mince dans une goutte de sang est un spirochète. Parmi les autres possibilités à considérer, il y a les brins de fibrine, qui peuvent sembler bouger avec le mouvement brownien (BSK n'empêche pas le développement de brins de fibrine, pas plus que l'EDTA). Des «cellules de panier et de maculage» sont parfois observées et ces lymphocytes en désintégration peuvent créer beaucoup de débris de formes inhabituelles.

Une ponction de la peau peut entraîner des échantillons contenant des cellules endommagées et des liquides non sanguins, ainsi qu'une contamination externe. Les fibres de collagène et les membranes cellulaires en décomposition ont été suggérées pour expliquer certains agents de type spirochète (15).

Lorsque les formes spirochètales deviennent visibles dans une goutte de sang, elles peuvent généralement être observées pendant quelques jours avant que la majorité d'entre elles ne se développent en une «chaîne de perles» caractéristique, qui se divise ensuite en chaînes plus courtes et en cocci individuels. Les formes résultantes nécessiteraient alors des techniques telles que la PCR ou la mise en évidence par anticorps pour les identifier comme étant du spirochète. Même si la fenêtre d'observation est assez large, son point de départ peut être très variable. Parfois, des formes spirochètales peuvent être observées immédiatement lors de la préparation d'une lame, mais même avec le même donneur à différentes occasions, leur croissance peut prendre des heures ou des jours. Si un donneur prend des antibiotiques, cela pourrait également être un facteur qui pourrait entraver la croissance.

Par conséquent, il est souhaitable de créer des conditions qui encouragent la croissance de toutes les formes de spirochètes présentes pour améliorer les chances d'observation.

Borrelia burgdorferi est microaérophile, préférant la présence d'oxygène à faible concentration (16). Mysterud et Laane (17) ont obtenu de bons résultats en isolant les spirochètes en hémoculture en utilisant une solution de citrate de sodium qui favorisait la croissance des spirochètes. De plus, l'environnement de mini-culture a progressivement développé des régions où les niveaux d'oxygène étaient favorables à la croissance de spirochètes.

Matériel et méthodes

Les donneurs ont donné leur consentement éclairé à la participation aux expériences et à la publication de leurs données. Toutes les expériences ont été menées conformément à la déclaration d'Helsinki de 1975.

Pour ces expériences, le milieu Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) contenant 6% de sérum de lapin (Sigma-Aldrich) a été choisi comme additif pour favoriser la croissance des spirochètes, diluer les composants sanguins susceptibles de gêner la croissance des spirochètes et séparer les cellules sanguines afin de faciliter l'observation. un microscope à fond noir.

Au cours de la première phase de l'expérience, un kit contenant un lot de lames en verre préalablement nettoyé et des lamelles couvre-objet de 50 mm, une lancette et un chiffon de nettoyage, ainsi qu'une enveloppe de retour estampée et adressée (SAE) a été envoyé aux donateurs. Les donneurs ont mis une petite goutte de sang du bout des doigts au centre de chaque lame, y ont placé la lamelle et les ont renvoyées par la poste. Au retour des lames, une goutte de BSK a été ajoutée au bord de la lamelle couvre-objet qui a été aspirée dans l'échantillon par tension superficielle. Les longs côtés de la lamelle ont ensuite été scellés avec un adhésif. Les premières observations au microscope ont été effectuées 24 à 48 heures après la préparation de l'échantillon et à nouveau les jours suivants pendant un total de 5 jours.

Le deuxième kit testé comprenait en outre une pipette stérile et un minuscule tube de BSK ainsi qu'un tube d'adhésif. Pour préparer l'échantillon, le donneur a prélevé une goutte de sang comme dans le kit 1, puis a ajouté une petite goutte de BSK à l'échantillon. Celui-ci a été agité pendant quelques secondes avec la pointe de la pipette avant que la lamelle couvre-objet pour ensuite être transférée. Les longs côtés de la lamelle ont ensuite été scellés avec un adhésif.

Le stock de BSK a été testé pour la contamination avec des lames de contrôle dans lesquelles le milieu de culture était exposé à l'atmosphère sur une lame pendant une minute et agité avec une pointe de pipette (comme cela était le cas avec le kit 2) avant qu'une lamelle de 50 mm soit placée et scellée; puis stocké pendant 48 heures et examiné pour la contamination. Quelques particules ont été observées, quelques bactéries très rares et très peu d'agents allongés n'ayant pas les caractéristiques du spirochète. Des vidéos de 640x480 pixels à 30 images par seconde ont été enregistrées à partir du microscope ainsi que des images fixes à 1600x1200 pixels avec une caméra numérique Fuji Finepix F10 montée sur l'oculaire du microscope. Les images et les vidéos ont été éditées avec soin en filtrant le bruit et en ajustant les niveaux. Certaines ont été recadrées. Des extraits de l'échantillon de chaque donneur ont été compilés en de courtes vidéos contenant les données principales de l'expérience. Sur un total de onze donneurs, sept donneurs ont fourni des échantillons pour le kit 1. Dix donneurs ont fourni des échantillons pour le kit 2, dont 6 donneurs du kit 1. Deux donneurs ont également fourni des échantillons pour des expériences de microscopie à fluorescence.

Données démographiques sur les donateurs

6 femmes et 5 hommes ont donné des échantillons. Les âges vont de 37 à 70 ans. Tous les donneurs ont eu des problèmes de santé à long terme, 8 sur 11 étant malades depuis 19 ans ou plus. On a diagnostiqué chez M. 8 donneurs à un moment donné 10 des 11 donneurs avaient subi un test de dépistage de la borréliose de Lyme par le biais du NHS et le résultat était négatif (un test non testé). 9 sur 11 ont subi des tests privés positifs; (2 non testé en privé). 7 sur 11 avaient pris des antibiotiques une semaine après avoir préparé leur échantillon de culture. L'impact de la maladie a varié considérablement parmi les donneurs, avec une capacité physique auto-évaluée moyenne de 32% et une capacité mentale de 44%. Voir le tableau 1.

LB = Borréliose de Lyme. M.E. = Encéphalomyélite Myalgique. Le test de laboratoire de NHS pour la borréliose de Lyme est un test en 2 étapes, la première partie étant un ELISA qui, s'il est positif ou équivoque, est suivi d'un Western Blot. Capacités auto-évaluées par rapport à l'ancien état de santé ou, si malade pendant plus de 10 ans, par rapport à des pairs.

Résultats du kit d'expérimentation 1

Un seul jeu de lames a été un échec complet et le donateur a aimablement fourni un second jeu approprié. Tous les autres ensembles avaient au moins une lame utilisable. Avec ce kit, il a été constaté que les problèmes étaient principalement liés à la quantité de sang mise sur la lame. Ceci est décrit dans la discussion ci-dessous.

Les formes spirochétales étaient généralement observées assez facilement, la majorité produisant des résultats entre 2 et 4 jours après le prélèvement de l'échantillon. La figure 1 montre des images prises en même temps que l'enregistrement vidéo ou extraites de la vidéo elle-même. La légende avec chaque image fait référence à la vidéo correspondante listée ci-dessous. 1, 2 et 8 proviennent du même donneur. Les vidéos 3, 8 (notez le spirochète de forme d'onde à 10 secondes) et 10 sont particulièrement recommandées.

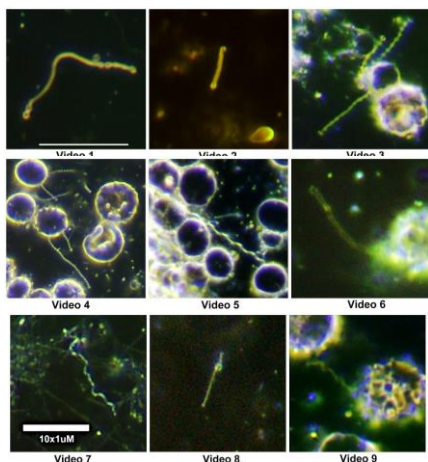


Figure 1. Résultats de la trousse 1 montrant des photographies prises au même moment que la vidéo ou une image fixe extraite de la vidéo. La légende sous chaque panneau correspond à un fichier vidéo.

Résultats du kit d'expérimentation 2

Une série de lames a montré une décomposition rapide des érythrocytes bien qu'une des lames de cette série ait été moins affectée et cela a été utilisé. D'autres ensembles contenaient parfois des érythrocytes en décomposition, généralement proches du bord court exposé de la lamelle. Un ensemble a produit des résultats en seulement 24 heures, bien que la plupart des résultats se soient produits entre 2 et 4 jours, comme dans le kit 1.

Certains donneurs ont eu de la difficulté à obtenir un rapport adéquat entre la BSK et le sang. Quelques-uns ont eu de la difficulté à manipuler l'adhésif pour sceller les bords longs de la lamelle couvre-objet et la colle s'est parfois traînée sur la lamelle (facile à enlever). Certains échantillons se sont révélés assez épais, rendant la microscopie difficile. Cependant, chaque ensemble avait au moins une lame utilisable.

La figure 2 montre des photographies du kit 2. En général, les résultats étaient meilleurs que ceux du kit 1. Les vidéos 15 et 16 proviennent du même donneur. Les vidéos particulièrement recommandées portent les numéros 10, 13, 14, 15, 16 et 20, cette dernière se terminant par une image fixe montrant un spirochète formant 30 coccoïdes individuels dans sa membrane, à la manière d'un «collier de perles».

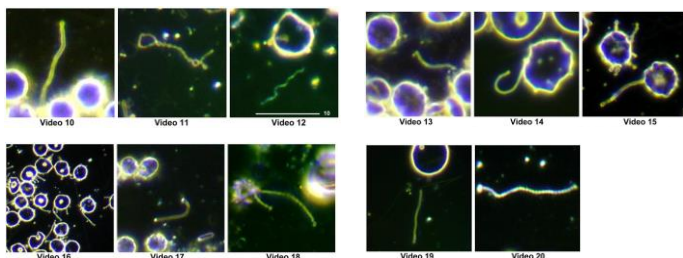
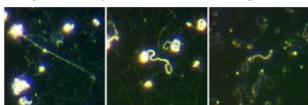


Figure 2. Résultats du kit 2. Affichage de photographies prises au même moment où la vidéo a été enregistrée ou d'une image fixe de la vidéo. La légende sous chaque panneau correspond à un fichier vidéo.

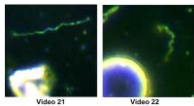
Résultats étendus de l'expérience

Bien que l'expérience visait à étudier des échantillons pendant 5 jours, quelques lames ont été examinées beaucoup plus tard et, comme prévu, la plupart étaient devenues inutilisables. Cependant, au bout de 10 jours, il a été constaté qu'un échantillon de lame de la trousse 2 contenait certains agents intéressants de type spirochète faciles à observer. Dans plusieurs panneaux, il semble y avoir des *spirochètes enkystés* (enroulés)



Vidéos supplémentaires pertinentes pour l'expérience

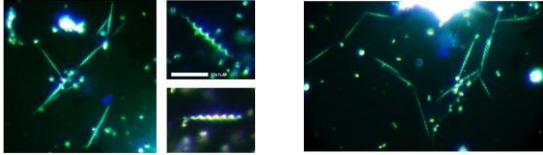
D'autres vidéos intéressantes sont également fournies à titre de données supplémentaires. La vidéo 21 montre une lame de culture utilisée dans le kit 2 avec une goutte de chlorure de sodium (NaClO_2) ajoutée après la croissance de spirochètes. La présence de la toxine a progressivement conduit les spirochètes à perdre leur flexibilité, pour finalement les rendre rigides. La vidéo 22 provient du sang veineux avec EDTA (tube de prélèvement à la lavande) fourni par un donneur participant à l'expérience. Des spirochètes vigoureux et très souples peuvent être vus dans cette vidéo montrée à une vitesse normale.



Preuves à l'appui d'expériences antérieures

D'autres preuves à l'appui de la nature spirochétale de certains sujets proviennent d'une expérience incluant 5 des mêmes donneurs ayant contribué à l'expérience actuelle. Ces 5 personnes avaient précédemment fourni du sang veineux dans un tube EDTA à tête lavande. 1 ml de sang total provenant de ces échantillons a été utilisé pour une culture à long terme dans 7 ml de milieu BSK avec 6% de sérum de lapin dans un tube scellé de 15 ml maintenu à la température ambiante pendant plus de 3 mois avant l'incubation à 30 ° C. À 5 mois, on a découvert que les cultures avaient développé des spirochètes avec leurs formes ondulées et hélicoïdales typiques, comme illustré à la figure 5.

Figure 5. Exemples de spirochètes cultivés chez 5 des donneurs actuels présentant une culture BSK à long terme.

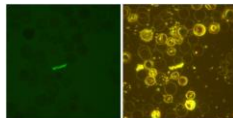


Preuves à l'appui:des expériences de coloration avec des anticorps fluorescents

Des preuves supplémentaires démontrent que des formes morphologiques à *Borrelia* pourraient être détectées chez 2 des donneurs ayant fourni une goutte de sang du bout du doigt et 1 donneur ayant fourni un échantillon veineux (EDTA à la lavande ?) pour une culture BSK à long terme.

Un échantillon a été mélangé avec les anti-borrelia spp de KPL, anticorps polyclonal FITC (cat: 02-97-92 Lien vers la page produit) et / ou anticorps anti-Borrelia burgdorferi garinii d'Abcam polyclonal FITC (chat: ab20118 lien vers la page produit). Une brève explication de la coloration des anticorps :

Les anticorps utilisés ici ont été produits chez des animaux hôtes contre les spirochètes morts. Les anticorps générés par leur système immunitaire contre l'infection ont été collectés et raffinés. Ceux-ci sont ensuite conjugués avec de la fluorescéine qui brille quand elle absorbe certaines fréquences lumineuses. La fluorescéine absorbe la lumière bleue mais émet de la lumière verte. Avec un filtrage correct, il est possible de visualiser UNIQUEMENT la fluorescence. Lorsqu'un anticorps trouve une protéine correspondante dans un échantillon, il se fixe dessus et se comporte exactement comme un anticorps. Cela signifie également que la fluorescéine combinée est également bloquée sur la cible correspondante. Si suffisamment d'anticorps se bloquent sur une cible, alors avec un filtre à fluorescence, la cible brillera vivement.



Deux autres types de fluorescence doivent être pris en compte en

1. La fluorescence de fond, due à une filtration imparfaite, à des effets thermiques et à la tendance de nombreuses substances à présenter une fluorescence minimale - y compris le plasma sanguin.

2. L'autofluorescence, qui se produit lorsque les cellules ont une fluorescence naturelle à des niveaux plus élevés. Cela pourrait potentiellement être mal interprété comme une coloration fluorescente réussie. L'autofluorescence est particulièrement notable avec les lymphocytes (globules blancs) et se produit également avec les plaquettes. En outre, le Dr Lida Mattman a estimé que l'empruntia (?) avait des propriétés auto-fluorescentes. Pour ces raisons, les expériences présentées ci-dessous comprennent des lames de contrôle. On notera que l'autofluorescence était systématiquement très faible, mais ceci est probablement dû en partie au mélange avec de l'eau distillée pour correspondre à la dilution similaire des taches. Lorsque le sang total n'est pas dilué, l'auto-fluorescence des cellules peut être considérablement plus élevée.

Discussion

On ne prétend pas que tous les agents allongés dans les images et les vidéos sont des spirochètes, mais beaucoup ont des caractéristiques qui, lorsqu'elles sont corrélées à la morphologie connue des spirochètes, à la santé et au diagnostic du donneur; ainsi que le succès de la coloration aux anticorps de 2 échantillons du donneur et de la culture à long terme de 1 donneur, confortent l'idée qu'il s'agit en réalité de spirochètes.

Les résultats étaient variables, mais ils ont montré que ces formes pouvaient être cultivées et observées dans des échantillons préparés par le donneur. La qualité de l'imagerie de microscopie dépend de divers facteurs. La quantité de cellules sanguines, le rapport avec et le mélange avec la BSK et l'épaisseur de l'échantillon ont tous affecté la microscopie. Néanmoins, les donneurs peu ou pas habitués ont réussi à préparer des lames donnant des résultats intéressants.

Les problèmes rencontrés avec le kit 1 concernaient principalement la taille de la goutte de sang. Une quantité idéale serait répartie pour couvrir 50% à 70% de la surface de la lamelle. Les donneurs avaient du mal à en jager, exigeant une précision de quelques microlitres. Trop de sang scellerait les bords de la lamelle et ne laisserait plus de place à l'ajout de BSK. Trop peu de sang a entraîné la dessiccation de l'échantillon et un mauvais mélange avec le BSK.

Avec le kit 2, le donateur a ajouté BSK rendant le processus plus compliqué. Cela a ralenti la préparation et a signifié que le sang et BSK ont été exposés à l'atmosphère plus longtemps et que des signes de contamination ont été observés. Le mélange du sang avec la BSK était parfois incomplet - il était demandé aux donneurs de mélanger le mélange avec la pointe de la pipette pendant 2 à 3 secondes, ce qui s'avérait trop court, laissant parfois des amas de sang évidents qui aboutissaient à un échantillon épais. Certaines des lames contenant des échantillons assez épais pour la microscopie auraient pu être améliorées avec un nouveau buvardage de la lame avant de sceller la lamelle. La fiche d'instruction du donateur doit être améliorée à cet égard.

Les donneurs étaient des personnes ayant reçu un diagnostic de M.E. (encéphalomyélite myalgique) et / ou de LB (borréliose de Lyme) . Dans ces maladies, un phénomène appelé «sang collant» peut se produire. Le Dr Byron Hyde a déclaré: "Il est bien intéressant que tous les médecins qui s'intéressent à la maîtrise de la ME, lisent cette définition sur Internet, recherchent le syndrome de Hughes sur Internet.... Un syndrome vasculaire, également appelé syndrome du sang collant, est très proche de la définition de M.E." (18)

Le Dr Charles L. Crist est un médecin expérimenté dans le traitement de la borréliose de Lyme, il observe sur son site web (<http://drcharlescrist.net/Borreliosis/Hypercoagulation/> Consulté le 26 novembre 2013.): "L'hypercoagulation, ou thrombophilie, peut être définie comme débit sanguin capillaire réduit ou tendance plus forte que la normale à la coagulation ou à la coagulation du sang. Sur environ 900 patients atteints de borréliose que j'ai testés, 90% souffrent d'hypercoagulation. En comparaison, seulement 5% de la population en bonne santé présente une hypercoagulation. "

Le «sang collant» ne se propage pas bien sous une lamelle couvre-objet et peut former un film épais dont le bord extérieur se dessèche rapidement. Il ne se mélange pas facilement avec le BSK et peut donner un échantillon trop épais pour la microscopie.

Outre les problèmes mentionnés, les personnes atteintes de M.E. ou de LB peuvent avoir des problèmes importants de coordination et de contrôle de la motricité fine, de déficience visuelle et de difficultés de concentration. Certains donneurs ont dû prendre des dispositions spéciales pour poster leurs échantillons. Compte tenu de la gravité de la maladie de certains donneurs, il est remarquable de constater à quel point ils ont bien géré. Il a été constaté que les donneurs étaient intéressés et enthousiastes à l'idée d'essayer l'expérience et que, avec peu ou pas d'expérience préalable, ils étaient souvent capables de préparer une lame adaptée à la microscopie.

Cinq des donneurs participant à cette expérience avaient précédemment fourni 2 ml de sang dans un tube de collecte d'EDTA. Cette méthode permet de contrôler la préparation des lames d'échantillons et de disposer d'un nombre suffisant d'échantillons pour démarrer des cultures à long terme et mener d'autres expériences; ce qui en fait une méthode bien meilleure que les kits testés ici. Néanmoins, cette expérience simple a permis à des personnes pratiquement confinées à leur foyer par leur maladie de participer à une expérience qui a produit des résultats.

Des variations dans les résultats ont été observées même chez des donneurs individuels, ce qui suggère que la méthode n'est pas optimale. cela pourrait également indiquer que la détection de faibles nombres de spirochètes serait encore plus variable. La durée de maladie la plus courte parmi les donneurs était de 5 ans, avec 8 des 11 malades depuis plus de 19 ans. On ignore si cette expérience pourrait permettre de cultiver des spirochètes chez des personnes malades depuis des mois, voire quelques années.

Les résultats présentés dans certaines vidéos semblent plutôt choquants. Il ne faut pas oublier que ce n'est pas l'état naturel du sang du donneur, mais qu'il présente un environnement créé artificiellement dans le but d'encourager la croissance des spirochètes. Aucune tentative n'a été faite pour compter les cellules et un minimum de détails sur les donneurs ont été recueillis. Pourtant, l'impression était que la gravité et la durée de la maladie du donneur n'étaient pas fortement corrélées au nombre de spirochètes dans cette expérience qui ne portait que sur le sang périphérique cultivé pendant une période limitée. La facilité avec laquelle les spirochètes ont été trouvés et leur nombre semblaient davantage corrélés aux caractéristiques de l'échantillon; c'est-à-dire qu'un échantillon peu épais avec une densité raisonnable de cellules bien réparties semblait être les facteurs qui permettaient de manière fiable d'observer les spirochètes.

Le sang déposé sur une lame de microscopie est soumis à de nombreuses contraintes qui peuvent endommager les cellules et créer des artefacts. Pourtant, 24 heures ou plus après la préparation d'une lame, les échantillons semblaient souvent parfaitement «propres». Les cellules avaient une apparence normale et ne présentaient aucun spirochète, aucune

fibre de collagène ou autre chose pouvant être interprété visuellement comme étant un spirochète.

Les spirochètes sont venus de quelque part et la logique suggère qu'ils soient issus de sphéroplastés présents dans le plasma et / ou attachés à la surface des cellules sanguines; et / ou qu'ils étaient à l'intérieur de cellules et en ont émergé. Il a été suggéré que des agents tels que ceux observés sont le produit de la désintégration des membranes cellulaires et cette théorie s'accorderait avec l'augmentation progressive des agents de type spirochète au fil du temps. Cependant, cela ne concorde pas avec le fait que quelques jours après leur apparition, le nombre de spirochètes diminue rapidement ; ils se sont convertis en de nombreuses formes coccoïdes. Si ces agents étaient des artefacts de décomposition cellulaire, on pourrait s'attendre à ce que leur nombre augmente jusqu'à ce que la majorité des cellules se soit effondrée.

Limites de l'expérience

Le comptage cellulaire n'a pas été tenté. Aucun contrôle en bonne santé n'a été inclus, ni les personnes récemment infectées. L'espèce de spirochète est inconnue.

Conclusion

Les donneurs atteints d'une maladie de longue durée et chez lesquels on a diagnostiqué une borréliose de Lyme et / ou un M.E peuvent préparer des mini- lames sur une goutte de sang prélevée au bout du doigt en utilisant un simple kit postal. Cela permet une observation directe des spirochètes de manière raisonnablement cohérente par microscopie à fond noir dans les 5 jours. *Lorsque le donneur prenait des antibiotiques au moment de la préparation de l'échantillon, cela n'empêchait pas l'observation des formes spirochètales. La culture à long terme et la coloration d'anticorps fluorescents peuvent également appuyer la conclusion selon laquelle des spirochètes sont présents.*

La reproduction de certaines de ces expériences par des personnes qualifiées dans des conditions de laboratoire et avec des sujets de contrôle sains présenterait un intérêt pour les communautés médicale et scientifique et pour les nombreux patients susceptibles d'être affectés.

References

1. Medscape Medical News. Lyme Culture Test Causes Uproar. Janis C. Kelly. January 30, 2013. Available: <http://www.medscape.com/viewarticle/778482>. Accessed 5 March 2014.
 2. IDSA. 2010. Final Report of the Lyme Disease Review Panel of the Infectious Diseases Society of America (IDSA). Available: http://www.idsociety.org/uploadedFiles/IDSA/Topics_of_Interest/Lyme_Disease/IDSA_Lyme_Disease_Final_Report.pdf. Accessed 14 December 2013.
 3. Centers for Disease Control and Prevention, USA. 2013. Post-Treatment Lyme Disease Syndrome. Available: <http://www.cdc.gov/lyme/postLDS/index.html>. Accessed 14 December 2013.
 4. Guo BP, Teneberg S, Münch R, Terunuma D, Hatano K, et al. 2009. Relapsing fever *Borrelia* binds to neolacto glycans and mediates rosetting of human erythrocytes. PNAS 2009 106: 19280-19285. Available: <http://www.pnas.org/cgi/crossref-forward-links/106/46/19280>. Accessed 14 December 2013.
 5. Dark ground microscopy and treponemal serology for diagnosis of early syphilis. J Clin Pathol. Dec 2004; 57(12): 1263. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1770499/>.
 6. Tylewska-Wierzbanska S, Chmielewski T. 2002. Limitation of serological testing for Lyme borreliosis: evaluation of ELISA and western blot in comparison with PCR and culture methods. Wien Klin Wochenschr. 2002 Jul 31;114(13-14):601-5
 7. Naumov RL, Vasil'eva IS, Shtannikov AV, Evsegneev SI. 2002. *Borrelia burgdorferi* s.s. length and its variability. Med Parazitol (Mosk). 2002 Apr-Jun;(2):38-43. Abstract Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12214524>
 8. Todar's Online Textbook of Bacteriology. 2013. *Borrelia burgdorferi* and Lyme Disease (p. 1). Available: <http://textbookofbacteriology.net/Lyme.html>. Accessed 26 November 2013.)
 9. Mursic VP, Wanner G, Reinhardt S, Wilske B, Busch U, Marget W. 1996. Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast-L-form variants. Infection. 1996 May-Jun;24(3):218-26. Erratum in: Infection 1996 Jul-Aug;24(4):335. PMID:8811359. Text only PDF available at: <http://www.lymepa.org/07%20Cysts%20and%20spherical%20forms%20of%20Borrelia%20burgdorferi.pdf>. Accessed 20 November 2013.
 10. Sadziene A, Denee Thomas D, Bundock V G., Holt Stanley C. and Barbour Alan G. 1991. A Flagella-less Mutant of *Borrelia burgdorferi*. Structural, Molecular, and In Vitro Functional Characterization. J. Clin. Invest. Volume 88, July 1991, 82-92. Available PDF: <http://www.jci.org/articles/view/115308/files/pdf>.
 11. Miklosy J, Kasas S, Zurn A.D, McCall S, Yu S, and McGeer P.L. 2008. Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. Journal of Neuroinflammation 2008, 5:40. doi:10.1186/1742-2094-5-40. Figure 5. Panel k. Accessed 26 November 2013.
 12. Aberer E and Duray P H. 1991. Morphology of *Borrelia burgdorferi*: structural patterns of cultured borreliae in relation to staining methods. J Clin Microbiol. 1991 April; 29(4): 764-772. PMID: PMC269867. Available PDF: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC269867/pdf/jcm00040-0114.pdf>. Accessed 27 November 2013.
 13. Hindle, E. 1912, On the life-cycle of spirochaeta gallinarum. Parasitology, Vol IV, pp. 463-7. Cited by Lyme Info. Available: <http://www.lymeinfo.net/medical/LDBibliography.pdf>. Accessed 12 December 2013.
 14. Ewing J. 1907. Note on involution forms of *Spirochaete pallida* in gummata. Proceedings of the New York Path. Soc., 1907-8, n.s. 7:166-71. Cited by Lyme Info. Available: <http://www.lymeinfo.net/medical/LDBibliography.pdf>. Accessed 12 December 2013.
 15. Duerden BI. 2006. Unorthodox and unvalidated laboratory tests in the diagnosis of Lyme borreliosis and in relation to medically unexplained symptoms. Department of Health, London, UK, 2006 Available: http://www.dh.gov.uk/prod_consum_dh/groups/dh_digitalassets/@dh/@en/documents/digitalasset/dh_4138917.pdf Accessed 28 November 2013.
 16. Sapi E, Pabbati N, Datar A, Davies EM, Rattelle A, Kuo BA. Improved Culture Conditions for the Growth and Detection of *Borrelia* from Human Serum. Int J Med Sci 2013; 10(4):362-376. doi:10.7150/ijms.5698. Available: <http://www.medsci.org/v10p0362.htm>. Accessed 27 November 2013.
 17. Mysterud I, Laane MM. 2013. A simple method for the detection of live *Borrelia* spirochaetes in human blood using classical microscopy techniques. Biological and Biomedical Reports. Vol 3, No 1 (2013) Available: <http://www.biomedicalreports.org/index.php?journal=bbr&page=article&op=view&path%5B%5D=98&path%5B%5D=69>. Accessed 20 November 2013.
 18. Hyde, Byron Marshall MD. 2007. The Nightingale Definition of Myalgic Encephalomyelitis (M.E.). Published by: The Nightingale Research Foundation, Ottawa, Canada. Available: http://www.nightingale.ca/documents/Nightingale_ME_Definition_en.pdf. Accessed 19 November 2013.
- <http://counsellingme.com/microscopy/ExperimentLgfont.html>