



CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES *BORRELIA*

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITÉ

Année 2013

Centre National de Référence des *Borrelia*

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. Missions et organisation du CNR	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 <i>Borrelia</i> (Laboratoire de Bactériologie, Plateau Technique de Microbiologie, Hôpitaux Universitaires de strasbourg)	5
1.3.1. <i>Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur</i>	5
1.3.2. <i>Organigramme</i>	5
1.3.3. <i>Description de la démarche qualité du CNR Borrelia : participation à un contrôle de qualité externe, programmes, accréditation, certification</i>	5
1.4 Locaux et équipements du CNR <i>Borrelia</i> (Laboratoire de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)	7
1.4.1. <i>Surface, plan</i>	7
1.4.2. <i>Principaux équipements du CNR Borrelia</i>	7
2. Activités d'expertise	7
2.1. Capacités techniques du CNR	7
2.1.1. <i>Liste des techniques de référence: diagnostic, identification, typage</i>	7
2.1.2. <i>Collections de matériels biologiques : souches, antigènes ou immun-sérums de référence</i>	8
2.1.3. <i>Liste des techniques (diagnostic/identification, typage, sensibilité aux anti-infectieux...) recommandées par le CNR</i>	9
2.2 Activités d'expertise de l'année 2013 du CNR des <i>Borrelia</i> (Laboratoire de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)	13
2.2.1. <i>Sérologies sanguines de B. burgdorferi sl réalisées en 2013</i>	13
2.2.2. <i>Etude de la synthèse intrathécale spécifique anti B. burgdorferi sensu lato</i>	16
2.2.3. <i>Activité d'expertise PCR du CNR Borrelia en 2013</i>	17
3. Activités de surveillance	20
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	20
3.1.1. <i>Surveillance nationale des cas de suspicion de borréliose de Lyme</i>	20
3.1.2. <i>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</i>	23
3.1.3. <i>Surveillance de l'anaplasmose granulocytaire humaine et des co-infections Anaplasma phagocytophilum avec Borrelia burgdorferi sensu lato et d'autres pathogènes transmis par les tiques</i>	26
3.2. Surveillance du vecteur <i>Ixodes ricinus</i> par le CNR en Alsace.....	28
3.2.1. <i>Objectifs de la campagne de collecte de 2013</i>	28
3.2.2. <i>Choix des sites et méthode de collecte</i>	30
3.2.3. <i>Analyses des nymphes et des données issues de la campagne 2013</i>	32
3.2.5 <i>Résultats de l'étude des densités en nymphes en Alsace</i>	35
4. Alerte	48
5. Activités d'information, de formation et de conseil	49
5.1. Information et formation.....	49
5.1.1. <i>Enseignement</i>	49
5.1.2. <i>Formation médicale continue aux professionnels de santé</i>	49
5.1.3. <i>Organisation d'un Contrôle de Qualité Externe (EEQ) proposé LABM</i>	49
5.1.4. <i>Accueil de stagiaires</i>	51
5.1.5. <i>Thèse de doctorat, participation à des jurys</i>	51
5.2. Guides élaborés (contenu, modes de diffusion)	52
5.3. Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou e-mails, volume d'activités...)	52
5.3.1. <i>Provenance géographique des demandes</i>	52
5.3.2. <i>E-mails / fax / lettres</i>	52
5.3.3. <i>Communications téléphoniques</i>	54

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...)	56
5.4.1. Avis pour la Direction Générale de la Santé	56
5.4.2. Avis pour l'ARS	56
5.4.4. Expert en tant que membre de réseaux internationaux	56
6. Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR	58
6.1. Analyse de la peau dans la transmission précoce de <i>Borrelia</i> et de son rôle potentiel dans la peau	58
6.1.1. Objectifs	58
Analyser le rôle de la blessure de la tique dans la transmission précoce de <i>Borrelia</i>	58
6.1.2. Etat d'avancement	58
6.2. Analyse de la latence de <i>Borrelia</i> par une approche protéomique et de l'organotropisme de <i>Borrelia</i> pour la peau	58
6.2.1. Objectifs	58
Confirmer le rôle de la peau dans la persistance et mettre en évidence des protéines de <i>Borrelia</i> qui pourraient servir de marqueurs d'infection active	58
6.2.2. Partenariats	58
6.3. Mise au point d'une technique de diagnostic précoce de <i>Borrelia</i> dans des biopsies cutanées par spectrométrie de masse	59
7. Liste des publications et communications	60
7.1. Publications nationales	60
7.2. Publications internationales	60
7.3. Communications nationales	60
7.4. Communications internationales	61
7.5. Conférences sur invitation	61
8. Programme d'activité pour 2013-2014	61
8.1. Volet vectoriel : analyse des tiques	61
8.2. Volet médical	62
8.2.1. Evaluation des coffrets PCR commerciaux existants	62
8.2.2. Evaluation des coffrets sérologiques commerciaux existants	63
8.3. Volet information	63
8.3.1. Site internet	63
Annexes	64

1. Missions et organisation du CNR

1.1. Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR

voir en annexe

1.2. Résumé des activités de l'année 2013: faits marquants, points clefs, contexte, principaux résultats de contribution à la surveillance et à l'alerte

En 2013, le CNR des *Borrelia* a poursuivi ses missions de surveillance diagnostique et de conseils, notamment par l'analyse de la fréquence des formes cliniques. Il a également participé à l'étude de l'incidence de la borréliose de Lyme en poursuivant sa collaboration avec le «réseau Sentinelles» (Inserm-UPMC), avec l'InVS (article soumis) et avec la CIRE Nord-Est dans le cadre de la mise en place de l'étude épidémiologique humaine ALSACETIQUE.

Afin de poursuivre la surveillance tant humaine que vectorielle et celle des réservoirs (faune sauvage) des personnes ont été intégrées dans l'équipe :

- Mme Danièle NAPOLITANO en tant que technicienne de laboratoire
- Mr Jean-Claude GEORGE en remplacement de Mme Nathalie BOULANGER pendant sa mise en disponibilité pour études scientifiques aux USA, pour la poursuite de la surveillance vectorielle

Cette approche globale permet d'analyser et d'évaluer le niveau de risque de contamination humaine.

Le CNR a également réalisé près de 8000 sérologies, effectué près de 250 recherches de synthèse intrathécale et réalisé près de 200 analyses de biologie moléculaire spécifique sur prélèvements cliniques pour la confirmation du diagnostic. Pour pouvoir réaliser ces missions, le CNR a développé une méthode de PCR en temps réel pour la détection des *Borrelia* agents de fièvres récurrentes. Le CNR *Borrelia* a poursuivi ses activités de surveillance de cas cliniques d'infection à *Borrelia burgdorferi* sensu lato via près de 1500 contacts (550 fiches de renseignements, 620 conversations téléphoniques, 345 courriers électroniques et fax et 34 dossiers avec plusieurs échanges de courriers). Devant l'augmentation des appels de patients angoissés, les appels successifs des interlocuteurs ont été tracés nominativement.

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 engagé pleinement dans la démarche de l'accréditation avec notamment la participation depuis 12 mois à des EEQ (Evaluation Externe de Qualité) trimestriels (aucun écart) et la préparation d'un dossier de validation de méthodes en sérologie.

Le CNR a également poursuivi 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 adaptée pour permettre la comparaison avec les données précédemment observées au fil des mandats antérieurs de l'ancien CNR. 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 2013, deux coffrets de sérologie par ELISA ont été évalués : le coffret Enzygnost IgG & IgM® sur l'automate Triturus® et le coffret Diasorin *Borrelia* IgG & IgM® sur automate Liaison XL®.

Sur le plan recherche fondamentale le CNR a poursuivi ses travaux sur le thème des interactions des protéines de la salive de tique avec *Borrelia* et le rôle de l'interface cutanée lors de l'infection initiale par *Borrelia*. Des résultats prometteurs ont été obtenus, notamment concernant la dynamique de l'infection du vecteur et de la transmission de *Borrelia* dans la peau sur un modèle de rongeur.

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

Mouvement de personnels :

Le 01/07/2013, le départ à la retraite de Mme Chantal DELENA a été suivi de la nomination, le 01/07/2013, de Mme Laurence ZILLIOX au poste de « Ingénieur Hospitalier » (1 ETP) et complété le 01/09/2013, par Mme Danièle NAPOLITANO au poste de technicienne de 0,6 ETP.

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

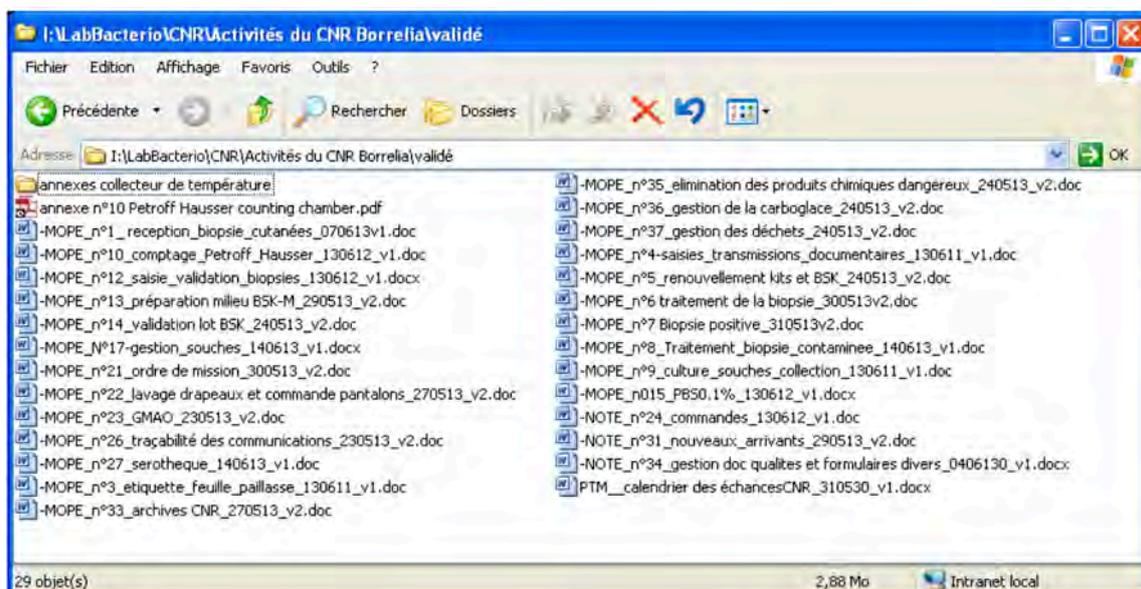
La démarche qualité du CNR des *Borrelia* s'inscrit dans le projet global de certification des HUS et d'accréditation du pôle de Biologie des HUS et de ce fait dans celle du laboratoire de Bactériologie. Le CNR des *Borrelia* est actuellement engagé dans une démarche qualité et d'accréditation obligatoire 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 engagés en 2012 ont été poursuivis en 2013.

Le dossier de validation de méthodes conformément aux exigences du COFRAC est en cours de réalisation. Cette démarche qualité a menée à un renouvellement de l'automate BEP 2000 d'ELISA réalisant les tests de dépistage sérologique des borrélioses de Lyme. Une nouvelle qualification de l'automate a été réalisée. Le dossier de validation de la méthode avec le nouvel équipement est en cours de mise à jour, il sera présenté pour accréditation en 2015.

Les modes opératoires en lien avec l'activité du CNR ont été rédigés, ils sont au nombre de 37 et sont en cours d'intégration dans le système qualité SMQ du pôle de biologie du CHU de Strasbourg.



Liste des fichiers informatiques « MOPE » du CNR *Borrelia*

Processus de management

- Pilotage de la qualité
- Mesure, analyse et amélioration
(processus intégrés au fonctionnement 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
- Maitrise 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

- Amélioration des procédures de réception mises en place en 2012, d'enregistrement et d'envoi des échantillons biologiques : réception et saisie informatique d'une biopsie cutanée pour analyse par culture et PCR, vérification de la saisie, 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
- Utilisation de fiches de non-conformité et traitement de ces non-conformités pré-analytiques mises en place en 2012
- En 2013 poursuite de la rédaction et réactualisation des modes opératoires « MOPE » préanalytiques (cf : liste des fichiers informatiques « MOPE » du CNR *Borrelia*).

Processus analytique

- Des CQI (Contrôle de Qualité Interne) sont utilisés pour évaluer en continu la répétabilité et la reproductibilité des tests sérologiques *Borrelia*. En 2013, le CNR a poursuivi la préparation de ces contrôles (pools de sérums). Le CNR a également acquis des CQI commerciaux supplémentaires les contrôles Accurun®, marqués CE, indépendants et conformes aux recommandations du COFRAC dans le cadre de l'accréditation de la phase analytique. Ces contrôles « prêt à l'emploi » viennent renforcer la gamme de contrôles du laboratoire. Le CNR procède à un suivi des lots de ces contrôles ainsi qu'à leur utilisation dans chaque série analytique. Leurs résultats sont tracés sur courbes de Lewey-Jennings afin de pouvoir agir en cas de dérive selon les règles de Westgard.
- Poursuite en 2013 de l'utilisation d'un contrôle de qualité interne dans chaque série PCR *Borrelia* : ADN (+) et T(+) d'extraction
- Evaluation externe de la qualité par l'analyse de quatre contrôles par an, distribués par la société européenne Labquality®. Il s'agissait de sérums à tester en ELISA IgG et IGM. Nos résultats en 2013 étaient 100% conformes
- Poursuite en 2013 de la traçabilité des matériels et réactifs : suivi en temps réel des réactifs et des enceintes de stockages : relevé des T° frigo, chambres froides, étuves
- En 2013, réactualisation des modes opératoires « MOPE » analytiques (cf : liste des fichiers informatiques « MOPE » du CNR *Borrelia*)

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 2013 : brève description (principes, validation)

2.1.1.2.1. *Mise au point d'une PCR en temps réel pour détection d'agents de fièvres récurrentes dans les tiques*

Cette recherche directe d'agents de fièvres récurrentes est réalisée sur ADN de nymphes d'*Ixodes ricinus*, obtenu après extraction à l'hydroxyde d'ammonium. En cas de positivité, un séquençage des amplicons pour identification de l'espèce est réalisé.

Cette détection moléculaire spécifique en temps réel repose sur la méthode publiée de J. Hovius ([Hovius JWR, de Werver B, Sohne M, et al. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. Lancet 2013, 382 : 658](#)).

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

(cf : chapitre 3.2.3)

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

2.1.2.1. Description, caractérisation

- Sérums en 2013, 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>). Certains sérums, liquides synoviaux et LCR correspondent à des manifestations cutanées, articulaires ou neurologiques, confirmées par culture et/ou PCR. D'autres sérums et LCR ont été sélectionnés *via* l'analyse de fiches de renseignements accompagnants les prélèvements (cf : 3.1.1. Surveillance nationale des cas de suspicion de borréliose de Lyme). 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 est régulièrement renouvelée.

Tableau : Collection détaillée d'immunsérums et LCR du CNR *Borrelia* en 2013

<i>Formes cliniques</i>	<i>Sérums</i>	<i>LCR</i>
<i>EM</i>	190	/
<i>NB</i>	114	110
<i>ACA</i>	44	/
<i>LCB</i>	26	/
<i>ART</i>	42	/
<i>Autres (EMM, Myosite,cardioborrélieuse, uvéite...)</i>	8	1
Total	424	111
<i>Autres échantillons (étude des réactions croisées)</i>	210	45

- Souches en 2013, nous avons enrichi notre collection de 5 souches de *B.garinii*, 4 *B. afzelii* et nous disposons actuellement d'une collection de 118 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*)

- 61 souches 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
- 13 souches de *B. garinii* isolées d'EM (11 souches), de lymphocytome cutané bénin (1 souche) et de LCR d'un patient atteint de neuroborréliose (1 souche)
- 39 souches de *B. afzelii* isolées d'EM (29 souches), 2 de lésions d'EMM (même patient), de lymphocytome cutané bénin (3 souches), d'acrodermatite chronique atrophique (4 souches), de myosite (1 souche)
- 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 possédons également en stock 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 isolées par nos soins 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 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.

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. Comme il n'existe pas de liste déposée auprès de l'ANSM, nous avons procédé par recoupement auprès de fournisseurs, de laboratoires d'analyses médicales, de sociétés proposant des EEQ pour ce paramètre en France. Les listes ci-dessous présentent ce que nous avons recensés et remis à jour en 2013.

Liste des tests de dépistage et de confirmation recensés en France

ELISA					
BORRELIA (Lyme) LISA	MEDAC	THERADIAG	TOTALES	SG (S)/LCR	ELISA
BORRELIA (Burgdorferi)	MEDAC	THERADIAG	G	SG (S)/LCR	ELISA
BORRELIA (Burgdorferi)	MEDAC	THERADIAG	M	SG (S)/LCR	ELISA
ENZYGNOST Lyme link VlsE	SIEMENS	SIEMENS	G	SG (S)/LCR	ELISA
ENZYGNOST Borreliosis	SIEMENS	SIEMENS	M	SG (S+P)	ELISA
Borrelia Liaison	DiaSorin	DiaSorin	G	SG (S+P)	ChimiL
Borrelia Liaison	DiaSorin	DiaSorin	M	SG (S+P)	ChimiL
VIDAS Lyme IgG	BioMerieux	BioMerieux	G	SG (S)/LCR	ELFA
VIDAS Lyme IgM	BioMerieux	BioMerieux	M	SG (S+P)	ELFA
VIDAS Lyme IgG/M	BioMerieux	BioMerieux	TOTALES	SG (S)	ELFA
Anticorps anti-Borrelia Select (IgG)	Euroimmun	Bioadvance	G		ELISA
Anticorps anti-Borrelia Plus VlsE (IgG)	Euroimmun	Bioadvance	G		ELISA
Anticorps anti-Borrelia (IgG)	Euroimmun	Bioadvance	G		ELISA
Borrelia burgdorferi ELISA (souche 2591)	Virotech GmbH	INGEN	G	SG/LCR	ELISA
Borrelia burgdorferi ELISA (souche 2591)	Virotech GmbH	INGEN	M	SG/LCR	ELISA
ELISA B. afzelii IgM Europe (souche PKo)	Virotech GmbH	INGEN	M	SG/LCR	ELISA
ELISA B. afzelii+VlsE IgG Europe (souche PKo)	Virotech GmbH	INGEN	G	SG/LCR	ELISA
LYME SIGN DUO G+M	Servibio	Servibio	TOTALES	SG (S+P)	IC
LYMETOP+	ALLDIAG	ALLDIAG	TOTALES	SG (S)	IC
Borrelia burgdorferi IgG Kit	VIRION SERION	ORGENTEC	G	SG (S+P)/LCR	ELISA
Borrelia burgdorferi IgG Kit	VIRION SERION	ORGENTEC	M	SG (S+P)/LCR	ELISA
Platelia Lyme IgG	Bio Rad	Bio Rad	G	SG (S+P)	ELISA
Platelia Lyme IgM	Bio Rad	Bio Rad	M	SG (S+P)/LCR	ELISA
recombWell Borrelia IgG	Mikrogen Diagnostik		G	SG (S+P)/LCR	
recombWell Borrelia IgM	Mikrogen Diagnostik		M	SG (S+P)/LCR	
Immunoblots					
Mastablot Borrelia IgG	MAST DIAGNOSTIC		G		WB
Mastablot Borrelia IgM	MAST DIAGNOSTIC		M		WB
EUROLINE-RN-AT IgG	Euroimmun	Bioadvance	G		Dot
EUROLINE-RN-AT IgM	Euroimmun	Bioadvance	M		Dot
EUROLINE-WB	Euroimmun	Bioadvance	G		WB
EUROLINE-WB	Euroimmun	Bioadvance	M		WB
Line Immunoblot IgG	Virotech GmbH	INGEN	G	SG/LCR	Dot
Line Immunoblot IgM	Virotech GmbH	INGEN	M	SG/LCR	Dot
Borrelia Europe plus Tpn17 LINE	Virotech GmbH	INGEN	G	SG/LCR	Dot
Borrelia Europe plus Tpn17 LINE	Virotech GmbH	INGEN	M	SG/LCR	Dot
ViraStripe Borrelia kit IgG	Servibio	Servibio	G	SG (S)	Dot
ViraStripe Borrelia kit IgG	Servibio	Servibio	M	SG (S)	Dot
LYMECHECK OPTIMA G	MICHROGEN	ALLDIAG	G	SG (S)	Dot
LYMECHECK OPTIMA M	MICHROGEN	ALLDIAG	G	SG (S)	Dot
RecomLine Dot G	MICHROGEN	DiaSorin	G	SG (S)	Dot
RecomLine Dot M	MICHROGEN	DiaSorin	M	SG (S)	Dot
EU Lyme + KSE Western Blot IgG	TRINITY BIOTECH	ORGENTEC	G	SG (S)	WB
LYME EU IgM	TRINITY BIOTECH	ORGENTEC	M	SG (S)	WB

Il est à noter la commercialisation d'un automate d'immunoblot de nouvelle génération. Il permet une automatisation de l'analyse à partir du tube primaire (identification des tubes, dilutions, incubations, lavages) ainsi que la transmission dans le système informatique du laboratoire. Les

bandes révélées sont ensuite scannées et évaluées par un logiciel de traitement d'image. Ce logiciel peut être connecté en bidirectionnel à une interface du laboratoire.

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

En 2013, nous avons évalué deux méthodes. Il s'agissait d'expertiser les résultats discordants obtenus par deux trousse commerciales en ELISA. Le résumé de cette évaluation est présenté ci-dessous.

2.1.3.2.1. Evaluation de deux tests d'ELISA *Borrelia* Liaison IgG et IgM Diasorin® et Enzygnost Lyme IgG et IgM Siemens®

Le but de l'étude initiale réalisée par un laboratoire d'analyses de biologie médicale, était de comparer les performances des deux trousse sur 62 échantillons pour les IgG et 60 échantillons pour les IgM. Ce laboratoire s'est adressé au CNR *Borrelia* pour expertise des échantillons présentant des résultats discordants.

Les seuils d'interprétation des trousse testées sont les suivants :

Trousses	Isotypes	Négatif	Douteux	Positif
Enzygnost sur Triturus	IgG et IgM	<9	9-11	>11
Liaison XL	IgG	<10	10-15	>15
	IgM	<18	18-22	>22

Résultats

Sur l'ensemble des échantillons de routine analysés et exploitables pour les deux coffrets, les résultats étaient les suivants :

	IgG	Liaison XL			
Enzygnost		Positif	Douteux	Négatif	Total
	Positif	32	0	0	32
	Douteux	1***	0	5	6
	Négatif	3*	1	20	24
	Total	36	1	25	62

	IgM	Liaison XL			
Enzygnost		Positif	Douteux	Négatif	Total
	Positif	13	0	17	30
	Douteux	0	0	0	0
	Négatif	3**	0	27	30
	Total	16	0	44	60

Le nombre de résultats discordants s'élève à 10/62 (16,1%) en IgG et à 30/60 (50%) en IgM.

Certains des échantillons analysés par les deux trousseaux ont été adressés au CNR pour expertise en ELISA Enzygnost® Siemens et western-blot maison. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Nbre d'échantillons à expertiser (n = 30)	Enzygnost® Triturus	Diasorin® Liaison XL	Expertise CNR Borrelia
3	IgM-	IgM+	1 IgM+ et 2 IgM-
3	IgG-	IgG+	1 IgG+ et 2 IgG-
1	IgGdtx	IgG+	1 IgG+
2	IgM+	IgM+	2 IgM+
8	IgM+/IgG-	IgM-	6 IgM+
3	IgM+/IgG+	IgM-	1 IgM+/2 IgG+
10	IgG+	IgG+	10 IgG+

En prenant la technique du CNR comme référence, ces observations montrent que les 12 sérums concordants par les deux techniques (2 en IgM et 10 en IgG) sont concordants avec les résultats du CNR.

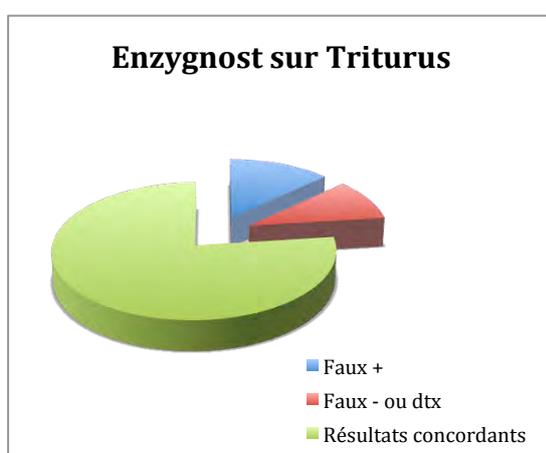
Les 14 sérums discordants en IgM par les deux techniques sont le fait de :

- 6 faux positifs : 4 par la technique Enzygnost® et 2 par la technique Diasorin®
- 8 faux négatifs : 1 par la technique Enzygnost® et 7 par la technique Diasorin®

Les 4 sérums discordants en IgG par les deux techniques sont le fait de :

- 2 faux positifs par la technique Diasorin®
- 1 faux négatif et 1 faux douteux par la technique Enzygnost®

Globalement pour la détection des IgG et IgM confondus, nous constatons que par rapport à l'expertise du CNR, les deux méthodes ont le même taux de faux positifs qui s'élève à 13%, la technique Diasorin® sur Liaison XL présente un taux de faux négatifs à 23% essentiellement en IgM. Ce taux est près de deux fois plus élevé que celui de la technique Enzygnost® sur Triturus qui est à 10% (2/3 en IgG et 1/3 en IgM).



En conclusion, le laboratoire d'analyses de biologie médicale a choisi la technique Diasorin® sur Liaison XL malgré la prépondérance des faux négatifs en IgM et cela pour des raisons d'organisation du flux des analyses réalisables avec cette technique. Ce laboratoire propose une surveillance plus systématique des cas de suspicion de borréliose aiguë avec un deuxième contrôle sérologique 3 semaines à 2 mois après la première sérologie.

2.1.3.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires

- **Destinataire** : Dr Cécile LEBRUN du CHU de Tours, PH au laboratoire de bactériologie
- **Méthode transférée** : protocole de la détermination d'ADN spécifique de *B. burgdorferi* *sl* par PCR en temps réel sur prélèvements humains : LCR, prélèvement synovial, biopsie cutanée.
-

2.2 Activités d'expertise de l'année 2013 du CNR des *Borrelia* (Laboratoire de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

En 2013, 8098 prélèvements ont été réceptionnés par le CNR *Borrelia* accompagnés de demandes de confirmation diagnostique de borréliose de Lyme principalement par sérologie et parfois par PCR \pm culture. Sur l'ensemble de ces prélèvements, le nombre d'analyses sérologiques réalisées par le CNR s'élève à 10 201. Parmi ces analyses, 10,8% ont été réalisées à titre gratuit car elles étaient accompagnées d'une fiche de renseignements cliniques et épidémiologiques. Ce taux représente 1106 analyses réalisées sur 754 soit 9,3% de l'ensemble des prélèvements reçus. Le recueil de ces 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 de *B. burgdorferi* *sl* réalisées en 2013

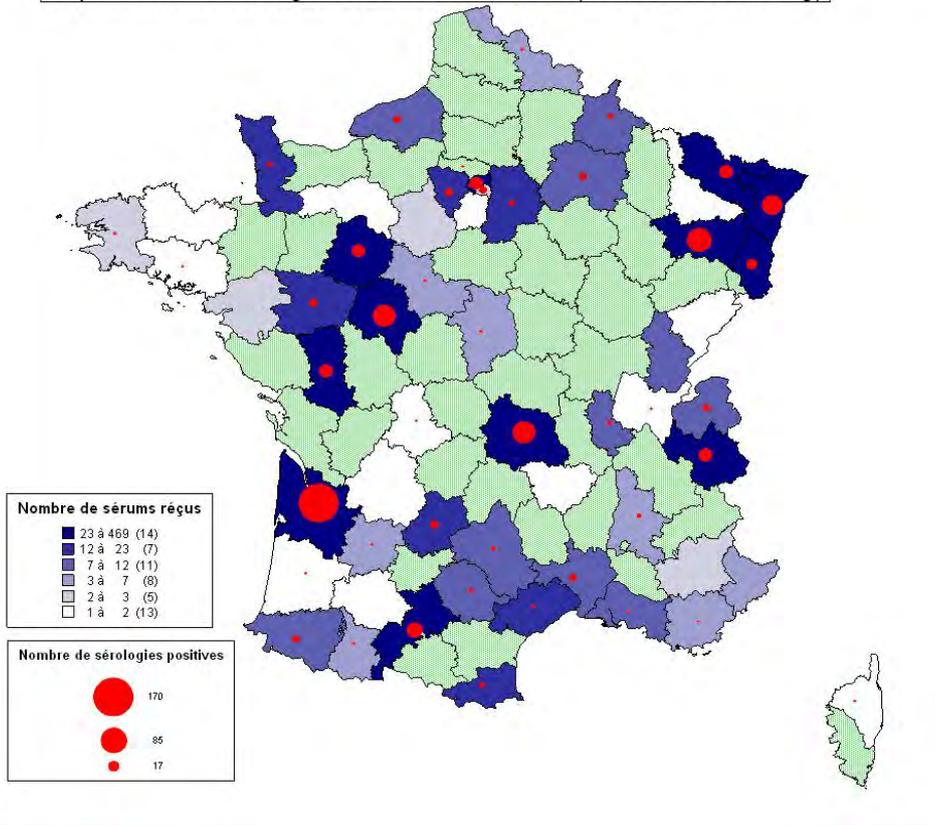
2.2.1.1. Sérologies de dépistage par ELISA

En 2013, nous avons réalisé 7464 sérologies de dépistage sur 5829 sérums, 1628 LCR et 7 liquides articulaires. Ils provenaient de 59 départements répartis sur le territoire national. Cette activité est stable par rapport à 2012.

Origine géographique (hors CHU de Strasbourg) des résultats positifs pour les sérologies de dépistage adressées au CNR des *Borrelia* en 2013

En France, hors CHU de Strasbourg, les demandes émanaient de 59 départements et représentaient 1893 analyses. La carte ci-dessous objective les départements demandeurs et le nombre d'analyses positives en sérologie de dépistage ELISA.

Répartition des sérologies demandées en 2013 (hors CHU Strasbourg)



Les départements en vert ne nous ont adressé aucune demande. En Alsace les nombreuses demandes du CHU de Strasbourg ont été exclues volontairement, elles sont analysées par la suite dans un paragraphe dédié.

Ces demandes nationales (hors CHU de Strasbourg) concernaient :

- 1255 sérums dont 501 (39,9%) étaient positifs
- 633 LCR dont 212 (33,5%) étaient positifs
- 5 liquides articulaires dont 5 (100%) était positifs

Au total, 718 (37,9%) 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 2013

En Alsace, zone d'endémie de la borréliose de Lyme, en 2013 les demandes représentaient 5737 analyses, soit 3 fois plus que les demandes nationales dont 5571 (97,1%) venant du CHU de Strasbourg et 166 (2,9%) hors CHU. La nature des échantillons biologiques adressés au CNR (sérum, LCR et liquide articulaire) était superposable entre le CHU de Strasbourg et les demandes hors CHU, soit près de 82% de sérums et 18% de LCR.

Les demandes d'Alsace hors CHU étaient réparties de la façon suivante :

- 106 sérums dont 55 (52%) positifs
- 59 LCR dont 11 (18,6%) positifs
- 1 liquide articulaire dont 1 positif

Sur ces 166 demandes, 67 (40,4%) 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, soit respectivement de 37,7% et de 40,4%.

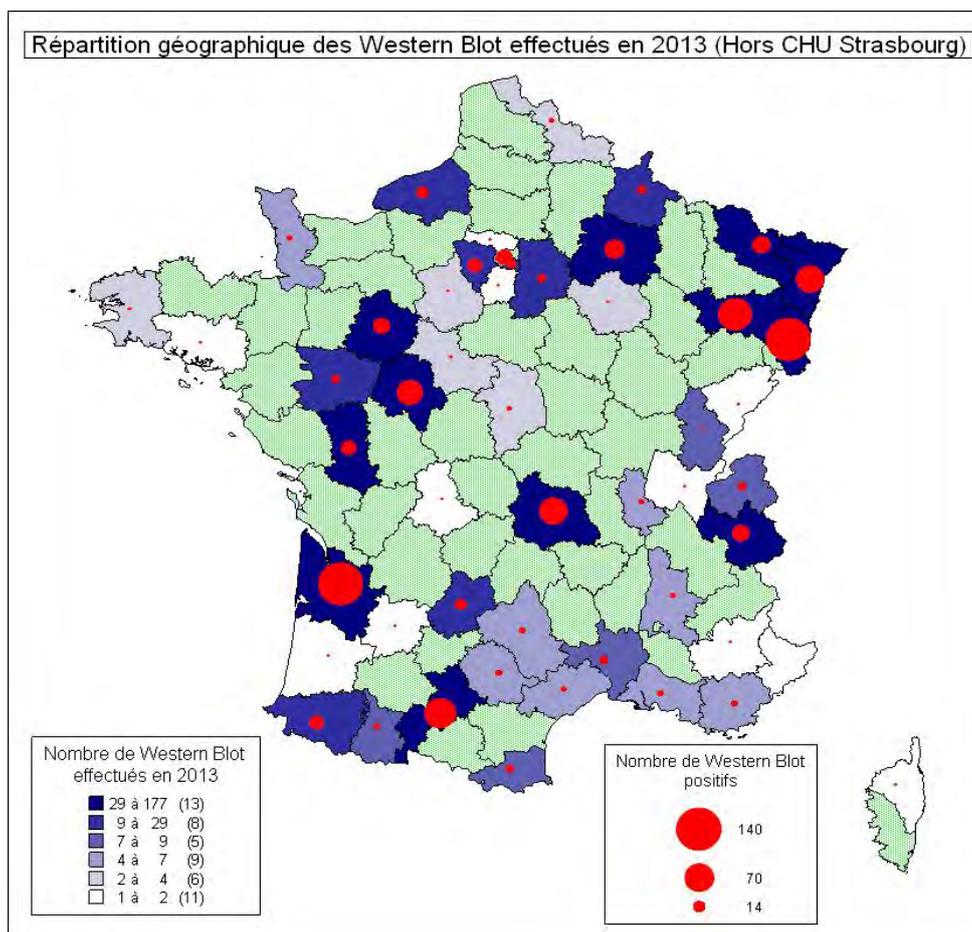
2.2.1.2. Sérologies de confirmation par western-blot (immuno-empreinte)

En 2013, nous avons réalisé 2466 confirmations par western-blot (WB). Cette activité est stable par rapport à 2012. Souvent, seule l'immunoempreinte nous était demandée sur des sérums déjà dépistés positif en ELISA par les laboratoires demandeurs. Le WB étant une technique de confirmation de spécificité, il n'est pas systématiquement réalisé. Certains laboratoires, notamment en faible zone d'endémie, préfèrent externaliser ces prestations.

Ces confirmations en WB ont été réalisées sur 2054 sérums, 405 LCR et 7 liquides articulaires. Sur ces 2466 analyses, 1609 étaient positives par WB, soit 65,2%. Par conséquent, 34,8% 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 WB 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 2013 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 CHU de Strasbourg, représentaient 1228 analyses. Sur la carte ci-dessous représentant le nombre de demandes par département et le nombre de WB positifs en sérologie de confirmation. Les départements en vert ne nous ont adressé aucune demande. En Alsace, les demandes du CHU de Strasbourg ont été exclues volontairement car elles sont analysées par la suite dans un paragraphe dédié.



Ces demandes nationales (hors CHU) concernaient :

- 943 sérums dont 759 (80,4%) positifs
- 280 LCR dont 198 (70,7%) positifs
- 5 liquides articulaires, tous détectés positifs

En moyenne, la spécificité des anticorps a bien été confirmée par western blot pour 78,3% des prélèvements initialement dépistés positifs en ELISA.

Sur l'ensemble de ces demandes, 309 prélèvements, soit environ 25%, ont été adressés seulement pour confirmation WB. Parmi ces 309 demandes, 242 (78,3%) positifs.

La similitude des pourcentages de confirmation par WB objective une amélioration de la standardisation de la spécificité des trousse ELISA utilisées sur l'ensemble du territoire.

Répartition des sérums testés en WB en Alsace, hors CHU et des résultats positifs pour les sérologies de confirmation adressées CNR des Borrelia en 2013

Cette année, en Alsace, 1483 western-blot ont été réalisés par notre laboratoire. Parmi ces analyses, 1114 (75,1%) étaient positives. Selon la nature du prélèvement, les demandes étaient réparties de la manière suivante :

- 1294 sérums dont 1005 (77,6%) positifs
- 177 LCR dont 106 (60%) positifs
- 3 liquides articulaires détectés positifs

Les demandes du CHU de Strasbourg étaient majoritaires, elles représentaient 1246 analyses (84%). Les demandes hors CHU ont généré 237 analyses (16%). La spécificité des anticorps a été confirmée par western blot pour 75,6% des prélèvements initialement dépistés positifs ou douteux en ELISA.

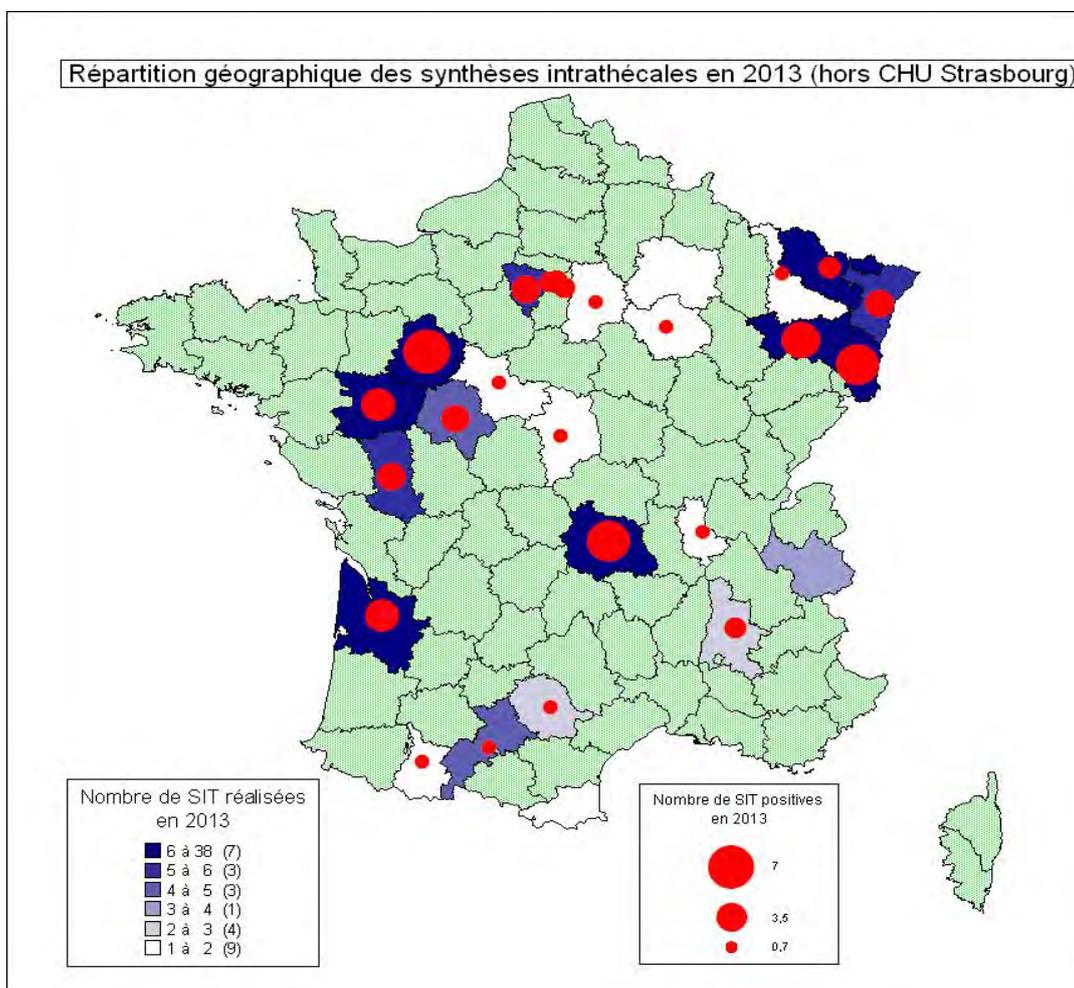
2.2.2. Etude de la synthèse intrathécale spécifique anti *B. burgdorferi* sensu lato

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 en 2013, à diffuser 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.

En 2013, l'ensemble des demandes de SIT s'élevait à 830, dont 568 (68,4%) n'ont pas été réalisées faute de sérologie significative dans le sérum et/ou le LCR. Dans ce cas, la recherche de SIT n'est pas indiquée.

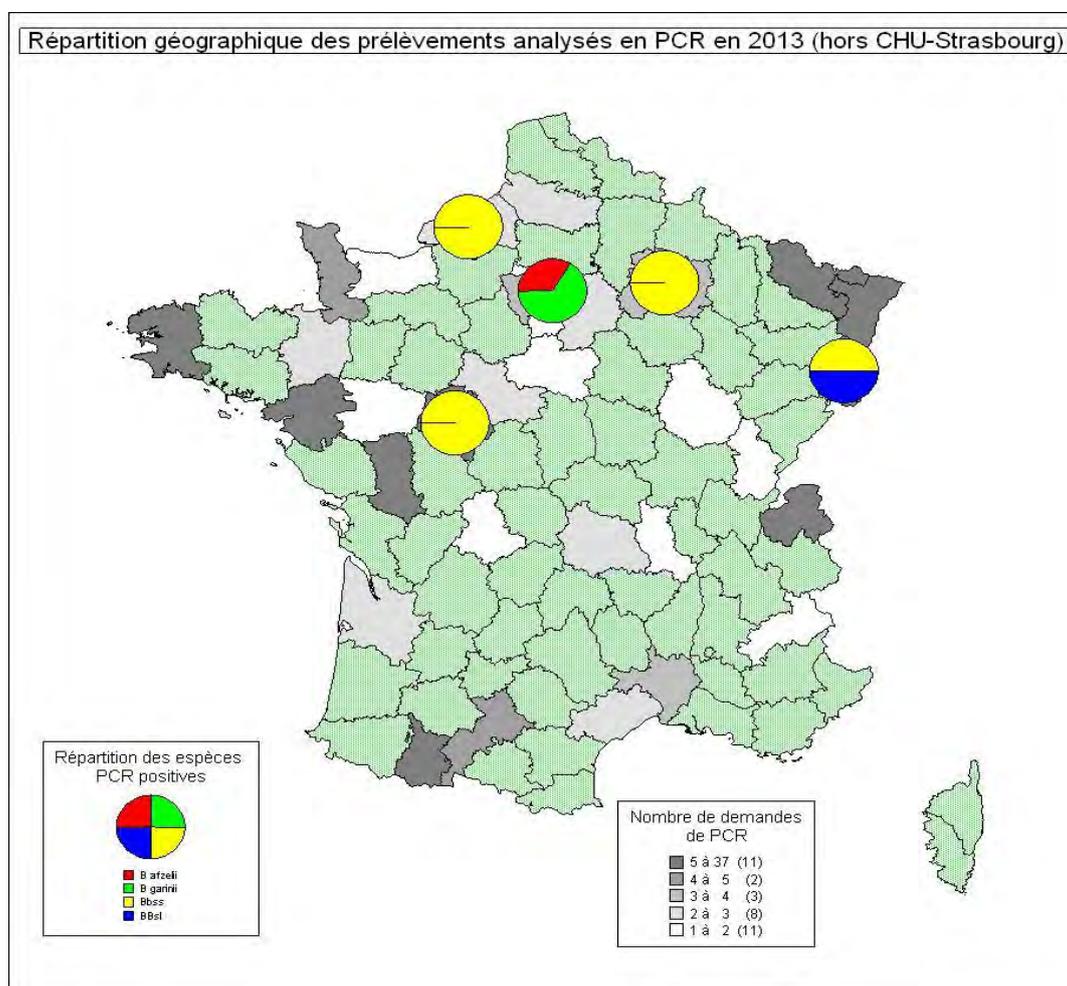
Au total, les 262 demandes de SIT réalisées nous ont été adressées de 17 départements. Les cliniciens du CHU de Strasbourg en ont prescrit 88, par ailleurs 174 autres demandes nous ont été adressées par différents laboratoires (principalement de CH et de CHU). Globalement, le nombre de demandes extérieures au CHU de Strasbourg s'est maintenu depuis 2011.



Le nombre d'analyses positives était de 83, soit 31,7%, permettant d'affirmer dans ce cas le diagnostic de neuroborréliose. Inversement, dans 68,3 % des cas où la sérologie était positive dans le LCR sans détection de SIT spécifique, ce test a permis d'éliminer ce diagnostic.

2.2.3. Activité d'expertise PCR du CNR *Borrelia* en 2013

En 2013, 175 prélèvements provenant de 36 départements ont été adressés au CNR pour recherche de *Borrelia* par PCR (carte ci-dessous). Ce nombre de demande a augmenté de 60% par rapport à l'année précédente.



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

Parmi les prélèvements reçus, on comptait 82 LCR, 55 prélèvements articulaires et 38 prélèvements divers (biopsies : cutanée, de disque vertébral, musculaire, rénale, de tissu profond, extrait ADN de valve cardiaque, humeur aqueuse et vitrée, sang, plasma et sérum). Ainsi, près de 47% des prélèvements adressés étaient des LCR mais 1 seul était positif (0,6%). Dans cet échantillon, l'ADN correspondait à *B. garinii*. Ce très faible pourcentage de positivité souligne la difficulté diagnostique directe 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 (recherche de SIT spécifique et non recherche d'ADN par PCR). Parmi les prélèvements articulaires reçus (n = 55), 9 étaient positifs (15,3%) : 5 à *B. burgdorferi* sensu stricto, 2 à *B. afzelii*, 1 à *B. garinii* et 1 non typable. Parmi les 38 prélèvements divers, seule une biopsie cutanée était positive (2,6%). Il s'agissait d'un EM dû à *B. garinii*.

Parmi les prélèvements articulaires reçus (n = 55), 9 étaient positifs (15,3%) : 5 à *B. burgdorferi* sensu stricto, 2 à *B. afzelii*, 1 à *B. garinii* et 1 non typable. Comme en 2012, les cas d'arthrite

constituaient la majorité des infections à *B. burgdorferi* si mises en évidence par PCR. L'origine géographique des cas était diverse (Alsace, Tours, Reims, région parisienne). Il s'agissait d'enfants dans plus de la moitié des cas. Le tableau clinique était une monoarthrite du genou dans tous les cas renseignés avec une sérologie fortement positive dans le sérum, conformément à la définition de l'EUCALB. Dans deux cas, la monoarthrite était récidivante chez un enfant insuffisamment traité par Bristopen® et chez un adulte traité par corticoïdes et Méthotrexate pour rhumatisme inflammatoire.

Enfin, parmi les 38 prélèvements divers, seule une biopsie cutanée était positive (2,6%). Il s'agissait d'un EM atypique dû à *B. garinii*. Parmi ces prélèvements, nous avons analysé plusieurs échantillons cardiaques post-mortem d'une jeune patiente du CHU de Reims atteinte de cardiomyopathie dilatée séronégative pour *Borrelia* pour laquelle les cardiologues avaient une très forte suspicion d'atteinte liée à *Borrelia*. Tous les prélèvements étaient négatifs en PCR *Borrelia*. Cela nous a conduit à réaliser avec le laboratoire de Virologie du CHU de Reims une étude sérologique sur 27 patients atteints de ce type de pathologie et inclus dans un protocole d'étude (protocole CardioVir) du CHU de Reims afin de tester l'hypothèse d'un rôle de *Borrelia* dans cette pathologie ; un seul était séropositif, soit une séoprévalence identique à celle de la population générale.

Espèces de *Borrelia* détectées en PCR en 2013 selon la nature des prélèvements

Espèce de <i>Borrelia</i>	Prélèvements articulaires	LCR	Divers	Total
<i>B. afzelii</i>	2 (liquide synovial)	0	0	2
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	5 (liquide synovial)	0	0	5
<i>B. garinii</i>	1 (liquide synovial)	1	1 (EM)	3
<i>B. burgdorferi</i> si non typable	1 (liquide synovial)	0	0	1

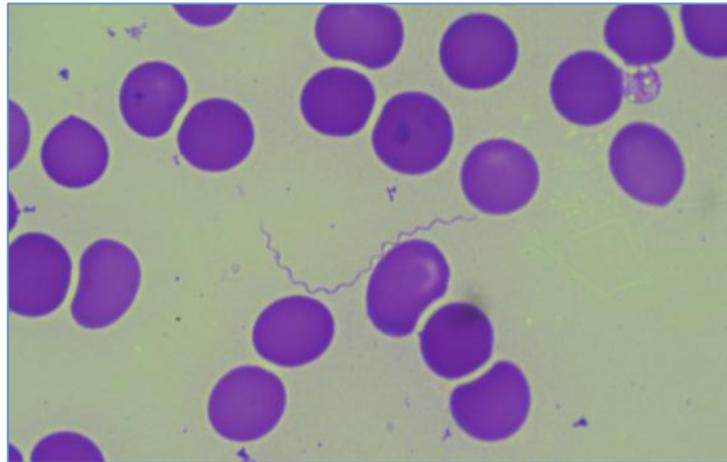
2.2.3.2. Expertise de prélèvements humains pour le diagnostic de fièvres récurrentes

En 2013, nous avons réceptionné 7 demandes d'analyses pour suspicion de fièvres récurrentes entre juillet et décembre 2013. Les prélèvements provenaient de la région parisienne pour 5 d'entre eux (Pitié Salpêtrière, Paris ; Saint Antoine, Paris ; Lariboisière, Paris ; CH Sainte Camille, Bry sur Marne) et de province pour 2 d'entre eux (CH Grenoble, CHU Lille).

Parmi les patients, on comptait un enfant âgé de 11 ans, un adolescent de 17 ans et 5 adultes (3 hommes et 2 femmes) âgés de 26 à 64 ans. La majorité de ces patients avaient séjourné en Afrique (Sénégal, Togo, Maroc). La majorité d'entre eux présentaient des fièvres récurrentes accompagnées ou non de signes associés (adénopathies, hépato-splénomégalie, CRP élevée de 100 à 300 mg/l). Sur ces 7 demandes, deux étaient positives. Un de ces patients positif avait séjourné au Maroc. Sa fièvre était accompagnée d'hépatosplénomégalie et d'une CRP à 300 mg/l. Son frottis sanguin coloré au MGG était négatif, tandis que la PCR spécifique sur sang total était positive à *B. hispanica*. Ses symptômes ont régressé sous traitement par Doxycycline® avec la survenue d'une réaction d'Herxheimer lors de son administration. L'autre patient positif avait séjourné au Sénégal et sa fièvre était accompagnée d'un syndrome inflammatoire franc avec une CRP à 189 mg/l. Son frottis sanguin coloré au MGG était positif (cf : photo ci-après) ainsi que la PCR spécifique de *Borrelia* de fièvres récurrentes sur sang total. Cependant la séquence d'ADN détectée n'a pas pu être typée.

Parmi les 5 patients négatifs, l'un d'entre eux présentait une méningite lymphocytaire et une sérologie de borréliose de Lyme faussement positive en ELISA, non confirmée par empreinte. Un autre présentait une myocardite de cause indéterminée évoluant depuis un an, sa sérologie de borréliose de Lyme était négative. Enfin, la patiente négative ayant séjourné au Togo a vu ses symptômes régresser sous traitement par Rocéphine®.

Photo de *Borrelia* de fièvre récurrente



(L. Zilliox, CNR *Borrelia*, Strasbourg)

► **Envois extérieurs de matériel biologique du CNR *Borrelia* en 2013**

En 2013, le CNR *Borrelia* a procédé à plusieurs envois extérieurs nationaux. Ces envois de matériels biologiques (ADN et/ou culots bactériens de *B. burgdorferi* sensu lato) 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 dans le cas de l'expertise de prélèvements autopsiques.

Date d'envoi	Matériel biologique	Souche	Raison	Destinataire
14/02/2013	Biopsies cutanées	<i>Borrelia afzelii</i>	Projet de recherche protéomique <i>Borrelia</i>	Gilles Schnell IPHC-ECPM Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique (Strasbourg)
25/09/2013	Antigène	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto (297)	Sérologie <i>Borrelia</i> sur les rongeurs du Grand Est	Franck Boue Unité pathologie des animaux sauvages Anses. Laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy (Malzéville)
22/10/2013	Extraits d'ADN	/	Expertise de prélèvements autopsiques	Dr Fanny RENOIS (AHU) Laboratoire de Virologie Médicale et Moléculaire (CHU Reims)
12/12/2013	Culots bactériens	<i>Borrelia afzelii</i> (IBS 52, IBS 53) <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto (297)	Projet de protéomique <i>Borrelia</i>	Laurence Sabatier IPHC-ECPM Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique (Strasbourg)
18/12/2013	Culots bactériens	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto (c297/4)	Projet de protéomique <i>Borrelia</i>	IPHC-ECPM Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique (Strasbourg)

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

Le CNR des *Borrelia* centralise tout au long de l'année des données provenant de différents axes de surveillance :

- 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
- surveillance de la diversité des souches pathogènes humaines réalisée *via* un Projet de Recherche Interne « biopsies cutanées » démarré lors du mandat précédent
- surveillance régionale des cas d'anaplasmoose granulocytaire humaine dans la région Est

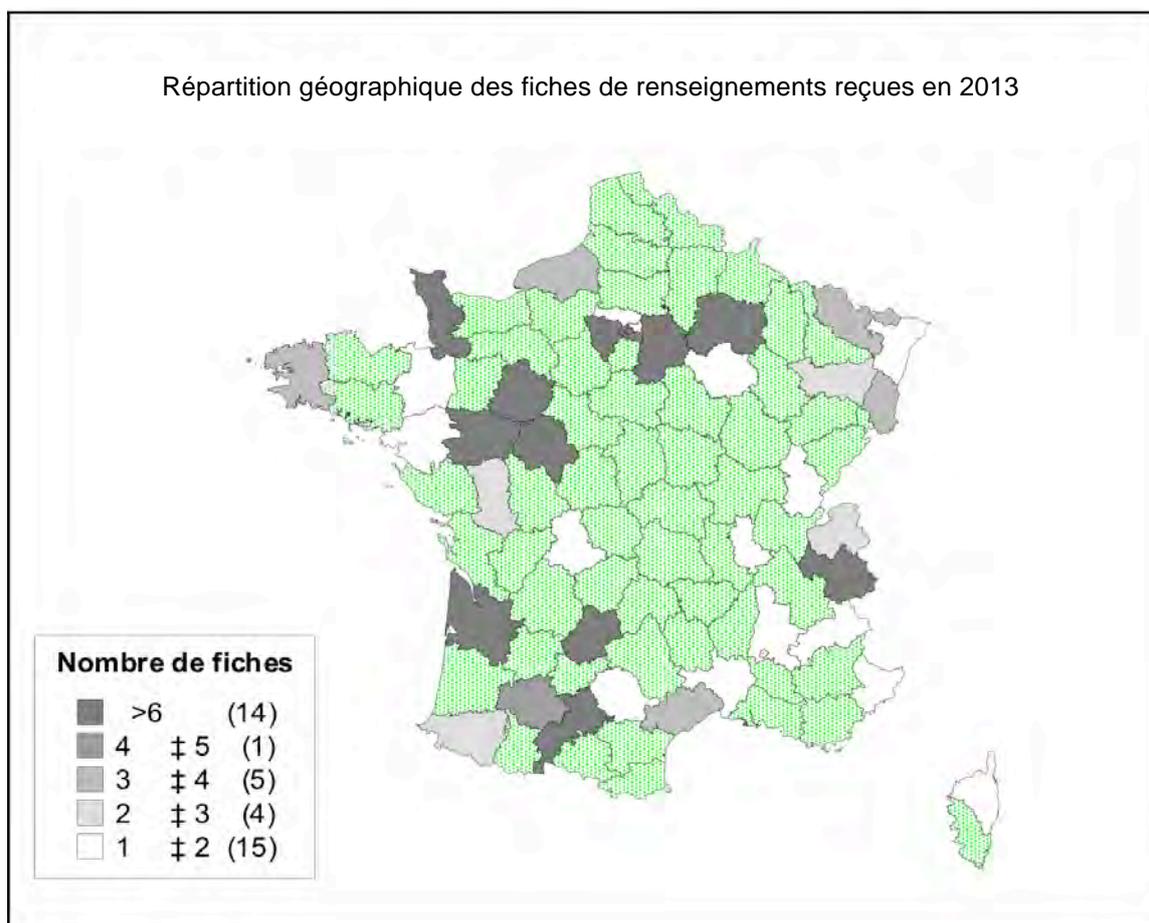
Les données ci-dessous rendent compte et synthétisent ces activités en 2013, en insistant sur les différentes catégories cliniques recensées durant cette année.

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 2013 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 2013 du CNR des *Borrelia*, les résultats biologiques issus du serveur de résultats d'analyses. 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 2013, 539 fiches de renseignements ont été recensées contre 458 en 2012 (+15%). Parmi ces fiches, 3,3% (18 sur 539) ont été mal remplies voire totalement inexploitablees contre 4,8% en 2012, on note donc une tendance à l'amélioration.



Les fiches proviennent principalement de grandes villes comportant un Centre Hospitalier Universitaire (CHU) comme Toulouse (121 fiches soit 22,4%), Bordeaux (106 fiches reçues soit

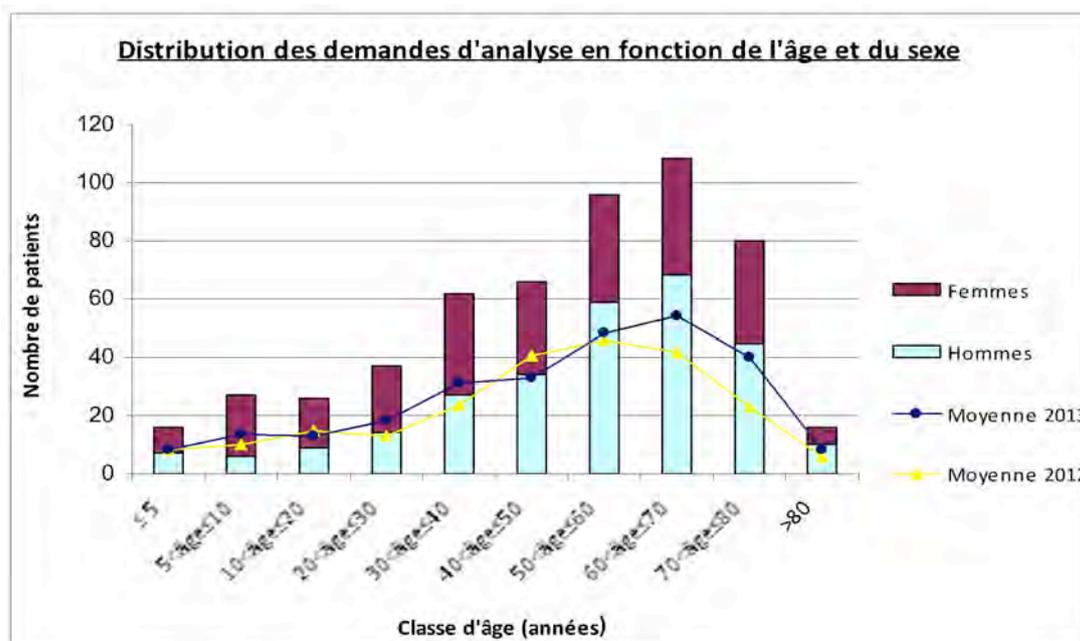
19,7%), Le Mans (62 fiches soit 11,5%), Tours (55 fiches soit 10,2%) ou Reims (31 fiches soit 5,8%). Le reste des demandes proviennent d'environ 50 autres établissements répartis sur l'ensemble du territoire. Dans ces derniers, le nombre de demandes varie globalement de 1 à 20.

Par rapport à l'an dernier, on constate une augmentation marquée des fiches provenant de Toulouse de près de 7% (22,4% contre 15,5% en 2012), et une diminution de 6% des demandes de Chambéry (0,9 % en 2013 contre 6,8% en 2012).

En général, ces demandes proviennent de centres hospitaliers qui ne sont pas totalement équipés pour le sérodiagnostic de la borréliose de Lyme (nombre de prescriptions faibles) ou correspondent à des problèmes diagnostiques ponctuels (25 centres).

On recense 52,3% de cas masculins (282/539) et 47,7% de cas féminins (257/539). Le sexe ratio des patients était de 1,1 en 2013 contre 0,86 en 2012.

Le graphique ci-dessous représente le nombre de patients en fonction de l'âge et du sexe.



L'âge des patients variait de 3 mois à 95 ans. On remarque qu'il n'y a pas de différence significative entre les hommes et les femmes. Les patients de 50 à 80 ans sont les plus concernés par les analyses pour diagnostic de borréliose : l'hypothèse étant que cette catégorie est plus exposée au risque de contamination (augmentation des loisirs en pleine nature,...).

On voit également que les courbes moyennes des demandes d'analyse en fonction de l'âge et du sexe suivent quasiment le même tracé en 2012 et en 2013.

Parmi les patients recensés, 101 patients (18,7% contre 12,9% en 2012) ont présenté au moins un diagnostic certain d'infection à *Borrelia* toutes manifestations cliniques confondues selon la définition des cas de l'EUCALB (annexe 2).

Parmi ces diagnostics certains, on retrouve :

- 50 cas d'érythèmes migrants (49,5%)
- 33 cas de neuroborrélioses (32,7%)
- 12 cas d'arthrites de Lyme (11,9%)
- 1 cas d'atteinte cardiaque due à *Borrelia* (1%)
- 5 cas d'atteintes oculaires dues à *Borrelia* (5%)

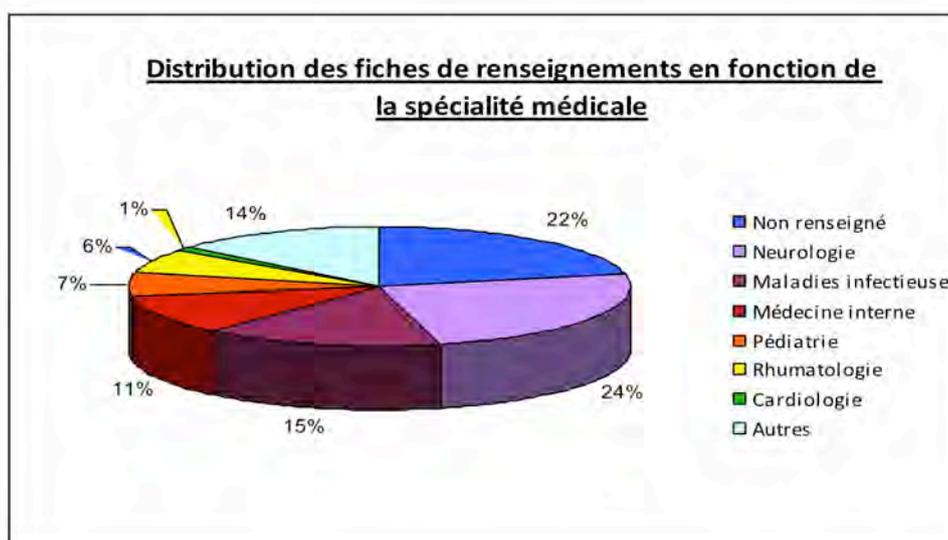
Le taux d'érythèmes migrants (EM) et de neuroborrélioses (NB) se maintient par rapport à 2012 (EM 2012 : 44,1% et NB 2012 : 30,5%).

Les différents facteurs de risque des patients recensés en 2013 ont été évalués. Le profil des patients en fonction de leur facteur de risque est semblable à celui de 2012. On voit que le risque de présenter un diagnostic certain à Borrelia est plus important en pratiquant une activité de loisir en pleine nature qu'en étant en contact avec des animaux (24,8% contre 19,8%).

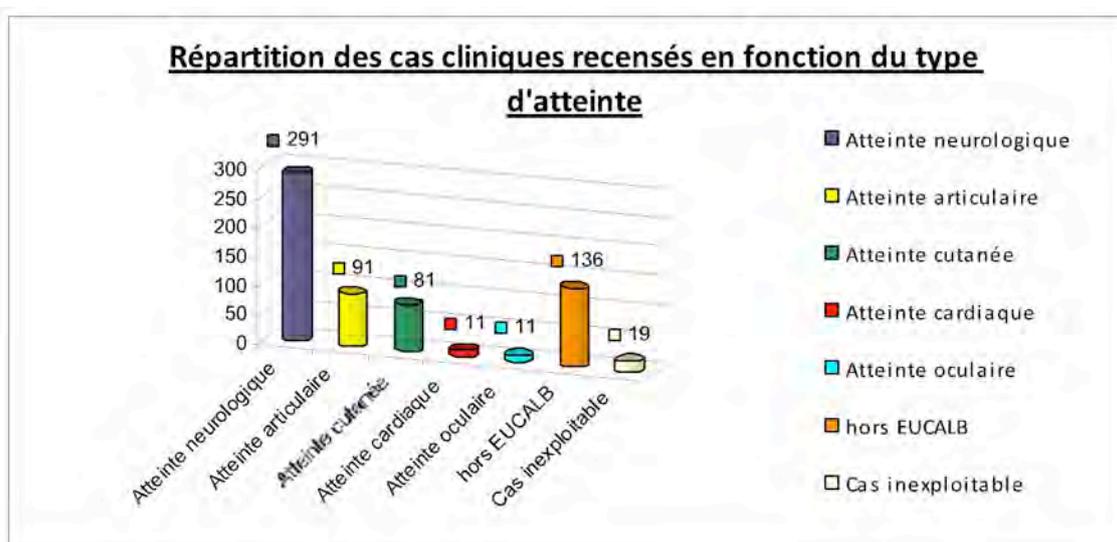
La majorité des fiches réceptionnées provenaient de Centres Hospitaliers Universitaires (380/539 soit 70,5%) et de Centres Hospitaliers (147/539 soit 27,3%). Soit 97,8% provenant d'un hôpital (contre 92,6% en 2012). La majorité des fiches ne renseignaient pas la spécialité médicale d'origine (117/539 soit 21,7% contre 29,3% en 2012). Cependant la neurologie reste la spécialité la plus rencontrée (129/539 soit 23,8% contre 27,9% en 2012). Ceci est principalement dû au fait que les diagnostics s'orientent le plus souvent vers des neuroborrélioses.

Les 293 fiches restantes (soit 54,4 %) provenaient d'autres spécialités, principalement de maladies infectieuses, médecine interne, pédiatrie et rhumatologie. La catégorie « Autres » regroupe des spécialités peu représentées comme les urgences, la dermatologie, la microbiologie, la réanimation, l'hématologie, l'ORL, la gériatrie, la biologie médicale, la néphrologie...

La répartition des fiches en fonction des spécialités est semblable à l'an passé, avec une part un peu plus importante des fiches de rhumatologie (2% en 2012) et de médecine interne (7% en 2012).



Les différents cas cliniques de l'année 2013 ont été classés par type d'atteinte d'après les critères diagnostiques de l'EUCALB (cf. annexe 2) et les renseignements complémentaires utiles. Ils sont représentés sur le graphique suivant.



On remarque que les atteintes neurologiques sont les atteintes pour lesquelles il y a le plus de demandes de diagnostic (54 % soit 291 demandes sur 539). Les atteintes articulaires arrivent en deuxième position (16,9 % soit 91 demandes sur 539) suivis par les atteintes cutanées (15 % soit 81 demandes sur 539). Cette répartition est peu différente de celle observée en 2012 où on avait (atteinte neurologie 60,3%, atteinte articulaire 19%, atteinte cutanée 10,9%). Les atteintes cutanées regroupent les érythèmes migrants, les lymphomes cutanés bénins et les acrodermatites chroniques atrophiantes. Les autres types d'atteintes sont plus rares (4,1 % soit 22 demandes sur 539).

Il est à noter que dans 16 % des cas (soit 86 cas sur 539), les patients présentaient au moins deux atteintes à la fois. Chez ces patients, on rencontrait le plus souvent l'association entre atteintes neurologique et cutanée (34,9 % soit 30/86). 24,4 % (21/86) des cas présentaient une atteinte neurologique associée à une manifestation articulaire et 14 % (12/86) des cas présentaient une manifestation cutanée aiguë associée à une manifestation articulaire. En 2013, on note une diminution de moitié des cas présentant une association atteinte neurologique et articulaire, cela semble inhérent à une meilleure définition des cas d'arthrite.

En 2013, on observe une augmentation des cas « hors EUCALB » d'environ 8% par rapport à 2012. Ce sont des cas pour lesquels les symptômes décrits pour l'analyse demandée n'entraient pas dans les critères définis par l'EUCALB. Ces cas remplacent les « non-cas » définis en 2012 (17%) pour lesquels l'analyse demandée n'était pas indiquée. En 2013, ont été considérés comme des cas « hors EUCALB », 25,2 % des demandes de diagnostic (136/539). Chez la plupart de ces patients, une borréliose a été suspectée face à des symptômes peu spécifiques (algie, asthénie, fièvre, lésion cutanée atypique hors EM,...) voire inappropriés (vertiges, épilepsies, hépatites, syphilis, troubles mnésiques, péricardite,...). Parmi ces demandes « hors EUCALB », on a quand même dénombré une neuroborréliose possible, 10 improbables et 8 indéfinissables, une atteinte articulaire possible et 11 improbables, un érythème migrant improbable et une atteinte oculaire improbable.

Enfin, 3,53 % des cas (19/539) sont inexploitable par manque d'informations cliniques sur le patient (absence de fiche de renseignements spécifiques du CNR ou défaut de remplissage).

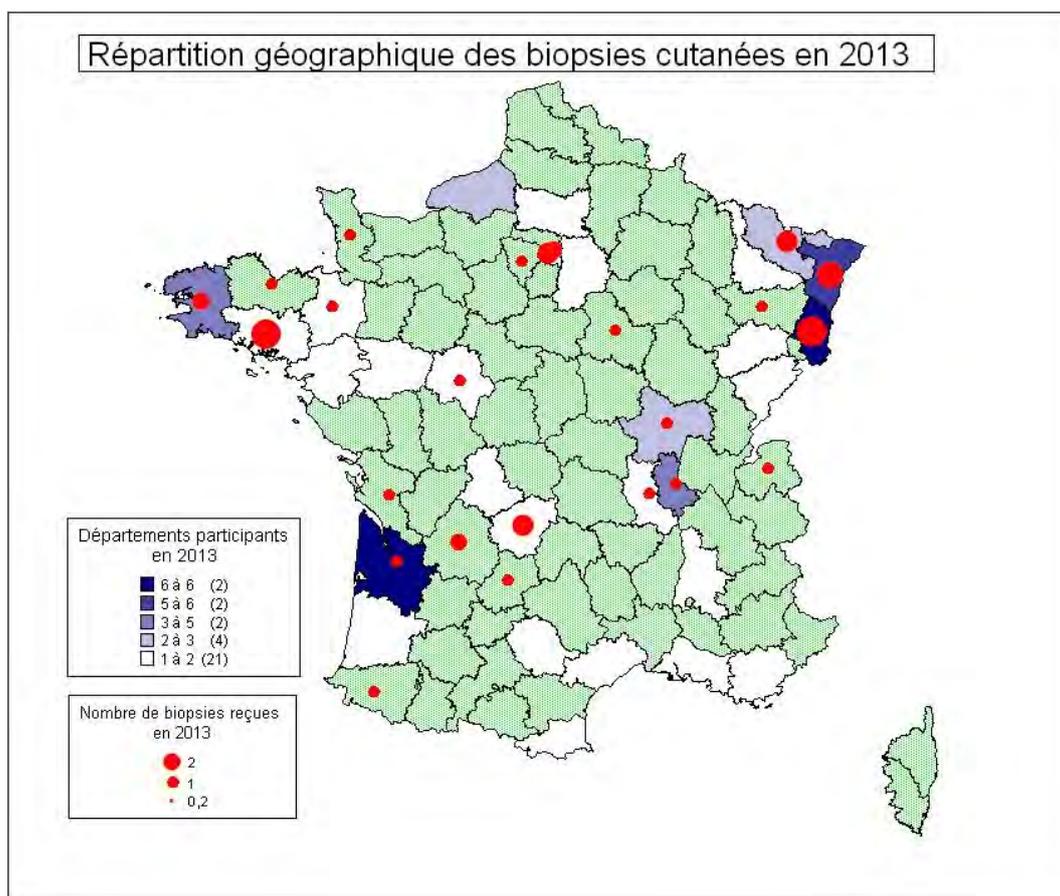
Face à ces observations, il convient de rappeler que l'activité d'information du CNR reste primordiale afin de sensibiliser les prescripteurs à la définition des cas de l'EUCALB et à l'intérêt d'un remplissage correct des fiches de renseignements.

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

Durant le mandat précédent, nous avons débuté l'analyse prospective de biopsies cutanées de patients présentant des lésions typiques ou atypiques dans le cadre d'une suspicion d'infection à *Borrelia burgdorferi* *sl.* Ces prélèvements nous ont été adressés de toute la France essentiellement par des dermatologues, mais également par quelques infectiologues et internistes. Tous les prélèvements viennent d'adultes nés entre 1921 et 1995, et sont conformes au protocole accepté par le CPP. Le financement des réactifs et consommables de ce protocole a été assuré jusqu'en 2012 par une bourse de la Société Française de Dermatologie.

Un financement complémentaire a été obtenu en 2013 auprès de la Société Française de Dermatologie pour poursuivre ce travail et couvrir les frais de consommables. Les analyses sont effectuées par le personnel du CNR *Borrelia*.

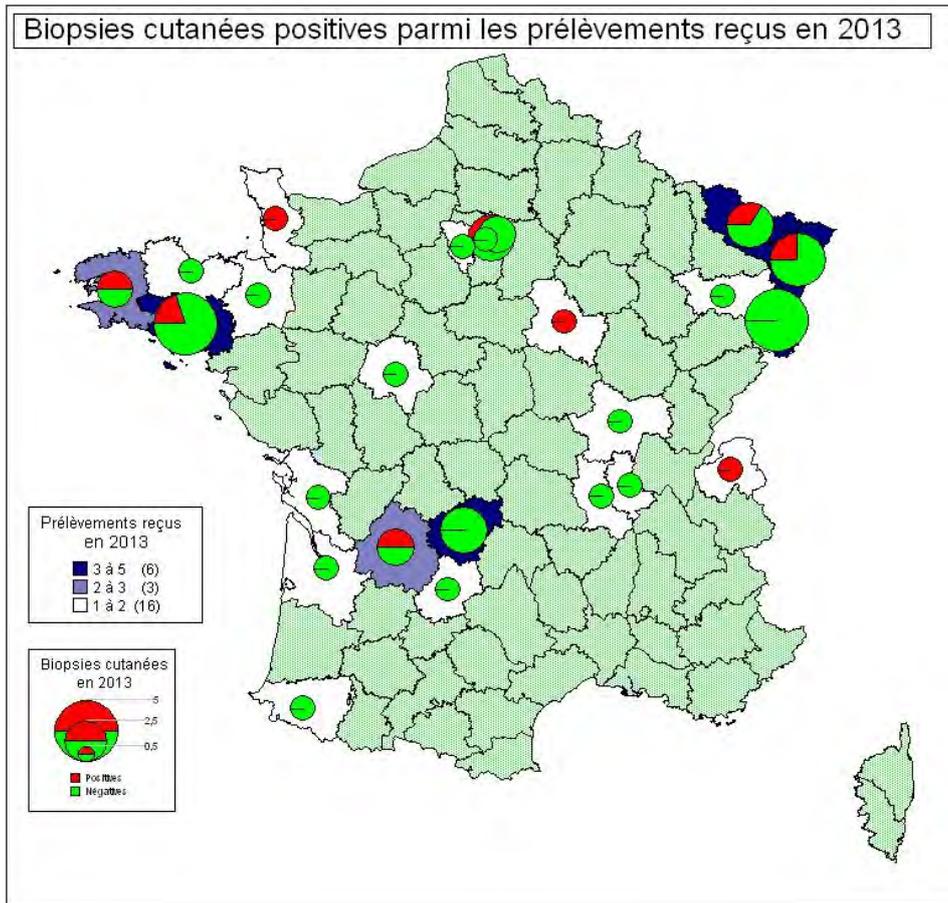
Pendant l'année 2013, nous avons ainsi reçu 45 prélèvements. Ces biopsies nous ont été adressées par 30 participants de départements différents répartis sur l'ensemble du territoire (cf carte ci-après). Parmi les participants, 22 nous ont adressé 1 seule biopsie cutanée et 8 nous ont adressé de 3 à 5 biopsies dans l'année.



Parmi les 45 prélèvements qui nous ont été adressés, 23 (51%) l'ont été pour suspicion d'EM, 10 (22%) pour suspicion d'ACA et 2 (4%) pour suspicion de lymphocytome cutané bénin. Dans 7 cas (15,5%), les lésions étaient très atypiques (hypodermite nodulaire, érythème maculeux réticulé, granulome annulaire, *livedo racemosa*, morphée).

Proportions de prélèvements (PCR et culture) négatifs et positifs

Parmi les 45 prélèvements reçus, 10 cas (22%) étaient positifs par PCR dont 2 cas (4,4%) l'étaient également par culture. La détection par PCR spécifique est de sensibilité supérieure à la culture malgré l'envoi systématique en milieu de transport fourni par le CNR.



Les échantillons positifs venaient plus fréquemment du Nord de la France (Bretagne, Normandie, Ile de France, Alsace, Lorraine) et plus rarement de la moitié sud (Dordogne, Haute-Savoie).

Analyse des suspicions d'EM (n= 23)

Une notion de piqure de tiques est rapportée dans 13 cas (56,5%) avec une date précisée dans 10 cas (43%). La durée d'attachement de la tique (de 1h à 72 h) est mentionnée dans 7 cas (30%). La localisation de la lésion était précisée dans 21 cas (91%) avec une prédominance sur les membres inférieurs (61%).

Il s'agissait majoritairement de lésion unique dans 18 cas (78%), alors que des localisations multiples étaient présentes dans 5 cas (22%). Cette répartition est quasiment identique à celle observée depuis 2011.

Parmi les lésions uniques, 14 lésions (78%) étaient à centre clair et 2 lésions (11%) étaient homogènes (2 cas non renseignés). Parmi les 5 EMM, 3 étaient à centre clair (60%) et 1 homogène (20%) (1 non renseigné). Ces proportions sont similaires à celles de 2012.

Le diamètre de la lésion au moment du diagnostic variait de façon importante, de 5 cm à 85 cm. La répartition montre que 14/23 des lésions étaient inférieures à 20 cm (61%).

Le délai d'apparition des lésions était rapporté dans 4 cas seulement (17%) et il variait de 1 à 45 jours. L'EM est une lésion indolore, le diagnostic était souvent tardif entre 1 et 2 mois.

Les signes associés étaient signalés dans 48% des cas. Un prurit était rapporté dans 6 cas (26%), des sensations de brûlures dans 3 cas (13%), des douleurs dans 2 cas (9%) et des paresthésies dans 2 cas (9%). Une antibiothérapie préalable au prélèvement avait déjà été mise en route dans 5 cas (22%) dont les biopsies étaient négatives dans 100% des cas. Après prélèvement et sans attendre le retour d'analyses, 17 des 23 suspicions d'EM (74%) ont bénéficié d'une antibiothérapie : 7 cas ont été traités par amoxicilline (30%), 9 cas par doxycycline ou Tolexine (39%), 1 cas par ceftriaxone (4%).

Parmi les 10 biopsies cutanées positives en 2013, 6 étaient des EM et 2 des EMM. Ces lésions étaient toutes présentes chez des patients en contact régulier avec la nature notamment pour

loisirs qui n'avaient pas reçu d'antibiothérapie préalable. Elles présentaient un centre clair dans 87% des cas, un diamètre de 10 cm à 85 cm et une durée moyenne d'évolution de 4 semaines (4 jours à 60 jours). Dans moins d'1/4 des cas ils étaient associés à des paresthésies ou arthralgies. Au plan bactériologique toutes étaient positives en PCR et seulement 2 (25%) étaient positives en culture. Les souches responsables de ces infections étaient 6 *B. afzelii* et 2 *B. garinii*. L'ensemble des EM et EMM positifs ont été traités : 3 par amoxicilline (37,5%), 4 par doxycycline ou Tolexine (50%), 1 par ceftriaxone (12,5%).

Analyse des suspicions d'acrodermatite chronique atrophiante (n = 10)

En 2013, 10 des 45 (22%) prélèvements reçus étaient des suspicions d'ACA. Elles n'étaient pas associées à d'autres manifestations. Dans 7 cas (70%), les lésions étaient localisées sur les membres inférieurs, dans 2 cas (20%) au niveau des membres supérieurs. Trois cas avaient bénéficié d'une antibiothérapie préalable (Amoxicilline, doxycycline et pyostacine), ils étaient négatifs en PCR. Parmi les suspicions d'ACA toutes étaient négatives en culture et 2 (20%) étaient positives en PCR à *B. afzelii*. Les deux patientes étaient des agricultrices, une en Dordogne, l'autre en région parisienne. Après biopsie, 8 cas (80%), dont les 2 positifs, avaient été traités selon les recommandations européennes par cyclines.

Analyse des suspicions de lymphocytome borrélien (n = 2)

En 2013, 2 prélèvements sur 45 (4%) étaient des suspicions de lymphocytome borrélien. Dans un cas la lésion était localisée au niveau de l'épigastre, dans l'autre au niveau de la jambe. Ce dernier avait été associé à un EM unique à centre clair. Leur durée d'évolution allait de 40 jours à un an. Aucun n'était associé à des signes généraux et n'avait bénéficié de traitement antibiotique préalable. Parmi ces 2 cas, aucun ne s'est révélé positif en culture ou par PCR. Après prélèvement, ces deux cas ont bénéficié d'une antibiothérapie par cyclines.

Espèces de *Borrelia* détectées (2009-2013)

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	2013
<i>B.afzelii</i>	28	6	19	12	8
<i>B.garinii</i>	4	2	3	0	2
<i>B.burgdorferi ss</i>	2	1	1	1	0
<i>Borrelia non typées</i>	2	0	2	0	0

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

Après développement et validation en 2009 d'une méthode PCR en temps réel Taqman® ciblant le gène *msp2* pour la détection d'*Anaplasma phagocytophilum*, le protocole a été diffusé auprès des CHU et CH de la région Est de la France via un PHRC entre 2010 et 2012 qui avait révélé un taux de positivité des prélèvements cibles de près de 8% (18 cas). Parmi ces cas, où l'analyse par PCR

révélaient 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 est donc une réalité clinique, au moins dans l'Est de la France et, suite à ce PHRC, elle doit être évoquée devant tout syndrome fébrile estival.

En 2013, 128 demandes de diagnostic d'anaplasmose granulocytaire par PCR ont été adressées au CNR. Au total, 14 patients étaient positifs (11%). L'âge moyen des patients infectés par *A. phagocytophilum* était de 62 ans (de 33 ans à 84 ans). L'ensemble des cas renseignés présentait un syndrome inflammatoire franc accompagné de thrombo-neutropénie et d'une augmentation des enzymes hépatiques. Un cas présentait une méningite lymphocytaire dont le LCR était également positif en PCR pour ce pathogène. La sérologie du virus responsable de l'encéphalite à tique a été réalisée dans un peu plus du 1/3 des cas sans résultat positif. La sérologie *Anaplasma* a été demandée dans 43% des cas. Seulement 2 (33%) étaient douteuses en IgG. La sérologie de la borréliose de Lyme n'a été réalisée qu'une fois, elle était négative.

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

3.2.1. Objectifs de la campagne de collecte de 2013

Dans cette nouvelle mission quinquennale du CNR *Borrelia*, nous avons décidé de concentrer en priorité nos efforts sur la région Alsace, zone d'endémie pour ce pathogène, afin de mettre en place et de tester de nouvelles approches méthodologiques afin de mieux définir les zones à risques d'infections et les facteurs susceptibles d'y contribuer.

Dans le cadre des missions du CNR *Borrelia*, la surveillance entomologique effectuée en 2013 a eu pour objectifs d'investiguer :

- l'évolution de la densité en nymphes 10 ans après l'étude de E. Ferquel et coll. (2006)
- l'impact de certains facteurs environnementaux sur la densité en nymphes, notamment la végétation et certains facteurs abiotiques (hygrométrie, température...)
- le taux de tiques infectées pour *Borrelia burgdorferi* sensu lato mais également pour d'autres pathogènes comme *Anaplasma phagocytophilum*
- la présence ou l'absence de *Borrelia* agents de fièvres récurrentes tels que *Borrelia miyamotoi*, agent de fièvre récurrente récemment rapporté comme infectant dans l'hémisphère Nord (« Relapsing like fever *Borrelia*») [Hovius et al., 2013 ; Krause et al., 2013 ; Platonov et al., 2011].

Pour notre premier objectif, nous nous sommes donc référés à l'étude du CNR *Borrelia* réalisée en Alsace en 2003 et 2004 [Ferquel et al., 2006]. L'enquête épidémiologique réalisée en Alsace en 2003 et 2004, avait en effet révélé que l'Alsace avait une forte endémicité de borréliose de Lyme parmi la population humaine du territoire français.

Les grandes vallées vosgiennes de Munster et de Guebwiller avaient alors été identifiées comme des zones à risque pour la borréliose de Lyme.

Le canton de Dannemarie avait été sélectionné pour sa relative faible incidence.

Les collectes de tiques avaient été effectuées de mars à novembre pendant ces deux années. Cette étude vectorielle faisait suite à celle sur l'épidémiologie humaine de la borréliose de Lyme en Alsace en 2001-2002 [www.invs.sante.fr] par la CIRE Est.

Nous avons voulu mesurer si la densité de nymphes et le taux de nymphes infectées avaient varié en Alsace 10 ans après.

Pour cela, les sites géographiques exacts de l'étude de 2003-2004 ont été repris en 2013 et collectés d'avril à octobre.

Parallèlement, nous avons souhaité évaluer le risque de maladies à tique pour la population en fonction de la proximité par rapport aux zones urbaines.

Ainsi, deux sites péri-urbains très fréquentés et situés à proximité de Strasbourg (Illkirch et Pourtalès) ainsi qu'un site plus éloigné des agglomérations (Niedermunster) ont donc été collectées mensuellement.

Notre deuxième objectif était de documenter et de comparer les densités en nymphes en différents points d'Alsace pour tenter de mettre en évidence des facteurs environnementaux corrélés à la présence des nymphes. Pour ce faire, quatre sites supplémentaires (répartis dans les deux départements alsaciens) ont fait l'objet de collectes au moment du pic d'activité des nymphes *I. ricinus* (en mai et juin) :

- la Petite Pierre (zone de régénération)
- la forêt d'Haguenau (zone de fréquentation du grand public)
- la forêt de Daubensand (zone de la plaine rhénane marécageuse)
- la Petite Camargue Alsacienne (site naturel protégé avec accès du grand public)

Nous avons collecté préférentiellement dans les sites déjà investigués en 2012, de façon à assurer un suivi et une comparaison dans le temps sur certains sites.

3.2.2 Choix des sites et méthode de collecte

Sites investigués en 2003 et 2004 :

Le repérage des points exacts a été réalisé au cours d'une sortie sur le terrain en 2013 avec le Dr. E. Ferquel, qui était co-responsable du CNR *Borrelia* pendant l'étude de 2003-2004.

Les points exacts de collecte nous ont été repérés très précisément sur le terrain au moyen d'un GPS et photographiés.

A partir du mois d'avril (inclus) et jusqu'au mois d'octobre, nous avons collecté tous les mois les nymphes et les adultes. Nous avons respecté quatre semaines d'intervalle entre chaque visite de site si les conditions météorologiques le permettaient.

Le choix des sites précédemment étudiés par le CNR Pasteur :

En 2003-2004, le CNR Pasteur a sélectionné les lieux de collecte selon un sondage aléatoire stratifié à deux niveaux. Le site d'échantillonnage constitue le premier niveau et la distance de 10 m de long le second niveau. Ces deux paramètres avaient été sélectionnés au hasard. La densité des tiques avait été estimée pour l'ensemble de la forêt à partir du nombre total de tiques collectées.

Au total, huit points de collecte ont été investigués en 2003-2004 et en 2013 sur lesquels 16 tirs de drapeau de 10 m ont été effectués (cela en accord avec la méthodologie de collecte des tiques présentée dans le rapport 2012).

Localisation de l'ensemble des sites investigués en 2013 (cf carte ci-dessous) :

Les points de collecte ponctuels sont répartis dans toute l'Alsace. Le choix des sites a été fait en prenant en considération l'intérêt de réitérer les investigations des sites collectées les années précédentes et répartis sur les deux départements alsaciens.

Munster, Guebwiller et Dannemarie sont les sites déjà évalués en 2003 et 2004.

Le CNR a aussi cherché à définir des biotopes à risque, c'est à dire à identifier dans l'environnement des paramètres (par exemple météorologiques) propices à la présence des tiques. Pour cela, nous avons étudié des facteurs météorologiques et des facteurs relatifs au

couvert végétal puis essayer de les corrélérer avec les données de densité de nymphes obtenues durant l'année 2013.

D'autres paramètres devront être également investigués (population de micromammifères et de gibier, culture de la forêt incluant les coupes de bois et la sélection de certaines essences forestières) dans la suite du mandat du CNR. Pour ce point, nous avons cherché à étudier l'impact du gibier sur la densité de tiques en nous rendant dans une zone de régénération -c'est à dire une zone fermée par l'Office National des Forêts où le gibier ne peut plus pénétrer. Dans ses sites, la végétation est composée très essentiellement de ronces ce qui a entravé la collecte des tiques au drapeau.

Nous nous sommes focalisés en 2013 sur l'étude des facteurs météorologiques car analyser l'ensemble des facteurs potentiellement explicatifs de la densité en nymphes infectées n'est pas possible sur une année. Ceci demanderait d'augmenter le nombre de mesures et donc le nombre de collectes et par là-même d'augmenter de façon trop importante le nombre d'analyses consécutives.

Pour l'étude des biotopes potentiellement à risque, nous avons demandé à l'ONF de nous définir le type de station forestière correspondant aux lieux de collecte. Une station forestière est définie comme une étendue de terrain de superficie variable homogène quant au climat, à la géologie, au relief, au sol et à la végétation [cf. Guide des stations et le choix des essences. Les milieux forestiers des collines sous vosgiennes. Centre Régionaux de la Propriété Forestière Lorraine-Alsace]. Le but de la démarche est d'essayer de mettre en évidence un type de forêt plus fortement à risque de tiques qu'une autre.

3.2.3. Analyses des nymphes et des données issues de la campagne 2013

Au cours de l'année n-1, le CNR a souhaité faire évoluer en partie ses méthodes de détection de *Borrelia burgdorferi* si chez les nymphes afin qu'elles soient plus adaptées à l'analyse de grandes quantités de tiques. L'analyse statistique a aussi été affinée.

► **Méthode d'extraction de l'ADN de *B. burgdorferi* si dans les nymphes**

Le nombre de tiques analysées cette année a été de 3 016 nymphes. Elles représentent un échantillon représentatif des nymphes collectées en 2013, puisque, dans la mesure du possible, un échantillon maximal de 60 nymphes par site par mois a été traité selon le protocole d'extraction à l'hydroxyde d'ammonium déjà utilisé en 2012. Par comparaison, le CNR précédent établissait le taux d'infection via l'analyse de 20 nymphes par parcelle (=site).

► **Méthode de détection de l'ADN de *B. burgdorferi* si dans les nymphes**

Par rapport à 2012, une chimie TaqMan a été utilisée pour réaliser nos analyses en 2013 afin de limiter les analyses complémentaires liées au manque de spécificité du SybrGreen®, que nous avons observé en 2012. La technique utilisée a été la même que celle choisie pour la détection de *Borrelia burgdorferi* si dans les prélèvements humains.

Le nombre de nymphes analysées en 2013 a été de 3 016 (974 en 2012). Dans les analyses réalisées en 2013, 5 n'ont pu être interprétées du fait de difficultés techniques, ce qui revient à un pourcentage de 0,2 % de données manquantes.

► **Analyse statistique**

Au vu des éléments de la littérature (cf ci-dessous) et des objectifs que nous nous étions fixés :

- analyser des facteurs environnementaux permettant de prédire la présence des nymphes

Nous avons approfondi notre démarche d'analyse statistique pour la surveillance vectorielle de 2013 par rapport à celle de 2012.

► **Revue de la littérature**

La distribution spatiale des tiques est habituellement fortement agrégée -c'est à dire que sur le couvert végétal, la répartition de la population des tiques n'est pas régulière et ceci même dans les sites où les conditions météorologiques et la végétation apparaît comme homogène [Taylor, 1961 ; Estrada-Pena, 2013].

En effet, on dit classiquement que les larves sont agrégées en « pocket » : c'est à dire qu'elles sont retrouvées dans l'environnement regroupées en paquet.

Si les tiques étaient distribuées régulièrement sur le couvert végétal, alors il n'y aurait pas une hyperdispersion dans la distribution des tiques [Taylor, 1961].

Cette condition n'étant pas observée, les données doivent subir une transformation avant l'analyse ou alors, nous devons utiliser des modèles linéaires généralisés c'est à dire n'utilisant pas de distribution gaussienne sous-jacente.

► **Les causes biologiques de l'agrégation des données:**

L'agrégation initiale des œufs issus d'une ponte et donc des larves conditionne l'agrégation de stases ultérieures. En effet, les capacités de déplacement des stades immatures (larves et nymphes) sont limitées (en particulier pour les larves et dans une moindre mesure pour les nymphes) [Medlock et al., 2013]. Celles-ci n'ont pas une grande capacité de dispersion. Les adultes peuvent eux être transportés sur de plus grandes distances de par le portage de ceux-ci par les cervidés et les oiseaux.

► **La collecte des données**

Les données météorologiques (température, humidité relative, intensité lumineuse) ont été extraites du site Infoclimat® (www.infoclimat.fr). Pour les sites investigués de façon mensuelle, nous avons collecté les données météorologiques fournies par la station la plus proche. Pour les sites d'Illkirch, de Pourtalès et de Niedermunster, la station météorologique de Strasbourg-Entzheim a été choisie. Pour les sites proches de Munster : la station de Munster-Soultzeren a été choisie. Pour le site de Dannemarie, celle de Bâle-Mulhouse, pour les sites proches de Guebwiller, la station de Colmar-Meyenheim a été choisie. Une telle approche a été déjà conduite notamment par Barandika et al. en 2006.

Les autres variables ont été recueillies sur place le jour de la collecte à savoir l'altitude, la température au sol, l'humidité relative, la couverture nuageuse. L'altitude a été mesurée grâce au GPS. La température au sol, l'humidité relative au sol ont été mesurées grâce à un thermomètre-hygromètre placé sur le sol pendant la collecte. L'appréciation de la couverture nuageuse a été faite par les collecteurs et notée grâce à l'échelle en octa, l'octa étant une unité de mesure utilisée en météorologie (ou 0 indique un ciel parfaitement clair et 8, un ciel couvert). Le choix de ces variables a été fait suite à une analyse détaillée de la littérature [Perret et al., 2002 ; Barandika et al., 2006] d'une part et au vu des informations que nous pouvions collecter en pratique.

► **Le déficit de saturation en eau dans l'air**

Pour le déficit de saturation en eau dans l'air, nous avons utilisé cette formule de calcul déjà utilisée par Perret et al. en 2000.

► **La formule est la suivante :**

$SD \text{ (en mm de Hg)} = (1-RH/100)*4.9463*\exp(0.0621*T)$

RH : Humidité relative, T : Température, SD : Déficit de saturation en eau dans l'air

► **Démarche d'analyse de l'ensemble des données de 2013 :**

L'ensemble de nos données a été répertorié dans un fichier Excel®. L'analyse statistique s'est déroulée de la façon suivante. La liste des co-variables testées en 2013 est répertoriée ci-après.

Nom des variables	Nom court de la variable	Type de variable	Modalité ou Unité
Lieu	Lieu	catégorielle	21 modalités
Date	Date	discrète	dd/mm/aaaa
Mois	Mois	discrète	m
Heure	Heure	discrète	hh:mm:ss
Caractéristique du lieu	CARACT_LIEU	catégorielle	2 modalités
Type topographique	TYPE_TOPO	catégorielle	4 modalités
Habitat forestier	ONF	catégorielle	7 modalités
Altitude	Altitude	continue	mètre
Température au sol	TEMP_SOL	continue	°C
Hygrométrie au sol	HUM_SOL	continue	%
Déficit de saturation en eau dans l'air sur place	SD	continue	mm de Hg
Couverture nuageuse	OCTAS	continue	octas
Humidité le jour de la collecte	HUM_J_COLL_STATION	continue	%
Humidité moyenne 48h avant la collecte	HUM_MOY_48H	continue	%
Température du jour donnée par la station météo	TEMP_J_COLL_STATION	continue	°C
Température moyenne 30 jours avant la collecte	TEMP_30J	continue	°C
Température moyenne 10 jours avant la collecte	TEMP_10J	continue	°C
Température moyenne 4 jours avant la collecte	TEMP_4J	continue	°C
Déficit de saturation en eau dans l'air	SD_STATION	continue	mm de Hg

► **Choix des co-variables pour le modèle linéaire généralisé :**

Dans un premier temps, nous avons réalisé une analyse univariée puis bivariée en prenant en compte le facteur « mois de collecte ». (Résultats ci-après)

3.2.4 Etude ancillaire

Le transfert de l'ensemble de l'activité du CNR *Borrelia* en 2012 à Strasbourg, s'est accompagné de changements dans les méthodologies de collecte :

- premièrement, nous avons choisi de réaliser 30 tirs de drapeau sur chaque site investigués (au lieu des 16 tirs de l'Institut Pasteur), ceci afin d'essayer de diminuer l'intervalle de confiance des données obtenues et de rendre ainsi possible une comparaison plus fine des données
- deuxièmement, dans un objectif d'évaluation du risque pour la population, nous nous sommes concentrés sur des collectes au bord des chemins
- troisièmement, le CNR jusqu'en 2012, utilisait une certaine formule de calcul pour estimer les densités en nymphes pour un lieu donné- ceci parce que le CNR Pasteur avait choisi ses sites selon un sondage aléatoire stratifié à deux niveaux.

Leur formule était la suivante :

$$d = \frac{1}{S} \hat{t}_y = \frac{1}{S} \frac{M}{m} \sum_{i=1}^m \frac{N_i}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} y_{ij}$$

Ferquel et al. 2006

De notre côté, nous n'avons pas opté pour un sondage aléatoire, de ce fait, nous n'utilisons pas une telle formule. Les implications de telles modifications nécessitaient d'être évaluées. Aussi, nous avons réalisé une comparaison des deux méthodologies.

Comparaison des méthodologies de recueil des tiques entre le CNR Strasbourg et CNR Pasteur:
 Nous avons, un même jour donné, réalisé les collectes sur le site de Guebwiller selon les deux méthodologies.

Les densités obtenues en 2013 selon les méthodologies des deux CNRs, sont les suivantes :

Juillet 2013	Intervalle de confiance de la densité
Strasbourg	[36 ; 70]
Pasteur	[0 ; 165]

Août 2013	Intervalle de confiance de la densité
Strasbourg	[29 ; 57]
Pasteur	[0 ; 123]

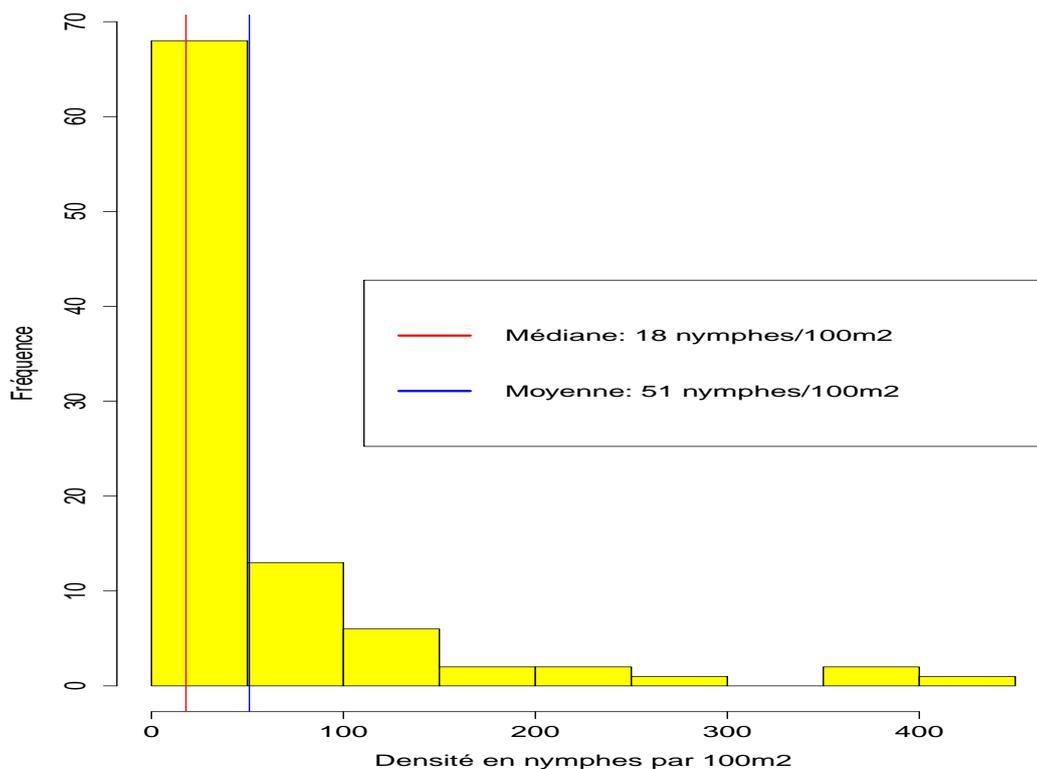
Les intervalles de confiances sont beaucoup plus resserrés avec la méthodologie du CNR Strasbourg et les intervalles de confiance entre les deux méthodologies se chevauchent, nous n'avons donc pas d'élément pour affirmer que les résultats obtenus selon les deux méthodologies sont différents. La méthodologie retenue à Strasbourg fournissant des intervalles de confiance plus étroits permettra potentiellement de mettre en évidence des différences plus fines sur les années à venir.

Sur cette base méthodologique, les résultats de la surveillance entomologique en Alsace en 2013 sont présentés ci-dessous.

3.2.5 Résultats de l'étude des densités en nymphes en Alsace

En 2013, nous avons réalisé 99 points de collectes de mars à novembre.
 L'histogramme ci-dessous montre la répartition globale des densités en nymphes en Alsace en 2013 – c'est à dire quel que soit le mois et le lieu de collecte.

Histogramme de la densité en nymphes par 100m² en Alsace

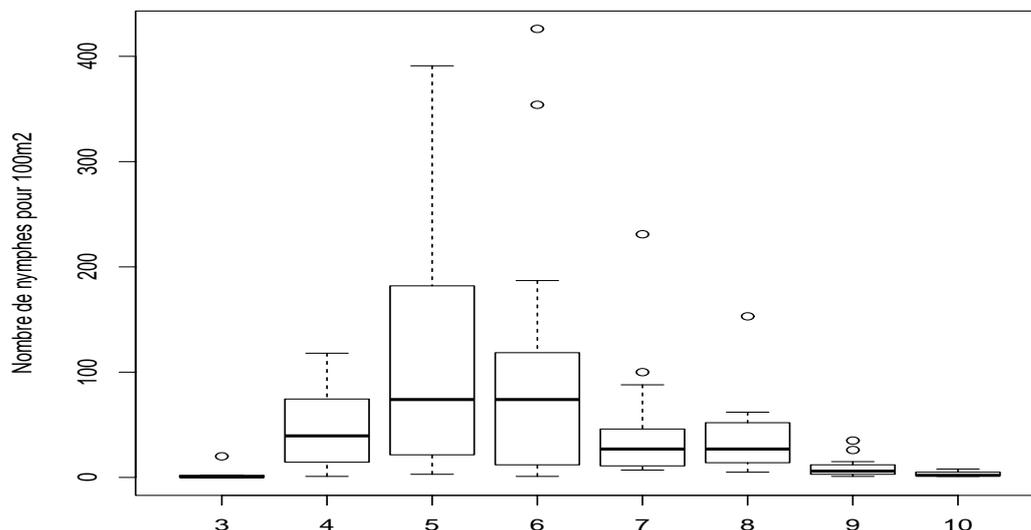


La valeur de la médiane est différente de celle de la moyenne et lui est inférieure. Ceci est caractéristique d'une distribution asymétrique vers la gauche. A nouveau (comme observé en 2012), on observe que la distribution des nymphes ne suit pas une loi normale. Ceci induit, pour l'analyse statistique, des étapes préalables pour le traitement des données.

Nous observons globalement que de mars à octobre, 50 % des sites investigués ont une densité en nymphes inférieure à 18 nymphes par 100m² ; en 2012, 50 % des sites avaient une densité en nymphes inférieure à 22 nymphes par 100m². En moyenne, en 2013, la densité en nymphes en Alsace est de 51 nymphes par 100m².

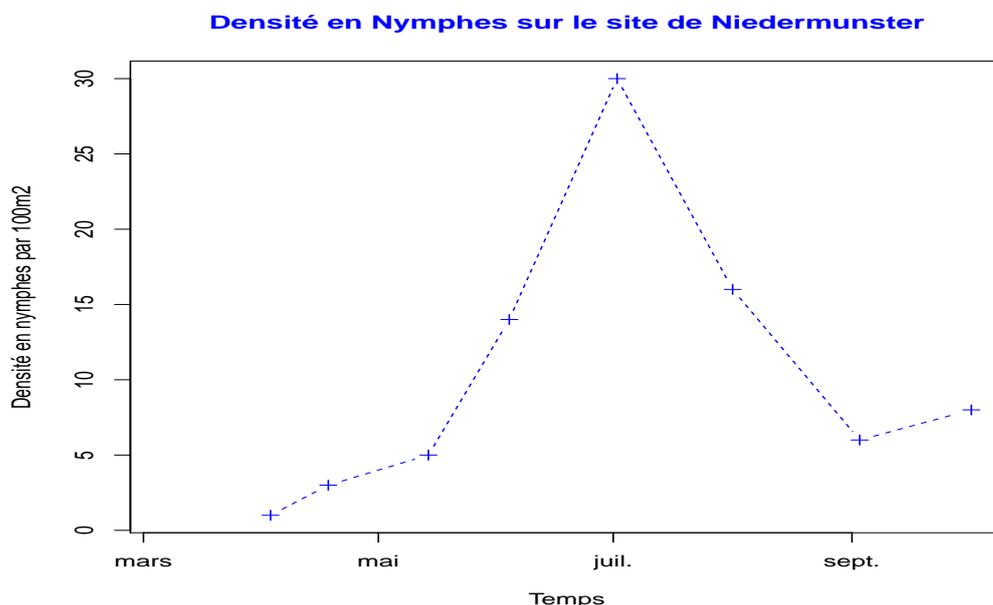
► Densités en nymphe en Alsace selon le mois de collecte :

Densité en Nymphes selon les mois de l'année

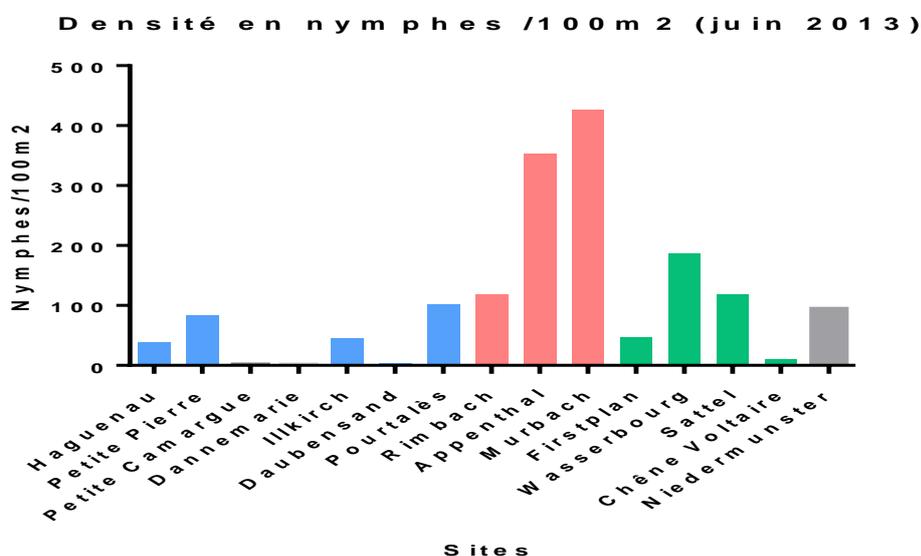


Les mois de collecte commencent par le mois 3 (mois de mars) et finissent avec le mois d'octobre (mois 10) car un nombre extrêmement faible de tiques est collecté avant mars ou après octobre. Ce type de graphique représente les densités en nymphes selon le mois de collecte. Ce graphique nous montre que pour le mois de mars (numéro 3) les densités en nymphes sont très faibles (proche de zéro). Pour les mois de mai (mois 5) et de juin (mois 6), représentant statistiquement dans nos données le pic d'activité en nymphes en 2013, on observe de fortes densités en nymphes avec des densités pouvant atteindre plus de 400 nymphes/ 100 m² (Murbach-Haut-Rhin).

Ci-dessous, la courbe d'évolution de la densité en nymphes en fonction du temps dans un des sites suivi de façon mensuelle : le site de Niedermunster.



Etant donné le pic d'activité au mois de mai-juin, nous avons aussi voulu présenter l'étendue des densités observées sur les sites investigués à cette période de l'année. On observe une étendue très forte des densités qui va de 1 nymphe par 100 m² (La Petite Camargue ou Dannemarie) à une densité de 426 nymphes par 100m² (Murbach, proximité de Guebwiller).



bleu : les sites de la vallée rhénane
rose : ceux de la vallée de Guebwiller
en vert : ceux de la vallée de Munster

► **Analyse des caractéristiques des lieux investigués :**

- le caractère péri-urbain ou non péri-urbain :

Nous avons catégorisé le type de lieu investigué en périurbain et en non péri-urbain. Au vu des résultats de l'analyse statistique, les sites péri-urbains ont une densité significativement inférieure par rapport aux sites plus éloignés du continuum urbain ($p=0,0232$).

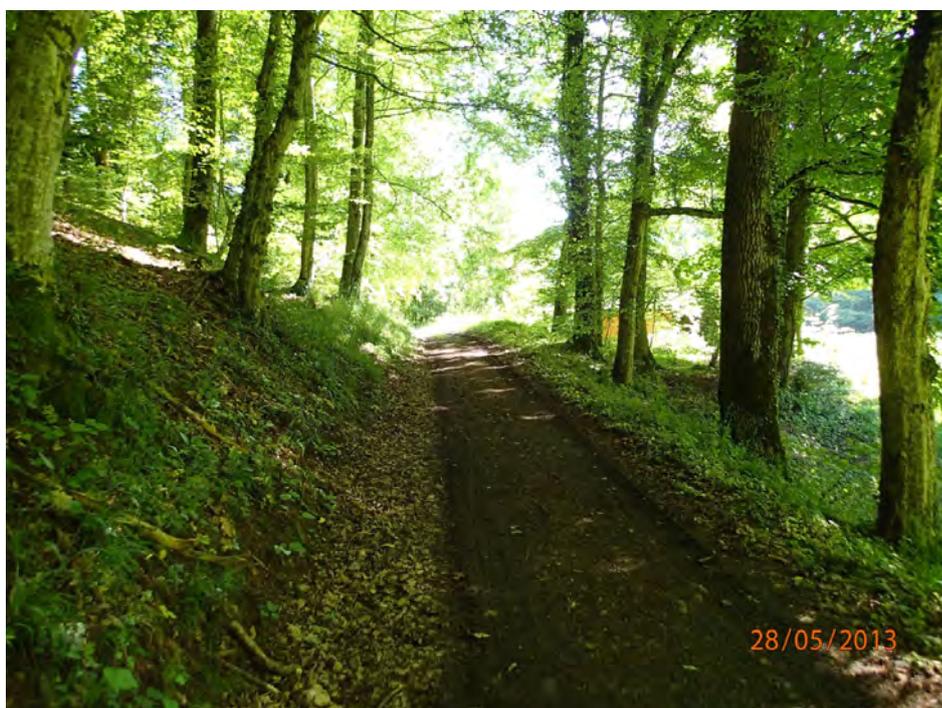
- le type de forêt investigué :

L'Office National des Forêt avec qui nous sommes en partenariat nous a fourni des habitats forestiers.

Exemple de carte fournie par l'ONF :



Photographie du site de Wasserbourg correspondant à l'habitat forestier ci-dessus Hêtraie de l'Asperulo-Fagetum)



De la même manière, dans la mesure du possible, l'ONF nous a caractérisé les lieux de collecte :

Niedermunster	Hêtraie Asperulo-fagetum/ Hêtraie Luzulo-fagetum/Forêt acidophile des etages montagnard a alpin (vaccino-piceatea)
La Petite Pierre	Hêtraie Luzulo-fagetum
Illkirch	Bois de taillis
Pourtalès	Taillis/Parc de la ville de Strasbourg
Petite Camargue	Bois de taillis
Daubensand	Forêt mixte à Quercus robur
Dannemarie	Hêtraie Asperulo-Fagetum
Vallée de Guebwiller	
Rimbach	*
Appenthal	Hêtraie Asperulo-fagetum
Murbach	Hêtraie de l'Asperulo-Fagetum
Vallée de Munster	
Firstplan	Hêtraie Asperulo-Fagetum
Wasserbourg	Hêtraie Asperulo-fagetum
Sattel	Hêtraie Asperulo-fagetum/ Hêtraie Luzulo-fagetum
Chêne Voltaire	Hêtraie Asperulo-fagetum

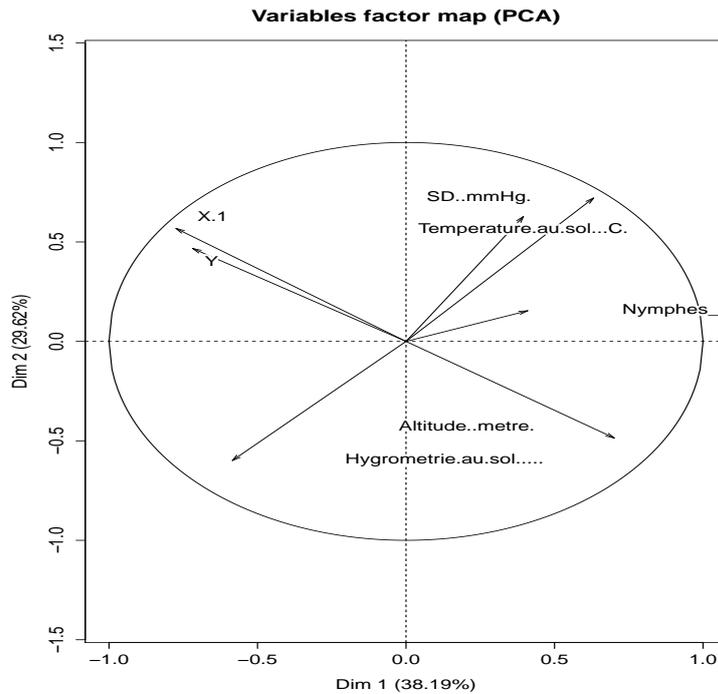
* *Données non fournies par l'ONF, complétées grâce aux observations personnelles du Dr. Jean-Claude George*

L'analyse nous montre que les forêts de type « Forêt mixte à *Quercus robur* » pourraient avoir des densités de nymphes statistiquement inférieures aux autres types de forêt. Ceci est une piste d'investigation. En effet, le nombre de site collecté dans ce type de forêt (n=1) empêche actuellement de conclure sur cette caractéristique du biotope comme moins propice à la prolifération des tiques.

► **Analyse des facteurs importants pour la densité en nymphe : l'humidité relative et la température**

Les résultats de l'analyse statistique montrent que la densité en nymphe est corrélée positivement avec la température mesurée au sol et négativement avec l'humidité relative au sol.

Ces résultats sont illustrés ci-dessous par un graphique issu d'une analyse en composantes principales.



Nous observons des relations entre la densité de nymphes et la température, l'humidité relative mesurée au sol et le déficit de saturation en eau dans l'air (SD) Les autres caractéristiques de l'environnement investiguées : la longitude (X) et la latitude (Y) du lieu de collecte en coordonnées Lambert, ne montrent pas de corrélation avec la densité en nymphes. La température au sol et le déficit de saturation en eau au sol sont corrélées positivement avec la densité en nymphe. L'hygrométrie au sol est négativement corrélée à la densité en nymphes.

Ces résultats nécessitent d'être confirmés au moyen de la campagne de collecte de 2014.

► **Description fine des lieux visités et densité en nymphes au mois de juin :**

Des données plus détaillées relatives aux caractéristiques des forêts visitées ont été élaborées par le Dr. JC George (membre temporaire du CNR de mars à août 2013 en remplacement du Dr. N Boulanger en mission à l'étranger durant cette période). Ci-dessous sont listés les caractéristiques floristiques, géologiques et faunistiques des sites prélevés. La densité en tique indiquée est celle observée au mois de juin.

Site	Caractéristiques floristiques	Profondeur de Sol	Faune sauvage	Litière	Exposition	Densité
Plaine Rhénane						
Nidermunster	beaucoup de lichen, mousse, myrtilliers	7 cm	sanglier, chevreuil	Tapis de feuilles de chêne et châtaignier 2 cm		94
Nidermunster chemin St Jacques		5-7 cm		Tapis de feuilles 2 cm	Sud	
Illkirch	robinier, arbuste, sureau, fusain d'Europe, noisetier. Ronces, lierre, ail des ours, géranium herbe à Robert, scille bifoliée, anémone des bois, laïches	7 cm	nombreuses traces de chevreuils et de sangliers	Litière de feuille: 1-2 cm	NA	46
Pourtalès	taillis sous futaie mixte, chênes, érables, trembles, châtaigniers, noisetiers, fusain, sureaux, ronces, clématites, ails des ours +++, renoncles, violettes, peu de lierre, végétation herbacée < 10 cm	5-7 cm	Rares coulees d'animaux sauvages (chevreuils, sangliers)	Tapis de feuille de 2cm	NA	102
Haguenau	Chenaie-charmaie avec quelques chênes pédonculés en perches régulier du côté droit, en futaie du côté gauche, corbeilles stéllaires, boutons d'or, d'ailet, peu d'aspérules anémones sylve, chèvre-feuille, liane	2-3 cm	Trace de chevreuils, sangliers, petits gibiers, lièvres et faisans	Litière de feuilles caduques d'environ 1 cm	NA	39
Dannemarie	Taillis sous futaie de hêtre, rares chênes; Amémone, pervenches, Euphorbe, carex, lierre, lamiacées, orties, ronces/ aspérules	> 15 cm	Traces de sangliers	Tapis de feuilles de hêtres surtout > 4 cm	NA	1
Daubensand	forêt alluviale, futaie irrégulière mixte, végétation de graminé réduite et fauché en grande partie, balsamine de l'Himalaya, strate arborée: grande diversité: peuplier noir, peuplier blanc, cerisier à grappes, orme lisse, aulne blanc, frêne commun, chêne pédonculé, saule commun, érables. Strate arbustive: troène, viorne lantane, noisetier, cornouiller sanguin, prunelier, aubépine monogyne	profondeur de sol: 1 cm; sol alluvial calcaire	Nombreux oiseaux, notamment aquatiques	Pas de litière de feuille	Nord-Sud	3
Petite Camargue	collecte dans un chemin de halage récemment fauché et dans le circuit du grand marais; strate arborée: chemin bordée de robiniers et de merisiers; strate arbustive: aubépine, prunelier, cornouillers, ronces; strate herbacées: chemin enherbé, bordé de roseaux.		Zone considérée comme halte migratoire pour avifaune: Très nombreux oiseaux notamment aquatiques et migrants et des bovins	aucune: chemin enherbé	Nord-Sud	1
Petite Camargue	circuit du grand marais: chemin empierré, bordé de hautes haies; strate arborée: saules, robiniers, frênes et merisiers; strate arbustives: aubépines, pruneliers, cornouillers, ronces; strate herbacée: acotemenst enherbés,, prairie non encore fauchée (très humide) , graminées, equisetum et larguerites de St Michel	calcaire				
Petite Pierre	collecte sous sapin sur épais tapis d'aiguilles de sapin, et dans clairières avec épais ronciers	> 15 cm; sol acide	zone de capture de cervidés	herbes hautes > 40 cm, orties et fougères mâles, profondeur de sol > 15 cm avec épais tapis d'aiguilles sous les sapins puis +/- zones enherbées	NA	83
	Sous futaie régulière mixte d'haître-sapinière (rares chênes)			strate herbacée très réduite, Tapis de feuille caduques et d'épines de sapin de 4 cm		
Vallée de Guebwiller						
Murbach	Chênes, charmes, châtaigniers, sapins++/hiux/violettes, oxalis, petite oseille, anémones des bois, aspérule odorante	> 15 cm	traces de chevreuil	2 cm de feuilles sèches caduques+ aiguilles de résineux	Nord-Est	426
Rimbach	trembles, érables/houx, chèvrefeuille, qq ronces/renoncles (ficiaires), sceaux de Salomon, pervenches,	Profondeur de sol 10 cm, sol avec affleurement de roches (ardoises)	Très nombreuses traces de chevreuils au sol	Tapis de feuilles 2 cm; herbe < 10 cm	Sud-Est	118
Appenthal	Futaie mixte, chêne, châtaigniers/chèvrefeuille/ fougère, muguet, anémones des bois, corbeilles d'argent, pensée, sceaux de salomon	Profondeur de sol: 5 cm; chêne, robinier, châtaignier, sapins	Traces de chevreuils et de cerfs	tapis de feuilles 2 cm; herbe > 10 cm	Ouest	354
Vallée de Munster						
Sattel	Pins sapins, chêne/ chèvrefeuilles, qq ronces et fougères, carex et oxalis, petite oseille, lichens, épicéa, bouleaux, saule, marsault, tapis d'épine et de feuille, qq ronces, pas végétation strate herbacée, futaie mixte pins des Vosges, érables/noisetiers, sureaux, ronces/oxalis, fougères, carex, digitales, orties, anémones	6 cm, litière d'épine: 2 cm de sapin et de feuille caduque sèches; différence amont/aval: 10 cm/ 3 cm de sol	traces de chevreuil et de sanglier	2 cm de litière d'épines de sapin et de feuilles caduques sèches	Nord-Est	119
Voltaire	futaie mixte, érables, ronces, orties, renoncles (ficiaires), anémones des bois, angélique et cardamine, amémone des bois, aspérules odorantes, carex, oxalis, petite oseille, arums	Profondeur de sol > 11 cm (amont du chemin); aval du chemin < 4 cm	Traces de chevreuils	Tapis de feuilles mixtes et sèches 2 cm	Nord-Sud	10
Wasserbourg	Erables, corbeilles d'argent, aspérules odorantes, bugles rampant, fraisiers, patience sauvage et herbe	Profondeur de sol (amont) > 6 cm; aval: 3 cm	Traces relevés de chevreuils à proximité immédiate, empreintes de cerfs au sol	Tapis de feuille sèche mixtes: 2cm	Nord-Est	187
Firstplan	Futaie mixte charmes, hêtres, châtaigniers, érables, cerisiers, sapins/ronces, noisetiers/orties, oxalis, petite oseille, carex aspérules	> 10 cm	trace de cerf	Tapis de feuille mixte > 3 cm	Nord-Ouest	47

Au total :

- on constate peu de différences dans les densités entre 2003 et 2004. Seul le mois de septembre de 2004 à Dannemarie possède une densité en nymphe supérieure à celle de 2003
- entre 2013 et 2004, on observe plus de différences : les densités à Dannemarie sont statistiquement inférieures entre 2013 et 2004 pour les mois d'avril, de mai, de juin et de septembre.

Ces résultats préliminaires demandent une confirmation en suivant ces sites sur plusieurs années ainsi que cela a été défini dans le programme quinquennal d'action du CNR.

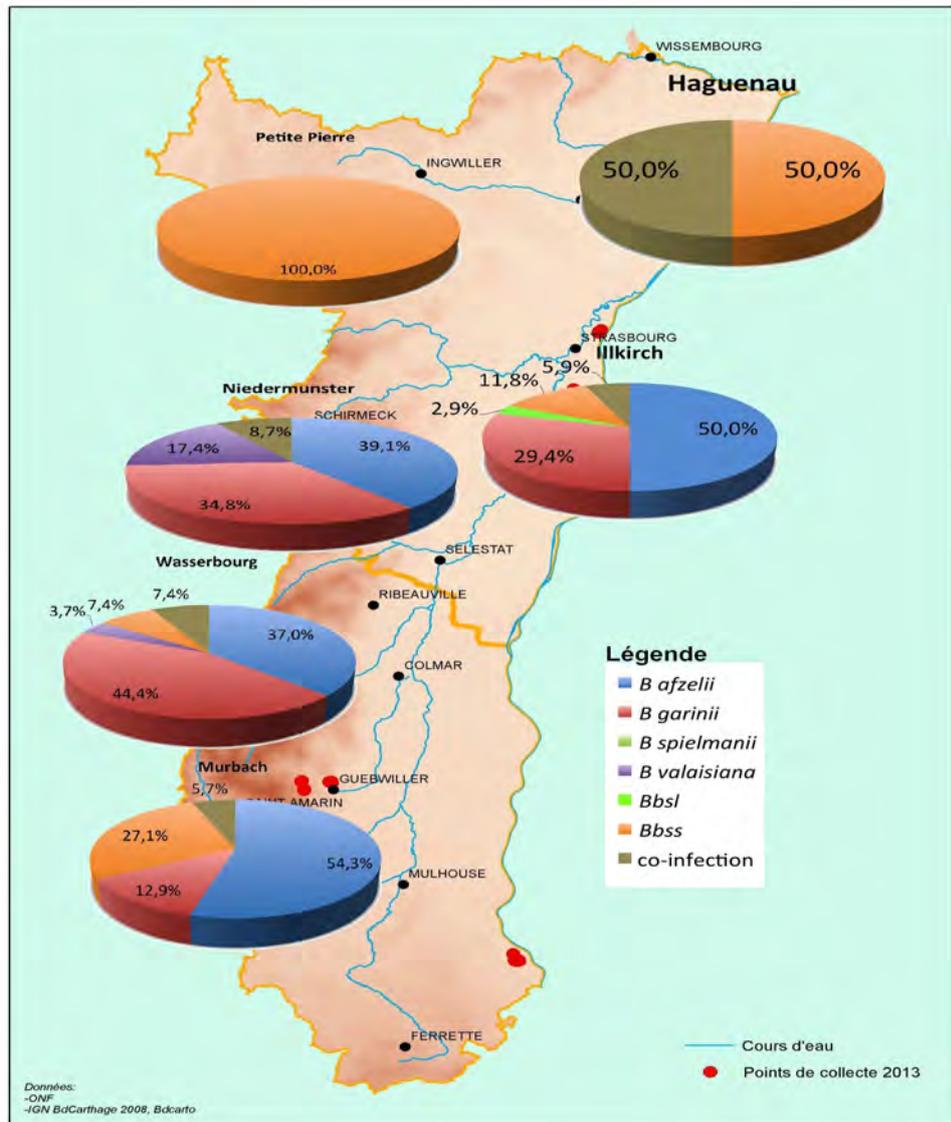
3.2.5.2. Evaluation du risque humain de borréliose de Lyme

L'évaluation du risque de Borréliose de Lyme nécessite de connaître le taux d'infection des nymphes. Globalement, en Alsace les taux d'infection des nymphes en fonction du mois de collecte sont les suivants :

	Alsace			
	n positives	n testées	%	IC
Mois				
Avril	45	464	9,7	[7,3;12,7]
Mai	49	618	7,9	[6;10]
Juin	60	742	8	[6;10]
Juillet	41	437	9,3	[7;12,4]
Août	54	441	12	[9,5;15,6]
Septembre	25	216	11,6	[8;16,5]
Octobre	10	90	11,1	[6;19]
2013	284	3008	9,4	[8,4;10,5]

Les différentes manifestations cliniques de borréliose de Lyme sont en partie liées à l'espèce de *B. burgdorferi* si inoculée par la tique, il est donc intéressant de déterminer les espèces de *Borrelia* infectant les tiques. Nous avons obtenu les résultats suivants pour la répartition des espèces de *B. burgdorferi* si dans les nymphes.

3.2.5.3. Répartition des espèces de *B. burgdorferi* si dans les nymphes collectées en 2013



A partir des données de 2013 et celles de 2012, on peut constater que les répartitions des espèces sont différentes d'une année sur l'autre. Certains sites « bi-espèces » montrent à présent une seule espèce dans les nymphes, comme le site de la Petite Pierre. A l'inverse, le site d'Illkirch, à proximité de Strasbourg, présente maintenant une diversité d'espèces plus importante et même qualitativement différente par rapport aux données que nous avons recueillies en 2012. De deux espèces (*B. garinii* et *B. valaisiana*) en 2012, nous passons à trois espèces (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. sensu stricto*) en 2013.

Cette répartition d'espèces d'une année sur l'autre sur un même site est un élément apparemment fluctuant. Nous allons poursuivre les collectes dans ces endroits de façon à confirmer si ces variations sont simplement dues à des fluctuations d'échantillonnage.

3.2.5.4 Recherche d'autres pathogènes dans les tiques

► *Anaplasma phagocytophilum*

La famille des Anaplasmataceae (ordre des Rickettsiales) regroupe les bactéries des genres *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* et *Wolbachia* qui sont des organismes intracellulaires stricts obligés de se multiplier au sein de vacuoles dans le cytoplasme des cellules eucaryotes.

A. phagocytophilum se multiplie sous forme de morula dans les globules blancs. Cette bactérie est vectorisée par un grand nombre d'espèces de tiques et peut infecter de très nombreux mammifères dont l'homme. Cette maladie semble être cosmopolite puisqu'elle est décrite au niveau animal et humain aussi bien en Europe, qu'en Asie, aux Etats-Unis ou en Australie.

Parmi les principales espèces de tiques du genre *Ixodes* vectrices de cette bactérie, on trouve *I. ricinus* en Europe, *I. persulcatus* en Russie et Asie et *I. scapularis*, *I. pacificus* et *I. spinipalpis* aux Etats-Unis. Les prévalences de cette bactérie varient d'un pays à l'autre et d'une espèce de tique à l'autre, avec notamment des taux compris entre moins de 1% et 20% chez *I. ricinus* en Europe de l'Ouest et entre 1,7 et 16,7% chez *I. persulcatus* en Europe de l'Est (Stuen et al., 2013).

En 2006, E. Ferquel et coll. ont publié des données concernant l'incidence d' *A. phagocytophilum* dans les tiques (Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72: 3074-3078). Sur les 1200 nymphes et tiques adultes, collectées dans trois cantons alsaciens, l'ADN d'*A. phagocytophilum* avait été détecté avec un taux de 0,4% chez les nymphes et 1,2 % chez les adultes.

Nous avons voulu savoir si une évolution du taux d'infection était observée dans les nymphes 10 ans plus tard. En 2013, nous avons testé 2762 tiques sur 21 sites répartis dans les 2 départements, 26 se sont révélées positives soit un taux d'infection de : 0,94 %. L'évolution n'est donc pas significative par rapport à l'enquête faite en 2003-2004. Les cas humains rapportés ces dernières années en Alsace (Koebel, 2012 et Edouard 2012) par le CNR sont donc plus liées à un meilleur diagnostic clinique et biologique de cette affection qu'à une augmentation du taux d'infestation des tiques.

Aucune co-infection *Borrelia* – *Anaplasma phagocytophilum* n'a été constatée. Ce résultat est à confirmer vu le nombre relativement faible de tiques positives détectées mais cela suggère que ces pathogènes partagent peu des hôtes communs

► ***Borrelia miyamotoi***

Cet agent de fièvres récurrentes a été décrit pour la première fois au Japon chez des tiques, *Ixodes persulcatus* en 1995. Approximativement 2% des tiques au Japon seraient infectées par ce pathogène. Le premier cas humain a été décrit récemment en Russie en 2011 (Platonov et al.), une revue de 2013 décrit également et confirme des cas humains aux Etats-Unis (Krause et al.). En 2013, le 1^{er} cas humain a été rapporté en Europe (Hovius et coll. Lancet, 2013) chez un patient profondément immunodéprimé.

Nous avons cherché à savoir si cette espèce de *Borrelia* ou d'autres espèces responsables de fièvre récurrente était présente en Alsace. Nous avons d'abord mis au point la technique décrite par Hovius et coll., en vérifiant notamment sa sensibilité et sa spécificité. Nous avons ensuite testé les tiques collectées en 2013 afin de détecter les espèces de *Borrelia* agent de fièvre récurrente.

Nous avons sélectionné 7 sites dans chaque département et testé un échantillon de 30 tiques par site:

Au total, 431 tiques ont été testées sur 14 sites, 8 étaient positives, soit en moyenne 1,85 % de nymphes infectées sur le territoire Alsacien. Après séquençage du fragment PCR, il s'agit dans tous les cas de *Borrelia miyamotoi*.

La présence de cette espèce de *Borrelia* nouvelle décrite comme pathogène pour l'homme sera donc investiguée plus spécifiquement en 2014 tant sur le plan vectoriel que sur le plan humain.

► **Bibliographie sur ce thème**

Ferquel E, Garnier M, Marie J, Bernède-Bauduin C, Baranton G, Pérez-Eid C, Postic D. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Anaplasmataceae members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. Appl Environ Microbiol. 2006 Apr;72(4):3074-8.

Fukunaga M, Takahashi Y, Tsuruta Y, Matsushita O, Ralph D, McClelland M, Nakao M. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. Int J Syst Bacteriol. 1995 Oct;45(4):804-10..

Hovius JW, de Wever B, Sohne M, Brouwer MC, Coumou J, Wagemakers A, Oei A, H, Narasimhan S, Hodiamont CJ, Jahfari S, Pals ST, Horlings HM, Fikrig E, Sprong H, van Oers MH. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. Lancet. 2013 Aug 17;382(9892):658.

Krause PJ, Narasimhan S, Wormser GP, Rollend L, Fikrig E, Lepore T, Barbour A, Fish D. Human *Borrelia miyamotoi* infection in the United States. N Engl J Med. 2013 Jan 17;368(3):291-3.

Platonov AE, Karan LS, Kolyasnikova NM, Makhneva NA, Toporkova MG, Maleev VV, Fish D, Krause PJ. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. Emerg Infect Dis. 2011 Oct;17(10):1816-23.

Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum*-a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. Front Cell Infect Microbiol. 2013 Jul 22;3:31.

Bonnet S, Michelet L, Moutailler S, Cheval J, Hébert C, Vayssier-Taussat M, Eloit M. Identification of Parasitic Communities within European Ticks Using Next-Generation Sequencing. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Mar 27;8(3):e2753. doi: 10.1371/journal.pntd.0002753.

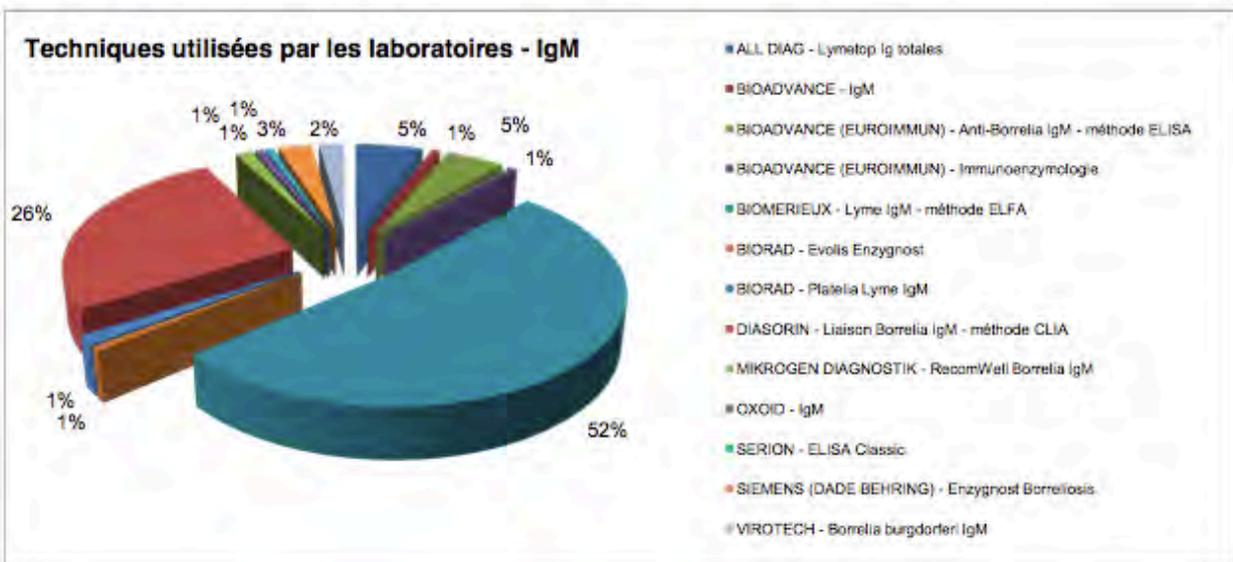
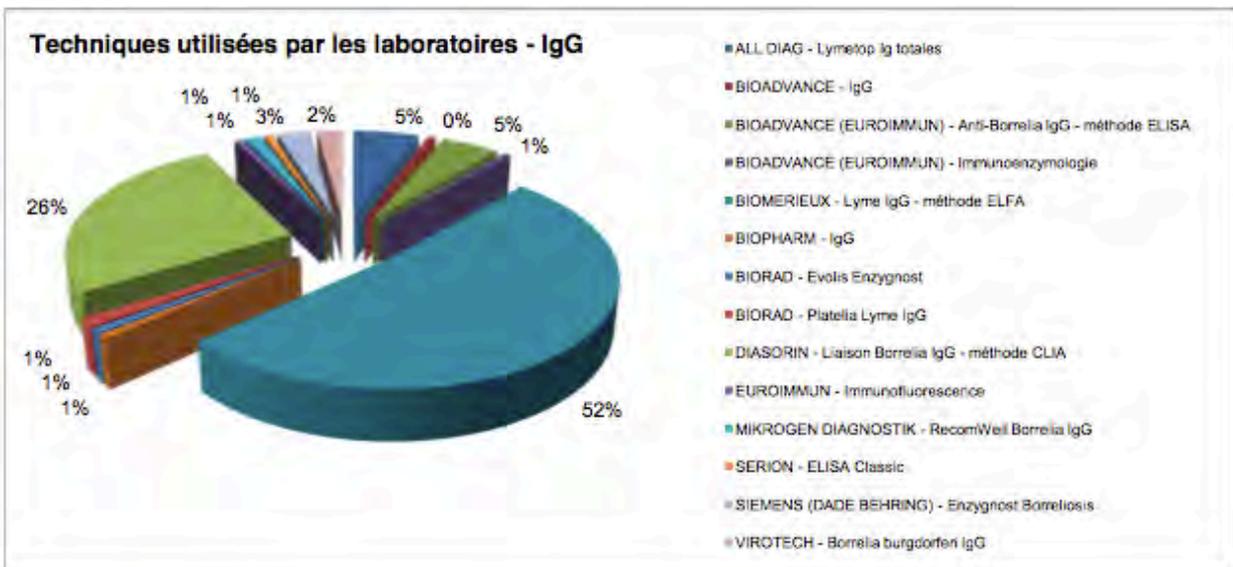
5. Activités d'information, de formation et de conseil

5.1. Information et formation

5.1.3. Organisation d'un Contrôle de Qualité Externe (EEQ) proposé aux LABM

En 2013, 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 146 laboratoires (contre 93 en 2012, soit +57%) qui avaient fait part de leur intention de participer.

Parmi les 146 laboratoires participants, jusqu'à 14 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 associées étaient en 2013 utilisées par près de 20% des laboratoires participant à cet EEQ. Ce taux est en augmentation par rapport à 2012, où seulement 4% des laboratoires participants utilisait ce genre de trousse.



La technique IgG et IgM séparées de BioMérieux est largement majoritaire (52%) 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 (26%). Une technique de confirmation (western-blot – immunoblot) a été utilisée par près de la moitié des participants qui utilisent 5 coffrets de fournisseurs différents : Bioadvance, Alldiag, Mikrogen, Servibio, Viramed.

Ces contrôles de qualité externe (EEQ) étaient :

- négatif en IgG et IgM : 100% de réponses exactes (il est à noter que près de 10% des participants ont réalisé une technique de confirmation par western blot alors qu'il n'est pas indiqué en cas de dépistage négatif en ELISA. Cette pratique n'est pas conforme aux recommandations de l'EUCALB)
- positif uniquement en IgG : près de 8% de faux négatifs en IgG majoritairement avec une technique d'immunochromatographie
- positif en IgG et positif faible en IgM correspondant à une infection débutante : près de 10% de faux négatifs en IgM, et moins de 1% de faux négatif en IgG. Il est à noter que seuls 2% des participants ont répondu IgM douteux, la majorité ont répondu IgM positifs
- un était positif en IgG et en IgM : près de 8% de faux négatifs en IgG et de 4% d'IgM douteux avec diverses techniques.

Au total, lors de 3 séries de contrôle sur 4 près de 10% des tests étaient faussement négatifs en IgG et/ou IgM. Dans le cas des faux négatifs en IgM l'utilisation de techniques diverses fait que le phénomène semble plus lié à des problèmes de robustesse des techniques intra-laboratoire, notamment avec des sérums proches du seuil de détection. Pour ce qui est des faux négatifs en IgG, cela semble lié à la qualité du coffret d'immunochromatographie commercialisé, dédouanant *a priori* les utilisateurs.

5.2. Guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

Néant

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

5.3.1. Provenance géographique des demandes

Les demandes provenaient de toute la France : on recense 345 demandes écrites et 620 appels téléphoniques. Les sites les plus demandeurs étaient la région parisienne (26%, soit près de 3 fois plus qu'en 2012), l'Ouest (15%) et le grand Est de la France (10%).

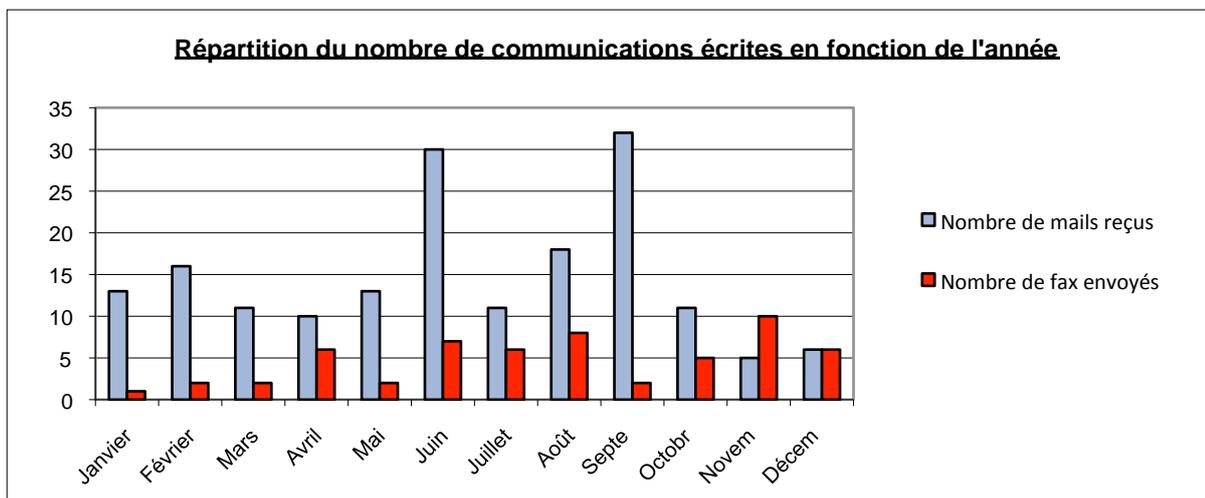
5.3.2. E-mails / fax / lettres

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 2013. La base de données a été constituée à partir de l'extraction de chaque mail: 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 345 communications par écrit durant l'année 2013. Parmi ces communications écrites, il y avait 288 E-mails et 57 fax.

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 10 à 15 par mois avec deux pics à 30 par mois en Juin et Septembre. En moyenne, le CNR recense une demande par jour tout au long de l'année.



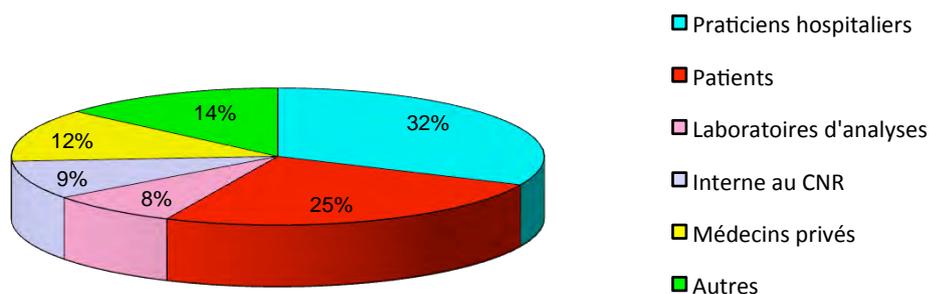
5.3.2.1. Fax

Parmi les 57 fax envoyés, 87% représentaient des résultats d'analyses demandés « en urgence » majoritairement par des laboratoires (60%). Les deux autres demandes correspondaient à des envois de formulaire d'analyse et de feuille de renseignements.

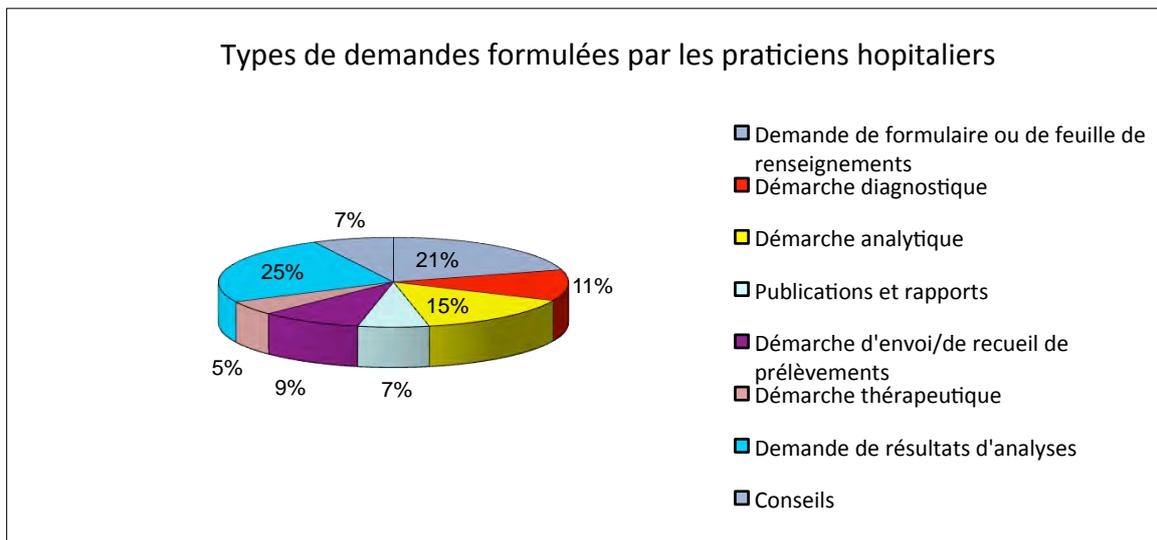
5.3.2.2. E-mails

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

Répartition des mails reçus en fonction de l'interlocuteur



Les demandes provenaient essentiellement de praticiens hospitaliers (32%) mais aussi de patients (25%, soit +10% par rapport à 2012). Les médecins libéraux nous ont adressé 12% d'e-mails. Par ailleurs, on recensait 14% d'e-mails provenant d'autres interlocuteurs comme des journalistes ou des organismes liés à la santé (InvS, CNAMTS, ARS).



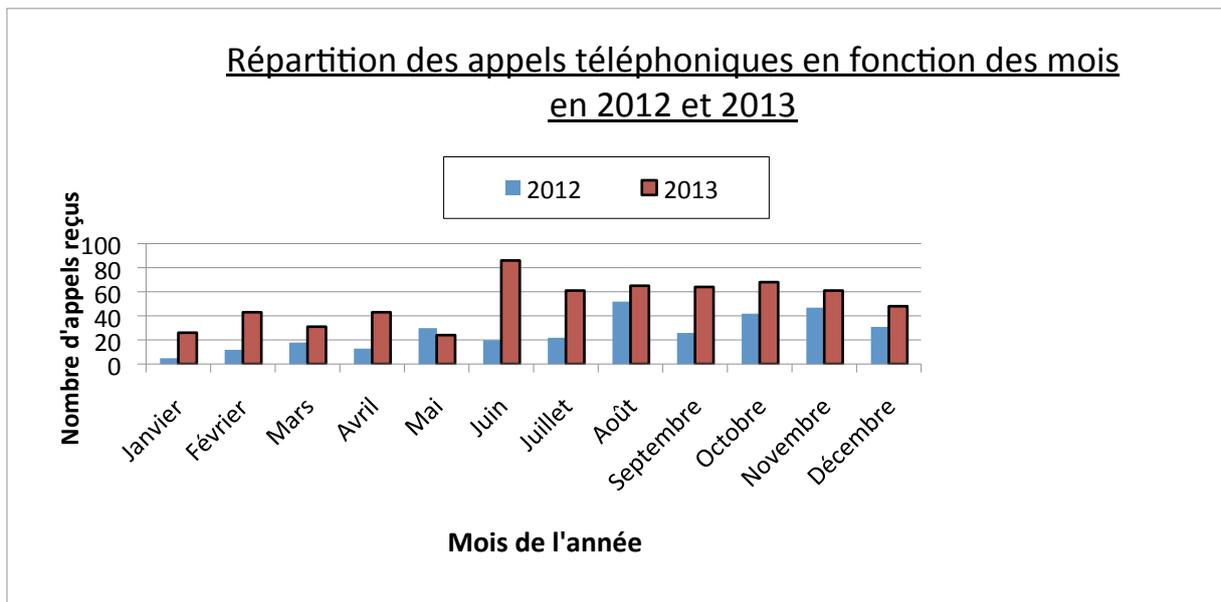
Dans ces mails, les demandes prépondérantes sont les demandes de résultats de patients (25%), suivies des demandes de formulaires d'analyses ou de feuilles de renseignements (21%). Ces demandes étaient principalement formulées par des praticiens hospitaliers (52%) mais provenaient aussi de laboratoires (20%) et de médecins privés (2%). Les conseils demandés dans ces messages ciblent en premier la démarche analytique (15%), puis la démarche diagnostique et de recueil de prélèvement (11% et 9%) et plus rarement la démarche thérapeutique (5%). La demande de publications et rapport ainsi que les conseils n'entrant pas dans les rubriques décrites s'élevait chacune à 7%.

5.3.3. Communications téléphoniques

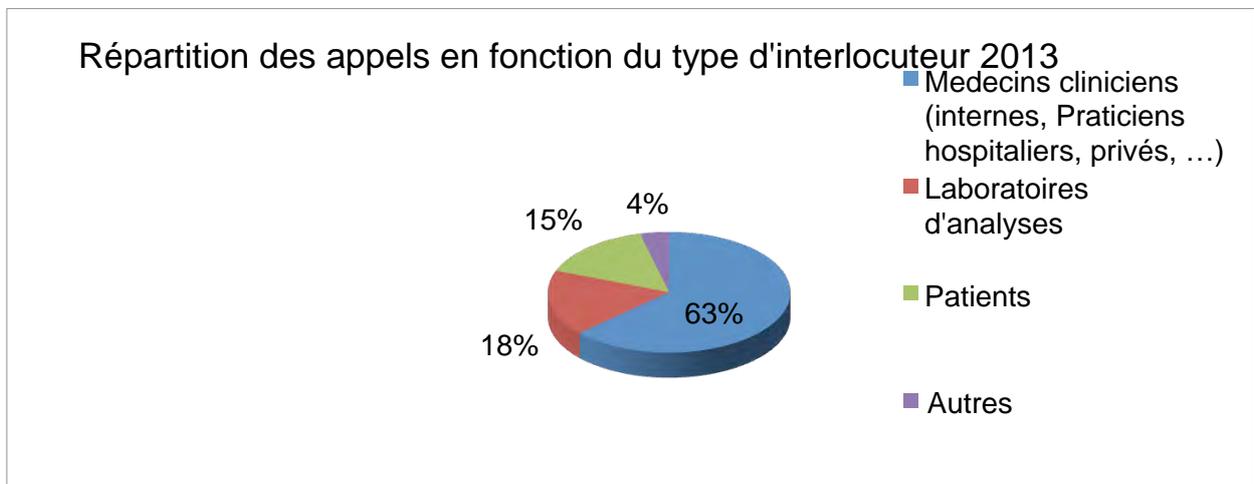
Les données des communications téléphoniques ont été analysées à partir d'un fichier Excel contenant la saisie manuelle des conversations téléphoniques recensées durant l'année 2013. Le principe a été d'extraire de ce fichier certaines informations à partir des conversations téléphoniques : la date, 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 620 appels durant l'année 2012 (liste non exhaustive car certains appels n'ont pas été tracés) soit près de 75h pour les biologistes et 32 h pour les techniciennes, passées au téléphone. Cette activité a doublé par rapport à 2011. Parmi ces appels, 276 appels (44,5%) ont été réceptionnés par les biologistes du CNR et 344 appels (55,5%) ont été réceptionnés par les techniciennes du CNR. La durée d'un appel est en moyenne de 7 min. Les biologistes apportaient des conseils essentiellement analytiques, diagnostiques ou thérapeutiques alors que les techniciennes répondaient plutôt à des questions sur les démarches à suivre pour l'envoi de prélèvements ou de documents ou des demandes de résultats.

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



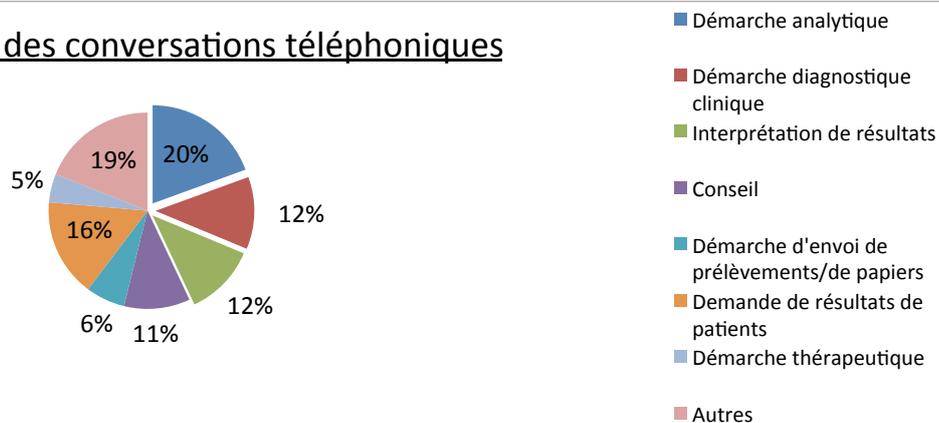
On recense plus d'appels dans la seconde moitié de l'année avec près de 60 appels par mois à partir de Juin contre 20 à 40 appels par mois de Janvier à Mai.



La majorité des communications téléphoniques ont été entretenues avec des médecins (63%), toutes spécialités et origines confondues. En général, c'était des praticiens hospitaliers qui rencontrent des problèmes avec leurs patients et qui demandent conseil au CNR. Dans 18% des cas, les interlocuteurs étaient des laboratoires d'analyses et 15% étaient des patients. Les 4% (7/318) des appels restants concernaient d'autres personnes (ARS, InVS, ministère de la santé, ...).

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

Thèmes des conversations téléphoniques



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 a été créé en 2013.

Les conseils à propos des **démarches analytiques** étaient prépondérants (20%), ainsi que les conseils divers (19%). Ces appels étaient essentiellement passés avec des médecins cliniciens : quelles analyses réaliser ? Leur intérêt ? ...

Les demandes de résultats de patients s'élevaient à 16% tandis que les démarches diagnostiques cliniques et d'interprétation des résultats (sérologie par ELISA et Western Blot) étaient au même niveau (environ 12%).

Enfin les autres thèmes regroupaient, en proportion égale (environ 5%), des conseils sur les démarches d'envoi de prélèvements ou de papiers (feuilles de renseignements, ordonnances, ...), et des conseils thérapeutiques (traiter ou non ? Quel antibiotique ? Combien de temps ? ...).

Il est à noter que 10% des appels comportaient plusieurs thèmes de discussion.

En conclusion, cette analyse de près de 1500 communications en 2013 (539 fiches de renseignements, 965 communications écrites ou téléphoniques) révèle que l'activité du CNR des *Borrelia* n'est pas seulement une activité analytique et d'expertise. Cette activité qui a augmenté de 50% en un an est très chronophage. 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. Avis pour la Direction Générale de la Santé

En 2013 B. Jaulhac a été contacté par le Dr. C. Ortmans pour relecture d'un document interne pour la DGS. A la demande du Dr. C. Ortmans (DGS, prévention des risques infectieux) nous avons participé à la rédaction d'une note interne pour la DGS sur la maladie de Lyme et notamment sur la problématique des tests biologiques

S. De Martino a participé au colloque sur les maladies et risques infectieux (ré)-émergents organisé par le Ministère des Affaires Sociales et de la Santé le 22 octobre 2013 à Paris

5.4.2. Avis pour l'ARS

En 2013, nous avons été contactés par l'ARS de Saint-Pierre et Miquelon suite à la mise en évidence de tiques évoquant des Ixodes sur l'île. De par la proximité avec le Canada et les Etats-Unis, le risque de borréliose de Lyme a été évoqué.

Nous avons établi un protocole de collecte et de transmission des tiques avec M. Boris Dumas, Ingénieur d'études sanitaires du pôle prévention et Santé Publique et fourni des informations sur ce vecteur, sur les pathogènes, la pathologie et les modes de transmission

5.4.4. Expert en tant que membre de réseaux internationaux

5.4.4.1. Meeting de l'ECDC

En octobre 2013, un 2^{ème} meeting sur l'évaluation des tests biologiques pour la borréliose de Lyme a été organisé par l'ECDC à Amsterdam.

Ce meeting de 2 jours avait pour but de présenter les 1ers résultats de cette évaluation. Etaient présents à cette réunion un expert des pays suivants : Allemagne, Autriche, Danemark, France ainsi que plusieurs représentants des Pays-Bas, pays responsable de ce travail.

Durant ce meeting, ont été présentées et discutées :

- les questions scientifiques complémentaires à répondre,
- les données épidémiologiques européennes,
- les attentes de cliniciens vis à vis des tests biologiques présents et futurs.

5.4.4.2. Réseau EUCALB – ESGBOR

- Le groupe ESGBOR (European Study Group on Lyme Borreliosis) a été fondé en avril 2012. Une réunion de travail du groupe ESGBOR a eu lieu en 2013 à Berlin lors de l'ECCMID. Différents axes de travail et de projet de recherche européens ont été discutés:
- étude du risque de développement d'une borréliose de Lyme après piqûre de tique,
- étude du rôle des grands mammifères sur l'abondance des tiques,
- paramètres influençant la densité des tiques,
- mise en place d'une étude interlaboratoire européenne sur la sensibilité et la spécificité des tests PCR *Borrelia* utilisés au sein du groupe.

Au sein du groupe, nous avons évalué en 2013 la littérature sur l'intérêt des tests de transformation lymphocytaire. Globalement, la littérature montre un manque de données de validation pour cette méthode et présente une faible spécificité. Plusieurs biais méthodologiques (critères d'inclusion, définition des cas et témoins, conflit d'intérêt) dans l'étude récente la plus souvent citée sur internet conduisent à des conclusions erronées et nous avons recommandé la plus grande prudence vis à vis de ce test (article accepté dans CMI).

Par ailleurs, Les membres de ce réseau assurent depuis une hot-line européenne pour les praticiens, biologistes et patients qui s'adressent à eux.

N. Boulanger a été membre du comité scientifique du Congrès "Lyme and other transmitted diseases », Boston, 21-23 août 2013.

5.4.4.3. Mise en place d'une collaboration avec les CNR d'autres pays européens

Au cours de l'année 2013, 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 de la méthodologie tant sur l'épidémiologie humaine que vectorielle.

Nous avons eu également une réunion commune CNR Suisse, CNR Allemand à Neuchâtel afin de partager nos approches épidémiologiques en médecine humaine et vectorielle.

5.4.4.4. 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.

B. Jaulhac :

Expert pour le réseau Sentinelles :

- membre du comité de pilotage du réseau Sentinelles – Inserm UMR –S 707 sur l' étude de l'incidence de la borréliose de Lyme en France. L'incidence moyenne estimée de la borréliose de Lyme est de 42 cas pour 100 000 habitants, stable entre 2009 et 2011 soit plus de 26 000 cas/an (article soumis).
- relecture du rapport annuel d'activité pour le domaine de compétence du CNR *Borrelia*

5.4.5. Agence Régionale de Santé (ARS) : mise en place l'étude réseau ALSA(CE)TIQUE 2014-2015 avec la Cire Lorraine-Alsace.

En 2013, une étude épidémiologique sur les maladies transmises par les tiques a été mise en place pour débiter du 1er janvier 2014 au 31 décembre 2015 en Alsace par la Cire Lorraine-Alsace. Afin d'en déterminer la méthodologie et les modalités, plusieurs réunions du COPIL ont eu lieu à l'automne 2013.

Cette étude portera spécifiquement sur 3 maladies transmises par les tiques : la borréliose de Lyme ; l'encéphalite à tiques ; l'anaplasmose granulocytaire humaine. Ses objectifs seront : d'estimer l'incidence de ces pathologies ; de décrire les caractéristiques des cas recensés afin d'améliorer leur prévention et leur traitement. Cette étude nécessite la mise en place d'un réseau de médecins volontaires, libéraux et hospitaliers de la région qui signaleront **mensuellement les nouveaux cas diagnostiqués** de borréliose de Lyme, d'encéphalite à tiques et d'anaplasmose granulocytaire humaine. Ce signalement sera effectué à l'aide d'un questionnaire individuel court, pouvant être complété en ligne ou sur papier. Un programme de formation des professionnels de santé participant au réseau a été établi pour le début 2014 sous forme de soirées dans différentes villes d'Alsace associant des membres de l'InVS, les biologistes du CNR et les infectiologues.

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

En 2013 (février à août), N. BOULANGER a bénéficié d'un congé recherche dans le cadre de son travail d'enseignant-chercheur à la faculté de pharmacie afin d'étudier l'immunité de la peau dans le contexte de la borréliose de Lyme. Ce travail a eu lieu à l'université de San Diego, Californie, dans le laboratoire du Dr. R. GALLO.

Durant cette même période, elle a été remplacée au CNR pour la mission d'étude vectorielle, par le Dr J.C. GEORGE.

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

6.1.1. Objectifs

Analyser le rôle de la blessure de la tique dans la transmission précoce de *Borrelia*.

Ce travail fait l'objet d'une thèse de Doctorat (QUENTIN Bernard), thèse cofinancée par la DGA (Direction Générale de l'ARMEMENT) et la Région Alsace.

6.2. Analyse de la latence de *Borrelia* par une approche protéomique et de l'organotropisme de *Borrelia* pour la peau.

6.2.1. Objectifs

Confirmer le rôle de la peau dans la persistance et mettre en évidence des protéines de *Borrelia* qui pourraient servir de marqueurs d'infection active.

6.2.2. Partenariats

Professeur Laurence SABATIER et deux étudiants de doctorat - Gilles SCHNELL et Benoit WESTERMANN - Département des Sciences Analytiques - Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien - CNRS Strasbourg - France.

6.2.3. Etat d'avancement

Ce travail fait l'objet d'une thèse de Doctorat (Antoine GRILLON, AHU en bactériologie).

6.3. Mise au point d'une technique de diagnostic précoce de *Borrelia* dans des biopsies cutanées par spectrométrie de masse.

6.3.1. Objectifs

Comparer une technique de spectrométrie de masse détectant des protéines bactériennes dans la peau aux deux techniques existantes : la PCR et la culture de *Borrelia*.

6.3.2. Partenariats

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

6.3.3. Etat d'avancement

Nous avons mis au point sur modèle murin une technique de diagnostic ciblée, la SRM-MS/MS (Selected Reaction Monitoring / Mass spectrometry).

Cette étude se fait en collaboration avec le service d'Infectiologie (Prof CHRISTMANN et HANSMANN) et de Dermatologie (Prof D. LIPSKER) du CHU de Strasbourg, le CH de Mulhouse (Dr KIEFFER) et le CH de Colmar (Dr MARTINOT).

7. Liste des publications et communications

7.1. Publications nationales

1. La Borréliose de Lyme
F. SCHRAMM, A. GRILLON, S.DE MARTINO, B.JAULHAC
Revue Française des laboratoires, 2013, 457, 35-49.

2. Borréliose de Lyme et neuroborréliose
F. BLANC, **B. JAULHAC**, Y. HANSMANN, JL DIETEMANN, C. TRANCHANT
EMC de Neurologie, 17-051-B-40.

7.2. Publications internationales

1. Smuggling across the Border: How Arthropod-Borne Pathogens Evade and Exploit the Host Defense System of the Skin
Q. BERNARD, **B. JAULHAC**, **N. BOULANGER**.
J Invest Dermatol, 2013, Dec 28. doi: 10.1038/jid.2014.36.
2. Identification of salivary antigenic markers discriminating host exposition between two European ticks: *Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor reticulatus*
V. VU HAI, L. ALMERAS, S. AUDEBERT, M. POPHILLAT, **N. BOULANGER**, P. PAROLA, D. RAOULT, F. PAGES
Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2013, 36 :39-53.
3. Immunoproteomic identification of antigenic salivary biomarkers detected by Ixodes ricinus-exposed rabbit sera
V. VU HAI, F. PAGÈS, **N. BOULANGER**, S. AUDEBERT, P. PAROLA, L. ALMERAS,
Ticks Tick Borne Dis, 2013, 4, 459-468
4. Protéines candidates pour un vaccin contre la maladie de Lyme,
N. BOULANGER, L. SABATIER, **B. JAULHAC**
Brevet N° 1358017, 16 août 2013.

7.3. Communications nationales

1. The Role of Toll-like Receptors During the Early Transmission of Lyme Disease.
Q. BERNARD, **B. JAULHAC**, **N. BOULANGER**
Communication **orale**, Journées de Microbiologie de Strasbourg, 8 avril 2013.
2. Identification des souches de *Borrelia* par spectrométrie de masse Maldi-Tof : développements techniques, constitution d'une base de données spectrales et application en bactériologie clinique au CNR *Borrelia*
S. DE MARTINO, F. SCHRAMM, L. ZILLIOX, **B. JAULHAC**
Communication **orale**, 33^{ème} RICAI, Paris, 21-22 novembre 2013.

7.4. Communications internationales

1. Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* ss population and its involvement on *Borrelia* virulence : study on a murine model
N. BOULANGER, A. KERN, G. SCHNELL, A. BOEUF, L. SABATIER, **S. DE MARTINO**, **B. JAULHAC**
Communication **orale**
Congrès International "Lyme disease and other tick borne diseases", Boston 18-21 août 2013, USA.
2. First detection of Lyme disease *Borrelia* DNA in king penguins (*Aptenodytes patagonicus halli*)
F. SCHRAMM, M. GAUTHIER-CLERC, J.C. FOURNIER, K.D. McCOY, C. BARTHEL, D. POSTIC, Y. HANDRICH, Y. LE MAHO, **B. JAULHAC**
Communication **affichée**
Congrès International "Lyme disease and other tick borne diseases", Boston 18-21 août 2013, USA.

7.5. Conférences sur invitation

1. Human Anaplasmosis in Europe
C. KOEBEL, **B. JAULHAC**, **S. DE MARTINO**
23^{ème} European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlin, 28/04/2013.
2. La borréliose de Lyme : actualités
B. JAULHAC
Séminaire interne, CHU de Lausanne, 17 juin 2013
3. Zoonotic infections transmitted by ticks in Europe
B. JAULHAC
71st Annual Assembly of the SSM : Emerging in a Changing World, Interlaken, 27/06/2013.
4. La borréliose de Lyme : épidémiologie et critères diagnostiques en 2013
B. JAULHAC
Colloque Inserm Interface Rhumatologie-Dermatologie, Paris, 13 novembre 2013.
5. Borréliose de Lyme : rappel sur l'agent infectieux, les examens biologiques – leurs indications et leur interprétation
S. DE MARTINO
Congrès de la Société Française de Pédiatrie 17 mai 2013 Clermont-Ferrand.

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 2013 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

Dr. Pierre Zachary : médecin biologiste, PA, 0,1 % 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 jusqu'au 01/07/2013

Mme Laurence ZILLIOX : Technicienne 75% ETP jusqu'au 01/07/2013 puis à partir du 01/07/2013 Ingénieur Biologiste Hospitalier, 100% ETP affecté au CNR et payés sur les crédits affectés au CNR

Madame Danièle NAPOLITANO : technicienne 60% ETP depuis le 01/09/2013

Tableau 1 :
Effectif / Qualification du Personnel (*actualisé*)

	<i>Médecins biologistes</i>	<i>Praticiens attachés</i>	<i>Ingénieur Techniciens</i>	<i>Total</i>
<i>en Équivalent Temps Plein (ETP)</i>	0,20	0,6	1,60	2,40
<i>Nombre de personnes</i>	2	2	2	6

L'organigramme du CNR est intégré à l'organigramme du plateau technique de Microbiologie

BUREAU PTM

- Coordonnateur : JAULHAC Benoît
- Responsables UF Disciplines :
 - UF 3431 Bactériologie : JAULHAC Benoît
 - UF 3432 CNR Borrelia : JAULHAC Benoît

- Responsables UF STAP :

UF 3461 Logistique et pré-analytique : BRU Valérie

UF 3462 (STAP) : DE MARTINO Sylvie
 BEL Christelle
 AFI-KREMER Samira

Laboratoire de Bactériologie	BACT-M1-ENRG-001
Organigramme fonctionnel du Laboratoire de Bactériologie	Version 3 : 14/02/2014 p. 1/1
Rédigé par : C. MENARD	Approuvé par : B. JAULHAC

Responsable Médical
 Benoît JAULHAC

Céline MENARD, Responsable Qualité
 Céline MENARD, Philippe RIEGEL, Responsables Informatiques

UF 3431					UF 3432	
<p>Secteur SA</p> <p>Sérologie S. DE MARTINO B. JAULHAC</p> <p>Antibiologie E. JEHL V. MURBACH</p>	<p>Secteur VUSB</p> <p>Vénérologie C. KOEBEL E. TWIZEYIMANA</p> <p>Urocultures E. TWIZEYIMANA A. GRILLON</p> <p>Coprocultures P. RIEGEL E. TWIZEYIMANA</p> <p>BMR - Epidémiologie C. MENARD F. JEHL</p>	<p>Secteur HAP</p> <p>Hémocultures B. JAULHAC S. DE MARTINO</p> <p>Anaérobies S. DE MARTINO F. SCHRAMM</p> <p>Liquides Internes, Matériels Implantés, divers P. RIEGEL F. SCHRAMM</p>	<p>Secteur REBK</p> <p>Respiratoire, Mucoviscidose A. GRILLON F. JEHL V. MURBACH</p> <p>Mycobactéries E. SCHRAMM C. KOEBEL E. TWIZEYIMANA</p>	<p>Secteur B. Moléculaire</p> <p>B. JAULHAC C. KOEBEL P. RIEGEL A. GRILLON</p>	<p>Autres Secteurs</p> <p>Réception C. MENARD B. JAULHAC</p> <p>Blotax B. JAULHAC</p> <p>Gardes PTM F. SCHRAMM S. DE MARTINO</p> <p>Milieux de culture G. PREVOST B. JAULHAC</p> <p>Identification P. RIEGEL F. SCHRAMM</p> <p>Antibiogramme E. JEHL F. SCHRAMM</p>	<p>CNR Borrelia</p> <p>B. JAULHAC S. DE MARTINO N. BOULANGER P. ZACHARY</p>
Marie SCHEFFKNECHT, Sandra SEIBERT - Cadres de santé et Carole REVIL -- FF cadre de santé Personnel technique et d'entretien Secrétariat médical						

Responsable : BRU Valérie
 Cadre de santé : SEIBERT Sandra

**UF 3462 (STAP)
 SEROLOGIE ET ANTIBIOLOGIE**

Responsable : DE MARTINO Sylvie
 Biologistes :
 cf. Organigramme fonctionnel bac (BACT-M1-ENRG-001)
 cf. Organigramme fonctionnel par (LPMM-M1-ENRG-002)
 cf. Organigramme fonctionnel viro (VIRO-M1-ENRG-002)
 Cadres de santé : SCHEFFKNECHT Marie
 REVIL Carole (faisant fonction)
 Techniciens : cf. Liste du personnel non médical du PTM (PTM-S1-ENRG-004)

Responsable médical du PTM (PTM-S1-ENRG-004)

**UF 3432
 CNR BORRELIA**

Responsable : JAULHAC Benoît
 Biologistes :
 cf. Organigramme fonctionnel bactériologie (BACT-M1-ENRG-001)
 Cadre de santé : SCHEFFKNECHT Marie
 REVIL Carole (faisant fonction)
 Techniciens : cf. Liste du personnel non médical du PTM (PTM-S1-ENRG-004)

UF 3432 CNR BORRELIA	
Nom - Prénom	ETP
Techniciens	
ZILLIOX Laurence	1
NAPOLITANO Danièle	0,6

RESPONSABLES TRANSVERSAUX

Achats, Informatique, Hygiène et sécurité, Maintenance des équipements, Métrologie, Qualité : cf. PTM-M1-ENRG-002 : Liste des référents du PTM

Formation : STOLL-KELLER Françoise, SEIBERT Sandra
 Gardes et internes : SCHRAMM Frédéric

GROUPE QUALITE

Coordonnateur PTM : JAULHAC Benoît
 Coordinatrice qualité : WENDLING Marie-Josée (RQ Virologie)
 Responsables qualité (RQ) UF disciplines :
 MENARD Céline (Bactériologie)
 FILISETTI Denis (Parasitologie)
 BELOTTI Laure (Hygiène Hospitalière)
 Cadre de santé : SCHEFFKNECHT Marie, SEIBERT Sandra et REVIL Carole (faisant fonction)

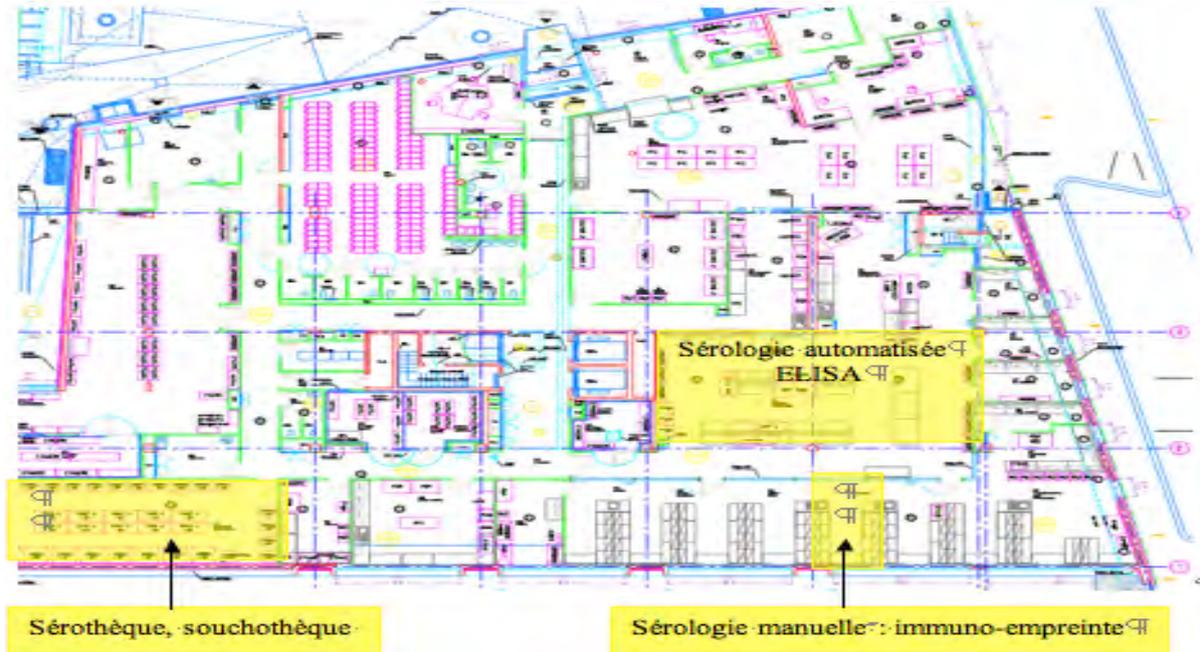
Techniciens référents :
 MIDEY Mélanie
 SOHN Véronique

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

Surface, plan :

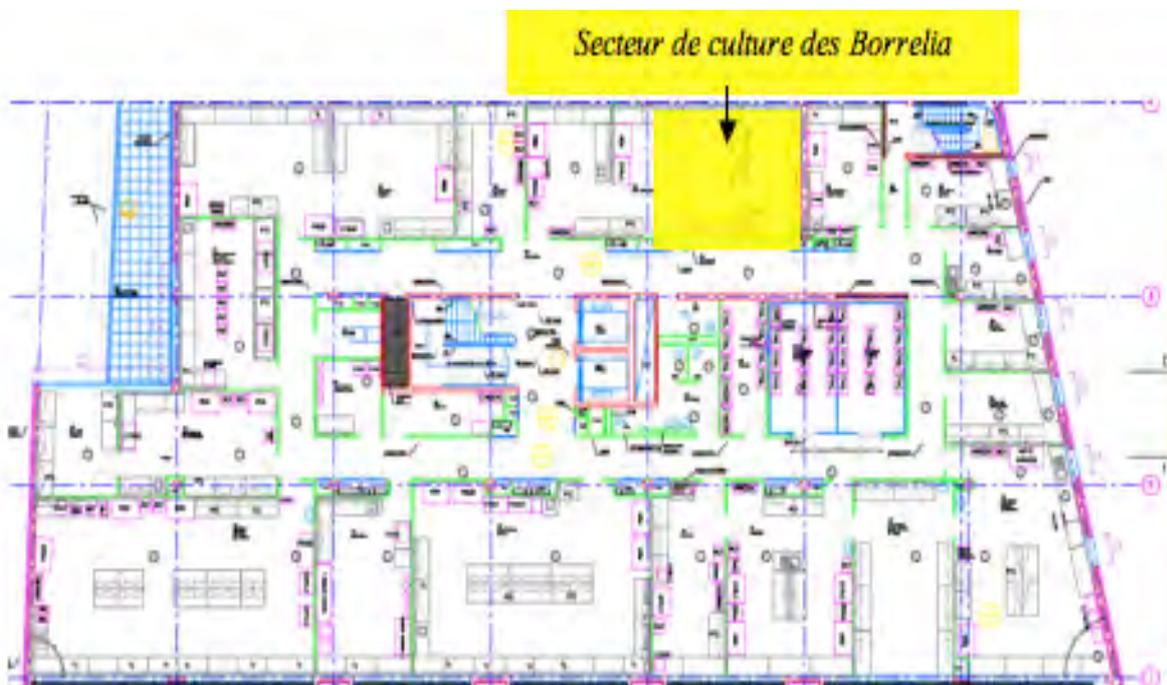
Depuis 2012, le CNR est localisé au sein du Plateau Technique de Microbiologie (bâtiment de 3 500 m² utiles). Son activité s'effectue en fonction des analyses à réaliser dans les différents Secteurs Techniques d'Activité Partagée (STAP) présentés ci après.

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

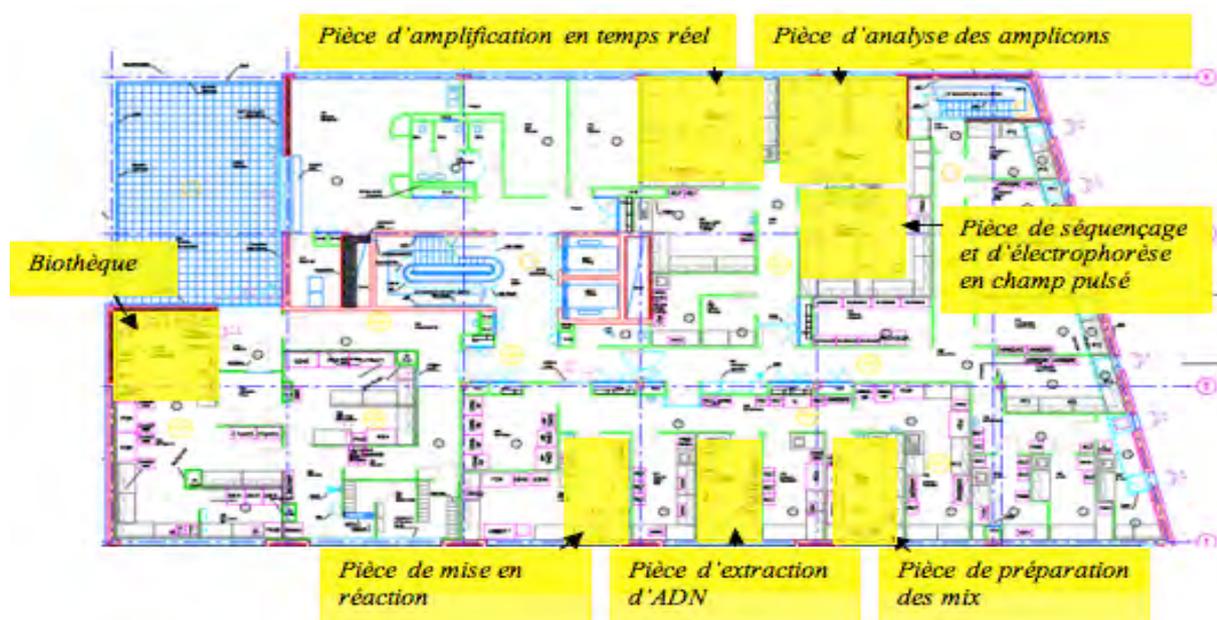


La souchothèque et la sérothèque sont situées dans une pièce séparée à accès réglementé et tracé par badge nominatif

1^{er} étage : secteur de culture :



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 accès 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 trois appareils de PCR en temps réel (Light Cycler (LC) II, LC 480, ABI 7500)
- Imprimante pour étiquettes
- Disque dur externe pour transfert de données
- Appareil photo étanche pour activité vectorielle
- GPS de randonnée pour activité vectorielle

Acquisitions en 2013

- Glacière réglementaire pour activité vectorielle (conservation des tiques lors des collectes)
- Congélateur -80°C (enregistrement continu de la T° et alarme en temps réel 24h/24).

Paragraphe 2.1 - Capacités techniques du CNR (actualisé)

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

2.1.1.1. Techniques disponibles :

2.1.1.1.1. *Techniques de recherche directe de Borrelia burgdorferi sensu lato (modif)*

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 et de tiques pour recherche de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Deux cibles disponibles : fragments des gènes chromosomiques de la flagelline, et *hbb*

Typage direct sur prélèvements humains et de tiques 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).

PCR pour le diagnostic de fièvres récurrentes ciblant l'espace intergénique 16S-23S ADN

Identification des souches de *B. burgdorferi* sensu lato par spectrométrie de masse.

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 VlsE 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 : projet de recherche « biopsies cutanées » (financé par une bourse 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
Erythema migrans	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
Borrelial lymphocytoma (rare)	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
Acrodermatitis chronica atrophicans	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
Lyme neuroborreliosis	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
Lyme arthritis	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.
Lyme carditis (rare)	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.
Ocular manifestations (rare)	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.

**DEMANDE* DE SEROLOGIE SPECIFIQUE
POUR LE DIAGNOSTIC DE LA BORRELIOSE 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 borréliose 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 borréliose de Lyme déjà réalisées sur ces prélèvements:

ELISA SERUM (Réactif :, seuil :) ELISA LCR (Réactif:, seuil :)

- IgM :
- IgG :

- IgM :
- IgG :

WB SERUM (Réactif :) WB LCR (Réactif :)

- IgG : kDa*
- IgM : kDa*

- 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