



CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES *BORRELIA*

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITÉ Année 2012

CNR

Laboratoire de Bactériologie

Plateau technique de microbiologie

Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

Responsable : Pr Benoît Jaulhac, MD., PhD

Expertise médicale : Dr Sylvie de Martino MD., PhD

Surveillance vectorielle : Dr. Nathalie Boulanger PharmD., PhD

1. Introduction	4
1.1. Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR	4
1.2. Résumé des activités de l'année N : faits marquants, points clefs, contexte, principaux résultats de contribution à la surveillance et à l'alerte	4
1.3. Equipe : personnels dévolus aux activités du CNR Borrelia (Laboratoire de Bactériologie, Plateau Technique de Microbiologie, Hôpitaux Universitaires de strasbourg)	5
1.3.1. Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur.....	5
1.3.2. Organigramme	5
1.3.3. Description de la démarche qualité du CNR Borrelia : participation à un contrôle de qualité externe, programmes, accréditation, certification,.....	5
1.4 Locaux et équipements du CNR Borrelia (Laboratoire de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)	6
1.4.1. Surface, plan.....	6
1.4.2. Principaux équipements du CNR Borrelia.....	6
2. Activités d'expertise	7
2.1. Capacités techniques du CNR.....	7
2.1.1. Liste des techniques de référence: diagnostic, identification, typage	7
2.1.2. Collections de matériels biologiques : souches, antigènes ou immun-sérums de référence	8
2.1.3. Liste des techniques (diagnostic/identification, typage, sensibilité aux anti-infectieux...) recommandées par le CNR :	9
2.2 Activités d'expertise de l'année 2012 du CNR des Borrelia (Laboratoire de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)	13
2.2.1. Sérologies sanguines <i>B. burgdorferi</i> <i>sl</i> réalisées en 2012.....	13
2.2.2. Etude de la synthèse intrathécale spécifique anti <i>B. burgdorferi</i> sensu lato.....	17
2.2.3. Activité d'expertise PCR du CNR Borrelia en 2012	18
2.2.4. Envois extérieurs de matériel biologique par le CNR Borrelia	21
3. Activités de surveillance.....	21
3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato et autres pathogènes transmis par <i>Ixodes ricinus</i> par le CNR (Laboratoire de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)	21
3.1.1. Surveillance nationale des cas de suspicion de borréliose de Lyme	22
3.1.2. Surveillance des manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France : « protocole biopsies cutanées » - Etude de la diversité des espèces de <i>Borrelia</i> dans les manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France	23
3.1.3. Surveillance de l'anaplasmose granulocytaire humaine et des co-infections <i>Anaplasma</i> avec <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato et d'autres pathogènes transmis par les tiques (PHRC 3960).	25
3.2. Surveillance du vecteur <i>Ixodes ricinus</i> par le CNR en Alsace	26
3.2.1. Choix des sites et méthodes de collecte.....	26
3.2.2. Méthodes de détection des ADN de <i>B. burgdorferi</i> sensu lato dans les tiques ...	30
3.2.3. Analyse statistique	30
3.2.4. Densité des nymphes - Résultats	30
5. Activités d'information, de formation et de conseil.....	38
5.1. Information et formation	Erreur ! Signet non défini.
5.1.1. Enseignement	Erreur ! Signet non défini.
5.1.2. Formation médicale continue aux professionnels de santé	Erreur ! Signet non défini.
5.1.3. Organisation d'un Contrôle de Qualité Externe (EEQ) proposé aux Laboratoires d'Analyses Médicales.....	38
5.1.4. Accueil de stagiaires	Erreur ! Signet non défini.
5.1.5. Thèse de doctorat, participation à des jurys	Erreur ! Signet non défini.
5.2. Guides élaborés (contenu, modes de diffusion)	40

5.3. Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...)	40
5.3.1. <i>Provenance géographique des demandes</i>	40
5.3.2. <i>E-mails / fax / lettres</i>	41
5.3.3. <i>Communications téléphoniques</i>	43
5.4. Liste des activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...)	45
5.4.1. <i>Expertise sous l'égide de la Haute Autorité de Santé</i>	45
5.4.3. <i>Avis pour la CNAM</i>	45
5.4.4. <i>Expert en tant que membre de réseaux internationaux</i>	45
5.4.5. <i>Expert en tant que membre de réseaux nationaux</i>	46
5.4.6. <i>Agence Régionale de Santé (ARS) : mise en place d'un comité de pilotage « Tiques et maladies à tique » avec la CIRE-EST</i>	47
6. Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR	47
6.1. Analyse de la peau dans la transmission précoce de <i>Borrelia</i> et de son rôle potentiel dans la peau	47
6.1.1. <i>Objectifs</i>	47
6.2. Analyse de la virulence de <i>Borrelia</i> par une approche protéomique sur culture de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato et sur peaux de souris infectées	48
6.2.1. <i>Objectifs</i>	48
6.2.1. <i>Partenariats</i>	48
6.2.3. <i>Etat d'avancement</i>	48
7. Liste des publications et communications	48
7.1. Publications nationales	48
7.2. Publications internationales	48
7.3. Communications nationales	49
7.4. Communications internationales	49
7.5. Conférences sur invitation	49
Annexes	51

1. Introduction

1.1. Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR

voir en annexe

1.2. Résumé des activités de l'année N : faits marquants, points clefs, contexte, principaux résultats de contribution à la surveillance et à l'alerte

L'année 2012 a été l'année de mise en place d'une nouvelle organisation et de nouveaux outils afin d'assurer l'ensemble des missions de surveillance du nouveau CNR *Borrelia*. Afin d'assurer ces missions et objectifs, nous avons recruté et intégré dans l'équipe :

- Mme L. Zilliox en tant que technicienne de laboratoire, pour ses compétences en biologie moléculaire

- Mme N. Boulanger, docteur en pharmacie et docteur es sciences, pour ses compétences entomologiques afin d'assurer le développement et la gestion de la surveillance vectorielle.

Cela permettra la poursuite de la surveillance tant humaine que vectorielle et celle des **réservoirs** (faune sauvage). Cette approche globale permet d'analyser et d'évaluer le niveau de risque de contamination de l'homme.

En 2012, le CNR des *Borrelia* a poursuivi son analyse de la fréquence des formes cliniques et participé à l'étude de l'incidence de la **maladie** et en poursuivant sa collaboration avec le «réseau Sentinelles» (Inserm-UPMC) et l'InVS (article soumis). La borréliose de Lyme est intégrée à la liste des sept maladies transmissibles surveillées par ce réseau national depuis 2009.

Afin de pouvoir réaliser une partie de ces dernières, le CNR a développé une méthode de détection moléculaire des *Borrelia* dans le cadre du diagnostic des cas importés de **fièvres récurrentes**.

Le CNR a également réalisé près de 8000 sérologies, effectué près de 250 recherches de synthèse intrathécale et réalisé une centaine d'analyses de biologie moléculaire spécifique de prélèvements cliniques pour la confirmation du diagnostic.

Le CNR *Borrelia* a poursuivi ses activités de **surveillance** de cas cliniques d'**infection à *Borrelia burgdorferi sensu lato*** via près de 500 fiches de renseignements et 1000 contacts (conversations téléphoniques, courriers et courriers électroniques).

Il a également poursuivi la coordination d'un réseau national de dermatologues dans le cadre d'une étude nationale sur les différentes formes cutanées de la borréliose de Lyme.

Dans le cadre de la démarche qualité, le CNR est entré pleinement dans la démarche d'accréditation avec notamment la mise en place d'EEQ trimestriels et la préparation d'un premier dossier de validation de méthodes en sérologie.

Le CNR a également mis en place les outils d'analyse biologique notamment moléculaire et la logistique pour **l'étude de l'infection par *Borrelia* des populations d'*Ixodes ricinus***. La méthode d'analyse de la densité des nymphes infectées (indicateur qui reflète le mieux le risque pour l'Homme) a été élaborée pour permettre la comparaison avec les données précédemment observées au fil des mandats antérieurs de l'ancien CNR ainsi qu'avec les données des autres pays européens. Cela s'inscrit dans une démarche de continuité de la surveillance de la borréliose de Lyme au niveau national.

Le CNR a également la mission **d'expertiser les principaux tests sérologiques commerciaux** et de **développer des méthodes d'identification** et d'analyse de la diversité des *Borrelia*. En 2012, deux coffrets de sérologie par immuno-empreinte ont été évalués : le coffret LYMECHECK OPTIMA IgG & IgM® et le coffret Euroimmun®. Nous avons aussi

développé une méthode d'identification des souches des différentes espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Sur le plan **recherche** le CNR a poursuivi ses travaux sur le thème des interactions des protéines de la salive de tiques avec *Borrelia* et le rôle de l'interface cutanée lors de l'infection initiale par *Borrelia*.

Sur un plan de recherche clinique, nous avons décrit et publié le 1^{er} cas d'endocardite de Lyme à *Borrelia afzelii*.

1.3. Equipe : personnels dévolus aux activités du CNR *Borrelia* (Laboratoire de Bactériologie, Plateau Technique de Microbiologie, Hôpitaux Universitaires de strasbourg)

1.3.1. Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur

voir en annexe

1.3.2. Organigramme

voir en annexe

1.3.3. Description de la démarche qualité du CNR *Borrelia* : participation à un contrôle de qualité externe, programmes, accréditation, certification,...

La démarche qualité du CNR des *Borrelia* s'inscrit dans le projet global de certification des HUS et d'accréditation du pôle de Biologie des HUS et de ce fait dans celle du laboratoire de Bactériologie. Le CNR des *Borrelia* est actuellement engagé dans une démarche qualité et d'accréditation obligatoire selon la norme NF EN ISO 15189.

Cet engagement a permis de définir un certain nombre de processus et de bénéficier d'outils de la qualité dans les domaines détaillés ci-dessous.

Parallèlement, de nombreux processus pré-analytiques et analytiques ont été réalisés ou engagés en 2012.

Le dossier de validation de méthodes conformément aux exigences du COFRAC est en cours de réalisation pour la sérologie ELISA. L'objectif est de le soumettre au COFRAC en 2013.

Processus de management

- Pilotage de la qualité
 - Mesure, analyse et amélioration
- Ces deux processus sont intégrés dans le fonctionnement global du pôle de biologie du CHU de Strasbourg.

Processus support

- Ressources humaines : intégré dans le fonctionnement global du pôle de biologie du CHU de Strasbourg
- Maitrise des achats : via l'organisation HusAppro du CHU de Strasbourg ; procédure concernant les commandes du CNR *Borrelia*
- Maitrise des équipements : intégré dans le fonctionnement global du pôle de biologie du CHU de Strasbourg ; (n° inventaire, fiche de vie des équipements métrologie, maintenance)
- Hygiène et sécurité : Recensement exhaustif en 2012 de la dangerosité des réactifs utilisés et fréquence d'utilisation du pôle de biologie

- Maîtrise des documents et de l'information : intégré dans le fonctionnement global de la documentation du pôle de biologie du CHU de Strasbourg.

Processus de réalisation

Au sein des processus de réalisation listés ci-dessous, nous avons affiché les actions réalisées au sein de chaque rubrique afin d'assurer la qualité de nos prestations.

Processus pré-analytique

- Mise en place en 2012 des procédures de réception, d'enregistrement et d'envoi des échantillons biologiques : réception et saisie informatique d'une biopsie cutanée pour analyse par culture et PCR, procédure d'envoi de kits de prélèvement de biopsie cutanée pour analyse par culture, conditionnement pour envoi d'ADN, protocole de prélèvement pour recherche par PCR
- Mise en place en 2012 de fiches de non-conformité et traitement de ces non-conformités pré-analytiques.

Processus analytique

- Préparation des CQI par le CNR : structuration en 2012 de la préparation des réactifs pour le CQI de sérologie *Borrelia*, traçabilité des tests pour acceptation des CQI, suivi des lots. Mise en place des contrôles de qualité interne quotidiens en sérologie *Borrelia* et suivi des dérives sur courbes de Lewey-Jennings
- Mise en place d'un contrôle de qualité interne et suivi à chaque série en PCR *Borrelia* : ADN (+) et T(+) d'extraction
- Mise en place en 2012 d'un contrôle de qualité analytique externe 4 fois/an (partenaire européen Labquality)
- Mise en place en 2012 de la traçabilité des matériels et réactifs avec suivi en temps réel des réactifs reçus et des enceintes de stockages : relevé des T° frigo, chambres froides, étuves
- Rédaction en 2012 de procédures et modes opératoires du CNR des *Borrelia* : biopsies cutanées, culture de *Borrelia*, préparation de l'antigène *Borrelia*, utilisation du microscope et du PSM, du GPS. Ces documents ont été intégrés au système de management qualité du laboratoire selon les règles en vigueur de gestion et d'archivage documentaire. Rédaction des fiches de poste.

1.4 Locaux et équipements du CNR *Borrelia* (Laboratoire de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

1.4.1. Surface, plan

voir en annexe

1.4.2. Principaux équipements du CNR *Borrelia*

voir en annexe

2. Activités d'expertise

2.1. Capacités techniques du CNR

2.1.1. Liste des techniques de référence: diagnostic, identification, typage

2.1.1.1. Techniques disponibles

Voir en annexe

2.1.1.2. Techniques développées durant l'année 2012 : brève description (principes, validation)

2.1.1.2.1. Mise au point d'une PCR pour le diagnostic de fièvres récurrentes

Le diagnostic biologique direct des borrélioses de fièvres récurrentes est réalisé sur sang total et LCR, d'une part par frottis sanguin coloré au May Grünwald Giemsa et d'autre part par amplification génique *in vitro* après extraction de l'ADN (colonnes Qiagen®) suivi, en cas de positivité, d'un séquençage des amplicons pour identification de l'espèce.

La détection moléculaire spécifique des différentes espèces de *Borrelia* responsables de fièvres récurrentes cible une séquence d'ADN de 476 paires de bases d'une région de l'espace intergénique 16S-23S ADNr, encadrée par deux amorces nucléotidiques :

Après vérification des qualités thermodynamiques des amorces (structures secondaires, dimères d'amorces et mise au point des conditions techniques (température, temps de réaction) des différentes étapes d'amplification, nous avons validé les conditions techniques. Nous procédons en deux temps avec par PCR 40 cycles d'amplification, puis révélation des amplicons éventuels sur gel d'agarose. Dans chaque série sont intégrées des témoins négatif et positif (ADN de *B. hermsii* à 100fg/μL) d'amplification. Lorsque l'amplification est positive, nous adressons 20 μL d'amplifiat à 10pg/μL à la société GATC® pour séquençage.

2.1.1.2.2. Mise au point d'une technique de PCR en temps réel par Sybr Green pour la détection de *B. burgdorferi* si dans les tiques

La mise au point de cette méthode est présentée au 3.2.2 du rapport

2.1.1.2.3. Technique en développement : identification des souches de *B. burgdorferi sensu lato*

L'identification des souches de *Borrelia* repose actuellement uniquement sur des méthodes moléculaires. L'identification par spectrométrie de masse repose sur la caractérisation de protéines constitutives de l'élément biologique à tester et, pour les bactéries, sur la caractérisation de certains constituants de ses protéines ribosomiques. Une petite colonie bactérienne suffit en général comme quantité de matériel en nombre de bactéries nécessaire. Ces bactéries ne se cultivant qu'en milieu liquide et avec un faible rendement, nous avons validé en 2011 un protocole de préparation de ces bactéries pour analyse sur Maldi-TOF.

La base de données fournie par le fabricant du Maldi-TOF disponible au laboratoire (Bruker) contient actuellement près de 3500 entrées dont quelques unes seulement correspondent à une souche de *Borrelia*.

En 2012, nous avons testé le protocole de préparation que nous avons mis au point sur les souches de référence des principales espèces. Nous avons tout d'abord réalisé ≥ 20 dépôts pour la souche type de chaque espèce afin d'obtenir un bon spectre moyen de référence.

2.1.2. Collections de matériels biologiques : souches, antigènes ou immun-sérums de référence

2.1.2.1. Description, caractérisation

- Sérums en 2012**, notre collection d'immun-sérums et de LCR de référence est composée de sérums et LCR de patients atteints des différentes formes cutanées, articulaires et neurologiques de la borréliose de Lyme, sélectionnés selon les critères diagnostiques définis par la 16^{ème} conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse sur la borréliose de Lyme en 2006 (http://www.infectiologie.com/site/medias/_documents/consensus/2006-lyme-long.pdf)
 Quelques sérums correspondent à des manifestations cutanées certaines confirmées par culture et/ou PCR : EM (6), ACA (4), LB (1).
 Les profils immunologiques de ces sérums et LCR ont été confirmés par western-blot IgG et/ou IgM. Les sérums sont stockés en fractions de 0,5 ml à -30°C. Cette collection est utilisée pour des études de performance de coffrets et régulièrement renouvelée.

Tableau : Collection détaillée d'immunsérums et LCR du CNR *Borrelia* en 2012

<i>Formes cliniques</i>	<i>Sérums</i>	<i>LCR</i>
EM	137	/
NB	81	77
ACA	44	/
LCB	26	/
ART	30	/
Total	318	77
<i>Autres échantillons (étude des réactions croisées)</i>	210	45

- Souches en 2012**, nous avons enrichi notre collection de 5 souches de *B. afzelii* et nous disposons actuellement d'une collection de **113** souches humaines de 6 espèces pathogènes de *B. burgdorferi* sensu lato (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. bissettii*, *B. spielmanii* et *B. bavariensis*) :

56 sont à très faible nombre de passages *in vitro*, gage de leur virulence originelle car isolées au laboratoire.

Il s'agit de :

- 7 souches de *B. burgdorferi* sensu stricto isolées d'EM, dont 1 souche isolée d'EM multiple d'un patient ayant séjourné aux USA,
- 12 souches de *B. garinii* isolées d'EM (10 souches), de lymphocytome cutané bénin (1 souche) et de LCR d'un patient atteint de neuroborréliose (1 souche)
- 35 souches de *B. afzelii* isolées d'EM (28 souches), de lymphocytome cutané bénin (3 souches), d'acrodermatite chronique atrophifiante (4 souches)
- 2 souches actuellement non typées isolées d'EM.

Pour certaines souches, la virulence après isolement a été confirmée sur modèle murin.

57 autres souches humaines nous ont été fournies par des collègues européens ou américains. Elles ont été isolées d'EM, de lymphocytome borrélien, d'arthrite, d'ACA et de LCR de patients atteints de neuroborréliose. Après accord du détenteur initial, ces souches peuvent être fournies par notre intermédiaire.

Nous détenons également 12 souches à bas passage *in vitro* isolées de tiques, provenant de 8 espèces de *Borrelia* différentes : *B. afzelii*, *B. andersonii*, *B. bissettii*, *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. spielmanii*. Ces souches ont été isolées par des collègues européens et américains qui nous les ont gracieusement fournies.

Nous détenons également une souche de chacune des espèces suivantes de *Borrelia* responsables de fièvres récurrentes européennes et africaines :

- *B. duttonii*
- *B. crocidurae*
- *B. hermsii*

2.1.2.2. Conditions de stockage

Ces souches sont répertoriées avec leur nombre de passage de culture *in vitro* et stockées en fractions de 0,5 ml à -80°C. Elles sont disponibles dans le cadre d'études collaboratives.

2.1.2.3. Conditions de mise à disposition de ces collections - transferts réalisés au moment d'un changement de CNR

Les souches isolés par nos soins sont répertoriées avec leur nombre de passages de culture *in vitro* et stockées en fractions de 0,5 ml à -80°C. Elles sont disponibles dans le cadre d'études scientifiques après accord de transfert ou dans le cas d'études collaboratives.

Les souches qui nous ont été fournies par des collègues européens ou américains peuvent être, après accord du détenteur initial, fournies par notre intermédiaire.

Les sérums que nous avons sélectionnés en sérothèque sont disponibles pour des études collaboratives.

Aucune souche de *Borrelia* du précédent CNR n'a pu encore être transférée à Strasbourg depuis le changement de localisation du CNR. L'avis du comité scientifique des CNR a été sollicité.

2.1.3. Liste des techniques (diagnostic/identification, typage, sensibilité aux anti-infectieux...) recommandées par le CNR :

2.1.3.1. Listes existantes :

En 2012, nous avons entrepris de recenser les tests sérologiques disponibles pour la borréliose de Lyme sur le marché français. Nous avons procédé par recoupement auprès de fournisseurs, de laboratoires d'analyses médicales, de sociétés proposant des EEQ (Evaluation Externe de Qualité) pour ce paramètre en France. Nous allons essayer d'améliorer ce recensement en échangeant ces informations avec des collègues européens puis en demandant aux fabricants s'ils sont importés en France. Cela nous servira pour mettre en place des évaluations ou des ré-évaluations comparatives des différents réactifs existants.

Liste des tests de dépistage actuellement recensés en France

TESTS	FABRICANTS	DISTRIBUTEURS	ISOTYPE	MATRICE	METHODE
BORRELIA (Lyme) LISA		THERADIAG	TOTALES	sang/LCR	ELISA
BORRELIA (Burgdorferi)	MEDAC	THERADIAG	G	sang/LCR	ELISA
BORRELIA (Burgdorferi)	MEDAC	THERADIAG	M	sang/LCR	ELISA
ENZYGNOST Lyme link VlsE	SIEMENS	SIEMENS	G	sang/LCR	ELISA
ENZYGNOST Borreliosis	SIEMENS	SIEMENS	M	sang/LCR	ELISA
Borrelia Liaison	DiaSorin	DiaSorin	G	sang/LCR	ChimiL
Borrelia Liaison	DiaSorin	DiaSorin	M	sang/LCR	ChimiL
VIDAS Lyme IgG	BioMerieux	BioMerieux	G	sang/LCR	ELFA
VIDAS Lyme IgM	BioMerieux	BioMerieux	M	sang/LCR	ELFA
VIDAS Lyme IgG/M	BioMerieux	BioMerieux	TOTALES	sang/LCR	ELFA
Anticorps anti-Borrelia Select (IgG)	Euroimmun	Bioadvance	G	sang/LCR	ELISA
Anticorps anti-Borrelia Plus VlsE (IgG)	Euroimmun	Bioadvance	G	sang/LCR	ELISA
Anticorps anti-Borrelia (IgG)	Euroimmun	Bioadvance	G	sang/LCR	ELISA
Borrelia burgdorferi ELISA (souche 2591)	Virotech GmbH	INGEN	G	sang/LCR	ELISA
Borrelia burgdorferi ELISA (souche 2591)	Virotech GmbH	INGEN	M	sang/LCR	ELISA
ELISA B. afzelii IgM Europe (souche PKo)	Virotech GmbH	INGEN	M	sang/LCR	ELISA
ELISA B. afzelii+VlsE IgG Europe (souche PKo)	Virotech GmbH	INGEN	G	sang/LCR	ELISA
LYME SIGN DUO G+M	Servibio	Servibio	TOTALES	Sang (S+P)	IC
LYMETOP+	ALLDIAG	ALLDIAG	TOTALES	sang (S)	IC
Borrelia burgdorferi IgG Kit	VIRION SERION	ORGENTEC	G	sang (S+P)/LCR	ELISA
Borrelia burgdorferi IgG Kit	VIRION SERION	ORGENTEC	M	sang (S+P)/LCR	ELISA

Liste des tests western-blot/immunoblot actuellement recensés en France

TESTS	FABRICANTS	DISTRIBUTEURS	ISOTYPE	MATRICE	METHODE
Mastablot Borrelia IgG	MAST DIAGNOSTIC		G	sang	Western-blot
Mastablot Borrelia IgM	MAST DIAGNOSTIC		M	sang	Western-blot
EUROLINE-RN-AT IgG	Euroimmun	Bioadvance	G	sang	Western-blot
EUROLINE-RN-AT IgM	Euroimmun	Bioadvance	M	sang	Western-blot
EUROLINE-WB	Euroimmun	Bioadvance	G	sang	Western-blot
EUROLINE-WB	Euroimmun	Bioadvance	M	sang	Western-blot
WESTERNBLOT	Euroimmun	Bioadvance	G	sang	Western-blot
WESTERNBLOT	Euroimmun	Bioadvance	M	sang	Western-blot
WESTERNBLOT	Euroimmun	Bioadvance	G	sang	Western-blot
WESTERNBLOT	Euroimmun	Bioadvance	M	sang	Western-blot
Line Immunoblot IgG	Virotech GmbH	INGEN	G	sang/LCR	Immuno-dot
Line Immunoblot IgM	Virotech GmbH	INGEN	M	sang/LCR	Immuno-dot
Borrelia Europe plus TpN17 LINE	Virotech GmbH	INGEN	G	sang/LCR	Immuno-dot
Borrelia Europe plus TpN17 LINE	Virotech GmbH	INGEN	M	sang/LCR	Immuno-dot
ViraStripe Borrelia kit IgG		Servibio	G	sang	Immuno-dot
ViraStripe Borrelia kit IgM		Servibio	M	sang	Immuno-dot
LYMECHECK OPTIMA G	MIKROGEN	ALLDIAG	G	sang	Immuno-dot
LYMECHECK OPTIMA M	MIKROGEN	ALLDIAG	G	sang	Immuno-dot
RecomLine Dot G	MIKROGEN	DiaSorin	G	sang	Immuno-dot
RecomLine Dot M	MIKROGEN	DiaSorin	M	sang	Immuno-dot
EU Lyme + KSE Western Blot IgG	TRINITY BIOTECH	ORGENTEC	G	sang	Western-blot
LYME EU IgM	TRINITY BIOTECH	ORGENTEC	M	sang	Western-blot

2.1.3.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse : méthode, état d'avancement, principaux résultats

En 2012, nous avons évalué trois méthodes. Il s'agissait d'une part d'une méthode de typage moléculaire commerciale de *B. burgdorferi* sensu lato et d'autre part, d'expertiser les résultats discordants obtenus par deux trousse commerciales d'immunoblots. Le résumé de ces évaluations est présenté ci-dessous.

2.1.3.2.1. Evaluation préliminaire d'une méthode de typage moléculaire commercialisée (Light Cycler, Roche)

L'étude a porté sur 16 échantillons typés à l'aide de ce coffret. Ces ADN étaient extraits de 5 biopsies de peau et de 11 liquides articulaires.

Le pourcentage global de concordance des résultats de détection et de typage moléculaire par la trousse commerciale et par la méthode de typage du CNR *Borrelia* est de 43,7%, avec 20% de concordance sur les biopsies cutanées et 54,5% de concordance sur liquides articulaires.

Les typages moléculaires d'espèces obtenus par la trousse commerciale concordaient avec ceux obtenus par la méthode de typage moléculaire du CNR dans 60% des cas pour *B. afzelii* (3/5), 50% des cas pour *B. burgdorferi* sensu stricto (3/6) et 0% des cas pour *B. garinii* (0/3).

Parmi les biopsies cutanées testées (n = 5), le typage moléculaire par la trousse commerciale a détecté une majorité de *B. garinii* (3/5), 1 *B. afzelii* et 1 *B. burgdorferi* ss, alors que le CNR les a toutes identifiées *B. afzelii*.

Parmi les liquides articulaires testés (n = 11), le typage moléculaire par la trousse commerciale a détecté une majorité de *B. burgdorferi* ss (5/11) et de *B. afzelii* (4/11), 1 était non typable et 1 prélèvement était négatif. Le CNR a confirmé la négativité de ce dernier et a identifié *B. afzelii* dans le liquide articulaire non typable par la trousse commerciale.

Concernant les échantillons typés par le kit commercial comme des *B. burgdorferi* ss, nous avons confirmé cette identification dans 60% des cas (3/5), les 2 autres étant en fait des *B. afzelii*

Parmi les échantillons typés par le kit commercial comme *B. afzelii*, nous avons confirmé cette identification dans 50% des cas (2/4), les 2 autres étant en fait des *B. garinii*.

Conclusion : que ce soit dans les biopsies cutanées ou les liquides articulaires, nous avons observé des discordances entre les deux méthodes.

2.1.3.2.2. Evaluation de deux tests d'immuno-empreinte Lymecheck® (Alldiag) et Euroline-WB® (Bioadvance)

Test d'immuno-empreinte LYMECHECK OPTIMA IgG & IgM₁₊₂

Ce test est un immunoblot développé par Mikrogen® et distribué en France par deux sociétés Alldiag® et Diasorin®. Il est basé sur des antigènes recombinants (p100, VlsE, p58, p41, p39, OspA, OspC et p18) de 5 espèces de *Borrelia* (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii* et *B. bavariensis*).

Test d'immuno-empreinte Euroimmun®

Ce test est un Western-Blot développé par Euroimmun® et distribué en France par Bioadvance®. La source d'antigène utilisée est la souche pKo de l'espèce *Borrelia afzelii*. Les bandes d'intérêt sont : 17, 19, 21, 25, 30, 31, 39, 83 kDa et une protéine recombinante de la VlsE.

Résultats

Au total, 186 échantillons de routine ont été analysés dont 168 exploitables (résultats pour les deux coffrets). 148 échantillons donnaient des résultats similaires (87% de corrélation).

20 échantillons étaient discordants (ci-joint tableau).

	Bioadvance (-)	Bioadvance (+)
Alldiag (-)	/	10
Alldiag (+)	10	/

On observe une dispersion symétrique entre les deux tests ; 10 échantillons sont positifs en bioadvance et négatifs en Alldiag et inversement.

Parmi ces 20 échantillons discordants, 17 ont été testés par le Western-Blot du CNR *Borrelia* dont les 15 échantillons discordants en IgG, les trois autres échantillons étaient de volume insuffisant et n'ont pu être expertisés. Parmi les 8 échantillons positifs uniquement par le test Alldiag seulement 2 ont été trouvés positifs par le Western-Blot IBS6. Parmi les 7 échantillons positifs uniquement par le test Bioadvance, 3 ont été trouvés positifs par le Western-Blot IBS6.

Il n'y a pas de différence significative entre les deux trousse commerciales (Bioadvance et Alldiag). L'expertise des résultats discordants entre ces 2 trousse par le CNR *Borrelia*, objective près de 60% de résultats confirmés par excès par les 2 réactifs commerciaux testés. Ces résultats témoignent de la nécessité du CNR d'évaluer la qualité des réactifs commerciaux d'immuno-empreinte et notamment d'en déterminer leurs limites.

2.1.3.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Destinataire : Dr Hadou TAAR, PH CHU de Nancy, responsable du secteur sérologie

Méthode transférée : protocole de la détermination de la synthèse intrathécale spécifique d'anticorps anti *B. burgdorferi* sI dans le LCR lors de la neuroborréliose.

2.2 Activités d'expertise de l'année 2012 du CNR des *Borrelia* (Laboratoire de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

En 2012, 10 376 prélèvements ont été adressés au CNR *Borrelia* pour analyses sérologiques. Parmi ces demandes, 459 (4,4%) ont été analysées à titre gratuit car elles étaient accompagnées d'une fiche de renseignements cliniques et/ou épidémiologiques. Ce recueil de fiches de renseignements entre dans le cadre de nos activités de surveillance des cas humains de borréliose de Lyme analysés plus loin. En l'absence de cette fiche, l'analyse est réalisée et facturée par le CHU de Strasbourg.

2.2.1. Sérologies sanguines *B. burgdorferi* sI réalisées en 2012

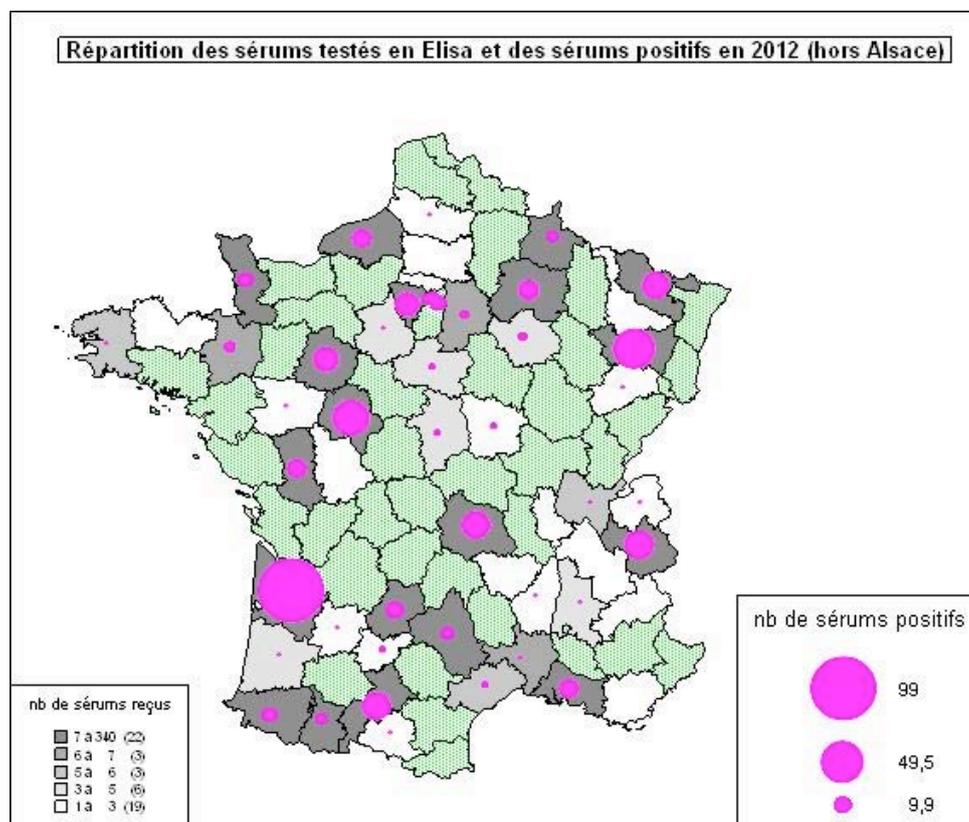
2.2.1.1. Sérologies de dépistage par ELISA :

En 2012, 7803 analyses sur 6138 sérums, 1655 LCR et 10 liquides articulaires nous ont été adressés. Ils provenaient de 56 départements répartis sur le territoire national.

Origine géographique (hors Alsace) des résultats positifs pour les sérologies de dépistage adressées au CNR des *Borrelia* en 2012

Hors Alsace, les demandes émanaient de 54 départements et représentaient 1834 analyses. La provenance des 1251 sérums testés en 2012 est représentée sur la carte ci-dessous. Elle objective les départements demandeurs et le nombre de sérums positifs en sérologie de dépistage ELISA.

Les départements en vert ne nous ont adressé aucune demande, excepté les deux départements alsaciens dont les demandes ont été exclues volontairement car elles sont analysées par la suite dans un paragraphe dédié.



Ces demandes nationales concernaient :

- 1251 sérums dont 450 (40%) étaient positifs ;
- 579 LCR dont 157 (27%) étaient positifs ;
- 4 liquides articulaires dont 1 (25%) était positif ;

Au total, 608 (33%) des prélèvements étaient positifs en ELISA. La spécificité de ces résultats a été confirmée par immuno-empreinte, conformément aux recommandations nationales et européennes.

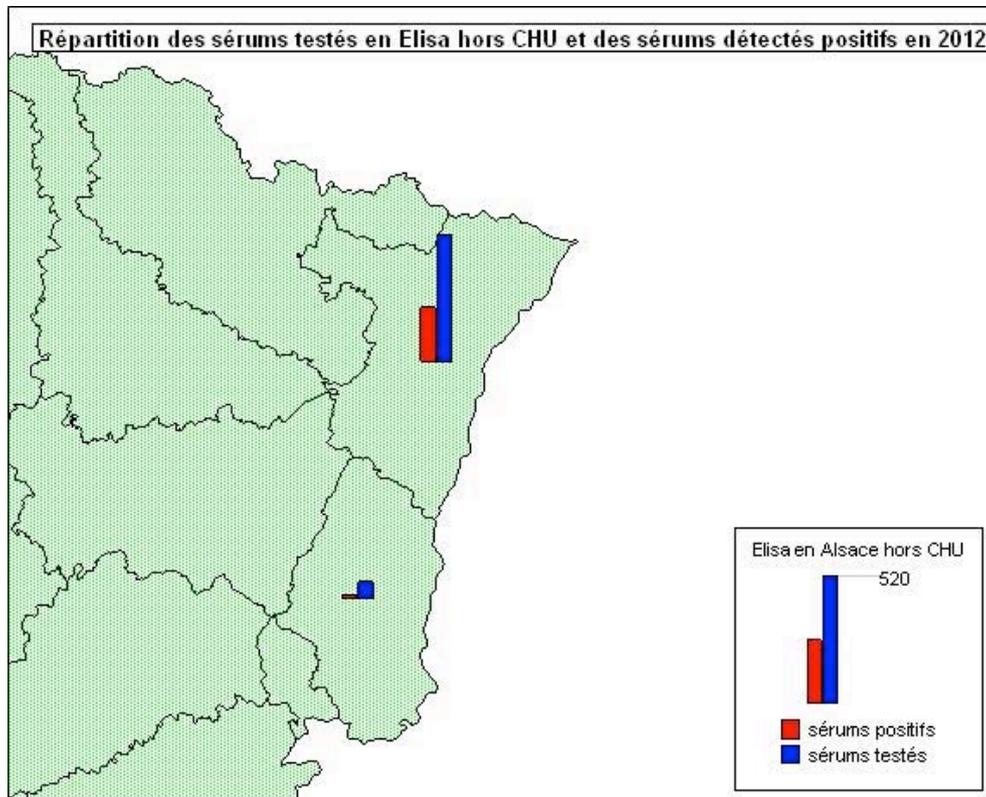
Répartition des sérums testés et des résultats positifs pour les sérologies de dépistage en ELISA adressées en Alsace au CNR des *Borrelia* en 2012

En Alsace, zone d'endémie de la borreliose de Lyme, en 2012 les demandes représentaient 5969 analyses dont 5224 (87,5%) venant du CHU de Strasbourg et 745 (12,5%) hors CHU. L'analyse de la nature de l'échantillon biologique adressé (sérum, LCR et liquide articulaire) montre que les proportions des différentes demandes étaient superposables entre le CHU de Strasbourg et les demandes hors CHU, : nous avons reçu près de 80% de sérums et 20% de LCR.

Les demandes d'Alsace hors CHU (carte ci-dessous) étaient réparties de la façon suivante :

- 595 sérums dont 249 (42%) positifs ;
- 148 LCR dont 37 (25%) positifs ;
- 2 liquides articulaires dont 1 positif.

Sur ces 745 demandes, 287 (38,5%) étaient positives en ELISA. La spécificité de ces résultats a été confirmée, conformément aux recommandations, par immuno-empreinte.



Au total, que ce soit en France hors région Alsace ou en Alsace hors CHU de Strasbourg, la proportion de dépistage positif en ELISA des prélèvements qui nous ont été adressés est similaire, respectivement de 38,5% et de 33%.

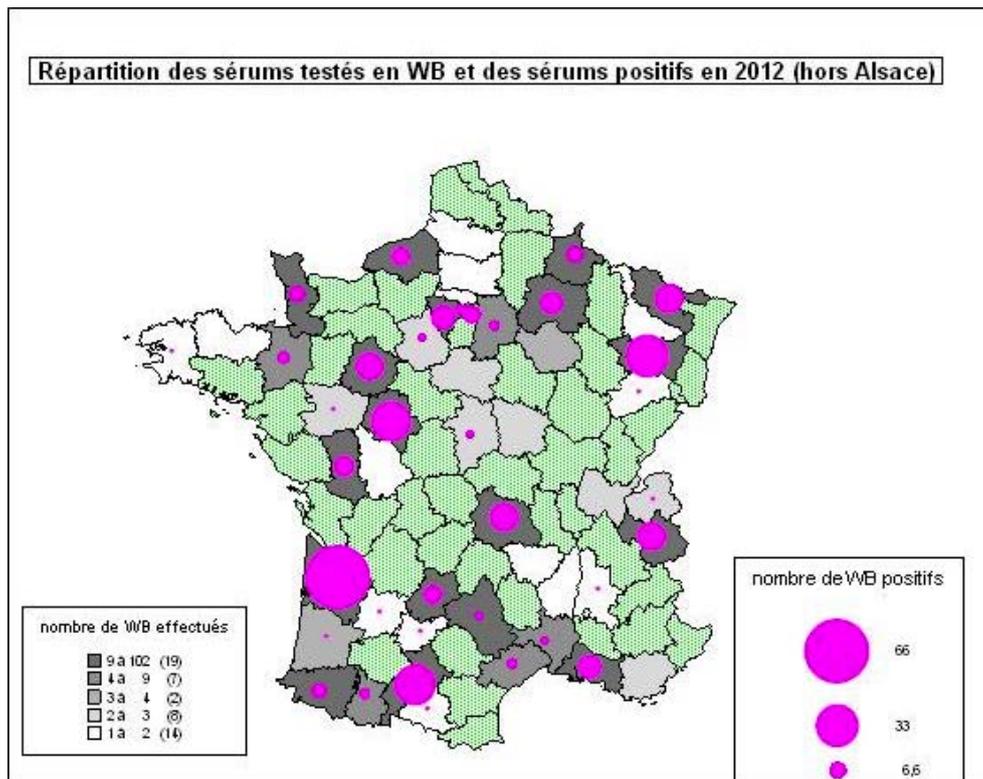
2.2.1.2. Sérologies de confirmation par western-blot (immuno-empreinte)

En 2012, nous avons réalisé 2334 confirmations par western-blot (WB) sur 1955 sérums, 376 LCR et 3 liquides articulaires. Sur ces 2334 analyses, 1088 étaient positives par western blot, soit 58%. Par conséquent, 42% des sérums initialement détectés positifs ou douteux en dépistage ELISA étaient de faux positifs. Ce taux élevé de réactions croisées en pratique courante objective l'importance de l'analyse de confirmation par immuno-empreinte avant de conclure à la positivité de la sérologie de Lyme.

Répartition des sérums testés en WB et des résultats positifs pour les sérologies de confirmation adressées au CNR des Borrelia en 2012 en France (hors région Alsace)

Les demandes de confirmation sérologique provenaient de 53 départements français répartis sur le territoire national. Les demandes en France hors Alsace (51 départements) représentaient 809 analyses. Sur la carte ci-dessous représentant le nombre de demandes par département et le nombre de western blot positifs en sérologie de confirmation par immuno-empreinte, les départements en vert ne nous ont adressé aucune demande,

excepté les deux départements alsaciens dont les demandes ont été exclues volontairement car elles sont analysées par la suite dans un paragraphe dédié.



Ces demandes nationales (hors Alsace) concernaient :

- **611** sérums dont 349 (57%) positifs
- **196** LCR dont 142 (72%) positifs
- **2** liquides articulaires détectés positifs

En moyenne, la spécificité des anticorps a bien été confirmée par western blot pour 61% des prélèvements initialement dépistés positifs en ELISA.

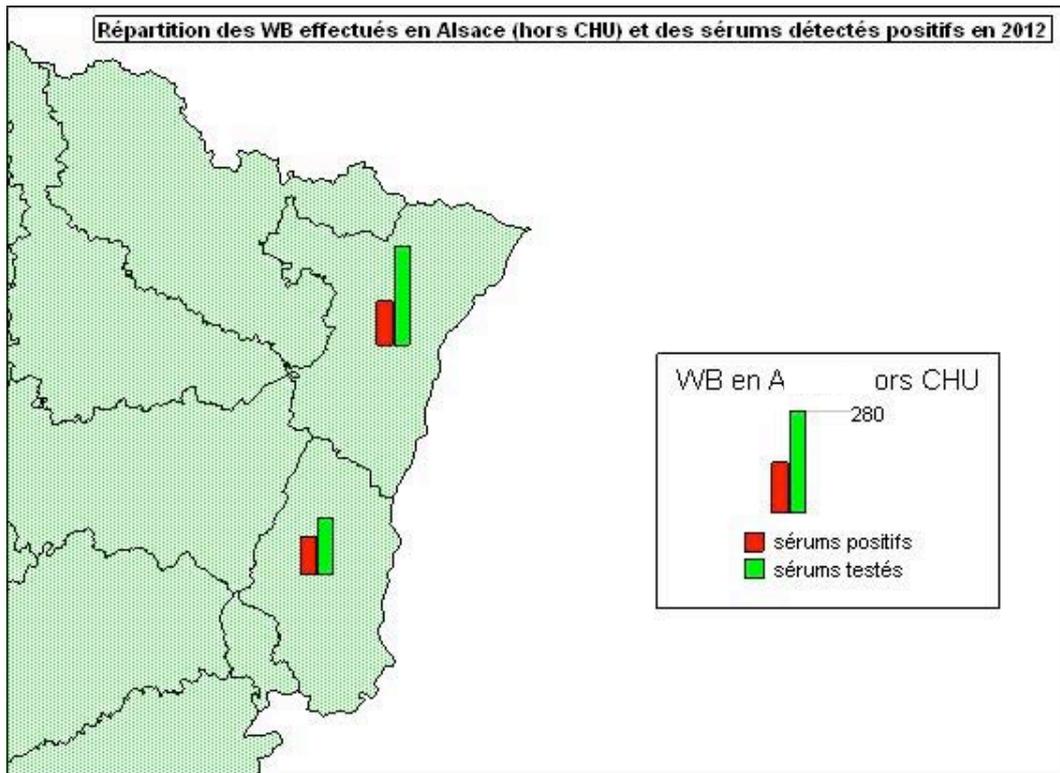
Répartition des sérums testés en WB en Alsace, hors CHU et des résultats positifs pour les sérologies de confirmation adressées CNR des Borrelia en 2012

Cette année, en Alsace, 1525 western-blot ont été réalisés par notre laboratoire. Parmi ces analyses, 867 (64,5%) étaient positives. Selon la nature du prélèvement, les demandes étaient réparties de la manière suivante :

- **1344** sérums dont 739 (55%) positifs
- **180** LCR dont 127 (70%) positifs
- **1** liquide articulaire détecté positif.

Les demandes du CHU de Strasbourg étaient majoritaires, elles représentaient 1017 analyses (66%). Les demandes hors CHU ont généré 508 analyses (33%).

La spécificité des anticorps a été confirmée par western blot pour 57% des prélèvements initialement dépistés positifs en ELISA. La carte ci-dessous représente la répartition géographique du nombre de WB réalisés pour l'Alsace et la proportion des positifs.



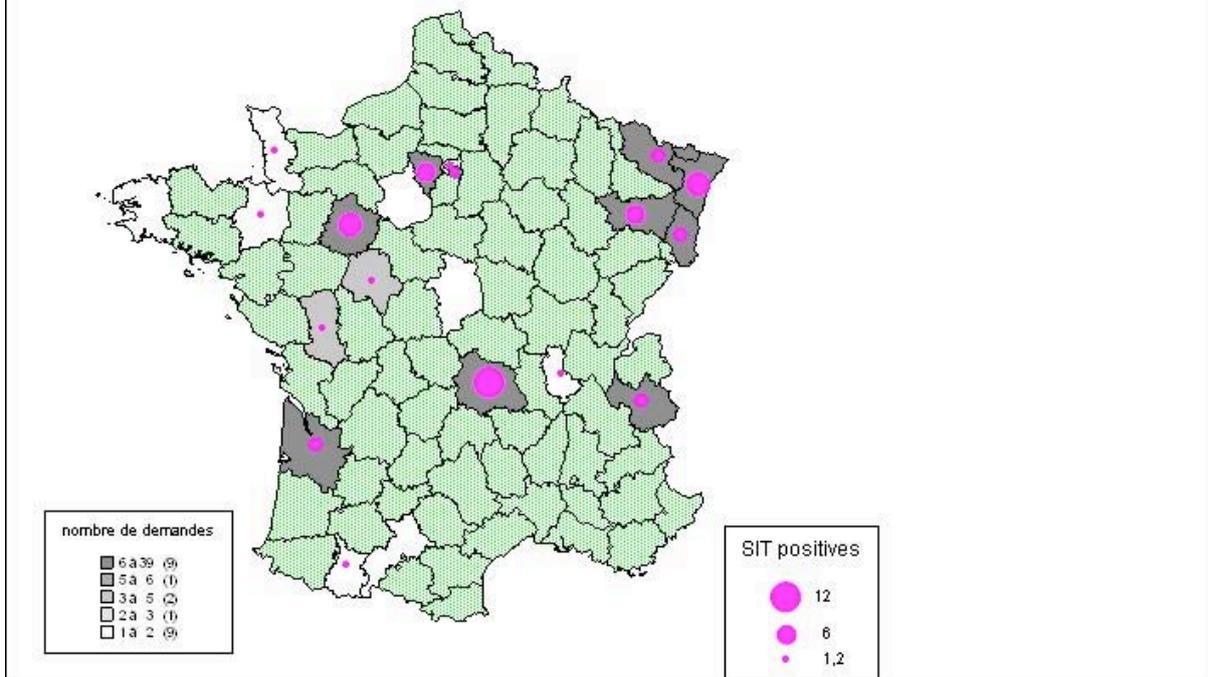
2.2.2. Etude de la synthèse intrathécale spécifique anti *B. burgdorferi* sensu lato

Les neuroborrélioses représentent en France comme dans toute l'Europe, la forme disséminée la plus fréquente de la borréliose de Lyme. La mise en évidence d'une synthèse intrathécale (SIT) spécifique d'anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* sensu lato fait ainsi partie en Europe (à la différence des USA) des critères diagnostiques pour poser le diagnostic d'une neuroborréliose.

Dans le cadre de nos conseils aux professionnels de santé, nous avons continué à diffuser 2012 auprès des cliniciens et des biologistes, l'intérêt de cet outil pour le diagnostic des neuroborrélioses et à expliquer aux collègues biologistes libéraux ou hospitaliers le protocole pratique pour réaliser l'analyse.

Au total 239 demandes d'analyse de ce type nous ont été adressées de 17 départements. Les cliniciens du CHU de Strasbourg en ont prescrit 69 et 170 autres nous ont été adressées par différents laboratoires (principalement de CH et de CHU). Globalement, le nombre de demandes extérieures au CHU de Strasbourg s'est maintenu au même niveau qu'en 2011.

Nombre de synthèses intrathécales déterminées (SIT) et nombre de SIT positives en 2012 (hors CHU)

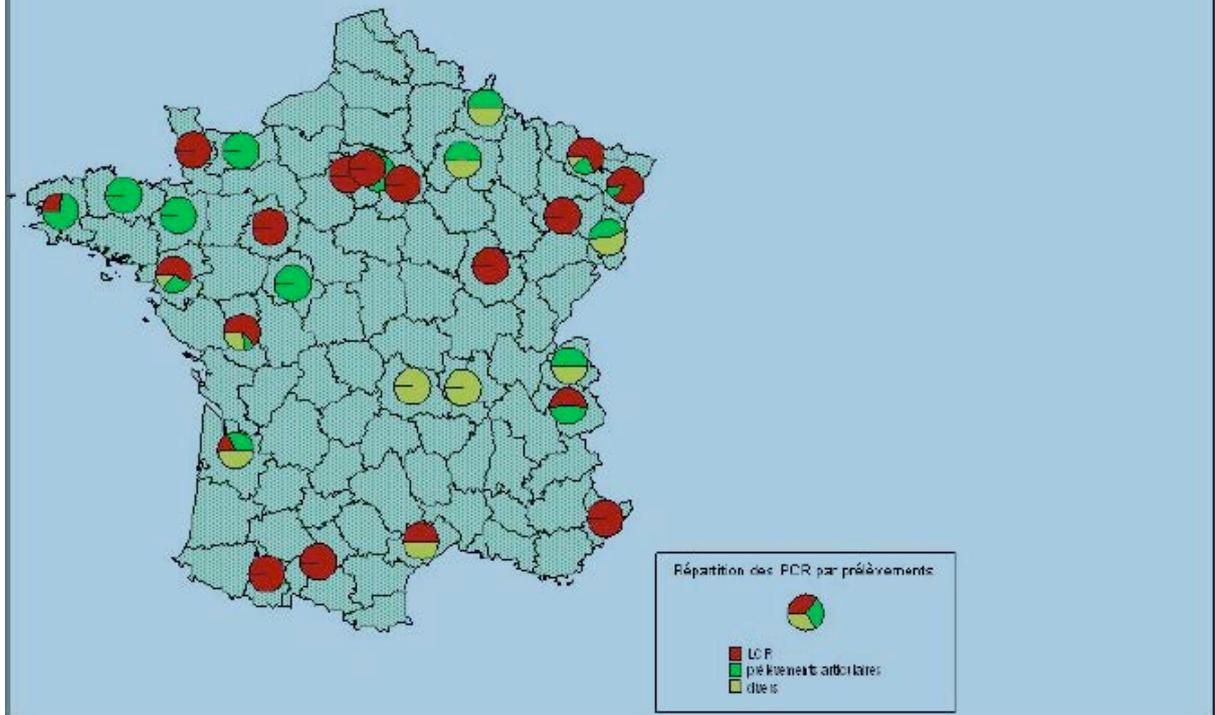


Le nombre d'analyses positives était de 74 soit 31% permettant d'affirmer dans ce cas le diagnostic de neuroborréliose. Inversement, dans 69 % des cas où la sérologie était positive dans le LCR sans détection de synthèse intrathécale spécifique, ce test a permis d'éliminer ce diagnostic.

2.2.3. Activité d'expertise PCR du CNR *Borrelia* en 2012

En 2012, 109 prélèvements provenant de 29 départements (dont un DOM) ont été adressés au CNR pour recherche de *Borrelia* par PCR (carte ci-dessous). Ce nombre de demande a augmenté de 17% par rapport à l'année précédente.

Répartition des analyses PCR effectuées en fonction de l'origine géographique et la nature du prélèvement en 2012 (hors CHU)



2.2.3.1. Expertise de prélèvements humains pour le diagnostic de borréliose de Lyme

Parmi les prélèvements reçus, on comptait 52 LCR, 34 prélèvements articulaires et 23 prélèvements divers (biopsies cutanée, valve mitrale, biopsie myocardique, biopsie hépatique, biopsie de fascia, humeur aqueuse, biopsie ganglionnaire).

Ainsi, près de 48% des prélèvements adressés étaient des LCR mais un seul était positif (1,9%). Ce très faible pourcentage de positivité souligne : la difficulté diagnostique des neuroborrélioses en raison du manque de spécificité des signes cliniques, le manque de sensibilité de la recherche directe de *Borrelia* par PCR dans le LCR et la connaissance insuffisante des prescripteurs des examens complémentaires à réaliser en cas de suspicion de neuroborréliose (synthèse intrathécale et non recherche d'ADN par PCR).

Parmi les prélèvements articulaires reçus (n = 34), 6 étaient positifs (17,6%) : 2 à *B. burgdorferi sensu stricto* 2 à *B. burgdorferi afzelii*, et 2 à *B. garinii*.

Parmi les 23 prélèvements divers, une seule biopsie cutanée était positive (4,3%). Il s'agissait d'une ACA due à *B. afzelii*.

Répartition des espèces de *Borrelia* détectées en PCR en 2012 selon la nature des prélèvements

Espèce de <i>Borrelia</i>	Prélèvements articulaires	LCR	Divers	Total
<i>B. afzelii</i>	2 (liquide synovial)	0	1 (ACA)	3
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	2 (liquide synovial)	0	0	2
<i>B. garinii</i>	2 (liquide synovial)	0	0	2
<i>B. burgdorferi</i> <i>sl non typable</i>	0	1	0	1

2.2.3.2. Expertise de prélèvements humains pour le diagnostic de fièvres récurrentes

En 2012, nous avons réceptionné 9 demandes d'analyses pour suspicion de fièvre récurrente. Parmi les patients, on comptait un enfant de 4 ans et 8 adultes (7 hommes et une femme) âgés de 22 à 76 ans. Tous ces patients présentaient une fièvre après retour d'Afrique (Sénégal, Niger, Burkina Faso, Nouvelle Guinée).

Dans la majorité des cas, il s'agissait du premier épisode fébrile et les patients avaient consulté aux urgences des différents CH (Paris Pitié-Salpêtrière, Nantes, Rennes, St Briec, La Rochelle, Beauvais, Abbeville) pour suspicion de paludisme. Dans un seul cas, le patient relatait 3 accès fébriles hebdomadaires durant 72 heures.

Sur les 9 demandes d'analyses, 2 étaient positives, il s'agissait de *B. crocidurae* dans les deux cas. Ces deux demandes avaient été secondairement orientées vers le CNR car sur le frottis sanguin coloré au MGG pour la recherche de *Plasmodium*, le biologiste du CH demandeur avait visualisé des *Borrelia*. Ces 2 cas ont été pris en charge précocément et dans ces deux cas il n'était pas relaté de récurrences fébriles après antibiothérapie.

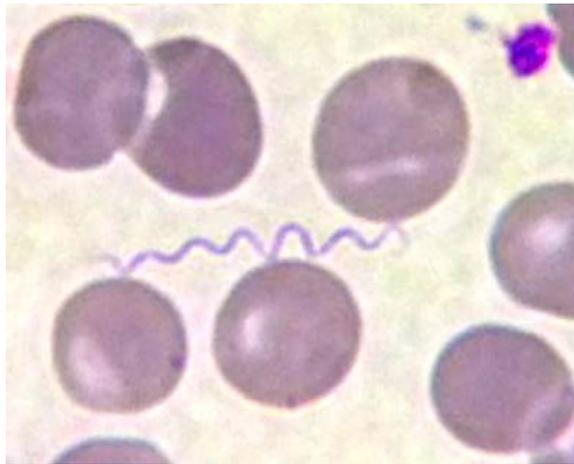


Image de *Borrelia crocidurae* de fièvre récurrente
(photo du Dr. Nicolas Desjardins, CH d'Abbeville)

2.2.4. Envois extérieurs de matériel biologique par le CNR *Borrelia*

En 2012 le CNR *Borrelia* a procédé à plusieurs envois extérieurs. Ces envois de matériels biologiques (ADN et/ou culots bactériens de *B. burgdorferi* sensu lato, sera de patients infectés) ont été réalisés sur demande des destinataires dans le cadre de projets de recherche sur la maladie de Lyme, de mise au point de protocoles de détection d'amplification et de typage de *B. burgdorferi* sensu lato, de détection d'autres pathogènes transmis par les tiques dans des sera de travailleurs forestiers ou de sujets possédant des anticorps anti-*B. burgdorferi* sensu lato.

Date d'envoi	Matériel biologique	<i>B. burgdorferi</i> sensu lato (souche)	Transmis à	Raison	Destination
21/05/12	ADN	<i>B. lusitaniae</i> (Poti B2)	Drs Kilbride and Biek	Projet de recherche sur l'écologie de la maladie de Lyme	Institute of biodiversity, animal health and comparative, University of Glasgow
20/08/12	ADN	<i>B. afzelii</i> (VS461 et 1895/97) <i>B. garinii</i> (20047) <i>B. lusitaniae</i> (Poti B2) <i>B. valaisiana</i> (VS116) <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (B31)	Dr Karen Mc Coy	Protocole de détection/amplification	MIVEGEC, CNRS/IRD, Montpellier
14/11/12	ADN, culots bactériens	<i>B. afzelii</i> (IBS 42) <i>B. garinii</i> (IBS 18)	Dr Vourc'h	Témoin de typage	INRA, Clermont Ferrand
4/07/12	Sera	45 sera de forestiers	Dr Almeras	Recherche d'autres pathogènes	CNRS-URMITE <i>Rickettsia</i> , Marseille
13/11/12	Sera	18 sera positifs en anticorps ant-Borrelia burgdorferi sensu lato	Pr Raoult	Recherche d'autres pathogènes	CNRS-URMITE <i>Rickettsia</i> , Marseille
fev., Juil. Oct. /2012	Culots bactériens	<i>B. garinii</i> (Pbi, cPBi/?) <i>B. afzelii</i> (163/98) <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (297, c279/4)	Gilles Schnell	Projet de recherche protéomique Borrelia	IPHC-ECPM Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique Strasbourg
2/11/12	Tubes Vacutainer®	/	Dr Le Bohec	Prélèvement de poussins manchots royaux	Laboratoire Européen Associé 'BioSenib', Monaco

3. Activités de surveillance

3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à *Borrelia burgdorferi* sensu lato et autres pathogènes transmis par *Ixodes ricinus* par le CNR (Laboratoire de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

Le Centre National de Référence (CNR) des *Borrelia* centralise tout au long de l'année des données provenant de différents axes de surveillance. Il s'agit :

- de la **surveillance nationale des cas de suspicion de borréliose de Lyme**, via des fiches de renseignements cliniques qui accompagnent les demandes d'analyses qui nous sont adressées par des médecins cliniciens répartis sur le territoire national

- de la **surveillance de la diversité des souches pathogènes humaines** réalisée via un **Projet de Recherche Interne « biopsies cutanées »** démarré lors du mandat précédent
- de la **surveillance régionale des cas d'anaplasmose granulocytaire humaine** dans la région Est, via un **PHRC régional** réalisé entre 2010 et 2012 en tant qu'investigateur principal.

Les données ci-dessous rendent compte et synthétisent ces activités en 2012, en insistant sur les différentes catégories cliniques recensées durant cette année.

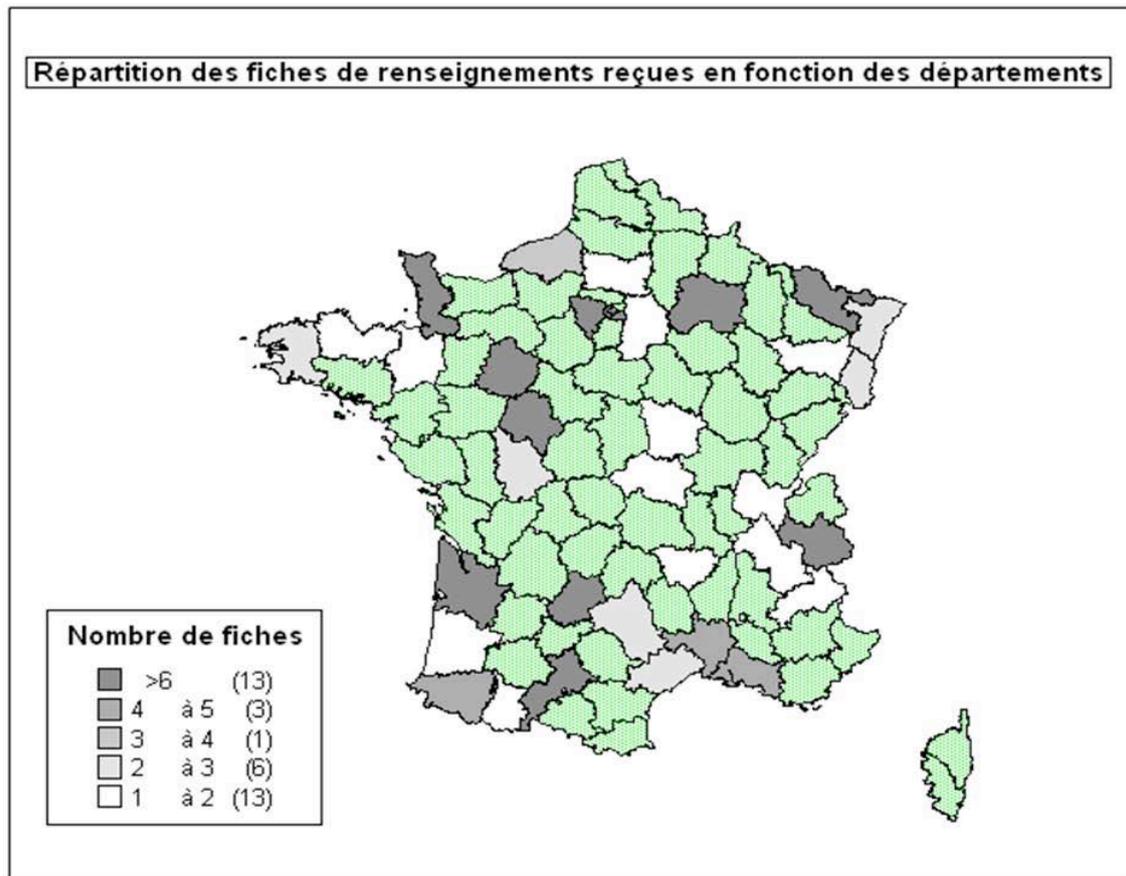
3.1.1. Surveillance nationale des cas de suspicion de borréliose de Lyme

L'objectif pour cette surveillance a été d'analyser les fiches de renseignements recensées durant l'année 2012 afin de fournir des informations sur les différents items de ces fiches (âge, sexe, facteur(s) de risque(s), clinique, ...).

Les données analysées ont été préalablement réunies dans un fichier Excel contenant la retranscription manuelle des fiches de renseignements 2012 du CNR des *Borrelia*, les résultats biologiques issus du serveur de résultats d'analyses « Glims ». Chaque cas a été classé en différentes catégories cliniques en fonction des critères diagnostiques de l'EUCALB (European Concerted Action on Lyme Borreliosis).

Les résultats montrent que durant l'année 2012, 458 fiches de renseignements ont été recensées contre 284 en 2011 (+60%). Cette augmentation du nombre de dossiers est principalement due au regroupement du CNR dans la totalité de ces activités à Strasbourg en 2012. Parmi ces fiches, 4,8% (22 sur 458) ont été mal remplies voire inexploitable (5% en 2011).

Ces fiches avaient la provenance géographique suivante :



3.1.2. Surveillance des manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France : « protocole biopsies cutanées » - Etude de la diversité des espèces de Borrelia dans les manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France

Pendant l'année 2012, nous avons ainsi reçu 49 prélèvements. Ces biopsies nous ont été adressées par 27 participants différents de 16 départements différents. Parmi les 27 participants qui nous ont adressés au moins un prélèvement, 17 nous ont adressé 1 seule biopsie cutané et 10 nous ont adressé de 2 à 5 biopsies dans l'année.

Prélèvements reçus en 2012

Nous avons ainsi reçu 49 prélèvements. Ces biopsies nous ont été adressées par 16 centres de consultation sur les 37 départements participants volontaires

Parmi les 49 prélèvements qui nous ont été adressés, 27 (55%) l'ont été pour suspicion d'EM, 12 (24%) pour suspicion d'ACA et 5 (10%) pour suspicion de lymphocytome cutané bénin. Dans 10 cas (20%), les lésions étaient très atypiques (syndrome sclérodermique diffus, morphee, lésion arciforme, fasciite, dermatophytose, papule érythémateuse, érythème télangiectasique, placard érythémateux réticulé infiltré, sclérose cutanée, granulome annulaire). Deux PCR ont été positives.

Les échantillons positifs viennent plus fréquemment du Nord de la France (Bretagne, Ile de France, Alsace, Lorraine). Dans le Sud, le pourcentage de biopsies positives est plus faible. La PCR est de sensibilité \geq à celle de la culture.

Analyse des suspicions d'EM (n= 27)

Lésion	Nb de biopsies revues(%)	Nb de biopsies positives (%)	PCR positive	Culture positive	Espèce
Erythème Migrant (EM) (%)	27 (100%)	9 (33%)	9 (33%)	5 (19%)	9 <i>B.afzelii</i>
EM unique	22 (81%)				
EM multiple	5 (19%)				
<u>Localisation :</u>					
Membre inf.	13 (48%)				
Thorax/abdomen	4 (15%)				
Membre sup.	4 (15%)				
Tête/cou	1 (4%)				
<u>Aspect typique du centre de la lésion (EM et EMM) :</u>					
Clair	15 (56%)				
Coloration homogène	7 (26%)				
<u>Diamètre :</u>					
5-10cm	9 (33%)				
11-20 cm	10 (37%)				
21-30cm	6 (22%)				
Supérieur à 30 cm	2 (7%)				
<u>Signes locaux :</u>					
Prurit	7 (26%)				
Brûlure	4 (15%)				
<u>Dissémination précoce :</u>					
Association					
Douleurs/ paresthésies	2 (7%)				
Signes généraux arthralgies	2 (7%)				
	2 (7%)				

Le délai d'apparition des lésions pour les EM était rapporté dans 8 cas seulement (30%) et il variait de 1 à 25 jours. L'EM est une lésion indolore, le diagnostic est donc souvent tardif. Les signes associés n'excédaient pas 30 % des cas. Un prurit était rapporté dans 7 cas (26%), des sensations de brûlures dans 4 cas (15%), des douleurs dans 5 cas (19%) et des paresthésies dans 4 cas (15%). L'association douleurs/paresthésie était présente dans deux cas soit 7% des cas, il y avait deux cas d'arthralgies (7%). On note un cas d'asthénie et un autre d'état fébrile.

Toutes les biopsies positives ont été typées comme *B. afzelii*.

Analyse des suspicions d'acrodermatite chronique atrophiante

Au sein des prélèvements d'ACA positifs, 2 étaient dus à *B. afzelii* et un cas à *B.burgdorferi* ss, espèce impliquée dans 3% des ACA en Europe. Dans 10 cas (83%), les lésions étaient localisées sur les membres inférieurs, dans un cas au niveau des mains et avant-bras, et enfin, un cas au niveau de l'avant-bras et de la jambe.

Parmi les suspicions d'ACA, dans 4 cas (33%) il y avait des manifestations articulaires associées dans 4 cas (2 arthralgies, une oligo-arthrite, et une polyarthrite) et dans un cas des manifestations neurologiques (troubles cognitifs).

Analyse des suspicions de lymphocytome borrélien

En 2012, 5 prélèvements sur 49 (10%) étaient des suspicions de lymphocytome borrélien. Deux cas avaient une localisation au niveau des membres supérieurs, un cas au niveau sous-mammaire et un cas à l'oreille, joue et prépuce (lésions multiples) et un cas de localisation non précisée. Aucun cas n'était associé à un EM ou à une ACA. Parmi ces 5 cas, aucun ne s'est révélé positif en culture ou par PCR. Un cas avait été préalablement traité par une cycline et 4 cas ont bénéficié d'une antibiothérapie (cyclines et un cas par amoxicilline). Le délai entre l'apparition de la lésion et la consultation médicale variait de 5 mois à deux ans.

Caractéristiques des lésions ayant fait l'objet de biopsies en 2012

Années	2009		2010		2011		2012	
	nb de biopsies	nb de + (%)	nb de biopsies	nb de + (%)	nb de biopsies	nb de + (%)	nb de biopsies	nb de + (%)
EM	67	29 pos (43%)	37	9 pos (24%)	44	16 pos (36%)	27	9 pos (33%)
Lymphocytome	9	2 pos (22%)	10	0 pos (0%)	6	2 pos (33%)	5	0 pos (0%)
ACA	16	5 pos (31%)	16	0 pos (0%)	10	7 pos (70%)	12	3 pos (11%)
Lésions atypique:	6	0 pos (0%)	18	0 pos (0%)	10	0 pos (0%)	10	0 pos (0%)

Espèces de *Borrelia* détectées (2009-2012)

La répartition des espèces identifiées au sein des prélèvements positifs (cf Tableau ci-dessous) confirme la présence en France des trois espèces de *Borrelia* les plus fréquemment incriminées dans les borrélioses de Lyme en Europe, avec une nette prédominance de l'espèce *B. afzelii*.

Espèces de <i>Borrelia</i>	2009	2010	2011	2012
<i>B.afzelii</i>	28	6	19	12
<i>B.garinii</i>	4	2	3	0
<i>B.burgdorferi ss</i>	2	1	1	1
<i>Borrelia non typées</i>	2	0	2	0

3.1.3. Surveillance de l'anaplasmose granulocytaire humaine et des co-infections *Anaplasma* avec *Borrelia burgdorferi* sensu lato et d'autres pathogènes transmis par les tiques.

Les demandes représentaient de 5 à 10 patients par semaine en période d'activité des tiques, d'avril à octobre. Au total, 227 analyses par PCR ont ainsi été réalisées sur plasma de patients présentant une fièvre > 38,5°C en période estivo-automnale.

Le taux de positifs certains s'élève à près de 8% (18 cas). Parmi ces cas, dont l'analyse par PCR révélait la présence d'*A. phagocytophilum* dans le sang, moins de 30% avaient une sérologie spécifique positive soit initiale soit à distance. L'anaplasmose granulocytaire humaine au moins dans l'Est de la France, et doit être évoquée devant tout syndrome fébrile

estival. Son diagnostic repose sur la mise en évidence directe du pathogène dans le sang par biologie moléculaire et non sur la sérologie.

3.2. Surveillance du vecteur *Ixodes ricinus* par le CNR en Alsace

De 2001 à 2003, une enquête épidémiologique avait révélé que l'Alsace avait la plus forte incidence de borréliose de Lyme en France avec 200 000 cas pour 100 000 habitants (Chapuis et coll., BEH 2010). Lors de cette étude, les vallées vosgiennes de Schirmeck, Sainte-Marie aux Mines, Munster et Guebwiller avaient été identifiées comme étant parmi les zones les plus à risque en Alsace pour la borréliose de Lyme.

Suite à cette étude humaine, une collecte des tiques *Ixodes ricinus* vectrices de *Borrelia* avait été réalisée en 2003 et 2004 dans trois cantons du Haut-Rhin : Guebwiller et Munster sélectionnés pour leur forte incidence et le canton de Dannemarie pour sa faible incidence (Ferquel et coll., 2006).

Dans cette mission quinquennale (2012-2016) du nouveau CNR *Borrelia*, nous avons décidé de réétudier la répartition de ce vecteur en Alsace afin notamment d'essayer de répondre aux questions suivantes :

- Y a-t-il eu évolution de la densité de tiques en Alsace ?
- Y a-t-il eu évolution du taux de tiques infectées en Alsace ?
- Quelle est la variation de la densité de tiques et du taux de tiques infectées durant une année sur un même site géographique ?
- La densité de tiques et du taux de tiques infectées sur une année est-elle la même dans différents biotopes d'une même région ?
- Quels paramètres peuvent être corrélés à ces éventuelles variations : biotope, faune sauvage, température, hygrométrie par exemple

En 2012, nous avons collecté des tiques dans différents points d'Alsace afin d'étudier les 3 premières questions et de mettre en place de nouvelles approches méthodologiques.

3.2.1. Choix des sites et méthodes de collecte

Les sites ont été choisis en fonction de leur localisation géographique, de l'activité humaine qui s'y déroule ou selon des données bibliographiques mentionnant l'intérêt du site pour la surveillance vectorielle. Nous avons ainsi sélectionné 18 sites différents à travers l'Alsace, afin de définir des zones à risque en fonction des biotopes (zone de plaine et zone d'altitude) et en fonction de l'activité humaine (zone de loisir, zone de travail forestier, zone périurbaine). En effet, un travail récent a analysé le risque vectoriel en fonction de l'activité humaine [1] et cette approche nous semble plus pertinente qu'un échantillonnage au hasard pour définir les zones à risque pour la population en fonction de ses activités (loisirs, travail). Nous avons aussi prélevé dans les cantons de Guebwiller et de Munster car ce sont les 2 cantons les plus endémiques pour la borréliose de Lyme selon des données disponibles de 2006.

Chaque endroit de collecte a aussi été déterminé en fonction de la fréquentation humaine. Ainsi, nous avons ajusté notre endroit de collecte sur une zone avec une forte probabilité de passage humain. Cela pouvait correspondre par exemple à un chemin fréquenté, à un parcours de santé.

3.2.1.2. Description des sites investigués en 2012

N°	Lieu	Activité humaine
1	Andlau	zone de travail forestier
2	Niedermunster	zone de loisirs
3	Forêt Illkirch	zone péri-urbaine
4	Forêt Neuhof	zone de loisirs péri-urbaine
5	Forêt château de Pourtalès	zone de loisirs péri-urbaine
6	Forêt Epfig	zone de loisirs
7	Moenkalb	zone de loisirs
8a	Munster	zone de travail forestier
8b	Munster	zone de loisirs
8c	Munster	zone de loisir et de travail forestier
8d	Munster	zone de loisirs et de travail forestier
8e	Munster	zone de loisirs et de travail forestier
8f	Munster	zone de loisirs et de travail forestier
8g	Munster	zone de loisirs et de travail forestier
8h	Munster	zone de loisirs et de travail forestier
9	Howald	zone de loisirs
10	Hungersberg	zone de travail forestier
11	Daubensand	zone de loisirs
12	Rosheim	zone de travail forestier

N°	Lieu	Activité humaine
13	Petite Camargue Alsacienne	zone de loisirs
14	Forêt de la Hardt	zone de loisirs
15a	Vallée de Thann	zone péri-urbaine
15b	Vallée de Thann	zone forestière
16a	Markstein	zone forestière
16b	Markstein	zone forestière
16c	Markstein	zone forestière
16d	Markstein	zone de loisirs
16e	Markstein	zone de loisirs
17	Petite Pierre	zone forestière
18	Forêt de Haguenau	zone de loisirs

3.2.1.3. Méthode de collecte des tiques

La méthodologie de collecte choisie par le CNR *Borrelia* a été la technique du drapeau. Notre protocole a été le suivant : une toile éponge de 1m² est trainée sur la litière. Tous les 10 m, l'investigateur observait sa toile et en prélevait les tiques, ceci correspondant à un « tir ». Au moins vingt tirs ont été réalisés sur chaque point de collecte. *In fine*, les résultats ont été ramenés à une surface de 100 m². Les tiques adultes et les nymphes ont été ensuite congelées afin d'analyser ultérieurement leur pourcentage d'infection.

D'autres méthodologies de collecte existent : la collecte par un piège, sur les animaux, ou sur les marcheurs. La « technique du drapeau » est largement répandue dans les publications scientifiques et a été employée par le CNR précédent et est employée par le CNR suisse depuis 30 ans, pays limitrophe de la région Alsace, disposant de données vectorielles depuis plus de 10 ans.

Dans le souci d'une uniformisation des pratiques entre les pays et de comparaison ultérieure des résultats obtenus dans différents pays d'Europe, cette même méthodologie « du drapeau » a donc été choisie.

3.4.1.4. Organisation des collectes

Deux à trois personnes ont réalisées les collectes. En 2012, le CNR *Borrelia* a réalisée **26 sorties** sur le terrain, **sur huit mois** de mars à octobre 2012, réparties dans toute l'Alsace. La majorité des sorties ont été programmées sur la journée, mais certaines ont

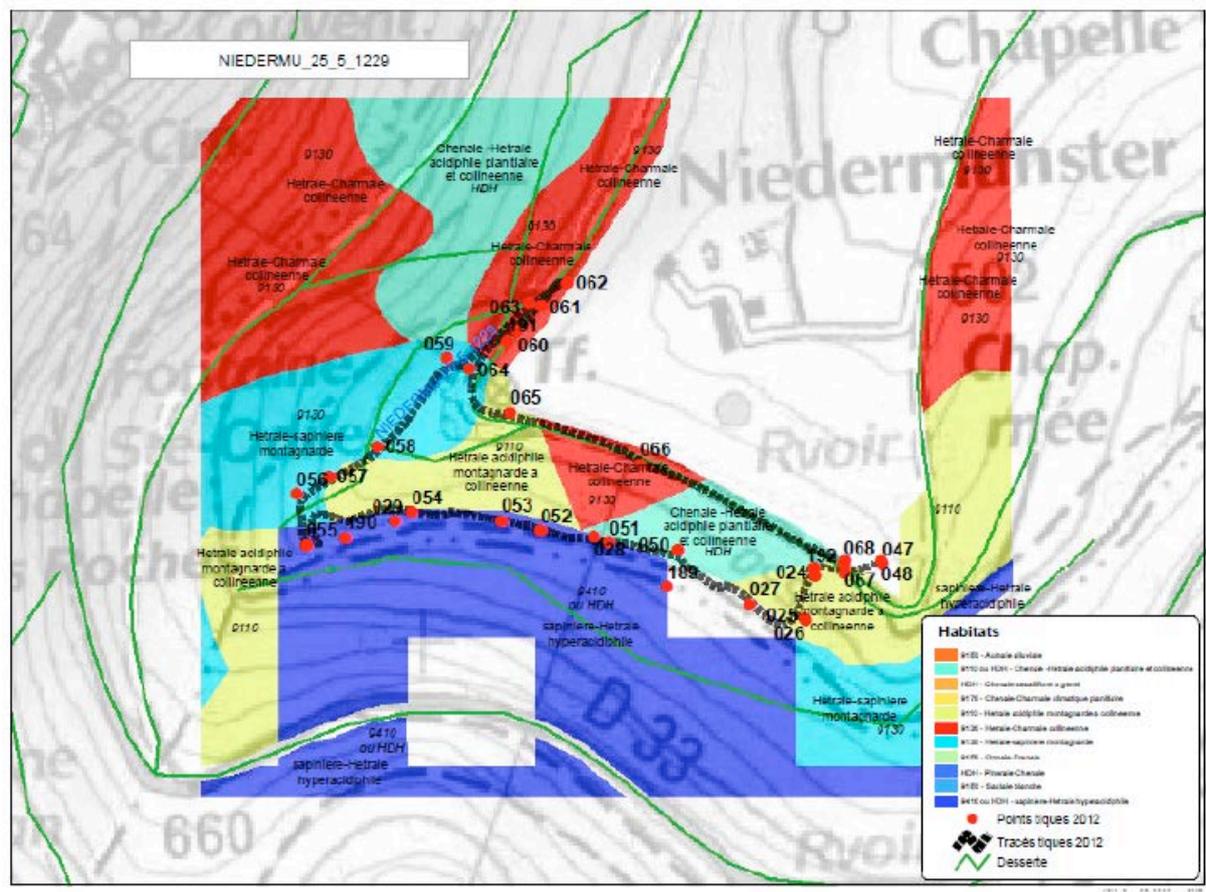
nécessité de séjourner sur place, notamment pour les déplacements à Munster et Guebwiller.

3.4.1.5. Inventaire forestier

Afin de disposer de données précises du biotope, nous avons débuté en 2012 une collaboration avec l'Office National des Forêts (ONF). Une convention a été signée avec l'ONF afin de pouvoir positionner les sites prélevés sur des cartes de végétation grâce aux relevés GPS effectués par nous-mêmes lors des collectes. L'ONF, grâce aux coordonnées GPS que nous lui avons fournies, pourra établir des cartes représentant le type de végétation pour chaque zone que nous avons collectées (collaborateurs ONF : Christophe Descamps, Laurent Gautier) .

La détermination de l'écosystème forestier a ainsi pu être réalisée en 2012 pour une partie des sites grâce au « Référentiel des types forestiers d'Alsace », publié par l'ONF.

Exemple de carte fournie par l'ONF (site de Niedermunster)



La caractérisation des biotopes favorables à la présence des tiques *Ixodes ricinus*, ainsi qu'à leur taux d'infection à *Borrelia burgdorferi* nous semble un élément important à investiguer.

3.2.2. Méthodes de détection des ADN de *B. burgdorferi* sensu lato dans les tiques

3.2.2.1. Méthode d'extraction des ADN de *B. burgdorferi* sensu lato dans les tiques

L'ensemble des tiques collectées cette année sur l'ensemble de l'Alsace (**n=2784 nymphes**) a été traité selon le protocole de préparation d'ADN utilisé par le CNR *Borrelia* suisse (L. Gern). La technique est basée sur un chauffage individuel des tiques dans une solution d'hydroxyde d'ammonium qui permet la formation de pores dans la cuticule de la tique. En 2012, nous avons ainsi préparé **2784 échantillons individuels** de nymphes d'*Ixodes ricinus* contenant potentiellement les ADN de différents pathogènes transmis par les tiques (*Borrelia*, *Anaplasma*, *Rickettsia* entre autres).

3.2.2.2. Méthode de détection des ADN de *B. burgdorferi* sensu lato dans les tiques

Durant l'année 2012, nous avons procédé à la **mise au point d'une méthode de détection de *Borrelia burgdorferi* sensu lato au sein de ces tiques.**

Nous avons choisi, pour détecter la présence de *Borrelia burgdorferi*, d'amplifier le gène *fla B* (gène codant pour une protéine majeure du flagelle) par technologie de **PCR** en temps réel, *fla B* étant une cible commune à toutes les espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

3.2.2.3. Méthode d'identification des espèces de *B. burgdorferi* sensu lato dans les tiques

Le typage a été réalisé par des sondes d'hybridation fluorescentes spécifiques des espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (cible = *fla B*). Onze sondes ont actuellement été mises au point par le CNR (10 sondes de FRET et une sonde TaqMan) pour *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* – *B. bavariensis*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. bissettii*, *B. spielmanii*, *B. andersonii*, *B. japonica*, *B. turdae* et *B. tanukii*

3.2.3. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée via le logiciel R 2.15.2. Les pourcentages d'infection des nymphes à *Borrelia burgdorferi* sensu lato ont été comparés entre les sites de collecte grâce à un test exact de Fisher ou un test du Chi².

3.2.4. Densité des nymphes - Résultats

3.2.4.1. Calcul de la densité des nymphes d'*Ixodes ricinus* :

Le stade nymphal est le plus à risque pour l'Homme: la nymphe par sa petite taille, passe en effet plus inaperçue pour les usagers des forêts. De plus, lors de nos collectes, nous avons constaté que le stade adulte ne représentait en moyenne que 13% des tiques récoltées. Nous avons donc choisi de nous intéresser plus particulièrement à la densité en nymphes.

La densité D en nymphes (ou en tiques) a été calculée de la façon suivante :

$D = \sum ni / t$; où ni est le nombre de nymphes (ou de tiques) totales prélevées sur le lieu de collecte i et t : le nombre de tirs effectués. D a été rapporté à une surface de 100m².

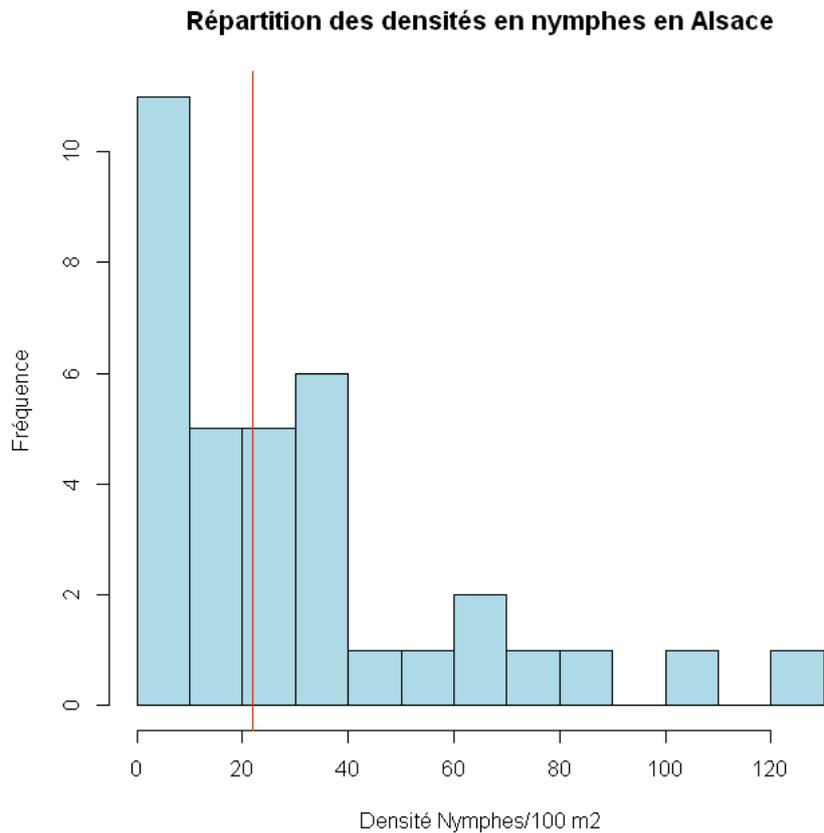
Dans le tableau ci-dessous sont présentées les caractéristiques des 35 points de collecte au sein des 18 sites investigués. Y sont mentionnés : l'heure de collecte, le mois de collecte, la météo, le nombre total de nymphes collectées et de tiques correspondantes ainsi que la présence éventuelle d'un autre genre de tiques : les *Dermacentor* (non vecteur de *Borrelia burgdorferi*)

N° du point de collecte	N° site	Lieu	Mois de collecte	Total Nymphes	Densité Nymphes	Total Tiques (nymphe+adultes)	Densité Tiques	Présence Dermacentor	Densité de Dermacentor
1	1	Andlau	Mars	32	22	35	25	non	NA
2	2	Niedermunster	Mars	14	13	26	24	non	NA
3	2	Niedermunster	Avril	68	32	78	37	oui	< 1
4	2	Niedermunster	Mai	158	61	171	66	oui	< 1
5	2	Niedermunster	Juin	118	35	135	40	non	NA
6	2	Niedermunster	août	14	3	17	4	non	NA
7	2	Niedermunster	octobre	15	4	16	4	non	NA
8	3	Foret Illkirch	Août	25	9	26	9	non	NA
9	4	Foret Neuhoef	Mars	5	16	6	20	oui	73
10	5	Foret chateau Pourtales	Avril	37	34	44	40	oui	8
11	6	Foret Epfig	Avril	27	23	29	24	oui	< 1
12	7	Moenkalt	Avril	13	7	25	13	oui	2
13	8a	Munster	Mai	95	25	107	27	non	NA
14	8b	Munster	Mai	94	22	115	26	non	NA
15	8c	Munster	Mai	94	18	113	22	non	NA
16	8d	Munster	Mai	99	32	108	35	non	NA
17	8e	Munster	Mai	256	65	281	72	non	NA
18	8f	Munster	Juin	205	108	219	115	non	NA
19	8g	Munster	Juin	283	129	307	140	non	NA
20	8h	Munster	Juin	70	47	91	61	non	NA
21	9	Howald	Juin	5	2	7	3	non	NA
22	10	Hungersberg	Juin	31	11	36	12	non	NA
23	11	Daubensand	Juin	349	78	364	81	oui	< 1
24	12	Rosheim	Juin	181	33	181	33	non	NA
25	13	Petite Camargue Alsacienne	Juin	29	14	33	15	non	NA
26	14	Foret de la Hardt	Juin	82	24	103	30	non	NA
27	15a	Vallee de Thann	Juillet	68	31	70	32	non	NA
28	15b	Vallee de Thann	Juillet	15	5	516	5	non	NA
29	16a	Markstein	Juillet	28	10	38	14	non	NA
30	16b	Markstein	Juillet	26	10	27	11	non	NA
31	16c	Markstein	Juillet	29	10	31	10	non	NA
32	16d	Markstein	Juillet	211	53	240	60	non	NA
33	16e	Markstein	Juillet	193	88	201	91	non	NA
34	17	Petite Pierre	Août	44	3	45	3	non	NA
35	18	Foret de Haguenau	September	12	3	14	4	oui	< 1

NA : non applicable, * : pas de données disponibles

3.2.4.2. Répartition des densités en nymphes en Alsace

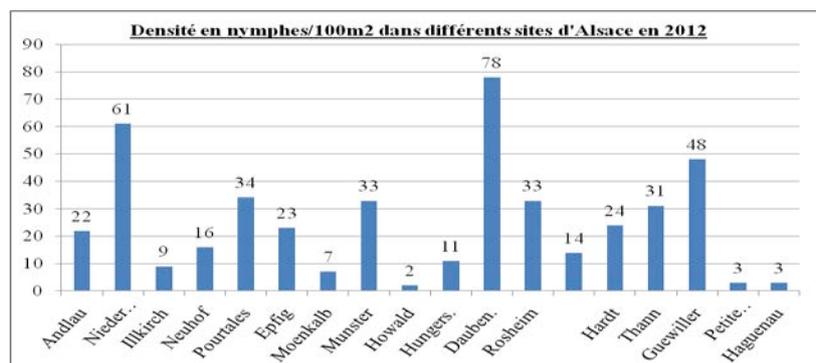
Le graphique ci-dessous représente les densités en nymphes/100m² pour l'ensemble des sites investigués en 2012.



On constate que cette répartition ne suit pas une loi normale (confirmée par le test de Shapiro-Wilk). La grande majorité des sites possèdent une densité inférieure à 40 nymphes/100m². La médiane, représentée en rouge sur le graphique, est de 22 nymphes/100m²; 90% des sites ont une densité inférieure à 122 nymphes/100m², 75% des sites ont une densité inférieure à 35 nymphes/100m².

La comparaison de nos données avec celles obtenues par le précédent CNR lors de collectes en Alsace en 2003-2004 montrent des données comparables : un pic à 120 tiques/100m² avait été atteint en 2003-2004 contre un pic à 145 tiques/100m² en 2012 (soit + 20,8%).

Nous avons ensuite analysé la densité des nymphes en fonction des sites géographiques. Le graphique ci-dessous représente la densité en nymphes/100m² pour les différents sites de collecte en 2012.



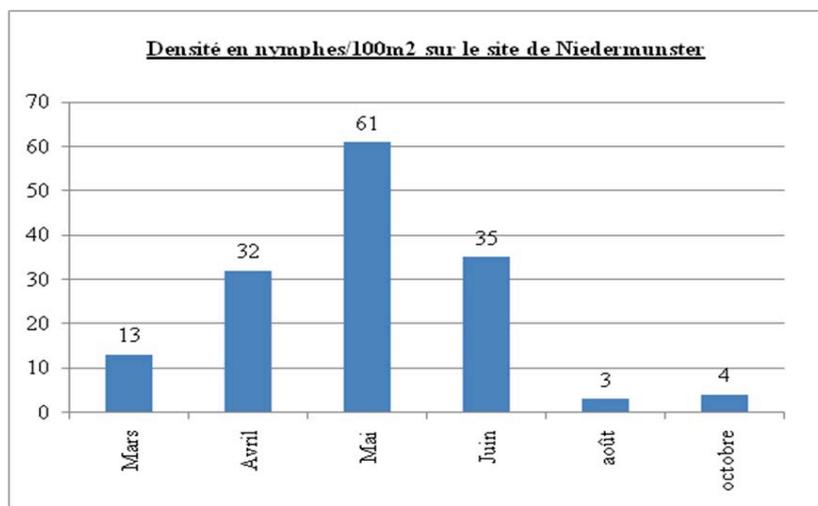
La majorité des sites (11 sur 18) a été investiguée durant la période d'activité maximale des tiques (mois d'avril à juin). Les densités les plus élevées ont été observées à Niedermunster (61 nymphes/100m²) et Daubensand (78 nymphes/100m²). Daubensand et Niedermunster possèdent la densité la plus forte mais des biotopes différents : hêtraie sapinière et hêtraie-charmaie pour Niedermunster et zone inondable pour Daubensand.

Par ailleurs, sur un même jour de collecte, le site de Munster a fait l'objet de 5 points de collecte géographiquement différents. Il présente une densité globale en nymphes de 33/100m². Sur les 5 points de collecte de ce site, la densité variait de 18 à 65 nymphes/100m² selon le site de collecte. Un des 5 points de collecte à Munster présente une densité proche de celle des sites de Daubensand et de Niedermunster, les deux sites à densité la plus forte. En 2013, nous allons étudier les facteurs pouvant donner lieu à ces variations (biotopes, hygrométrie notamment).

Focus sur le site de Niedermunster

Durant ces investigations, nous avons effectué des collectes mensuelles sur un des sites, celui de Niedermunster. Il a été choisi car il est près d'un site très touristique en Alsace, le Mont St Odile.

Nous avons observé que la densité en nymphes/100m² variait en fonction du mois de collecte (graphique ci-dessous).



On constate que sur un site alsacien suivi régulièrement, la densité de nymphes suit une distribution unimodale, avec un pic vers la fin du printemps. Ce pic unimodal avait déjà été observé en 2003 et 2004 en Alsace par E. Ferquel et coll. (2006) et est décrit plus globalement en Europe dans la littérature concernant l'activité des tiques (Kurtenbach et col, 2006).

3.2.4.3. Analyse de l'impact du biotope

L'analyse du biotope s'est révélée difficile pour l'année 2012. Il n'a pas été possible d'analyser la corrélation du biotope avec la densité des tiques car la cartographie de la végétation fournie par l'ONF est très détaillée. En effet, pour un même site de collecte présentant sur le terrain pour un œil non-expert peu de différences, plusieurs biotopes ont été individualisés par l'ONF (site de Niedermunster par exemple).

Nous modifierons en 2013, la méthode de collecte en suivant les cartographies ONF de façon à rendre une corrélation avec le biotope possible.

3.2.4.4. Prévalence de *Borrelia burgdorferi* sensu lato chez les nymphes

Le tableau suivant synthétise les données sur la prévalence de l'infection à *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans les nymphes pour les sites de collecte investigués.

Nous avons choisi d'étudier un panel de sites du Nord au Sud de l'Alsace. Toutes les nymphes de chaque site ont été analysées, soit **n=974 échantillons**. Ceci nous fournit donc des taux d'infection pour sept sites et un pourcentage moyen d'infection pour l'Alsace par agrégation de l'ensemble des données.

Site	Nymphes		Infection	
	nombre de nymphes testées	nombre de nymphes positives	Taux (%)	IC _{95%}
Moyenne en Alsace	974	67	6,6	[5,3-8,5]
Niedermunster	147	10	6,1	[2,2-10,0]
Haguenau	67	3	4,5	[0,5-9,5]
Petite Camargue	38	2	5,3	[1,8-12,4]
Munster	493	32	6,5	[4,3-8,7]
Guebwiller	172	14	8,1	[4,0-12,2]
Petite Pierre	35	3	8,6	[0,7-17,9]
Illkirch	22	3	13,6	[0,7-27,9]

Le taux moyen d'infection des nymphes en Alsace en 2012 est de 6,6 % (IC_{95%}= [5,3-8,5]). Les taux d'infestation varie de 4,5% (Haguenau) à 13,6% (Illkirch).

Les données issues d'études antérieures réalisées en Europe [2] ou en France [3] ont trouvé des taux moyen d'infection moyenne respectivement de 10,8 % en Europe et 4,65 % en France. La comparaison des taux d'infection des données agrégées françaises de Gilot [3] et de celles que nous avons recueillies montrent que ces taux sont statistiquement différents ($p=0.035$), l'Alsace possède un taux d'infection plus élevé. Il faut noter que les lieux précis de collecte ainsi que les méthodes de détection des pathogènes sont différents (Immunofluorescence directe pour Gilot et biologie moléculaire pour le CNR), ce qui a pu influencer en partie les résultats.

La comparaison des taux d'infection entre les sites alsaciens ne montre pas de différence significative entre les sites (test exact de Fisher ; $p= 0.7526$). Nous n'avons pas pu mettre en évidence un « effet centre » au sein de l'Alsace. Que ce soit dans des sites péri-urbains (Illkirch, à proximité de Strasbourg) ou très ruraux (Petite Camargue, Munster, Guebwiller) la probabilité qu'une nymphe soit infectée, ne dépend ni de la localisation géographique du site ni du continuum de l'habitat.

3.2.4.5. Comparaison entre départements

Site	nombres de nymphes		Pourcentages
	positives	négatives	
Bas-Rhin	19	252	7,0%
Haut-Rhin	48	655	6,8%

Nous avons également réalisé des comparaisons des taux observés en 2012 entre les deux départements Bas-Rhin et Haut-Rhin : il n'existe pas de différence significative.

3.2.4.6. Densité en nymphes infectées/100m²

Sites	Densité (nymphes/100m ²)	Infection (%)	Densité en nymphes infectées (nymphes/100m ²)
<i>Moyenne en Alsace</i>	34	6,6	2
<i>Niedermunster</i>	61	6,1	4
<i>Haguenau</i>	3	4,5	< 1
<i>Petite Camargue</i>	14	5,3	< 1
<i>Munster</i>	33	6,5	2
<i>Guebwiller</i>	48	8,1	4
<i>Petite Pierre</i>	3	8,6	< 1
<i>Illkirch</i>	9	13,6	< 1

3.2.4.8. Importance relative et répartition des espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en Alsace, dans les différents sites étudiés

Toutes les nymphes positives ont été typées pour déterminer la ou les espèces de *Borrelia* infectantes.

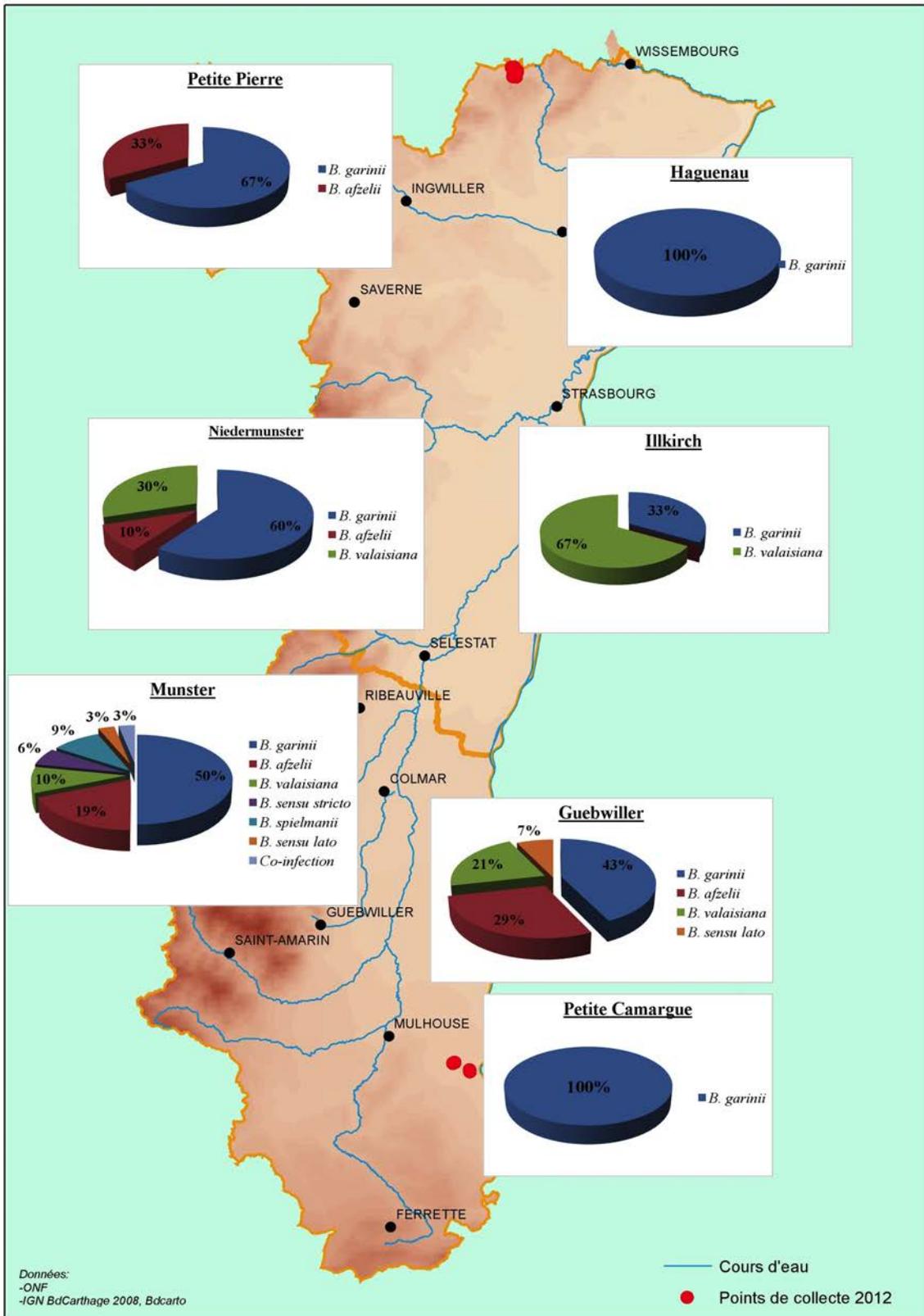
Espèce de <i>Borrelia</i>	% d'infection
<i>B. garinii</i>	53,7
<i>B. afzelii</i>	17,9
<i>B. valaisiana</i>	16,4
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	3,0
<i>B. spielmanii</i>	4,5
<i>B. burgdorferi sensu lato</i>	3,0
Co-infection <i>Borrelia</i>	1,5

B. garinii est l'espèce détectée majoritairement en Alsace en 2012. D'autres espèces sont aussi très représentées : *B. afzelii* et *B. valaisiana*.

Nous n'avons observé qu'une seule co-infection (*B. garinii* + *B. valaisiana*) à Munster. C'est également à Munster qu'une tique positive à *B. spielmanii* a été identifiée. Le précédent CNR avait également détecté dans ce même site l'espèce *B. spielmanii* en 2003 - 2004.

La répartition des espèces au sein des nymphes varie selon les sites géographiques analysés. Ainsi, certains sites apparaissent mono-, bi-, ou tri-espèces, le site de Munster est celui présentant le plus de bio-diversité avec la présence des 3 espèces les plus fréquentes en Europe (*B. garinii*, *B. afzelii* et *B. burgdorferi sensu stricto*) ainsi que *B. valaisiana* et *B. spielmanii* et la présence de co-infections. Nous poursuivrons ce travail en 2014 pour voir si ces tendances se confirment ou non.

3.2.4.9. Carte de répartition des différentes espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato et lieux de collecte



Références

Christelle Méha, Vincent Godard, Bernard Moulin et Hedi Haddad, « La borréliose de Lyme : un risque sanitaire émergent dans les forêts franciliennes ? », *Cybergeo : European Journal of Geography* [En ligne], Environnement, Nature, Paysage, article 601, mis en ligne le 20 avril 2012, consulté le 20 mars 2013. URL : <http://cybergeo.revues.org/25285> ; DOI : 10.4000/cybergeo.25285.

Hubalek Z, Halouzka (1998) Prevalence rates of *Borrelia burdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitol Res*84 :167-172.

Gilot B et al (1996) Prevalence of *Borrelia burdorferi* (sensu lato) in *Ixodes ricinus* (L.) populations in France, according to a phytoecological zoning of territory. *Eur J Epidemiol* 12 :395-401.

Kurtenbach K, Hanincová K, Tsao JI, Margos G, Fish D, Ogden NH. Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4:660-9.

Ferquel E, Garnier M, Marie J, Bernèd-Baudin C, Baranton G, Pérez-Eid C, Postic D. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Anaplasmatataceae members in *Ixodes ricinus* in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. *Appl Environ Microbiol.* 2006 :72 :3074-8.

5. Activités d'information, de formation et de conseil

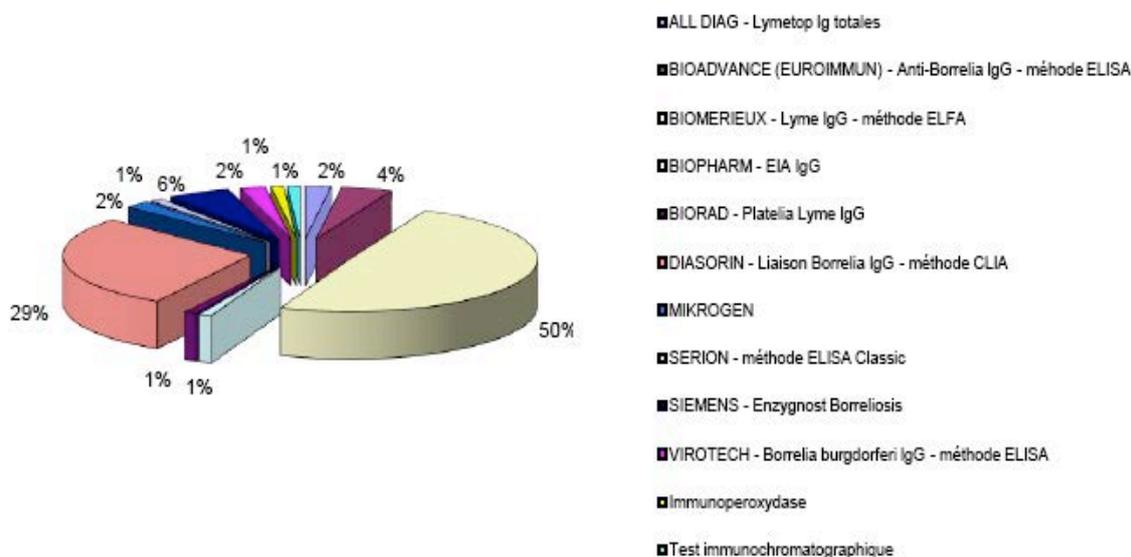
5.1.3. Organisation d'un Contrôle de Qualité Externe (EEQ) proposé aux Laboratoires d'Analyses Médicales

En 2012, nous avons proposé comme les années précédentes aux laboratoires d'analyse médicale volontaires du Nord-Est, un contrôle de qualité externe (EEQ) pour la sérologie de *Borrelia*. Avec l'aide logistique d'une association (Biologie Prospective, Nancy) nous avons diffusé 4 sérums à 93 laboratoires (contre 86 en 2011, soit +8%) qui avaient fait part de leur intention de participer .

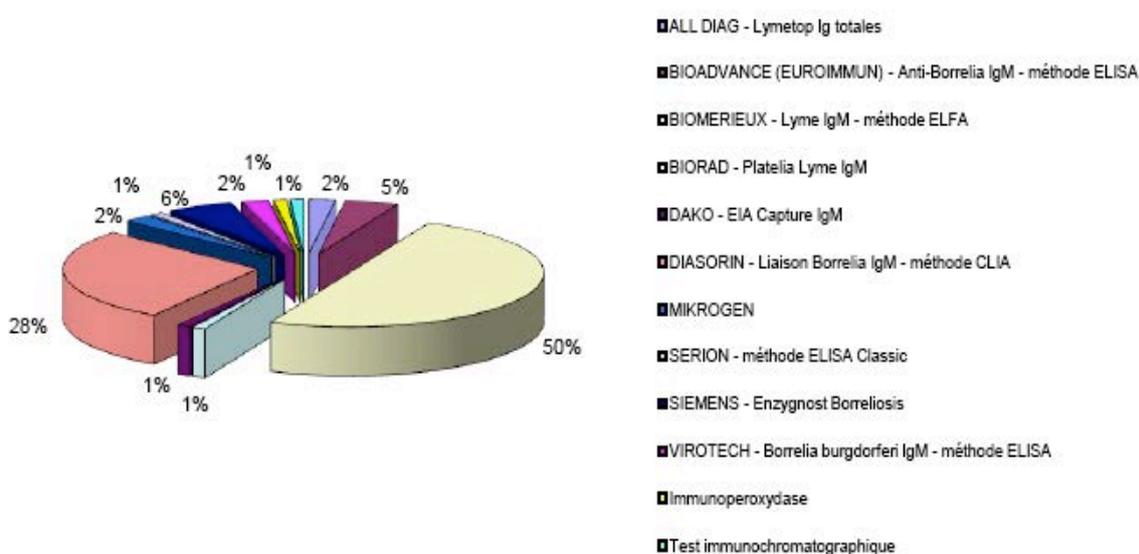
Cette année, deux sérums ont aussi été ouverts à un EEQ en western-blot en plus de l'EEQ habituel en ELISA.

Parmi les 93 laboratoires participants, 12 techniques EIA différentes ont été utilisées. Neuf d'entre elles permettaient la détection séparée des IgG et des IgM anti *B. burgdorferi*, les 3 autres permettaient la détection des Ig totales. Les techniques IgG – IgM séparées étaient en 2012 utilisées dans 96% des laboratoires participant à cet EEQ.

Techniques utilisées par les laboratoires - IgG



Techniques utilisées par les laboratoires - IgM



La technique IgG et IgM séparées de BioMérieux est largement majoritaire dans les laboratoires et représente près de la moitié des parts de marché. Parmi les autres coffrets, Diasorin représente comme l'an dernier le 2^{ème} choix en terme de fréquence d'utilisation, avec 29% des choix de notre panel d'utilisateurs.

Une technique de confirmation (western-blot – immunoblot) a été utilisée par 42 participants (45%) utilisant 5 coffrets de fournisseurs différents : Bioadvance, Alldiag, Mikrogen, Servibio, Viramed

Parmi ces sérums, un était positif uniquement en IgG seulement anti *B. burgdorferi*, un autre était un positif faible en IgG et en IgM correspondant à une infection débutante :

- Réponse des laboratoires participants au sérum IgM (-) / Ig G (+) :

Pour ce sérum, nous avons observé 100% de réponses exactes en IgG et 13% de faux positifs en IgM dont 8 étaient observés avec le même coffret pour la détection des IgM.

- Réponse des laboratoires participants au sérum IgM (+) / Ig G (+) :

Nous avons observé 98% de réponses exactes en EIA IgM et 97% en EIA IgG.

En western-blot IgG, 24 des 42 laboratoires (soit 57%) ayant ensuite réalisé un western-blot IgG n'ont pas détecté ce sérum comme positif et ont conclu à un faux positif. Ce problème a été observé avec les différents coffrets utilisés. Cela pourrait être dû à un problème de sensibilité des coffrets utilisés ; ce point sera étudié sur un prochain EEQ.

5.2. Guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

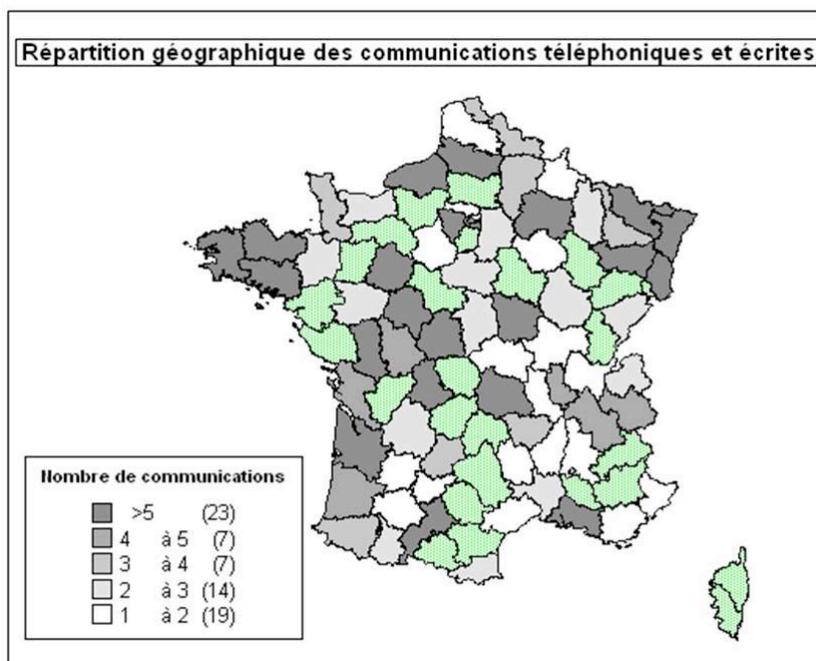
Rédaction par le CNR *Borrelia* d'un livret de 28 pages « Lyme borreliosis : from patient diagnosis to disease management » Rédaction de 2 éditions anglaise et française.

Public ciblé : laboratoires d'analyses médicales et médecins généralistes.

5.3. Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...)

5.3.1. Provenance géographique des demandes

Les demandes provenaient de toute la France : on recense 338 demandes écrites et 318 appels téléphoniques. Les départements les plus rencontrés étaient Paris (71 demandes soit 10,8%), le Bas-Rhin (65 demandes soit 9,9%), la Gironde (38 demandes soit 5,8%). Des autres départements émanaient moins de 10 demandes en 2012.



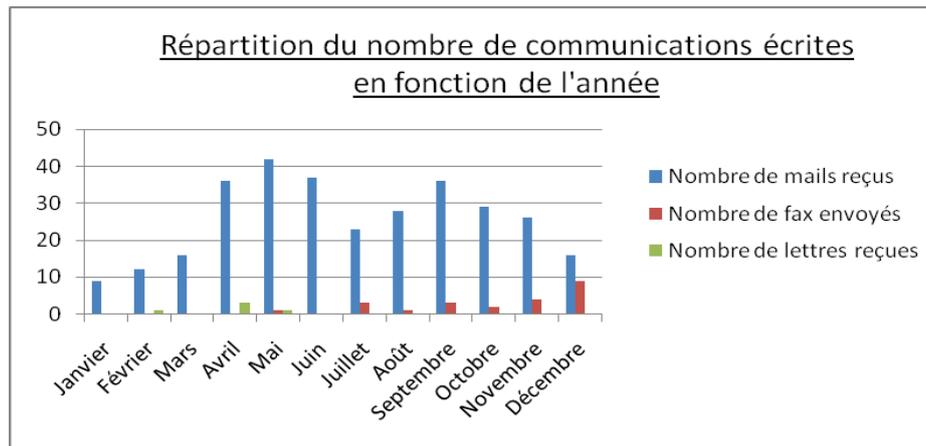
5.3.2. E-mails / fax / lettres

L'activité du CNR *Borrelia* est analysée ci-dessous à partir d'un fichier Excel contenant la saisie manuelle des E-mails et fax de l'année 2012. La base de données a été constituée à partir de l'extraction de chaque mail, de : la date, l'émetteur et son destinataire, la provenance géographique et le thème de la demande.

Ainsi, les résultats sont les suivants :

Nous avons recensé 338 communications par écrit durant l'année 2012. Parmi ces 338 communications écrites, il y avait 310 E-mails, 26 fax et 2 lettres.

Le graphique ci-dessous décrit la répartition de ces communications en fonction des différents mois de l'année. On observe une répartition relativement homogène des demandes durant l'année avec une diminution des demandes durant les mois de décembre à mars inclus. Le nombre de demandes varie de 11 par semaine (mois de mai) à 2 par semaine (mois de janvier). En moyenne, le CNR recense une demande par jour d'avril à novembre inclus.



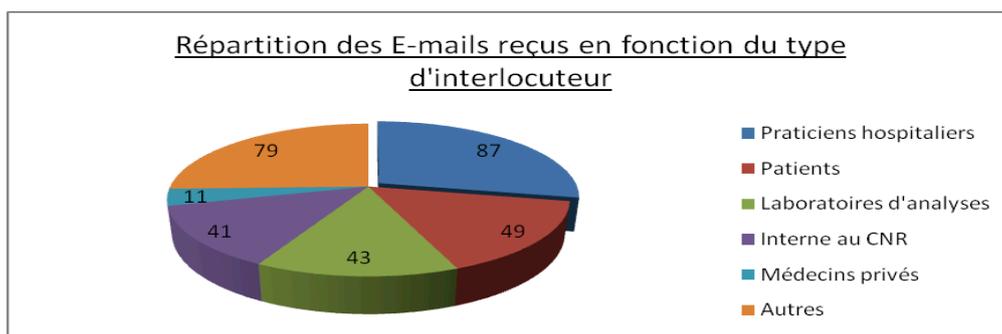
5.3.2.1. Fax

Parmi les fax envoyés, 92% représentaient des résultats d'analyses demandés « en urgence » par des médecins ou des laboratoires (soit 24/26). Les deux autres cas correspondent à des envois de formulaire d'analyse et de feuille de renseignements.

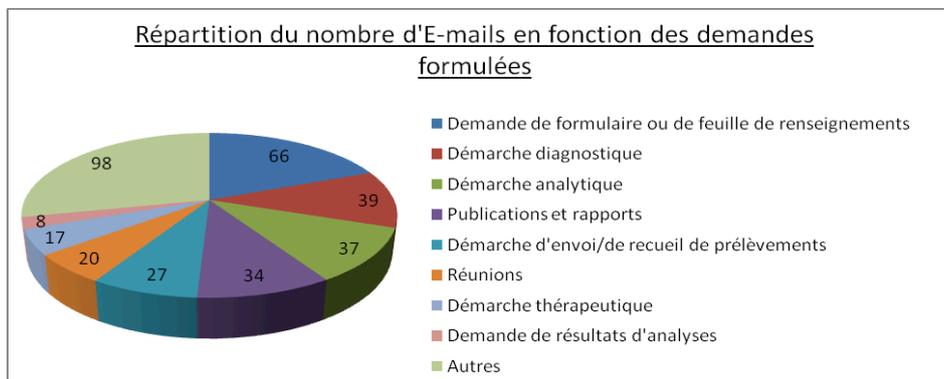
Les 2 lettres reçues concernaient respectivement l'engagement du CNR dans la démarche qualité et la demande d'expertise d'une analyse difficile à interpréter.

5.3.2.2. E-mails

Les e-mails ont eux été analysés en fonction du type d'interlocuteur et de la demande formulée.



Les demandes provenaient essentiellement de praticiens hospitaliers (87 cas/310 soit 28%) mais aussi de patients (49 cas soit 16%) et 43 cas ou de laboratoires (soit 14%). Les médecins libéraux nous ont adressés 11 e-mails (soit 3,5%). Par ailleurs, on recense 79 e-mails, soit 25,5%, provenaient d'autres interlocuteurs comme des journalistes ou des étudiants.



Dans ces mails, on retrouve des **demandes de formulaires d'analyses ou de feuilles de renseignements** (66 demandes, soit 21%). Ces demandes étaient principalement formulées par des praticiens hospitaliers (45% ou 30/66) mais provenaient aussi de laboratoires (15% ou 10/66) ou de médecins privés (3% ou 2/66)..

Ensuite, on recense 39 mails de questions concernant des **démarches diagnostiques** et 37 concernant des démarches **analytiques** (13% et 12% respectivement). Les démarches analytiques qui posaient problème dans ces e-mails étaient des interprétations d'analyses. En ce qui concerne les démarches diagnostiques, le CNR a fourni une aide au diagnostic en mettant en relation les analyses mais aussi la clinique du patient. Ces types de demandes provenaient de centres hospitaliers (18% ou 14/76) ou de médecins privés (3% ou 2/76), de laboratoires (18% ou 14/76), mais aussi de patients (12% ou 9/76).

Par ailleurs, 34 e-mails (11%) portaient sur des **questions autour de publications** et de rapports concernant la maladie de Lyme notamment dans le contexte d'articles journalistiques grand public (26% ou 9/34), de reportages TV (9% ou 3/34), de données affichées sur des sites internet ou des blogs (12% ou 4/34), de livrets d'informations (9% ou 3/34),... Ils provenaient de centres hospitaliers (12% ou 4/34), de laboratoires (18% ou 6/34) ou autres (étudiants, journalistes,...).

Les **démarches d'envoi ou de recueil de prélèvements** étaient à l'origine de 27 e-mails (87%). Ces e-mails provenaient essentiellement de centres hospitaliers (59% ou 16/27) ou de laboratoires (19% ou 5/27).

Les **questions thérapeutiques** ont été discutées dans 17 mails (5,5%), soit avec des patients soit avec des médecins (à part égale).

Quelques cas (7 praticiens hospitaliers et un laboratoire) ont demandé par e-mails des copies de **résultats d'analyses** pour leur patient (2,6% de demandes), ce type de demande est majoritairement téléphonique.

Enfin, on recensait 98 autres demandes (32%) :

- 24% provenant de patients (24/98): Le CNR leur a essentiellement donné des conseils (75% ou 18 cas) concernant la **surveillance et la prévention de la transmission de la maladie de Lyme** mais aussi concernant des adresses de médecins spécialistes. Enfin,

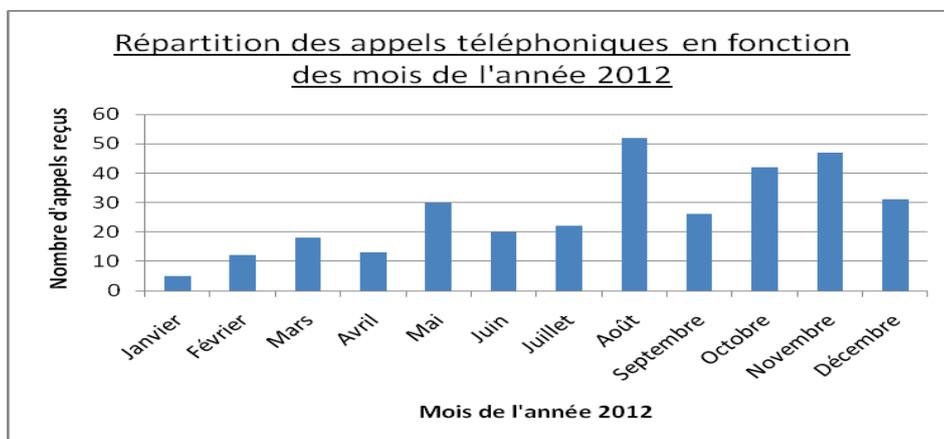
- 4 demandes (17%) portaient sur des analyses difficiles à interpréter par d'autres laboratoires.
- 20% provenant de médecins hospitaliers (20/98) : 9 e-mails (45%) contenaient des **photos de lésions** de patients (érythèmes migrants, acrodermatites chroniques atrophiantes,...).
 - 4% provenant de laboratoires d'analyses (4/98): Celles-ci concernaient des **démarches qualité**
 - 34% soit 33 demandes parmi 98 provenant d'autres personnes (CIRE Lorraine-Alsace, INVS, fournisseurs,...) : Ces personnes demandaient diverses informations sur la maladie de Lyme (épidémiologie,...).

5.3.3. Communications téléphoniques

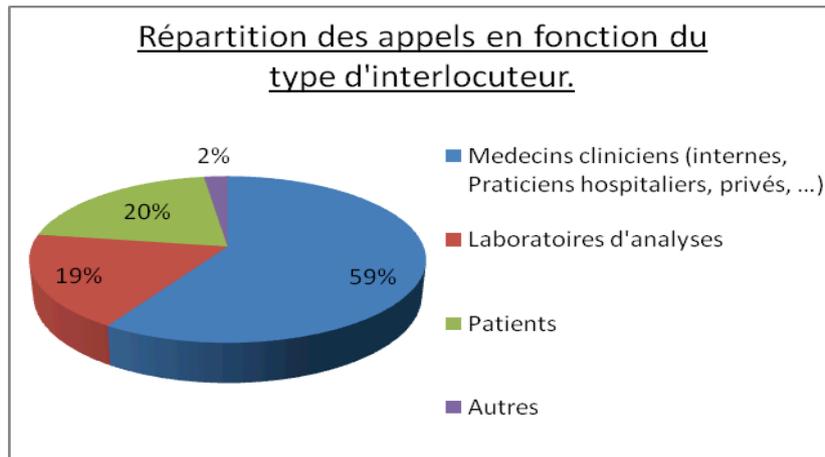
Les données des communications téléphoniques ont été analysées à partir d'un fichier Excel contenant la saisie manuelle des conversations téléphoniques recensées durant l'année 2012. Le principe a été d'extraire de ce fichier certaines informations à partir des conversations téléphoniques : la date, la durée de la communication, l'interlocuteur, sa provenance géographique et le thème de la discussion. Les résultats obtenus sont les suivants :

Le CNR a reçu 318 appels durant l'année 2012 (liste non exhaustive car certains appels n'ont pas été tracés) soit plus de 49h passées au téléphone. Parmi ces appels, 224 appels (70%) ont été réceptionnés par les biologistes du CNR et 94 appels (30%) ont été réceptionnés par les techniciennes du CNR. La durée d'un appel est en moyenne de 11,4 min et de 6,2 min respectivement pour les biologistes et les techniciennes du CNR. Les biologistes apportaient des conseils essentiellement analytiques, diagnostiques ou thérapeutiques (148 appels sur 224 soit 66%) alors que les techniciennes répondaient plutôt à des questions sur les démarches à suivre pour l'envoi de prélèvements ou de documents (56/94 soit 60%) ou des demandes de résultats.

La répartition des appels en fonction des différents mois de l'année est la suivante :

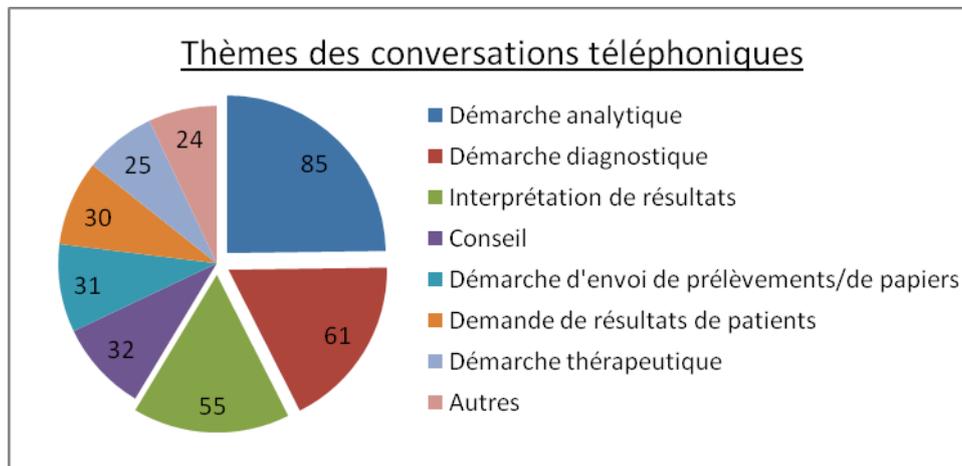


On recense plus d'appels dans la seconde moitié de l'année : 220 appels de juillet à décembre contre 98 appels de janvier à juin soit 69% et 31% respectivement. Avant le mois de mai, la fréquence moyenne des appels était de 12 appels par mois soit environ 3 appels par semaine. A partir du mois de mai, on observe une augmentation moyenne des appels reçus qui va de 5 appels par semaine à 2 appels par jour.



La majorité (185/318 soit 59%) des communications téléphoniques ont été entretenues avec des médecins, toutes spécialités et origines confondues. En général, ce sont des praticiens hospitaliers qui rencontrent des problèmes avec leurs patients et qui demandent conseil au CNR. Dans 19% des cas, (58/318) les interlocuteurs étaient des laboratoires d'analyses et 20% (64/318) étaient des patients. Les 2% (7/318) des appels restants concernaient d'autres personnes (pharmaciens, InVS, ministère de la santé, ...).

Les thèmes principaux de ces conversations téléphoniques sont représentés ci-dessous :



Le but est de voir la répartition des demandes en fonction de l'interlocuteur afin d'orienter le fonctionnement ultérieur du CNR vers une sensibilisation prioritaire de ces personnes sur les questions qui leur posent un problème spécifique et de proposer des réponses standardisées pour les questions les plus fréquentes sur le site internet qui sera créé en 2013.

Ainsi, 85 appels parmi 318 (27%) ont fait l'objet d'une discussion à propos de **démarches analytiques**. Ces appels étaient essentiellement passés avec des médecins cliniciens (75% ou 64/85) : quelles analyses réaliser ? Leur intérêt ? ...

Par ailleurs, 61 appels parmi 318 (19%) avaient pour thématique une **démarche diagnostique** (dont 72% avec des médecins cliniciens). Dans ce cas, la démarche analytique s'associait à une réflexion sur la clinique du patient afin de mieux guider le praticien dans son diagnostic.

L'interprétation de résultats (sérologie par ELISA et Western Blot) était aussi un thème très abordé (55 appels recensés sur 318 soit 17%). Ce type de demande provenait essentiellement de médecins cliniciens (58% ou 32/55) et plus rarement de laboratoires (27% ou 15/55).

32 appels téléphoniques parmi 318 (10%) ont permis de donner des conseils : orientation vers des consultations de médecins, conseils de surveillance clinique,... Ces **conseils** étaient principalement destinés à des **patients** (78% ou 25/32).

Enfin les autres thèmes (35% soit 110 appels) regroupaient, en proportion égale, des conseils sur les démarches d'envoi de prélèvements ou de papiers (feuilles de renseignements, ordonnances, ...), des demandes de résultats de patients, des conseils thérapeutiques (traiter ou non ? Quel antibiotique ? Combien de temps ? ...).

Il est à noter que 25 appels (8%) comportaient plusieurs thèmes de discussion.

En conclusion, cette analyse de plus de 1000 communications en 2012 (458 fiches de renseignements, 656 communications écrites ou téléphoniques) révèle que l'activité du CNR des *Borrelia* n'est pas seulement une activité analytique et d'expertise. Le conseil et l'information occupent aussi une très grande place. Les demandes présentaient des diversités géographiques, thématiques et provenaient de divers interlocuteurs, la majorité des demandes étant celles des cliniciens à propos de la démarche diagnostique et analytique en cas de suspicion de borréliose de Lyme.

Le diagnostic de maladie de Lyme est délicat et l'interprétation des différentes analyses n'est pas toujours aisée pour les prescripteurs. Il en découle l'optimisation des programmes à mettre en place pour améliorer son activité et cibler les personnes pour lesquelles ces actions sont plus ou moins destinées.

5.4. Liste des activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...)

5.4.1. Expertise sous l'égide de la Haute Autorité de Santé

Au cours des années 2010-2011, N. Boulanger a participé à la rédaction de recommandations de pratique clinique : « Protection personnelle dans la lutte anti-vectorielle » en collaboration de la société de médecine des voyages et la société française de parasitologie <http://www.medecine-voyages.fr/publications/ppavtextecourt.pdf>.

En 2012, un texte long a été publié sous forme de livre aux Editions de l'IRD (Institut de Recherche et Développement) <http://www.ird.fr/editions/catalogue/ouvrage.php?livre=673>.

5.4.3. Avis pour la CNAM

En 2012, le CNR a été contacté par le Dr. A.F. Kuhn pour l'interprétation faite par certains LAM libéraux de la cotation de la NABM des actes de sérologie de Lyme par ELISA et par WB sur sérum et sur LCR ainsi que sur la réalisation de la synthèse intra-thécale. Une analyse de la base de ces pratiques et un avis a été rendu.

5.4.4. Expert en tant que membre de réseaux internationaux

5.4.4.1. Meeting de l'ECDC

En novembre 2012, un meeting sur l'évaluation des tests biologiques pour la borréliose de Lyme a été organisé par l'ECDC à Stockholm.

Ce meeting de 2 jours avait pour but de définir la méthodologie de cette évaluation. En plus des membres concernés par cette thématique à l'ECDC, étaient présents à cette réunion un expert des pays suivants : Allemagne, Autriche, Danemark, France ainsi que plusieurs représentants des Pays-Bas, pays qui sera responsable du projet scientifique.

Durant ce meeting, ont été décidé :

- les contours de l'évaluation (sérologie, tests de transformation lymphocytaire)
- les questions scientifiques à répondre
- la méthodologie d'analyse de la littérature

Du fait de la forte polémique actuelle en France sur ce sujet, le CNR *Borrelia* n'a pas souhaité participer activement à la partie analyse de la littérature afin que les conclusions qui seront rendues ne puissent avoir été influencées par une opinion française

5.4.4.2. Réseau EUCALB – ESGBOR

- Le groupe ESGBOR (Eur Study Group on Lyme Borreliosis) a été officiellement fondé à l'ECCMID en avril 2012. Une réunion de travail du groupe ESGBOR a eu lieu novembre 2012 à Vienne. Différents axes de travail et de projet de recherche européens ont été étudiés :
- étude du risque de développement d'une borreliose de Lyme après piqûre de tiques
- étude du rôle des grands mammifères sur l'abondance des tiques
- Paramètres influençant la densité des tiques
- Evaluation multicentrique des tests sérologiques – constitution d'une sérothèque européenne
- Apport de la MLSA dans la connaissance des espèces de *B. burgdorferi* sl.

Par ailleurs, Les membres de ce réseau assurent depuis une hot-line européenne pour les praticiens, biologistes et patients qui s'adressent à eux. Huit demandes ont été prises en charge par B. Jaulhac en 2012 dans ce cadre.

5.4.4.3. Mise en place d'une collaboration avec le CNR Suisse

Au cours de l'année 2012, nous avons réalisé deux réunions de travail avec le CNR Suisse (Dr. L. Gern, Prof. B. Betschart ; Dr. O. Peter) afin d'échanger sur les objectifs respectifs des deux CNR et sur nos approches pour :

- l'envoi de matériel biologique et l'échange de souches
- les axes et la méthodologie d'évaluation de tests biologiques (échanges sur nos méthodologies)
- la mise en place d'un CIQ et d'un EEQ en sérologie
- la méthodologie tant sur l'épidémiologie humaine que vectorielle.

Un échange des guidelines en vigueur dans nos deux pays a été réalisé et la réalisation d'un projet épidémiologique vectoriel commun a été discuté.

5.4.5. Expert en tant que membre de réseaux nationaux

N. Boulanger :

- Membre du réseau **CNEV: Centre National Expertise des Vecteurs**. Responsable. Dr. D. Fontenille. Expert pour les tiques. Membre du consortium CNEV
- Membre **du réseau REID** (Réseau des Interactions durables : Maladies à Tiques) Réunion annuelle tenue en 2012 à Clermont-Ferrand. Dans ce cadre, un projet de

rédaction de livre sur les tiques est en cours et devra être finalisé pour fin 2013.
Coordinatrices : K. McCoy et N. Boulanger.

5.4.6. Agence Régionale de Santé (ARS) : mise en place d'un comité de pilotage « Tiques et maladies à tique » avec la CIRE-EST

Dans le projet régional de santé Alsace, l'axe « maladies infectieuses » inclut la thématique « Maladies transmises par les tiques ». Deux réunions du comité de pilotage « Maladies transmises par les tiques en Alsace » se sont déroulées durant l'année 2012. Ce comité de pilotage regroupe les acteurs impliqués dans la problématique sus-citée : le syndicat mixte des gardes champêtres du Haut-Rhin, le CNR *Borrelia*, les acteurs en lien directe avec la Santé : la médecine du travail, le service des maladies infectieuses du CHU de Strasbourg, la MSA, l'ONF...

L'objectif est de cibler les maladies transmises uniquement par les tiques à savoir : Lyme, anaplasmose, babésiose, et les autres *Borrelia* agents de fièvres récurrentes. Ce groupe de travail vise surtout à informer via des sites d'informations accessibles à tous car ce groupe de travail ne dispose d'aucun budget propre pour la mise en place d'action sur le terrain comme l'implantation de panneau d'informations, de plaquettes auprès des professionnels de santé. Ce COPIL fait un état des lieux des actions en cours ou prévues, de lister les problématiques et de constituer une feuille de route des actions à mettre en place.

Contexte

Une première étude épidémiologique humaine réalisée par la CIRE –EST a eu lieu en 2001-2002 et a permis de disposer pour la première fois en France de données fiables sur la maladie de Lyme. Dix ans après celle-ci, il paraît nécessaire de disposer de nouvelles données sur les maladies transmises par les tiques pour voir l'évolution et de mettre en place une démarche plus globale de prévention de ces maladies.

La nouvelle étude épidémiologique nécessite de prendre en compte les recommandations européennes et celle de la conférence de consensus sur la maladie de Lyme. Cette nouvelle étude a aussi pour ambition d'allier un suivi des cas humains à une étude du vecteur.

Il paraît en effet nécessaire de répondre objectivement aux problématiques soulevées par la population : Y a-t'il des zones nouvellement peuplées par les tiques ? La population de tiques est-elle en augmentation ? Leur infestation est-elle en augmentation ? Quelles sont les causes de divergence entre les données françaises et celles des autres pays européens concernant l'encéphalite à tique ?

Il est donc décidé d'établir un état des lieux des connaissances, une démarche de communication visant à rectifier certaines idées reçues, de proposer et de hiérarchiser des mesures de prévention.

6. Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR

6.1. Analyse de la peau dans la transmission précoce de *Borrelia* et de son rôle potentiel dans la peau

6.1.1. Objectifs

Identifier le rôle de la peau et de la tique dans la transmission précoce de la maladie.

Ces deux aspects font en 2012 l'objet d'une thèse de Doctorat (QUENTIN Bernard) et d'un Master M2 (GRILLON Antoine).

Le CNR nous permet d'avoir accès à différents pathotypes humains et à des biopsies humaines quand il sera nécessaire de valider les résultats obtenus sur notre modèle murin à l'homme.

Ce travail se fait en collaboration avec le service de Maladies Infectieuses (Pr. Christmann et Hansmann) et de Dermatologie (Pr. D. Lipsker) du CHU de Strasbourg.

6.2. Analyse de la virulence de *Borrelia* par une approche protéomique sur culture de *Borrelia burgdorferi* sensu lato et sur peaux de souris infectées

6.2.1. Objectifs

La virulence de *Borrelia* est principalement attribuée dans la littérature aux gènes OspC et RST (16S-23S rRNA intergenic spacer). Des données préliminaires en protéomique semblent indiquer que ces gènes ne sont pas les seuls responsables. Nous planifions par une approche protéomique (Electrophorèse en gel et spectrométrie de masse) d'identifier de nouveaux marqueurs de virulence potentiellement utilisable dans une approche vaccinale et diagnostic de la borréliose de Lyme.

6.2.1. Partenariats

Professeur Laurence Sabatier et deux étudiants de doctorat (Gilles Schnell et Amandine Bœuf), Département des Sciences Analytiques Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg, France

6.2.3. Etat d'avancement

Un manuscrit est en cours de rédaction. Ce projet a fait l'objet d'une soumission de présentation au Congrès International « Lyme Borreliosis and Other Tick-borne Diseases » Boston, 18-21 August 2013.

7. Liste des publications et communications sur le sujet

7.1. Publications nationales

1. Ocular Lyme disease occurring during childhood: five case reports
Sauer A, Hansmann Y, Jaulhac B, Bourcier T, Speeg-Schatz C
J Fr Ophtalmol. 2012;35:17-22. French.

7.2. Publications internationales

1. Emergence of human granulocytic anaplasmosis in France
Edouard S, Koebel C, Goehringer F, Socolovschi C, Jaulhac B, Raoult D, Brouqui P.
Ticks Tick Borne Dis. 2012;3:403-5.
2. Clinical images: toe dactylitis revealing late Lyme borreliosis
Levy E, Morrucci C, Barbarini A, Sordet C, Cribier B, Jaulhac B, Lipsker D.
Arthritis Rheum. 2012;64:1293.

3. Lyme endocarditis
Hidri N, Barraud O, de Martino S, Garnier F, Paraf F, Martin C, Sekkal S, Laskar M, Jaulhac B, Ploy MC.
Clin Microbiol Infect. 2012;18:E531-2.
4. Update on the proteomics of major arthropod vectors of human and animal pathogens
Patramool S, Choumet V, Surasombatpattana P, Sabatier L, Thomas F, Thongrungrat S, Rabilloud T, Boulanger N, Biron DG, Missé D.
Proteomics. 2012;12:3510-23.
5. Identification of salivary antigenic markers discriminating host exposition between two European ticks: *Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor reticulatus*
Vu Hai V, Almeras L, Audebert S, Pophillat M, Boulanger N, Parola P, Raoult D, Pages F.
Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2013;36:39-53.
6. Microarray analyses of inflammation response of human dermal fibroblasts to different strains of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*
Schramm F, Kern A, Barthel C, Nadaud S, Meyer N, Jaulhac B, Boulanger N.
PLoS One. 2012;7:e40046.
7. Human granulocytic anaplasmosis in eastern France: clinical presentation and laboratory diagnosis
Kobel C, Kern A, Edouard S, Hoang AT, Celestin N, Hansmann Y, Jaulhac B, Brouqui P, De Martino SJ.
Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;72:214-8.

7.3. Communications nationales

1. Conférence « Actualités en Infectiologie », Groupement Hospitalier Nord, Maladies Infectieuses et tropicales – Hôpital de la Croix Rousse, LYON, « Diagnostic biologique de la maladie de Lyme », 26 janvier 2012, B. JAULHAC.
2. Réunion scientifique REID « Maladies à tique », Projets entomologiques prévus au sein du CNR « *Borrelia* pour le plan 2012-2015 », Clermont-Ferrand, du 14 au 17 novembre 2012, N. BOULANGER.

7.4. Communications internationales

1. Modification of skin homeostasis during the early transmission of Lyme disease to the vertebrate host. BOULANGER N., Kern A., Schramm F., Barthel C., Collin E., Marchal C., JAULHAC B. Gordon Conference on Spirochetes, Ventura, California, 22-27 Jan 2012.

7.5. Conférences sur invitation

1. Symposium on ticks and tick borne diseases. BOULANGER N. Reference center on Lyme disease and transmission of *Borrelia*. Speyer, Germany, 22-23 Février 2012.
2. Conférence « Borréliose de Lyme » par B. JAULHAC et Y. HANSMANN, Forum de la Faculté de Médecine, Strasbourg, le 19 juin 2012.

3. Conférence « Borréliose de Lyme » par B. JAULHAC et P. KIEFFER, Centre Hospitalier de Mulhouse, le 28 juin 2012.
4. Les tiques d'importance médicale. BOULANGER N. Journées de la société de Médecine des Voyages. Strasbourg, 5-6 octobre 2012
5. Mesures de prévention contre les morsures de tiques. BOULANGER N. Journées de la société de Médecine des Voyages. Strasbourg, 5-6 octobre 2012
6. Conférence « Maladie de Lyme ». B. JAULHAC. Club III ; Communauté Israélite de Strasbourg, le 27 novembre 2012.

Annexes

Paragraphe 1.1. - Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR :

Développer et diffuser des méthodes pour le diagnostic des différentes formes de borreliose

Développer des techniques de typage de *Borrelia*

Evaluer les tests sérologiques

Apporter aux LAM son expertise

Collaborer avec les structures expertes en entomologie et en santé animale pour caractériser l'écologie de *Borrelia*

Contribuer à la surveillance épidémiologique et participer aux réseaux internationaux

Contribuer à l'alerte à l'InVS de tout événement inhabituel (nombre de cas, cas groupés, modification de la présentation clinique, etc)

Paragraphe 1.3. - Equipe : personnels dévolus aux activités du CNR *Borrelia* (Laboratoire de Bactériologie, Plateau Technique de Microbiologie, Hôpitaux Universitaires de strasbourg)

Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur

Le CNR *Borrelia* est intégré depuis janvier 2012 au laboratoire de Bactériologie sur le Plateau Technique de Microbiologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Le CNR *Borrelia* a fonctionné en 2012 avec les moyens humains suivants :

Pr. Benoît Jaulhac : médecin biologiste, directeur du CNR, PU-PH, 10 % ETP hospitalier payés sur les crédits affectés au CNR

Dr. Sylvie De Martino : médecin biologiste, MCU-PH, 10 % ETP hospitalier payés sur les crédits affectés au CNR

Mme Nathalie Boulanger : pharmacienne, MCU-PA, 50 % ETP hospitalier payés sur les crédits affectés au CNR

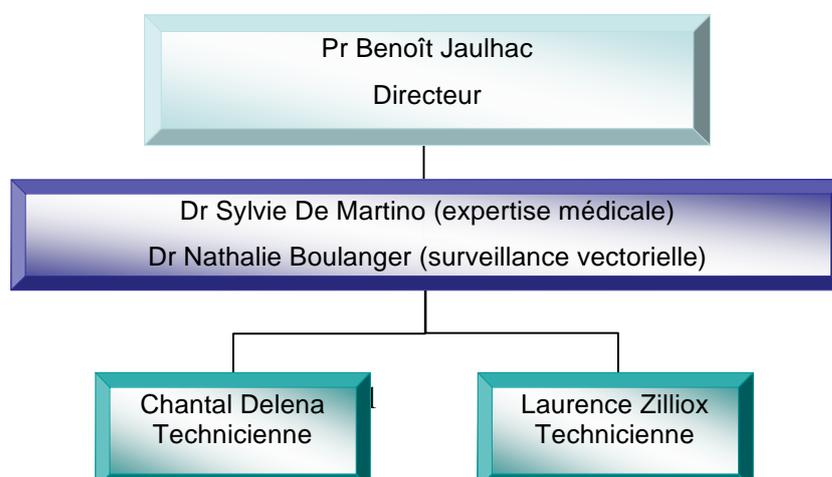
Mme Chantal Delena : technicienne, 90 % ETP affecté au CNR et payés sur les crédits affectés au CNR

Mme Laurence Zilliox : technicienne, 75 % ETP affecté au CNR et payés sur les crédits affectés au CNR

Tableau 1 : Effectif / Qualification du Personnel

	Médecins	Scientifique	Techniciens	Total
en Équivalent Temps Plein (ETP)	0,20	0,5	1,65	2,35
Nombre de personnes	2	1	2	5

Organigramme

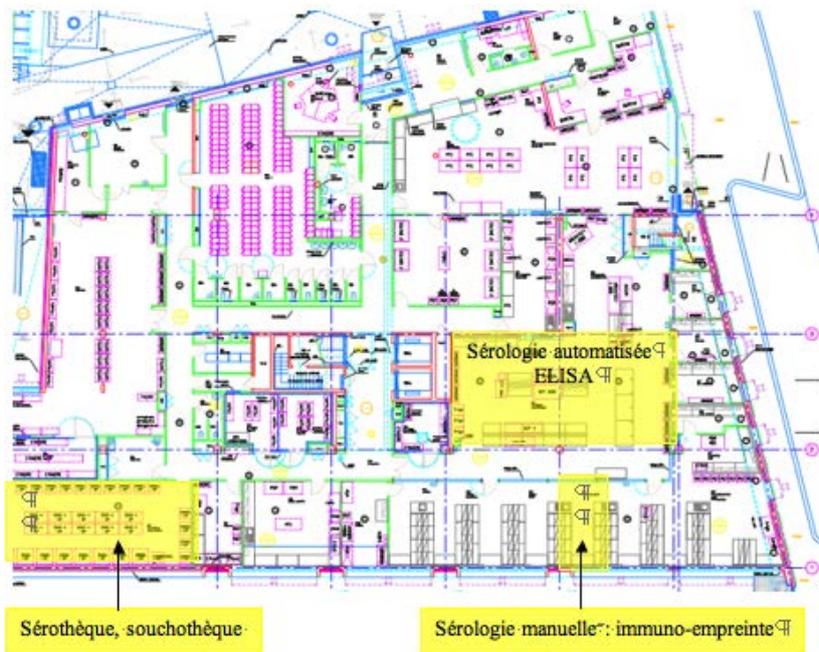


Paragraphe 1.4 - Locaux et équipements du CNR *Borrelia* (Laboratoire de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg) :

Surface, plan :

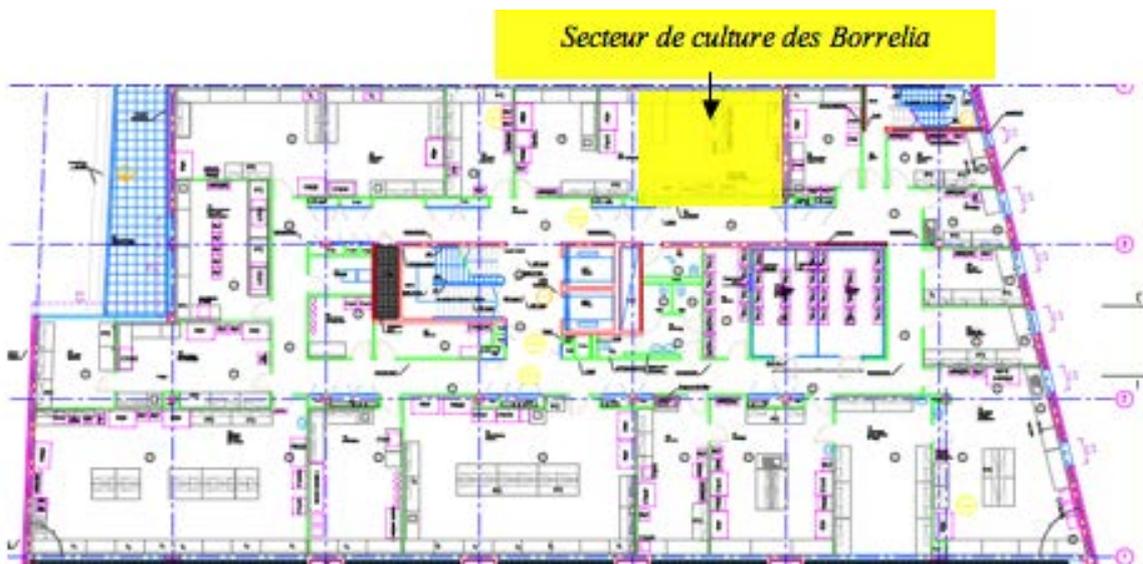
En 2012, le CNR est localisé au sein du Plateau Technique de Microbiologie (bâtiment de 3 500 m² utiles). Son activité s'effectue en fonction des analyses à réaliser dans les différents Secteurs Techniques d'Activité Partagée (STAP) présentés ci après.

Rez-de-chaussée : secteur sérologie automatisée et manuelle, sérothèque, souchothèque :

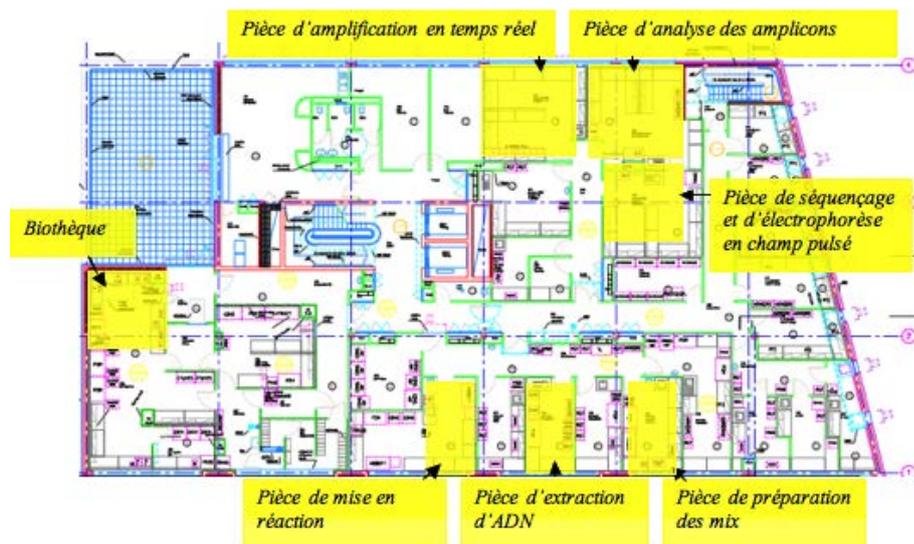


La souchothèque et la sérothèque sont situées dans une pièce séparée à accès réglementé et tracé par badge nominatif.

1^{er} étage : secteur de culture :



2^{ème} étage : secteur biologie moléculaire :



La Biothèque à -80°C est située à cet étage dans une pièce séparée à accès réglementé et tracé par badge nominatif.

Principaux équipements du CNR *Borrelia*

- 1 PSM - 2 bains secs chauffants – 1 Centrifugeuse pour microtubes
- 2 étuves de culture microbiologique 33°C et 37°C (enregistrement continu de la T°)
- Microscope à fond noir (Leica)
- Réfrigérateur à +4°C, congélateur à -30°C (froid ventilé) et à -80°C (enregistrement continu de la T° et alarme en temps réel 24h/24)
- Accès à des automates pour ELISA (BEP III, BEP 2000)
- Accès à un appareillage pour western-blot (Bio-Rad)
- Accès à un extracteur d'acides nucléiques (MAGNA pure)
- Accès à deux appareils de PCR en temps réel (Light Cycler)

- Appareil de PCR en temps réel pour activité vectorielle (ABI 7500)
- Imprimante pour étiquettes
- disque dur externe pour transfert de données
- Appareil photo étanche pour activité vectorielle
- GPS de randonnée pour activité vectorielle

Paragraphe 2.1 - Capacités techniques du CNR

2.1.1.1. Techniques disponibles :

2.1.1.1.1. Techniques de recherche directe de *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Culture

Culture de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en milieu liquide BSK-H à partir de prélèvements biologiques et en milieu BSK modifié selon Sinski et Piesman (amélioration de la culture primaire de *Borrelia afzelii*)

Culture en milieu liquide BSK additionné de sérum pour les souches de *Borrelia* de fièvres récurrentes

Culture de souches de *Borrelia burgdorferi* sensu lato sur milieu solide mis au point par le laboratoire (production de souches clonales)

Amplification génique spécifique in vitro

PCR en temps réel avec sonde TaqMan® sur prélèvements biologiques humains pour recherche de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Deux cibles disponibles : fragments des gènes chromosomiques de la flagelline, et *hbb*,

Typage direct sur prélèvements humains ou sur culture de *Borrelia* par sondes d'hybridation fluorescentes spécifiques des espèces du complexe *Borrelia burgdorferi* (cible = gène chromosomique de la flagelline),

PCR en temps réel et sonde TaqMan sur prélèvements biologiques pour recherche d'*Anaplasma phagocytophilum* (cible: fragment du gène *msp2* codant la protéine de surface p44).

2.1.1.1.2. Techniques de recherche indirecte de *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Sérologie ELISA quantitative IgG et IgM séparés (utilisation du coffret Enzygnost VIsE Siemens®) pour la réalisation de sérologie sur sérum, plasma, LCR et pour la recherche d'une synthèse intrathécale spécifique anti *B. burgdorferi* sensu lato

Sérologie de confirmation sur sérum et/ou LCR des résultats positifs ou douteux lors du dépistage par une technique d'immuno-empreinte « maison » pour étude des anticorps anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato. Calibration à l'aide d'un panel d'anticorps monoclonaux.

Les techniques de PCR, de culture et de sérologie citées sont utilisées dans le cadre de l'activité propre du CNR ainsi que pour la réalisation de projets de recherche clinique : PHRC inter-régional « Epidémiologie et présentation clinique de l'anaplasmose granulocytaire humaine » N°3960 et du projet de recherche « biopsies cutanées » (financé sur bourses de la Société Française de Dermatologie).

2.1.1.1.3. Techniques d'étude de *Borrelia* in vivo

Inoculation à l'animal (souris C3H et rats Lewis, sensibles à l'infection par *Borrelia*). Accès à une animalerie agréée n° A 67 482 34.

Maintien de lignées de tiques *Ixodes ricinus*.

Critères diagnostique de l'EUCALB de la borréliose de Lyme

Site internet de l'European Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB) :
http://meduni09.edis.at/eucalb/cms_15/index.php

DIAGNOSIS : Case Definition

Term	Clinical case definition	Laboratory evidence: essential	Laboratory/clinical evidence: supporting
<i>Erythema migrans</i>	with or without central clearing. Advancing edge typically distinct, often intensely coloured, not markedly elevated. See Medical Images .	None	Detection of <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from skin biopsy
<i>Borrelial lymphocytoma (rare)</i>	Painless bluish-red nodule or plaque, usually on ear lobe, ear helix, nipple or scrotum; more frequent in children (especially on ear) than in adults. See Medical Images .	Seroconversion or positive serology**. Histology in unclear cases	Histology. Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from skin biopsy. Recent or concomitant EM
<i>Acrodermatitis chronica atrophicans</i>	Long-standing red or bluish-red lesions, usually on the extensor surfaces of extremities. Initial doughy swelling. Lesions eventually become atrophic. Possible skin induration and fibroid nodules over bony prominences. See Medical Images .	High level of specific serum IgG antibodies**	Histology Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from skin biopsy
<i>Lyme neuroborreliosis</i>	In adults mainly meningo-radiculitis, meningitis, with or without <u>facial palsy</u> ; rarely encephalitis, myelitis; very rarely cerebral vasculitis. In children mainly meningitis and facial palsy.	Pleocytosis and demonstration of intrathecal specific antibody synthesis***	Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from CSF. Intrathecal synthesis of total IgM, and/or IgG and/or IgA. Specific serum antibodies. Recent or concomitant EM
<i>Lyme arthritis</i>	Recurrent attacks or persisting objective joint swelling in one or a few large joints. Alternative explanations must be excluded. See Medical Image .	Specific serum IgG antibodies, usually in high concentrations**	Synovial fluid analysis. Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by PCR and/or culture from synovial fluid and/or tissue.
<i>Lyme carditis (rare)</i>	Acute onset of atrio-ventricular (I-III) conduction disturbances, rhythm disturbances, sometimes myocarditis or pancarditis. Alternative explanations must be excluded.	Specific serum antibodies**	Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from endomyocardial biopsy. Recent or concomitant erythema migrans and/or neurologic disorders.
<i>Ocular manifestations (rare)</i>	Conjunctivitis, uveitis, papillitis, episcleritis, keratitis	Specific serum antibodies**	Recent or concomitant Lyme borreliosis manifestations. Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from ocular fluid.

*if less than 5 cm in diameter a history of tick-bite, a delay in appearance (after the tick bite) of at least 2 days and an expanding rash at the site of the tick-bite is required

**Specific antibody levels in serum may increase in response to progression of infection, or may decrease due to abrogation of the infection process. Samples collected a minimum of 3 months apart may be required in order to detect a change in IgG levels; as a rule, initial and follow up samples have to be tested in parallel in order to avoid changes by inter-assay variation.

***In early cases intrathecally produced specific antibodies may still be absent.

Centre National de Référence des *Borrelia* - Tel : 03 69 55 14 27
PTM – HUS 1 rue Koeberlé 67085 Strasbourg

FICHE DE RENSEIGNEMENTS BORRELIOSÉ DE LYME

Médecin prescripteur :	Laboratoire :
Hôpital et service :	Biologiste :
Nature du prélèvement :	Date : /_/_/ _/_/ _/_/
Examen demandé : Sérodiagnostic : <input type="checkbox"/>	PCR <input type="checkbox"/> Culture : <input type="checkbox"/>
PATIENT: Nom : Prénom : Sexe : <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> H	
Date de naissance : /_/_/ _/_/ _/_/ Code postal du domicile : /_ _ _ _ _/	
Profession :	
FACTEURS DE RISQUE :	
- Activités de loisirs : <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Si oui, nature :	
- Contacts avec des animaux ? <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Si oui, lesquels ? :	
- Exposition aux tiques (fréquentation de milieux forestiers...) : <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui	
- Antécédents de piqûre de tique ? <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Si oui, <input type="checkbox"/> unique ou <input type="checkbox"/> multiple?	

**DEMANDE* DE SEROLOGIE SPECIFIQUE
POUR LE DIAGNOSTIC DE LA BORRELIOSIS DE LYME**

(* Joindre obligatoirement une ordonnance à cette demande)

A l'attention du **Centre National de Référence des *Borrelia***

Plateau Technique de Microbiologie

Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 1 rue Koeberlé, 67085

Strasbourg

Tel : 03 69 55 14 27 – Fax : 03 69 55 16 98 – E-mail :

cnr.borrelia@medecine.u-strasbg.fr

Patient

Nom :

Prénom :

Sexe : féminin masculin

Date de naissance :

Prescripteur

Dr.

Hôpital et service/laboratoire :

.....

Coordonnées (tel, mel) :

Nature et date de(s) prélèvement(s)

SERUM prélevé le :/...../..... àh

LCR prélevé le :/...../..... àh

Analyses demandées

ELISA + WB (le WB sera réalisé si l'ELISA est positif ou douteux)

WB seulement (résultats de l'ELISA à préciser dans le cadre « informations complémentaires » ci dessous)

INDEX DE SYNTHÈSE INTRATHECALE D'ANTICORPS SPECIFIQUES ANTI-*B.burgdorferi*

(A demander si troubles neurologiques et si la sérologie de la borreliose de Lyme est positive. Pour déterminer cet index, les volumes minimum nécessaires sont de **0,8 mL de LCR** et **1 mL de sérum prélevés le même jour**.

il est nécessaire de nous communiquer valeurs du dosage pondéral des IgG totales dans ce sérum et ce LCR. Si cela ne peut être réalisé, cocher la case ci-dessous.)

DOSAGE PONDERAL DES IgG TOTALES, dans le **sérum** et dans le **LCR** à faire réaliser par le laboratoire d'immunobiochimie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

Informations complémentaires liées au patient

Résultats des sérologies de la borreliose de Lyme déjà réalisées sur ces prélèvements:

ELISA SERUM (Réactif :, seuil :.....)

- IgM :

- IgG :

ELISA LCR (Réactif:, seuil :.....)

- IgM :

- IgG :

WB SERUM (Réactif :

- IgG : kDa*

- IgM : kDa*

WB LCR (Réactif :

- IgG : kDa*

- IgM : kDa*

(* préciser la nature des bandes réactives de *B. burgdorferi* : par exemple p32, p41, VlsE ou autres)

DOSAGE PONDERAL DES IgG TOTALES :

- IgG totales du sérum : g/L

- IgG totales du LCR : mg/L