



CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES *BORRELIA*

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITÉ

Année d'exercice 2014

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 : Mme Nathalie Boulanger PharmD., PhD

Table des matières

Résumé analytique	4
1. Missions et organisation du CNR.....	5
1.1. Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR <i>Borrelia</i>	5
1.2. Description de l'équipe du CNR <i>Borrelia</i>	5
1.3. Description détaillée des locaux et de l'équipement du CNR <i>Borrelia</i>	5
1.4. Description de la démarche qualité du laboratoire.....	5
2. Activités d'expertise du CNR <i>Borrelia</i>	8
2.1. Evolution des techniques au cours de l'année 2014.....	9
2.1.1. Techniques développées ou en développement.....	9
2.1.2. Travaux d'évaluation de trousse commerciale d'immuno-empreintes.....	9
2.1.3. <i>Techniques transférées vers d'autres laboratoires</i>	10
(néant en 2014).....	10
2.2. Activités d'expertise de l'année 2014 et évolutions observées.....	10
2.2.1. <i>Sérologies sanguines de B. burgdorferi si réalisées en 2014</i>	10
2.2.2. <i>Activité d'expertise PCR du CNR Borrelia en 2013</i>	15
2.2.3. <i>Envois extérieurs de matériel biologique du CNR Borrelia en 2014</i>	18
3. Activité de surveillance du CNR <i>Borrelia</i>	19
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.....	19
3.1.1. <i>Surveillance nationale des cas de suspicion de borréliose de Lyme</i>	19
3.1.2. Surveillance des manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France : « protocole biopsies cutanées »	23
3.2. Surveillance du vecteur <i>Ixodes ricinus</i> par le CNR en Alsace	27
3.2.1. Objectifs de la campagne de collecte 2014.....	27
3.2.2. <i>Choix des sites et méthode de collecte</i>	27
3.2.3. Résultats de densités en nymphes en 2014.....	29
3.2.4. <i>Taux d'infection des nymphes en Alsace en 2014</i>	32
3.2.5. <i>Densités en nymphes infectées/100m²</i>	33
3.2.6. Evolution des densités en nymphes entre 2003 et 2014	34
3.2.7. <i>Répartition des espèces de B. burgdorferi si dans les nymphes collectées</i>	37
en 2014	37
3.2.8. <i>Recherche d'autres pathogènes dans les tiques</i>	41
3.3. Participation aux réseaux de surveillance.....	42
3.3.1. <i>Réseau EUCALB – ESGBOR</i>	42
3.3.2. <i>Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance</i>	42
4. Alerte.....	43
5. Activités d'information, de formation et de conseil.....	43
5.1. Information et formation	43
5.1.1. <i>Enseignement</i>	43
5.1.2. <i>Formation médicale continue aux professionnels de santé</i>	44
5.1.3. <i>Information pour les médias grand public et site internet</i>	44
5.1.4. <i>Participation à l'organisation par l'ANSM d'un Contrôle de Qualité Externe (EEQ)</i>	45
5.1.5. <i>Organisation d'un Contrôle de Qualité Externe (EEQ) proposé aux LABM par le CNR</i>	45
5.1.6. <i>Accueil de stagiaires</i>	47
5.1.7. <i>Thèse de doctorat, participation à des jurys</i>	47
5.2. Guides élaborés (contenu, modes de diffusion).....	48

5.3.	Activités de conseil aux professionnels.....	48
5.3.1.	<i>Communications téléphoniques</i>	48
5.3.2.	<i>E-mails</i>	50
5.3.3.	<i>Fax</i>	52
5.4.	Activités d'expertises auprès de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire	52
6.	Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR	53
6.1.	Activités de recherche en cours.....	53
6.1.1.	<i>Analyse de la peau dans la transmission précoce de Borrelia et de son rôle potentiel dans la peau.</i>	54
6.1.2.	<i>Analyse de la latence de Borrelia par une approche protéomique et de l'organotropisme de Borrelia pour la peau.</i>	54
6.1.3.	<i>Mise au point d'une technique de diagnostic précoce de Borrelia dans des biopsies cutanées par spectrométrie de masse.</i>	55
6.1.4.	<i>Mise au point d'une technique de détection de Borrelia burgdorferi sensu lato dans les tiques par spectrométrie de masse</i>	56
6.1.5.	<i>Aspects épidémiologiques de la borreliose de Lyme en zone d'endémie.</i>	56
6.2.	Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR	57
6.2.1.	<i>Publications nationales</i>	57
6.2.2.	<i>Publications internationales</i>	57
6.2.3.	<i>Communications nationales</i>	57
6.2.4.	<i>Communications internationales</i>	58
6.2.5.	<i>Conférences sur invitation, congrès, séminaires</i>	59
	Annexe 1 : Missions & organisation du CNR.....	60
	Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	2

Résumé analytique

En 2014, 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 (notamment avec Dr. E. Couturier pour la mise à jour du site internet <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-transmission-vectorielle/Borreliose-de-lyme> réactualisé en juin 2014) et avec la CIRE Nord-Est dans le cadre de la mise en place de l'étude épidémiologique humaine ALSACETIQUE.

Le CNR a réalisé près de 10 500 sérologies soit 2500 (30 %) de plus qu'en 2013, effectué près de 300 recherches de synthèse intrathécale soit 50 (20 %) de plus qu'en 2013 et réalisé près de 230 analyses de biologie moléculaire spécifique sur prélèvements cliniques pour la confirmation du diagnostic, soit 50 (15 %) de plus qu'en 2013.

La surveillance tant humaine que vectorielle et celle des réservoirs (faune sauvage) a été assurée en 2014 à personnel constant. Cette approche globale permet d'analyser et d'évaluer le niveau de risque de contamination humaine.

Pour pouvoir réaliser ses missions, le CNR utilise l'ensemble des méthodes développées au cours des années précédentes (cf : annexe 2) tant pour le diagnostic de la borréliose de Lyme que 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 1680 contacts, soit une augmentation de 12 % par rapport en 2013 (607 fiches de renseignements, 760 conversations téléphoniques, 260 courriers électroniques et fax et 57 dossiers avec échanges de courriers papiers). Devant l'augmentation des appels de professionnels de santé mais également de nombreux patients, une nouvelle ligne téléphonique d'accueil du CNR *Borrelia* a été ouverte au n° 03 69 55 16 66.

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 2 ans à des EEQ 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.

Entre 2013 et 2014, nous avons observé une tendance à l'augmentation du taux d'infection par *Borrelia* agents de fièvres récurrentes et en particulier *Borrelia miyamotoi*, il est nécessaire de poursuivre nos études sur cette bactérie nouvellement décrite comme pathogène

En 2014, nous avons étudié certains facteurs biotiques et abiotiques qui pourraient impacter la densité en nymphes.

Concernant sa mission d'expertise sur les principaux tests sérologiques commerciaux, le CNR *Borrelia* a initié, en 2014, l'évaluation de 6 coffrets de sérologie par Western Blot ou immunoempreinte.

Sur le plan de la recherche fondamentale le CNR a poursuivi ses travaux sur le thème des interactions des protéines de la salive de tiques avec *Borrelia* et le rôle de l'interface cutanée lors de l'infection initiale par *Borrelia*. 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. Ces résultats sont en cours d'exploration dans le développement d'applications diagnostiques et vaccinales.

1. Missions et organisation du CNR

La description détaillée des missions et organisation du CNR *Borrelia* est présentée en **annexe 1**. Nous avons signalé dans cette partie les changements par rapport au rapport d'activité de l'année 2013.

1.1. Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR *Borrelia*

1.2. Description de l'équipe du CNR *Borrelia*

Voir annexe 1

- **Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR *Borrelia***
- **Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur**
- **Organigramme**

1.3. Description détaillée des locaux et de l'équipement du CNR *Borrelia*

Voir annexe 1

En 2014, le CNR *Borrelia* a acquis une caméra Leica™ DFC450. Il s'agit d'une caméra digitale adaptable sur le microscope à fond noir du CNR *Borrelia*. Sa haute qualité (5 mégapixel CCD sensor) permet de capturer des images fines, ténues et brillantes, telles que des *Borrelia* en suspensions dans un milieu liquide. Cette acquisition permettra de documenter la détection de *Borrelia* issues de divers prélèvements analysés au CNR.

1.4. Description de la démarche qualité du laboratoire

La politique qualité du CNR des *Borrelia* s'inscrit dans le projet global de certification des HUS et d'accréditation du pôle de Biologie et de ce fait dans celle du laboratoire de Bactériologie.

Le CNR a choisi d'intégrer la démarche qualité du pôle de Biologie.

Afin de répondre aux exigences de la version 2012 de la norme « NF EN ISO 15189_Laboratoire d'analyses de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence », le pôle de Biologie a mis en place un système de management de la qualité (SMQ) basé sur l'approche processus.

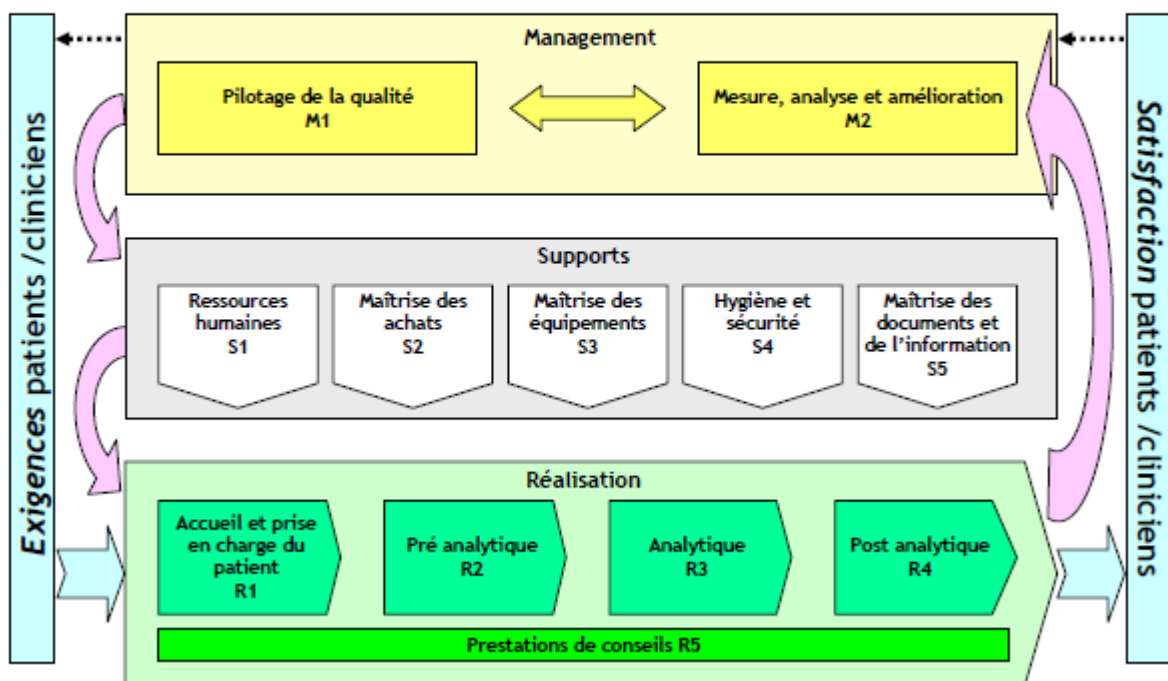
Les processus du laboratoire sont :

- Les processus de management dont la finalité est de :
 - Définir la politique qualité et les objectifs « qualité »,

- Décliner la politique et les objectifs en actions,
 - Surveiller, mesurer et analyser les processus, les prestations et le niveau de satisfaction des clients et des partenaires.
- Les processus supports qui fournissent les ressources nécessaires aux processus de réalisation,
 - Les processus de réalisation qui correspondent aux différentes activités du laboratoire : accueil du patient, préanalytique, analytique, postanalytique et prestations de conseils ; ils permettent de satisfaire les attentes des clients et des partenaires.

Une cartographie décrit les différents processus du laboratoire et leurs interactions (PBIO-M1-ENRG-011_Cartographie des processus).

	Pôle de biologie	PBIO-M1-ENRG-011
	Cartographie des processus	Version 2 : 18/10/12 p. 1/1
Rédigé par : M. BOUZZAOUÏ	Validé par : Groupe qualité - pôle de biologie	Approuvé par : B. LUDES



Afin d'assurer la qualité de nos prestations, nous avons affiché les actions réalisées au sein du CNR pour chaque processus.

Processus de management

Pilotage de la qualité :

- Le CNR des *Borrelia* s'intègre dans la politique qualité du pôle de Biologie.

Mesure, analyse et amélioration :

- Contrôles internes de qualité :
 - Des CIQ sont intégrés à chaque série d'analyse.
 - L'analyse des résultats des CIQ selon les règles définies par Westgard se fait

- en temps réel via des courbes de Levey-Jennings et a pour but d'identifier tout dysfonctionnement afin de prévenir la validation de résultats inexacts.
- Pour la sérologie de Lyme, outre les CIQ proposés par le fournisseur, le CNR a poursuivi la fabrication et la validation de CIQ (pools de sérum), et a poursuivi l'évaluation de CIQ commerciaux indépendants. Une réflexion est en cours afin de valider la stratégie de passage des différents CIQ actuellement utilisés.
- Pour la recherche de *Borrelia* par biologie moléculaire, des CIQ (témoins positif d'amplification, négatif d'extraction), sont également intégrés à chaque série d'analyse.
- Evaluations externes de la qualité (EEQ) :
 - Le CNR est inscrit depuis 2013 à un programme d'EEQ organisé par Labquality® comprenant 2 sérums 4 fois par an pour le sérodiagnostic dépistage de la maladie de Lyme : nous avons obtenu 100 % de conformité en 2014.
 - Le CNR s'est également inscrit pour 2015 à un programme d'EEQ organisé par QCMD® comprenant 8 à 12 échantillons par an pour la recherche de *Borrelia* par biologie moléculaire.
- Traitement des non conformités :
 - Acquisition d'un logiciel de gestion des événements indésirables Normea® par les HUS avec déploiement au pôle de Biologie
- Audits qualité :
 - Le CNR suit la politique d'audit définie par le pôle de Biologie.

Processus support

Ressources humaines :

- Des fiches fonctions et des fiches de poste ont été mises en place.

Maîtrise des achats :

- Les achats et/ou mises à disposition sont effectués par l'intermédiaire des services concernés des HUS, à savoir :
 - La Direction des Equipements (DE) pour les équipements mobiliers et biomédicaux ainsi que les achats de consommables médicaux,
 - La Direction des Achats et de la Logistique (DAL) pour les fournitures de bureau, les travaux d'imprimerie, etc., ...
 - Le Centre de Ressources Informatiques Hospitalières (CRIH) : pour le matériel informatique.

Ces services se conforment aux obligations réglementaires du code des marchés publics.

- La sélection des fournisseurs est réalisée conjointement avec les services supports selon les critères prédéfinis.
- La gestion des stocks et la vérification des dates de péremption sont assurées par le personnel technique.
- L'évaluation des fournisseurs critiques est réalisée chaque année par le personnel du CNR.

Maîtrise des équipements :

- Certaines enceintes thermostatées ont été cartographiées en 2014, les autres le seront en 2015 et un suivi centralisé des températures est en place pour s'assurer de la conservation des réactifs selon les préconisations des fournisseurs.
- Pour la maintenance de ses équipements, le CNR fait appel à la Direction des Equipements via la GMAO (logiciel de Gestion des Maintenances Assistée par

Ordinateur).

Hygiène et sécurité :

- La liste des réactifs dangereux établie en 2012 a été mise à jour.

Maîtrise des documents et de l'information :

- La mise à jour des modes opératoires se poursuit.
- La validation des systèmes informatiques a été mise en place.

Processus de réalisation

Accueil et prise en charge du patient :

- Le CNR ne reçoit pas de patient. Il travaille avec des réseaux de médecins prescripteurs.

Processus préanalytique :

- Amélioration des procédures de réception mises en place en 2012, d'enregistrement et d'envoi des échantillons biologiques : réception et saisie informatique en temps réel d'un échantillon biologique 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
- En 2014, poursuite de la rédaction et réactualisation des modes opératoires « MOPE » préanalytiques (cf : liste des fichiers informatiques « MOPE » du CNR *Borrelia*). Mise en place de l'édition d'un accusé de réception automatique quotidien des examens demandés au CNR.

Processus analytique :

- Les dossiers de validation de méthode sont en cours de finalisation afin de répondre aux exigences de la version 2012 de la norme NF EN ISO 15189.

Processus postanalytique :

- La validation des résultats est réalisée par les biologistes après analyses des résultats des différents CIQ.

Prestation de conseil :

- Le CNR des *Borrelia* est particulièrement impliqué dans le conseil donné aux cliniciens et aux patients en ce qui concerne les modalités de prélèvement et d'envoi d'échantillons biologiques, le choix des techniques à réaliser en fonction du contexte clinique et l'interprétation des résultats.

2. Activités d'expertise du CNR *Borrelia*

annexe 2

2.1. Évolutions des techniques au cours de l'année 2014

2.1.1. Techniques développées ou en développement : néant en 2014

2.1.2. Travaux d'évaluation de trousse commerciales d'immunoempreintes (techniques, réactifs et trousse ; méthode, état d'avancement)

Dans le cadre de nos missions de Centre National de Référence des *Borrelia*, nous avons proposé aux fabricants et fournisseurs français d'évaluer leurs réactifs sérologiques de confirmation des infections à *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Bbsl) par immuno-empreinte.

Notre objectif est d'évaluer et de comparer les coffrets disponibles sur le marché français. Cette évaluation est importante notamment pour les biologistes utilisateurs des tests dans la pratique quotidienne, ces derniers nous sollicitent en effet régulièrement pour avoir de telles informations.

Pour mener à bien cette étude, nous avons sollicité en septembre 2014 la participation des sociétés dont nous avons connaissance. La majorité a répondu positivement et nous ont fourni gracieusement les réactifs nécessaires. Une fois les problèmes organisationnels et logistiques résolus (automatisation partielle), nous débuterons les manipulations

Actuellement, 7 coffrets disponibles (cf : tableau ci-dessous) sont en cours d'évaluation comparative sur les différents panels de sérums suivants :

- **Panel 1** : sérums de patients atteints d'érythème migrant diagnostiqués par des dermatologues ou des infectiologues et confirmés par recherche directe de *Borrelia* (culture ou amplification génique)
- **Panel 2** : sérums de patients atteints de neuroborréliose évolutive selon les critères de l'EUCALB et ayant une sérologie positive dans le LCR confirmée par un index de synthèse intrathécale spécifique
- **Panel 3** : sérums de patients ayant une manifestation tardive de la borréliose de Lyme (arthrite ou acrodermatite) diagnostiqués par des dermatologues, des infectiologues ou des rhumatologues et pour certains, confirmés par recherche directe de *Borrelia* (culture ou amplification génique)
- **Panel 4** : sérums de donneurs de sang (Il s'agit de sérums de patients citadins ne fréquentant pas les forêts. Les sérums prélevés ont été retenus sur la base de leur négativité par notre western-blot maison)
- **Panel 5** : sérums de patients atteints de maladies donnant potentiellement des réactions croisées (syphilis évolutive, mononucléose infectieuse, maladies auto-immunes)

Au total, cette étude sera réalisée sur :

- une centaine de sérums de donneurs de sang
- une centaine de sérums des différentes manifestations cliniques de la borréliose de Lyme
- une centaine de sérums donnant des réactions croisées.

Caractéristiques techniques et applications pratiques des trousse d'immunoempreintes évaluées ; réactifs utilisés pour la confirmation sérologique de l'infection à *Borrelia burgdorferi* sensu lato :

Nom de la trousse	Recom line <i>Borrelia</i> IgG/M	Euroline RN-AT IgG/M	Euroline WB IgG/M	Virastripe IgG / M	<i>Borrelia</i> Europe LINE IgM	<i>Borrelia</i> Europe Plus TPn17 line IgG	Lymecheck optima IgG/M
-------------------	--	----------------------------	----------------------	-----------------------	---------------------------------------	--	---------------------------

Automate	Euroblot	Euroblot	Euroblot	Autoblot	Autoblot	Autoblot	Autoblot
Temps total	2H 30 MIN	2H	2H	1H 40 MIN	2H	2H	2H 30 MIN
Fournisseur	MIKROGEN	Bioadvance	Bioadvance	Servibio	Ingen	Ingen	ALL DIAG

Le test employé pour la confirmation sérologique initiale des échantillons des panels détaillés ci-dessus a été développé au CNR *Borrelia*. L'antigène utilisé provient d'une souche native de *Borrelia garinii* isolée d'un érythème migrant de patient. Cette souche autochtone a été sélectionnée pour ses propriétés antigéniques parmi des souches cliniques humaines des 3 principales espèces de *Borrelia burgdorferi* sensu lato pathogènes pour l'homme.

2.1.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires (néant en 2014)

2.2. Activités d'expertise de l'année 2014 et évolutions observées

En 2014, l'activité diagnostique s'est maintenue par rapport à l'année 2013. 8756 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 ± culture. Sur l'ensemble de ces prélèvements, le nombre d'analyses sérologiques réalisées par le CNR s'élève à 10 491. Parmi ces analyses, 11,1 % ont été réalisées à titre gratuit car elles étaient accompagnées d'une fiche de renseignements cliniques et épidémiologiques. Ce taux représente 1260 analyses réalisées sur 900 soit 10.3 % 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.

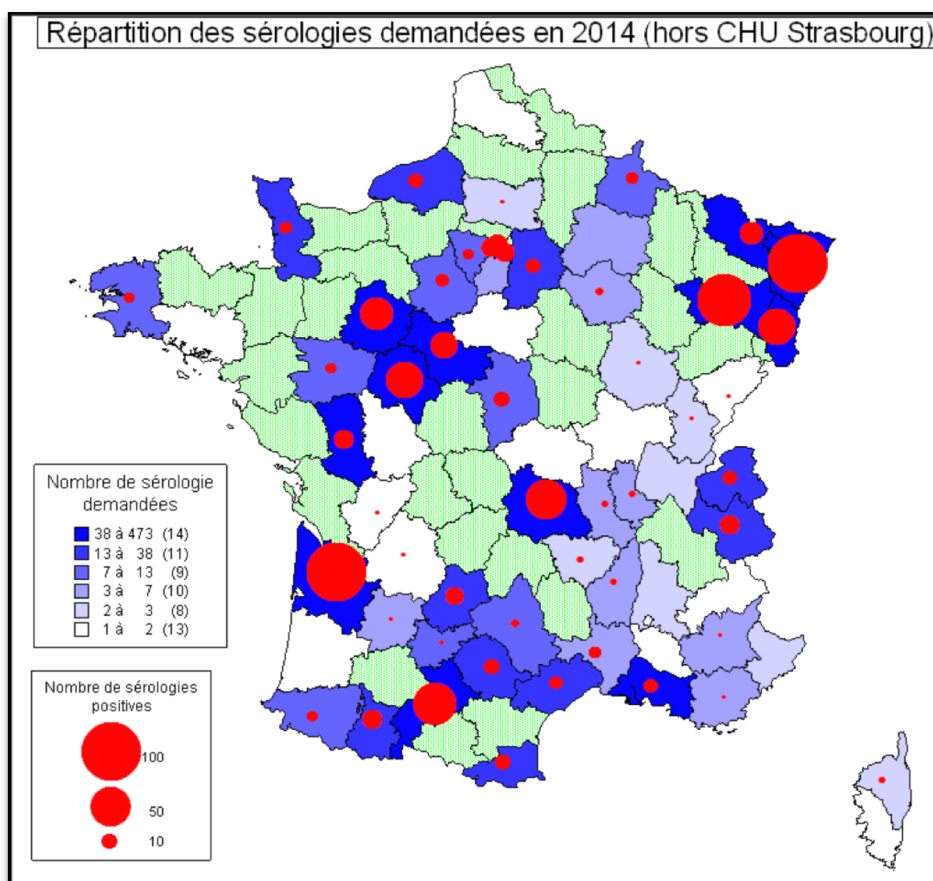
2.2.1. Sérologies sanguines de *B. burgdorferi* si réalisées en 2014

2.2.1.1. Sérologies de dépistage par ELISA

En 2014, nous avons réalisé 7 655 sérologies de dépistage sur 5 919 sérums, 1 734 LCR et 2 liquides articulaires (la sérologie sur liquide articulaire n'étant pas validée par les troussees commerciales actuelles, en cas de suspicion d'arthrite de Lyme, la sérologie dans le sérum est privilégiée ainsi que l'amplification génique éventuelle sur prélèvement (liquide/biopsie) synovial). Ils provenaient de 62 départements répartis sur le territoire national. Cette activité est en légère augmentation par rapport à 2013 (+ 1,5 %).

Origine géographique (hors CHU de Strasbourg) des résultats positifs pour les sérologies de dépistage adressées au CNR des *Borrelia* en 2014

En France, hors CHU de Strasbourg, les demandes émanaient de 62 départements (contre 59 en 2013) et représentaient 2269 analyses (contre 1893 en 2013). La carte ci-dessous objective les départements demandeurs et le nombre d'analyses positives en sérologie de dépistage ELISA.



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 :

- 1539 sérums dont 590 (38,3 %) étaient positifs et 158 (10,3 %) étaient douteux
- 728 LCR dont 250 (34,3 %) étaient positifs
- 2 liquides articulaires dont aucun n'était positif

Au total, 998 prélèvements étaient positifs (37 % en 2014 versus 37,9 % en 2013) ou douteux (7 %) en ELISA. La spécificité de ces résultats a été confirmée par immunoempreinte, conformément aux recommandations nationales et européennes.

Répartition des sérums testés et des résultats positifs pour les sérologies de dépistage en ELISA adressées par l'Alsace au CNR des Borrelia en 2014

En Alsace, zone d'endémie de la borréliose de Lyme, en 2014 les demandes représentaient 5810 analyses, soit 2,5 fois plus que les demandes nationales dont 5386 (92,75 %) venant du CHU de Strasbourg et 421 (7,25 %) hors CHU. On observe une augmentation nette des demandes de sérologies provenant de laboratoires hors CHU (7,25 % en 2014 versus 2,9 % en 2013).

La nature des échantillons biologiques adressés au CNR (sérum, LCR et liquide articulaire) était superposable entre CHU de Strasbourg et demandes hors CHU, soit près de 76 % de sérums et 24 % de LCR.

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

- 299 sérums dont 143 (40,7 %) positifs
- 122 LCR dont 30 (24,6 %) positifs

Sur ces 421 demandes, 173 (41,1 %) étaient positives en ELISA. La spécificité de ces résultats a été confirmée, conformément aux recommandations, par immunoempreinte.

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 % et de 41,1%. Globalement, ces chiffres sont stables par rapport à l'activité de 2013.

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

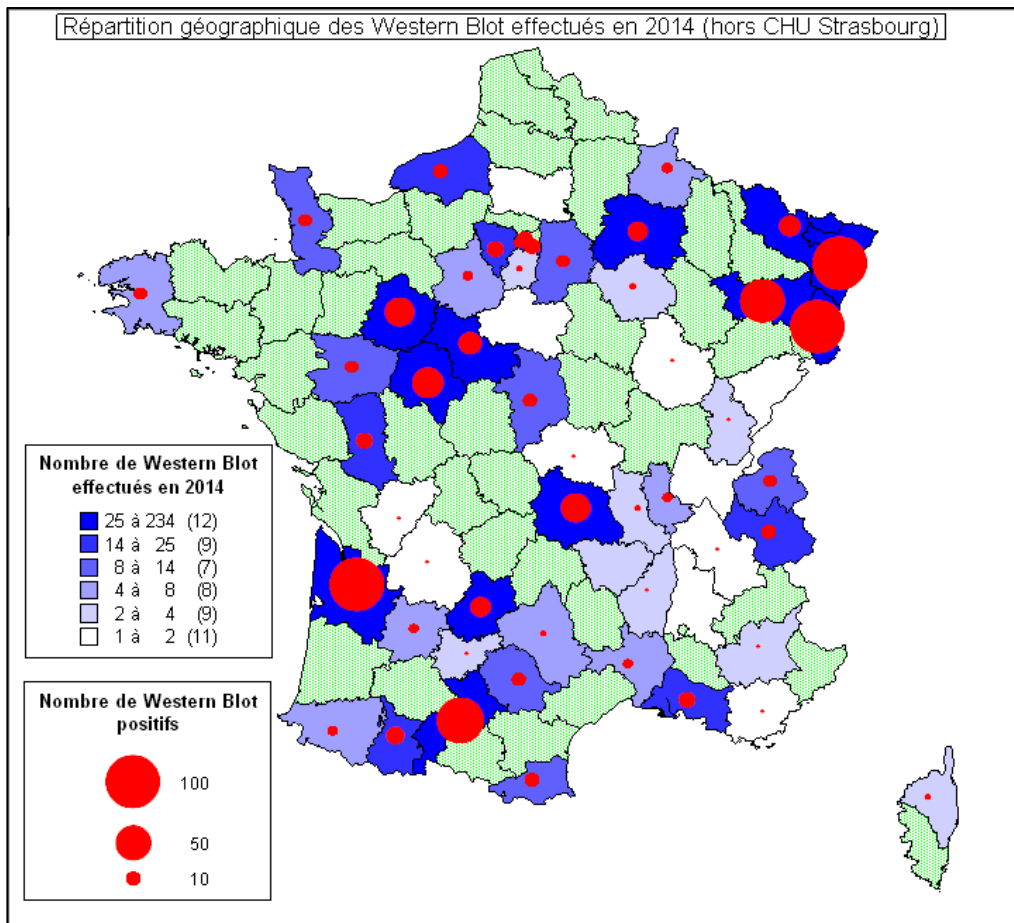
En 2014, nous avons réalisé 2526 confirmations par western-blot (WB). Cette activité est stable par rapport à 2013. Souvent, seule l'immunoempreinte nous était demandée sur des sérums déjà dépistés positif en ELISA par les laboratoires demandeurs. Le WB étant une technique de confirmation de spécificité, 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 2101 sérums et 425 LCR.

Sur ces 2526 analyses, 1709 étaient positives par WB, soit 67,7 %. Par conséquent, près d'un tiers (32,3 %) 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 2014 en France (hors région Alsace)

Les demandes de confirmation sérologique provenaient de 56 départements français répartis sur le territoire national (contre 53 en 2013). Les demandes en France, hors CHU de Strasbourg, représentaient 1339 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 :

- 1040 sérums dont 705 (67,8 %) positifs
- 299 LCR dont 212 (70,9%) positifs

En moyenne, la spécificité des anticorps a bien été confirmée par western blot pour 68,5 % des prélèvements initialement dépistés positifs en ELISA.

Sur l'ensemble de ces demandes, 368 prélèvements, soit 27,6 %, ont été adressés uniquement pour confirmation WB. Parmi ces 368 demandes, 243 (66 %) étaient positives.

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 et des résultats positifs pour les sérologies de confirmation adressées CNR des Borrelia en 2014

Cette année, 1579 western-blot réalisés par notre laboratoire ont été prescrits en Alsace. Parmi ces analyses, 1058 (67 %) étaient positives. Selon la nature du prélèvement, les demandes étaient réparties de la manière suivante :

- 1392 sérums dont 929 (66,7 %) positifs
- 187 LCR dont 129 (68,9 %) positifs.

Les demandes du CHU de Strasbourg étaient majoritaires, elles représentaient 1180 analyses (74,7 %). Les demandes hors CHU ont généré 399 analyses (25,3 %). La spécificité des anticorps a été confirmée par western blot pour 67,8 % des prélèvements initialement dépistés positifs ou douteux en ELISA.

En 2013, environ 3/4 des demandes étaient réellement positives, confirmées par immunoempreinte, alors qu'en 2014, seulement 2/3 des demandes le sont. Devant l'augmentation du nombre de demandes (+ 17,4 %) et la diminution du nombre de sérologies confirmées positives, montrent une tendance à la prescription de tests sérologiques de confirmation sans fondement, c'est-à-dire chez des patients ne présentant probablement pas les éléments cliniques et anamnestiques en faveur d'une infection à *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

2.2.1.3. Etude de la synthèse intrathécale spécifique anti *Borrelia burgdorferi* sensu lato

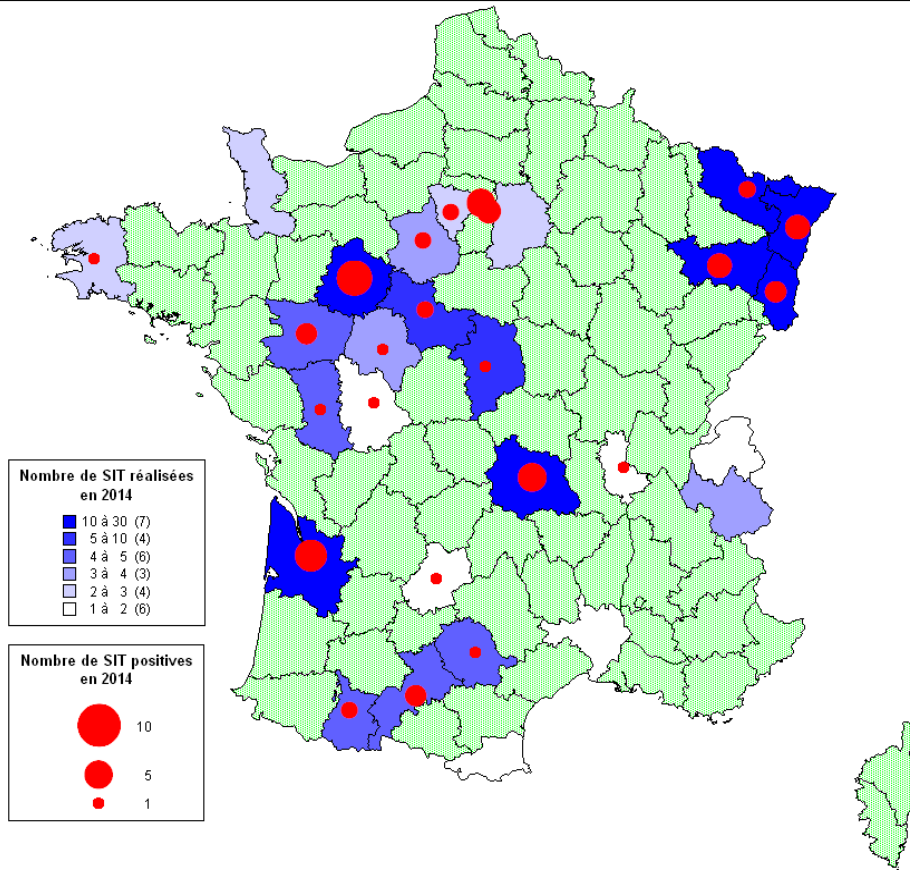
Les neuroborrélioses représentent en France comme dans toute l'Europe, la forme disséminée la plus fréquente de la borréliose de Lyme. La mise en évidence d'une synthèse intrathécale (SIT) spécifique d'anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* sensu lato fait ainsi partie en Europe (à la différence des 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 2014, l'ensemble des demandes de SIT s'élevait à 1262 (versus 830 en 2013), dont 952 (75,4 %) 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. Les demandes de SIT ont augmentées de 52 %, et le taux de SIT non réalisées est passé de 68,4 % en 2013 à 75,4 % en 2014, on note ici une dérive des prescriptions.

Au total, les 310 demandes de SIT réalisées nous ont été adressées de 30 départements (contre 17 en 2013). Les cliniciens du CHU de Strasbourg en ont prescrit 97 (versus 88 en 2013), par ailleurs 213 autres demandes nous ont été réalisées pour différents laboratoires (principalement de CH et de CHU). Globalement, le nombre de demandes extérieures au CHU de Strasbourg est en augmentation de 22,4 % depuis 2012.

Répartition géographique des synthèses intrathécales en 2014 (hors CHU Strasbourg)

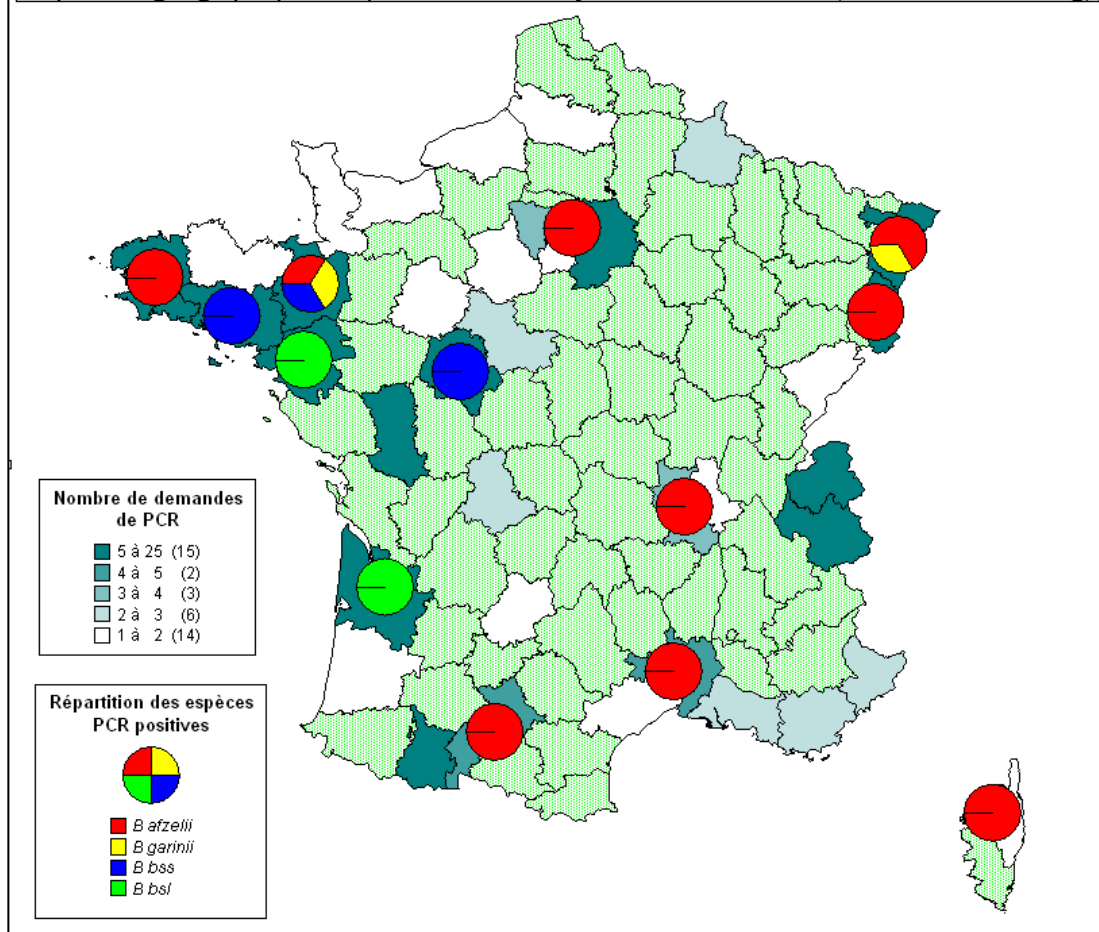


Le nombre d'analyses positives était de 78, soit 25,2 %, permettant d'affirmer dans ce cas le diagnostic de neuroborréliose. Inversement, dans 68,4 % des cas où la sérologie était positive dans le LCR sans détection de SIT spécifique, ce test a permis d'éliminer ce diagnostic. Dans 6,4 % des cas le résultat de la SIT est douteux, ne permettant ni d'affirmer, ni d'infirmer le diagnostic.

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

En 2014, 231 prélèvements provenant de 40 départements (versus 36 en 2013) ont été adressés au CNR pour recherche de *Borrelia* par PCR (carte ci-dessous). Ce nombre de demande a augmenté de 32 % par rapport à l'année précédente.

Répartition géographique des prélèvements analysés en PCR en 2014 (hors CHU Strasbourg)



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

Parmi les prélèvements reçus, on comptait 105 LCR, 71 prélèvements articulaires et 55 prélèvements divers (biopsies : cutanée, de tissu profond, de fragment d'articulation, extrait ADN d'hémoculture, humeur aqueuse, sang, et hémoculture). La demande de PCR par rapport à 2013 a augmentée de 32 %.

Ainsi, près de 45,5 % des prélèvements adressés étaient des LCR mais aucun n'était positif. L'absence de positivité pour les LCR 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 = 71), 9 étaient positifs (12,7 %) : 4 à *B. burgdorferi* sensu stricto, 2 à *B. afzelii*, 1 à *B. garinii* et 2 non typables.

L'origine géographique des cas était diverse (Libourne, Nantes, Renne, Strasbourg, Toulouse et Tours). Il s'agissait d'enfants dans la moitié des cas. Dans les cas renseignés, le tableau clinique correspondait à une monoarthrite du genou, conformément à la définition de l'EUCALB.

Enfin, parmi les 55 prélèvements divers, 12 biopsies étaient positives (21,8 %) : 10 à *B. afzelii*, 1 à *B. burgdorferi* sensu stricto et 1 à *B. garinii*. Dans les biopsies positives, 9 proviennent du « protocole biopsies cutanées » - Etude de la diversité des espèces de *Borrelia* dans les manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France (voir chapitre 3.1.2), et les 3 autres ont été adressées par le CHU de Nîmes, l'hôpital de Créteil et le CHU de Toulouse.

Espèces de *Borrelia* détectées en PCR en 2014 selon la nature des prélèvements

Espèce de <i>Borrelia</i>	Prélèvements articulaires	LCR	Divers	Total
<i>B. afzelii</i>	2 (liquide synovial)	0	10	12
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	4 (liquide synovial)	0	1	5
<i>B. garinii</i>	1 (liquide synovial)	0	1	2
<i>B. burgdorferi</i> sl non typable	2 (liquide synovial)	0	0	2

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

En 2014, nous avons réceptionné 16 demandes d'analyses (versus 7 en 2013), pour suspicion de fièvres récurrentes entre février et décembre 2014. Les prélèvements provenaient de la région parisienne pour 3 d'entre eux (Pitié Salpêtrière, Paris ; Necker, Paris) et de province pour 13 d'entre eux Agen (n=1) Garches (n=4), Lyon (n=1), Nice (n=2), Marseille (n=2), Montbelliard (n=1), Montceau Les Mines (n=1), et Sarrable (n=1).

Parmi les patients, on comptait 8 femmes entre 30 et 64 ans et 8 hommes entre 21 et 63 ans. 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 16 analyses, seule la demande provenant du CH d'Agen était positive. Il s'agissait d'une femme de 46 ans qui a séjourné 3 semaines au Maroc. Le premier épisode fébrile a eu lieu une semaine après son arrivée au Maroc, elle présentait également symptômes cardiaques : palpitations. Son frottis sanguin coloré au MGG était positif, la PCR spécifique sur sang total était positive à *B. crocidurae*. Ses symptômes ont régressé sous traitement par Ceftriaxone® avec une posologie de 2 g/jours durant 21 jours.

Parmi les 15 patients négatifs, l'un présentait des épisodes fébriles depuis plusieurs années avec de nombreux voyages à l'étranger (Asie, Amérique du Sud et Afrique), pour deux d'entre eux, les examens complémentaires ont permis de mettre en évidence une infection par *Plasmodium*.

La grande majorité des demandes faisaient suite à de retour de séjours à l'étranger (Togo, Centre Afrique, Sénégal, Moyen-Orient, Cap Vert, Nigéria). Divers symptômes étaient associés suivant les cas : sueurs nocturnes, myalgies, arthralgies, cytopénie, céphalées.

Quatre demandes correspondaient à des recherches pour des patients asymptomatiques ou sans facteur de risque : pas de voyage à l'étranger ou pas de récurrence de l'épisode fébrile, voire pas de fièvre du tout. Ces quatre analyses se sont révélées négatives.

Photo de *Borrelia* de fièvre récurrente [Source : L. Zilliox, CNR *Borrelia*, Strasbourg (2014)]



2.2.3. Envois extérieurs de matériel biologique du CNR *Borrelia* en 2014

En 2014, 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 ou de projets concernant la réponse immunitaire après infection par *Borrelia*.

Date d'envoi	Matériel biologique	Souche	Raison
02/04/2014	Extraits d'ADN	<i>Borrelia afzelii</i> VS461 <i>Borrelia garinii</i> 20047 <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto B31 <i>Borrelia valaisiana</i> VS116 <i>Borrelia lusitaniae</i> PotiB2	Projet de recherche <i>Détection de Borrelia</i> et oiseaux de mer
22/04/2014	Cellules broyées infectées	/	Projet de recherche réponse des fibroblastes à l'infection par différentes espèces de <i>Borrelia</i>
11/06/2014	Culots bactériens	<i>Borrelia afzelii</i> IBS 26 <i>Borrelia afzelii</i> IBS 39 <i>Borrelia afzelii</i> IBS 51	Projet de recherche « impact of chronic bacterial infection on NKT cell lymphomagenesis in mice and humans »
24/06/2014	Biopsies cutanées	4 échantillons	Projet de protéomique <i>Borrelia</i>
04/07/2014	Biopsies cutanées	5 échantillons	Projet de protéomique <i>Borrelia</i>
29/08/2014	Biopsies cutanées	4 échantillons	Projet de protéomique <i>Borrelia</i>
14/12/2014	Extraits d'ADN	<i>Borrelia afzelii</i> VS461 <i>Borrelia garinii</i> 20047 <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto B31 <i>Borrelia valaisiana</i> VS116 <i>Borrelia spielmanii</i> A14S	Mise au point technique de détection

3. Activité de surveillance du CNR *Borrelia*

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 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 du CNR
- surveillance régionale des cas d'anaplasmose granulocytaire humaine dans la région Nord-Est

Les données ci-dessous rendent compte et synthétisent ces activités en 2014, en insistant sur les différentes catégories cliniques recensées durant cette année.

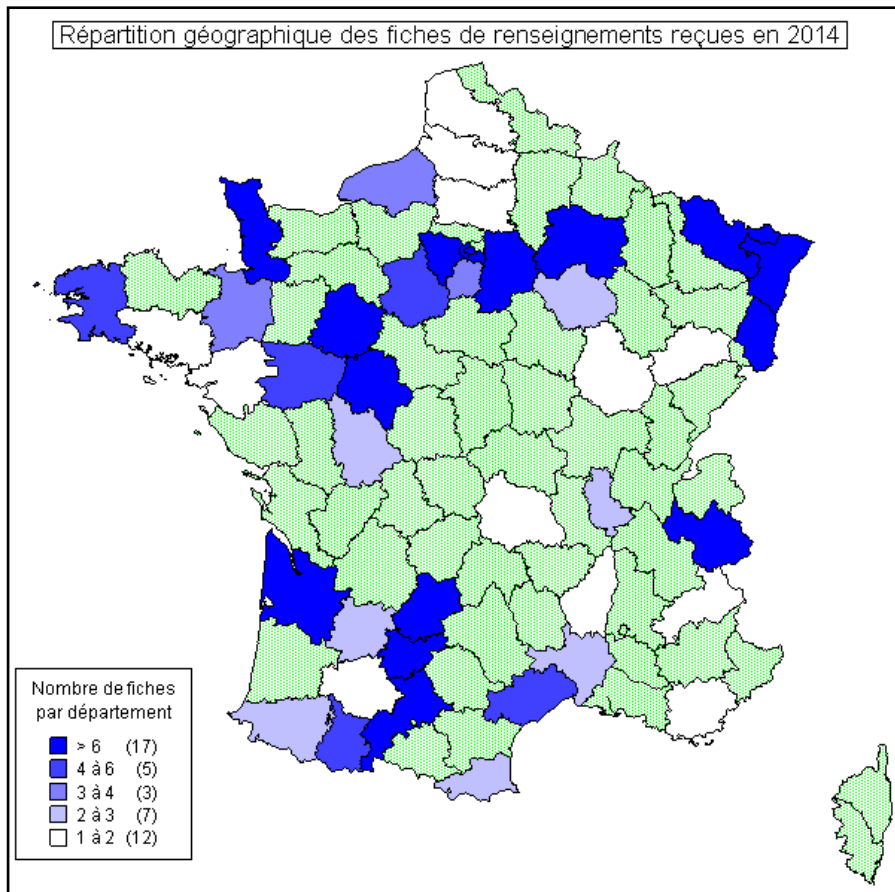
3.1.1 Surveillance nationale des cas de suspicion de borréliose de Lyme

Pour cette surveillance, nous avons analysés les fiches de renseignements recensées durant l'année 2014 afin de fournir des informations sur les différents items de ces fiches (âge, sexe, facteur(s) de risque(s), épidémiologie, clinique, ...).

Les données analysées ont été préalablement réunies puis saisies dans un fichier Excel® contenant la retranscription manuelle des fiches de renseignements 2014 du CNR des *Borrelia*, les résultats biologiques issus du serveur de résultats d'analyses. Chaque cas a été ensuite classé en différentes catégories en fonction des critères diagnostiques de l'EUCALB (European Concerted Action on Lyme Borreliosis : voir annexe 2).

Les résultats montrent que durant l'année 2014, 607 fiches de renseignements ont été recensées contre 539 en 2011 et 458 en 2012, soit une augmentation constante de près de 12% du nombre de demandes par an. La majorité des fiches réceptionnées provenaient de Centres Hospitaliers (318/607 soit 52,3 %) et de Centres Hospitaliers Universitaires (231 soit 38 %), soit 90,3 % provenant d'un hôpital (contre 97,8 % en 2013 et 92,6 % en 2012).

Par contre, parmi ces fiches, 7,2 % (44 sur 607) ont été mal remplies voire totalement inexploitable contre 3,3 % en 2013. On note donc une nette augmentation du nombre de fiches mal remplies. Afin de pallier cette insuffisance, nous avons prévenu les prescripteurs que les dossiers inexploitable sur le plan épidémiologique ou clinique ne pouvaient pas être utilisés pour les activités de surveillance du CNR et ne pouvaient donc pas bénéficier de la prise en charge financière des analyses par le CNR *Borrelia* et seraient facturées à partir de 2015.

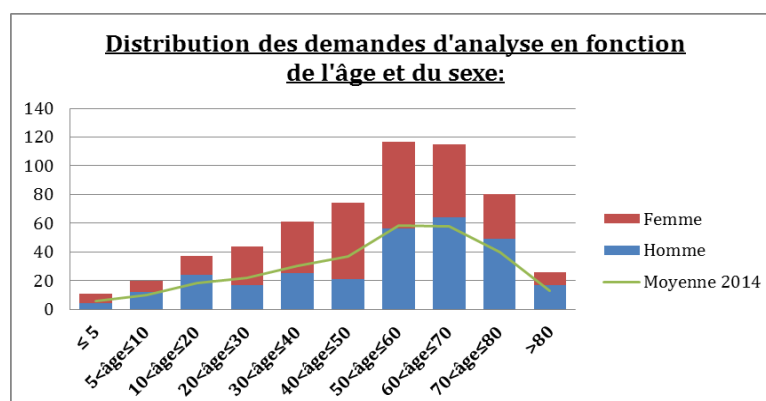


Les fiches analysées proviennent principalement des CH ou des CHU des grandes villes comme Toulouse (117 fiches soit 19,3 %), Bordeaux (106 fiches reçues soit 17,5 %), Le Mans (90 fiches soit 14,8 %), Tours (38 fiches soit 6,3 %) ou Reims (23 fiches soit 3,8 %). Le reste des demandes proviennent d'environ 50 autres établissements répartis sur l'ensemble du territoire. Dans ces derniers, le nombre de demandes varie globalement de 1 à 20. La répartition est globalement stable par rapport à 2013.

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

La répartition montre 53,7 % de cas masculins (326/607) et 45,9 % de cas féminins (279/607). Le sexe ratio des patients était de 1,2 en 2014 contre 1,1 en 2013.

Représentation ci-dessous du nombre de patients en fonction de l'âge et du sexe :



L'âge des patients variait de 1 à 94 ans, cette distribution est stable par rapport à 2013 et 2012. 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,...).

Parmi les patients recensés, 81 patients (13,3 % contre 18,7 % en 2013 et 12,9 % en 2012) présentaient 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 :

- 30 cas de neuroborrelioses (NB) (37 %)
- 25 cas d'érythèmes migrants (EM) (30,9 %)
- 18 cas d'arthrites de Lyme (AL) (22,2 %)
- 5 cas d'acrodermatite chroniques atrophiantes (ACA) (6,2 %)
- 3 cas d'atteintes cardiaques due à *Borrelia* (3,7 %)

Le taux de 37 % de neuroborrelioses (NB) est cohérent avec les données de la littérature européenne indiquant que les NB sont les manifestations disséminées les plus fréquentes en Europe. Ce taux est similaire aux années précédentes (32,7 % en 2013 et 30,5 % en 2012) ce qui est en faveur d'une stabilité du nombre de NB en France et une stabilité des formes non typiques de NB en France, formes pour lesquelles les cliniciens s'adressent au CNR *Borrelia* .

Le taux de 30,9 % d'érythème migrant a diminué par rapport aux années précédentes (EM 49,5 % en 2013 et 44,1 % en 2012). Il est logique que le taux d'érythème migrant recensé par le CNR soit inférieur au taux de NB car le diagnostic des EM est d'une part essentiellement clinique et d'autre part le plus souvent typique.

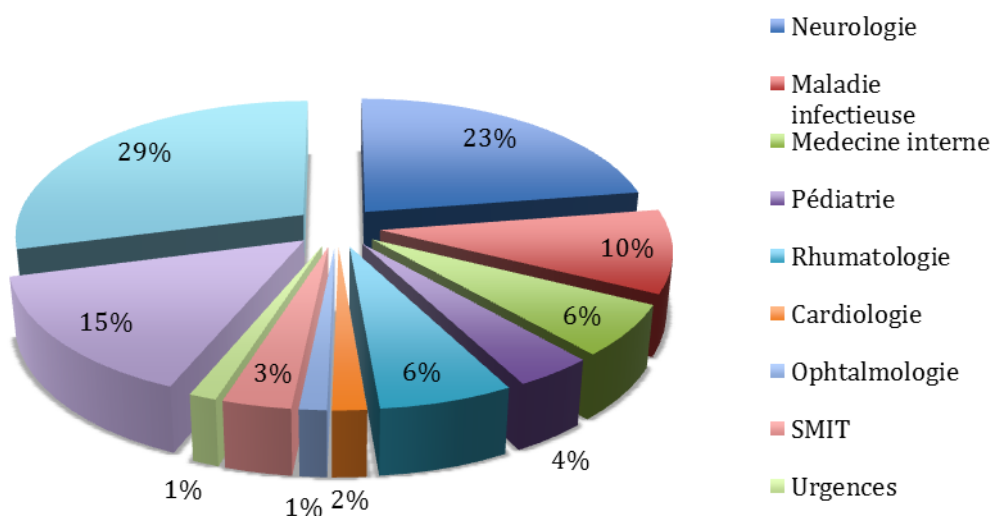
Le taux d'arthrite de Lyme recensées au CNR a doublé de 2013 à 2014 (11,9 % en 2013) Cela pourrait être lié au fait que les recommandations EUCLAB et du CNR d'analyser le liquide articulaire en cas d'arthrite sont mieux suivies par les cliniciens afin de mieux documenter les cas d'arthrite de Lyme.

Les différents facteurs de risque des patients présentant un diagnostic de Lyme certain recensés en 2014 ont été évalués. Le profil de ces patients en fonction de leurs facteurs de risque est semblable à celui de 2013 et de 2012. On note que le risque de présenter une infection à *Borrelia* est plus important en pratiquant une activité de loisir en pleine nature qu'en étant en contact avec des animaux est autour de 25 % (24,8 % en 2013 et 19,8 % en 2012).

La majorité des fiches réceptionnées provenaient de Centres Hospitaliers et de CHU ; 29 % (177/607) des fiches ne mentionnaient pas la spécialité médicale d'origine (similaire à 2012).

La répartition des fiches en fonction des spécialités est semblable à l'an passé :

Distribution des fiches de renseignement en fonction de la spécialité médicale

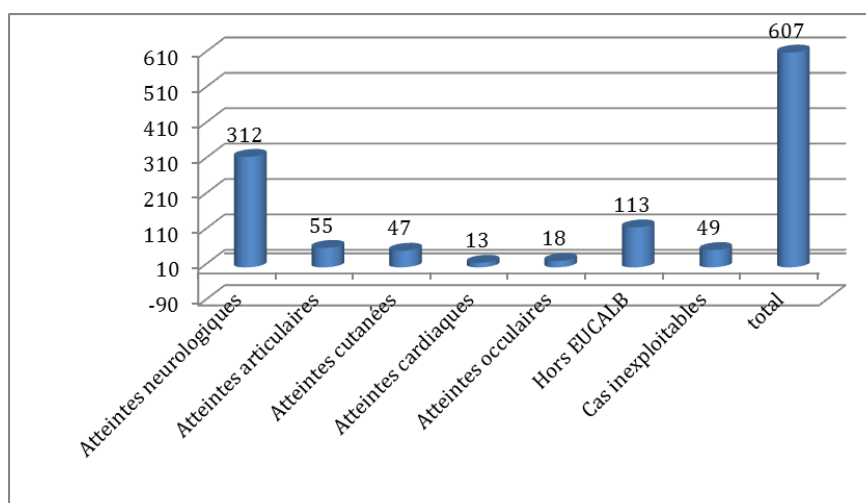


La neurologie reste la spécialité la plus demandeuse avec 22,6 % des demandes (137/607) (23,8 % en 2013 et 27,9 % en 2012). Ceci est dû au fait que les diagnostics délicats s'orientent le plus souvent vers la suspicion de neuroborréliose.

Les 294 autres fiches analysables, soit 48 % (54,4 % en 2013), provenaient d'autres spécialités, principalement de maladies infectieuses, médecine interne, pédiatrie, urgences, rhumatologie et service de maladies infectieuses et tropicales (SMIT). La catégorie « Autres » regroupe des spécialités peu demandeuses comme la dermatologie, la microbiologie, la réanimation, l'hématologie, l'ORL, la gériatrie, la biologie médicale, la néphrologie, etc.

Les différents cas de l'année 2014 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.

Répartition des cas cliniques en fonction du type d'atteinte



On remarque que les atteintes neurologiques sont les atteintes pour lesquelles il y a le plus de demandes d'aide au diagnostic, avec 51,5 % (54 % en 2013). Les atteintes articulaires arrivent en deuxième position avec 9 % (versus 16,9 % en 2013) suivis par les atteintes cutanées avec 7.8 % (versus 15 % en 2013).

Les atteintes cutanées regroupent les suspicions d'érythème migrant (78 % des suspicions), d'érythèmes migrants multiples (2 %), de lymphocytomes cutanés bénins (6 %) et d'acrodermatites chroniques atrophiantes (14 %). Les autres types d'atteintes (cardiaques, oculaires) sont plus rares (5 %).

Il est à noter que seulement 2 % des patients présentaient au moins deux atteintes à la fois, soit 12 sur 607 demandes (versus 16 % en 2013). Chez ces patients, on rencontrait le plus souvent l'association entre atteintes neurologique et cutanée, dans 58 % des cas (7/12) ; par ailleurs 3 cas présentaient une atteinte neurologique associée à une manifestation articulaire et 2 cas présentaient une manifestation oculaire associée à une manifestation neurologique.

En 2014, on observe une diminution des cas « hors EUCALB » adressés au CNR d'environ 8 % par rapport à 2013 (de 25,2 % en 2013 à 18 % en 2014, soit 110/607). Le niveau de ces cas a rejoint la tendance de 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. Chez la plupart de ces patients « hors EUCALB », une borréliose a été suspectée face à des symptômes peu spécifiques (algie, asthénie, fièvre, lésion cutanée atypique hors EM, vertiges, épilepsie, hépatite, syphilis, troubles mnésiques isolés,...). Parmi ces demandes « hors EUCALB », ont été adressées au CNR 25 suspicions de neuroborrélioses, dont une associée à une suspicion d'arthrite, 6 suspicions d'arthrite seule, 1 suspicion d'atteinte oculaire, 1 suspicion d'atteinte cardiaque, et une suspicion d'érythème migrant.

Enfin, 8 % des cas (49/607) étaient inexploitablement par manque d'informations cliniques sur le patient (absence de fiche de renseignements spécifique du CNR ou défaut majeur de remplissage).

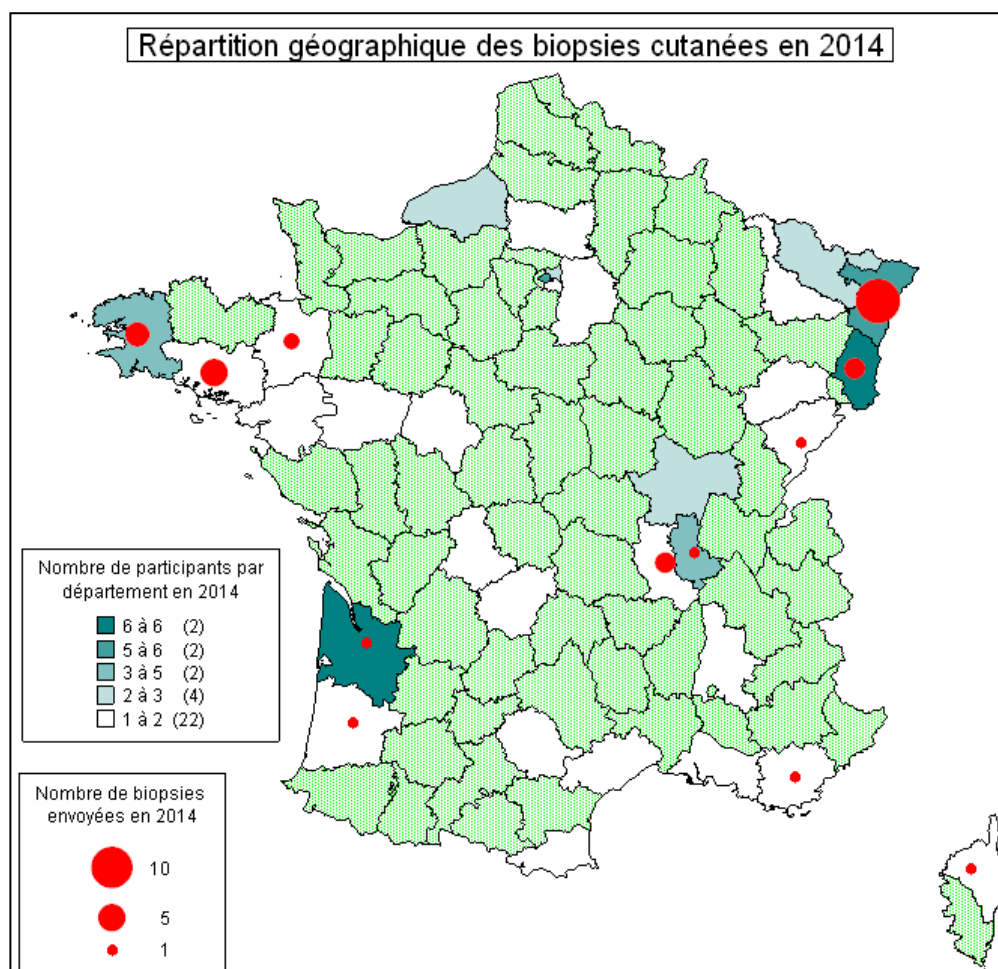
Face à ces observations, l'activité d'information du CNR reste primordiale afin de sensibiliser les prescripteurs à la définition des cas de l'EUCALB et à l'intérêt d'un remplissage correct des fiches de renseignements.

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 cutanée à *Borrelia burgdorferi* s.l. Ces prélèvements nous sont adressés de toute la France essentiellement par des dermatologues, mais également par quelques infectiologues et internistes. Tous les prélèvements viennent d'adultes nés entre 1935 et 1984, et sont conformes au protocole accepté par le CPP. Le financement des réactifs et consommables de ce protocole est assuré par une bourse de la Société Française de Dermatologie. Les analyses sont effectuées par le personnel du CNR *Borrelia*.

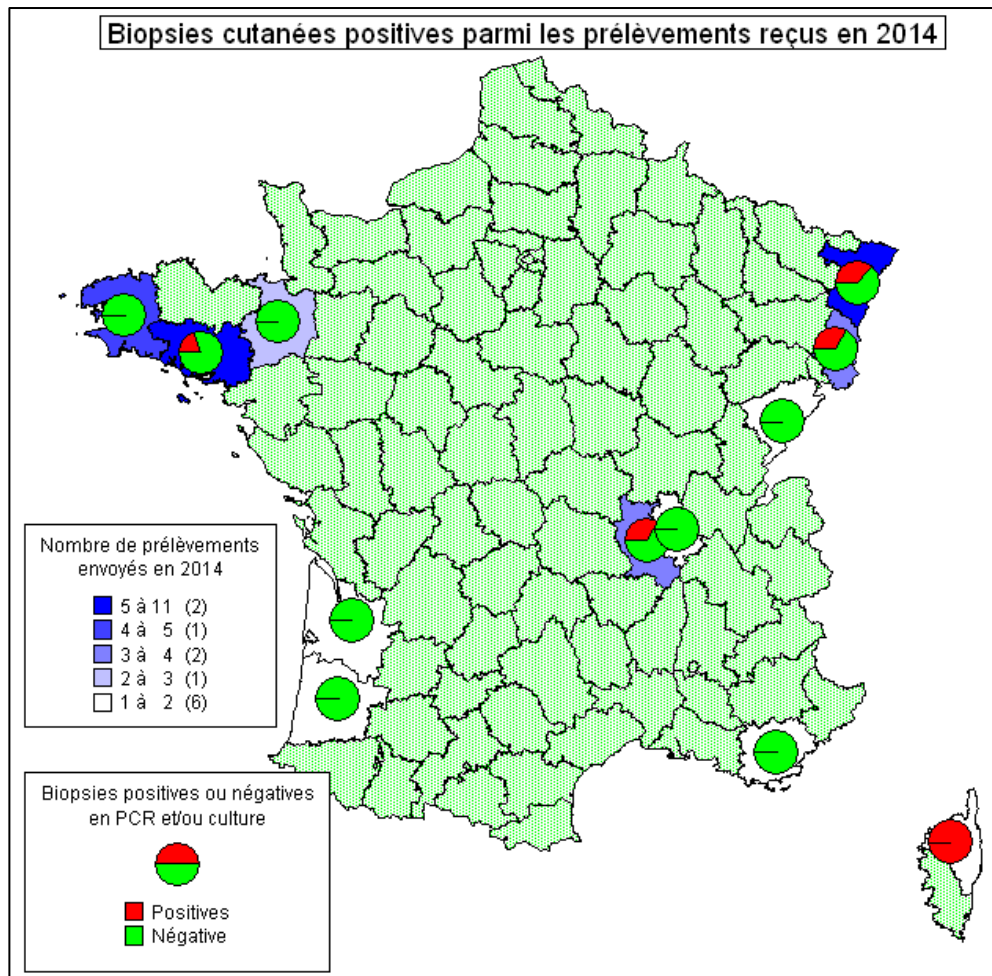
Pendant l'année 2014, nous avons reçu 34 prélèvements (45 en 2013). Ces biopsies nous ont été adressées par 16 participants de départements différents répartis sur l'ensemble du territoire (cf carte ci-après). Parmi les participants, 8 nous ont adressé 1 seule biopsie cutanée et 8 nous ont adressé de 2 à 5 biopsies dans l'année.



Parmi ces 34 prélèvements, 26 (soit 76,5 %, 51 % en 2013) l'ont été pour suspicion d'EM, 6 (soit 17,6 %, 22 % en 2013) pour suspicion d'ACA et 2 (5,9 %, versus 4 % en 2013) pour suspicion de lymphocytome cutané bénin. Dans 4 cas (11,8 %, versus 15,5 % en 2013), les lésions étaient très atypiques (lichen scléreux vulvaire, polyarthrite, lésion eczématisée, suspicion de morphée).

Proportions de prélèvements (PCR et culture) négatifs et positifs

Parmi les 34 prélèvements reçus, 8 cas (23,5 %) étaient positifs par PCR dont 3 cas (8,8 %) l'étaient également par culture. Ces proportions sont similaires à celles de l'année 2013. 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 (Morbihan, Bas-Rhin, Haut-Rhin et Loire) que de la moitié Sud.

Analyse des suspicions d'EM (n= 26)

Une notion de piqure de tiques est rapportée dans 10 cas (38,5 %) avec une date précisée dans 9 cas (34,6 %). La durée d'attachement de la tique (de 2 h à 72 h) est mentionnée dans 2 cas (7,7 %). La localisation de la lésion était précisée dans 23 cas (88,5 %) avec une prédominance sur les membres inférieurs (69,2 %).

Il s'agissait majoritairement de lésion unique dans 16 cas (61,5 %), alors que des localisations multiples étaient présentes dans 8 cas (30,8 %). Cette répartition est quasiment identique à celle observée depuis 2011.

Parmi les lésions uniques, 7 lésions (43,8 %) étaient à centre clair et 4 lésions (25 %) étaient homogènes (5 cas non renseignés). Parmi les 8 EMM, 5 étaient à centre clair (62,5 %) et 2 à centre homogène (25 %) (et 1 cas non renseigné). Ces proportions sont similaires à celles de 2012 et 2013. La proportion de lésion homogène est significative (1/4 des cas) et se maintient, elles peuvent être de diagnostic clinique plus difficile.

Le diamètre de la lésion au moment du diagnostic variait de façon importante, de 4 cm à 60 cm. La répartition montre que 12/22 des lésions étaient inférieures à 15 cm (54,5 %) (4 cas non renseignés).

Le délai d'apparition des lésions était rapporté dans 5 cas seulement (19,2 %) et il variait de 2 à 15 jours. L'EM est une lésion indolore, le diagnostic est souvent tardif et le délai d'apparition inconnu.

Les signes associés étaient signalés dans 46,2 % des cas. Un prurit était rapporté dans 10 cas (38,5 %), des sensations de brûlures dans 5 cas (19,2 %), des douleurs dans 2 cas (7,7 %) et des paresthésies dans 3 cas (11,5 %). Une antibiothérapie préalable au prélèvement avait déjà été mise en route dans 6 cas (23,1 %) dont les biopsies étaient négatives dans 100 % des cas.

Après prélèvement et sans attendre le retour d'analyses, 18 des 26 suspicions d'EM (69 %) ont bénéficié d'une antibiothérapie : 11 cas ont été traités par amoxicilline (42,3 %), 8 cas par doxycycline (30,8 %), 1 cas par ceftriaxone (3,8 %). A noter que 6 suspicions n'ont pas été traitées suite au prélèvement (23,1 %).

Parmi les 8 biopsies cutanées positives en 2013, 5 étaient des EM et 1 EMM. Ces lésions étaient toutes présentes chez des patients en contact régulier avec la nature, majoritairement pour loisirs et n'avaient pas reçu d'antibiothérapie préalable. Elles présentaient un centre clair dans 50 % des cas. Dans tous les cas sauf un, le diamètre était compris entre 20 cm à 40 cm et une durée moyenne d'évolution de 5 semaines (2 jours à 75 jours) au moment du prélèvement. Aucun de ces cas n'était associé à des arthralgies et un seul était associé avec des paresthésies.

Sur le plan bactériologique toutes étaient positives en PCR et seulement 3 (50 %) étaient positives en culture. Les espèces de *Borrelia* responsables de ces infections étaient 4 *B. afzelii*, 1 *B. bss* et 1 *B. garinii*. L'ensemble des EM et EMM confirmés bactériologiquement ont été traités : 1 par amoxicilline (16,7 %), 5 par doxycycline (83,3 %).

Analyse des suspicions d'acrodermatite chronique atrophiante (n = 6)

En 2014, 6 des 34 (17,6 %) prélèvements reçus étaient des suspicions d'ACA. Elles n'étaient pas associées à d'autres manifestations. Dans 4 cas (66,7 %), les lésions étaient localisées sur les membres inférieurs, dans 2 cas (33,3 %) au niveau des membres supérieurs, un cas non renseigné et un cas où les localisations étaient à la fois sur les membres supérieurs et inférieurs. Parmi les suspicions d'ACA toutes étaient négatives en culture et 5/6 en PCR. Après biopsie, 5 cas (83,3 %), dont le patient positif, avaient été traités selon les recommandations européennes par cycline, seul un cas avait été traité par amoxicilline, ce qui ne correspond pas aux recommandations européennes.

La base de données constituée par ce travail prospectif a été l'occasion en 2014 de faire le bilan des présentations histologiques des ACA. Ce travail de corrélation a été réalisé par le Dr. Cédric Lenorman et le Pr. Dan LISPKER du service de Dermatologie du CHU de Strasbourg. Il porte sur 20 patients confirmés par culture et/ou PCR et montre l'existence de formes histologiques plus atypiques à côté de la présentation usuelle avec infiltrat perivasculaire et interstitiel lymphoplasmocytaire. Ce travail sera soumis pour publication en 2015.

Analyse des suspicions de lymphocytome borrélien (n = 2)

En 2014, 2 prélèvements sur 34 (5,9 %) étaient des suspicions de lymphocytome borrélien. Dans un cas, la lésion était localisée au niveau du sein, dans l'autre au niveau de la face postérieure du bras droit. Leur durée d'évolution allait de 2 mois à plus de 6 mois. Aucun n'était associé à des signes généraux et n'avait fait l'objet de traitement antibiotique préalable. Un cas était positif en PCR à *Borrelia afzelii* et négatif en culture. Il s'agissait du cas où la localisation était le sein, après une évolution de deux mois.

Après prélèvement, ces deux cas ont bénéficié d'une antibiothérapie par clamoxyl dans un cas et doxycycline dans l'autre cas.

Espèces de *Borrelia* détectées (2010-2014)

Le suivi de 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>	2010	2011	2012	2013	2014
<i>B.afzelii</i>	6	19	12	8	5
<i>B.garinii</i>	2	3	0	2	1
<i>B.burgdorferi</i> ss	1	1	1	0	1

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

3.2.1. Objectifs de la campagne de collecte de 2014

Dans le cadre des missions du CNR *Borrelia*, la surveillance acarologique effectuée en 2014 a eu pour objectif d'investiguer :

- la répartition du vecteur *Ixodes ricinus* en Alsace
- l'évolution de la densité en nymphes 10 ans après l'étude de Ferquel et coll. (2006)
- le risque acarologique de borréliose de Lyme (BL) en Alsace
- l'impact de certains facteurs environnementaux sur la densité en nymphes, notamment la végétation et certains facteurs abiotiques (hygrométrie, température, sol ...)
- le taux de nymphes infectées par *Borrelia burgdorferi* sensu lato mais également par d'autres pathogènes comme *Anaplasma phagocytophilum* ou *Borrelia* agents de fièvre récurrente

3.2.2. Choix des sites et méthode de collecte

En 2014, afin d'étudier la répartition du vecteur *Ixodes ricinus*, nous avons effectué 102 collectes sur 13 sites répartis dans le Bas-Rhin et le Haut-Rhin (voir carte ci-dessous).

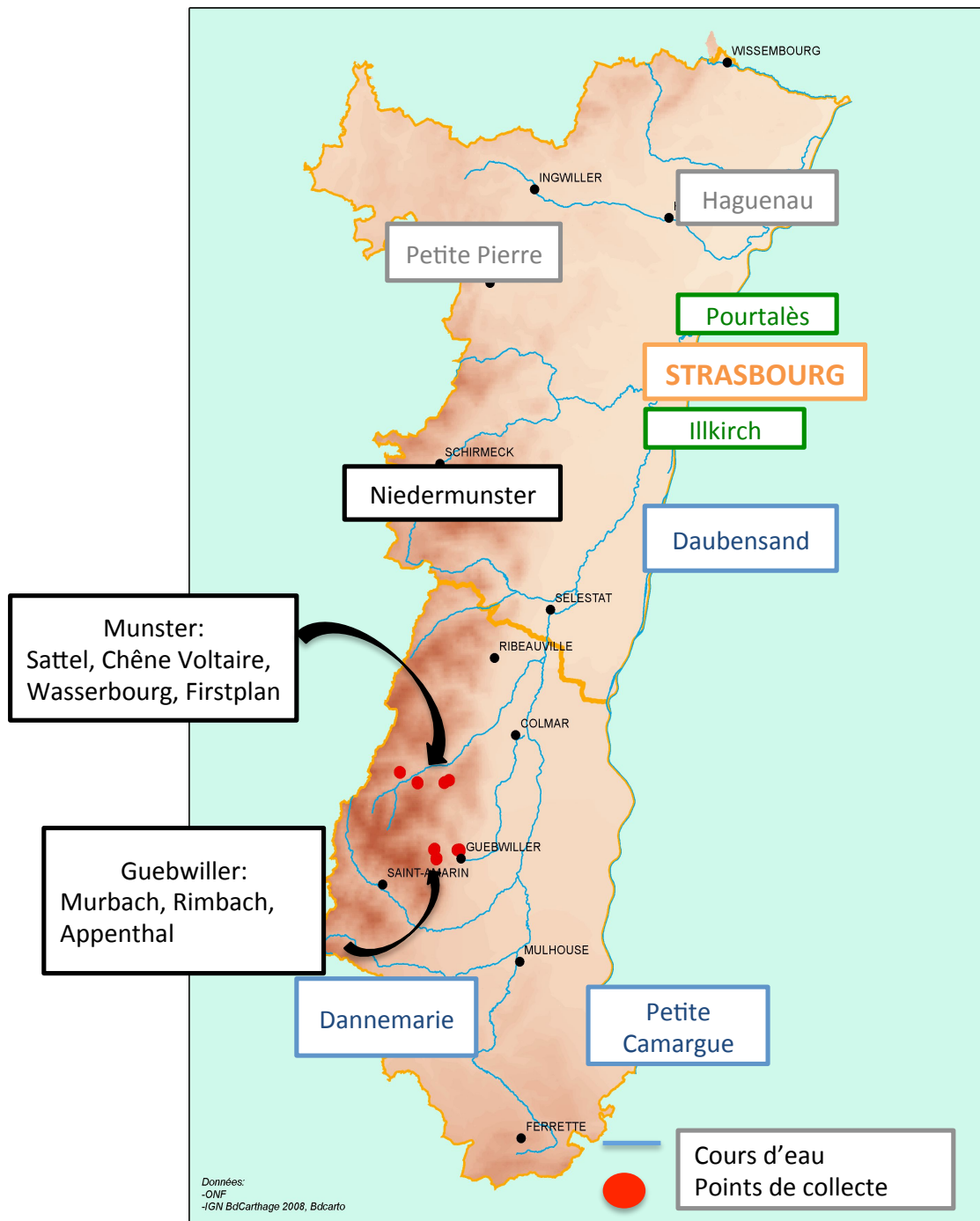
Ces sites ont été choisis en fonction de leur localisation géographique, de l'activité humaine qui s'y déroule et selon les données bibliographiques, en particulier l'étude du CNR *Borrelia* réalisée en Alsace en 2003 et 2004 (Ferquel et al., 2006).

L'enquête épidémiologique réalisée en Alsace en 2003 et 2004, avait révélé que l'Alsace avait la plus forte incidence de borréliose de Lyme en France.

Les grandes vallées vosgiennes de Munster et de Guebwiller avaient alors été identifiées comme 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 en 2003 et 2004.

Carte de répartition des sites investigués en Alsace en 2014



- En vert** sont représentés les sites péri-urbains
- En bleu** les sites de plaines +/- inondables
- En noir** les zones forestières +/- montagneuses
- En gris**, deux sites collectés uniquement en 2013

Les sites collectés mensuellement de mars à novembre sont les sites de Niedermunster, d'Illkirch et de Pourtalès pour le Bas-Rhin, et les sites de Munster, Guebwiller et Dannemarie pour le Haut-Rhin. Les sites de Daubensand et de la Petite Camargue ont été collectés ponctuellement.

La méthode de collecte utilisée est la technique du drapeau.

3.2.3. Résultats de densités en nymphes en 2014

La densité en nymphes notée D a été calculée de la façon suivante :

$$D = \sum ni/t$$

n correspond au nombre de nymphes totales prélevées sur le lieu de collecte i, et t : le nombre de tirs effectués.

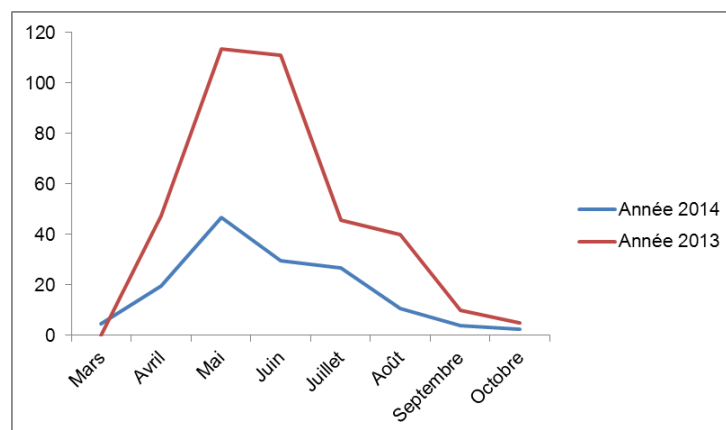
La densité D est rapportée à une surface de 100 m².

Site	Nymphes collectées	Adultes collectés	Densité en nymphes	Densité en adultes
Appenthal	1078	163	36	5
Chêne Voltaire	274	44	9	2
Dannemarie	130	12	4	<1
Daubensand	151	5	26	1
Firstplan	492	25	17	1
Illkirch	384	23	14	1
Murbach	1231	68	40	2
Niedermunster	177	35	12	2
Petite Camargue	183	4	11	<1
Portalès	284	14	10	1
Rimbach	355	22	13	1
Sattel	466	61	16	2
Wasserbourg	586	108	20	4
Totaux	5791	584		

Les densités en nymphes les plus élevées ont été observées à Murbach et Appenthal et les densités en adultes les plus élevées ont été observées à Wasserbourg et Appenthal.

Précédemment en 2012 et 2013, nous avons observé une variation saisonnière (intra-annuelle) de la densité en nymphes. Celle-ci est à nouveau observée en 2014. Nous avons choisi de comparer les densités moyennes en Alsace en fonction du mois de collecte entre 2013 et 2014.

Densités moyennes globales en Alsace en nymphes selon le mois de collecte en 2013 et 2014



On remarque que les densités en 2014 sont statistiquement inférieures à celles de 2013 ($p < 10^{-8}$). On observe de fortes disparités interannuelles.

Le risque acarologique est donc variable d'une année sur l'autre. Cette variation interannuelle peut être en partie expliquée par le fait que l'hiver 2012/2013 et l'hiver 2013/2014 étaient très différents du point de vue météorologique.

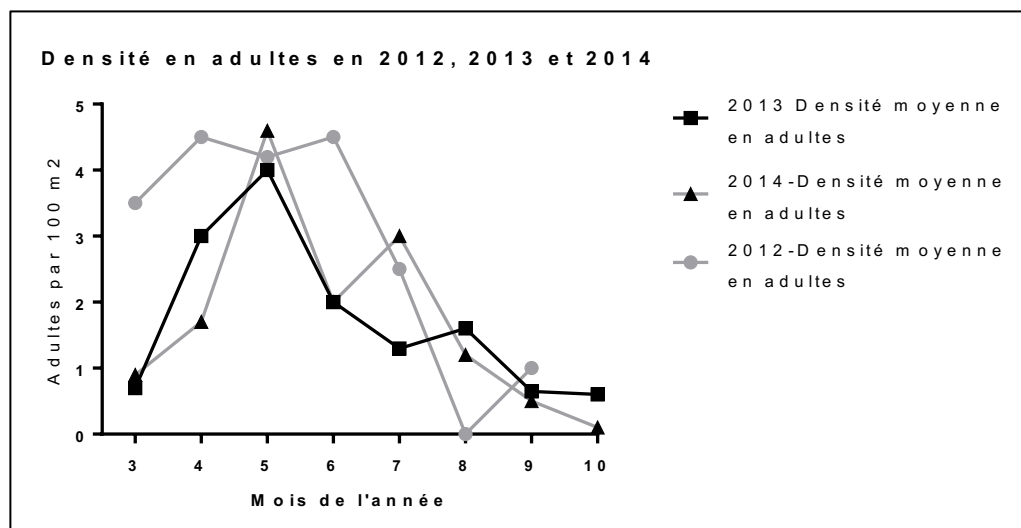
La rigueur hivernale des températures pour 2012/2013 s'oppose à la douceur des températures de l'hiver 2013/2014.

Il a déjà été observé en Allemagne, une corrélation positive entre les températures de l'hiver précédent (année n-1) et les densités de tiques observées (année n) (Lauterbach, Wells, O'Hara, Kalko, & Renner, 2013).

Contrairement à ces résultats allemands, nous ne retrouvons pas une telle association entre températures de l'hiver précédent et densités en nymphes.

Aussi, d'autres facteurs peuvent expliquer ces variations interannuelles. Par exemple, les densités en micromammifères et/ou en cervidés sont des facteurs pouvant influencer les densités en nymphes. En effet, les fluctuations dans les densités en rongeurs, servant d'hôtes de gorgement pour les stases immatures, larves et nymphes, sont des facteurs importants pour le risque de borréliose de Lyme (Heyman et al., 2010).

Contrairement à la population en nymphes, celle des adultes ne montre pas de variation entre 2012, 2013 et 2014 :

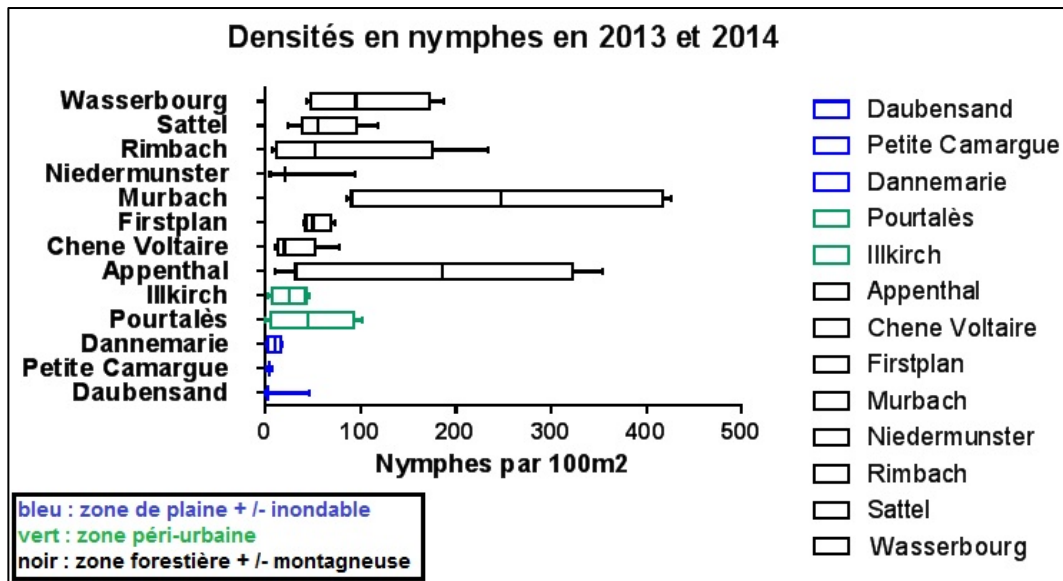


L'ensemble des données des collectes réalisées en 2013 et 2014 a été compilé de façon à affiner la description des populations de nymphes sur ces sites et donc d'informer sur le risque acarologique de façon plus pertinente.

Les sites collectés en 2014 et 2013 sont les mêmes à l'exception des sites de la Petite Pierre et de Haguenau qui n'ont été investigués qu'en 2013 (cf carte de répartition des sites investigués).

Nous avons considéré les densités en nymphes observées au moment du pic d'activité de mai-juin pour 2014 et 2013. A partir des densités observées pour les différents sites de collecte, nous obtenons le graphique ci-dessous :

Pour chaque site, le diagramme en boîte représente le minimum, le maximum, la médiane des densités observées

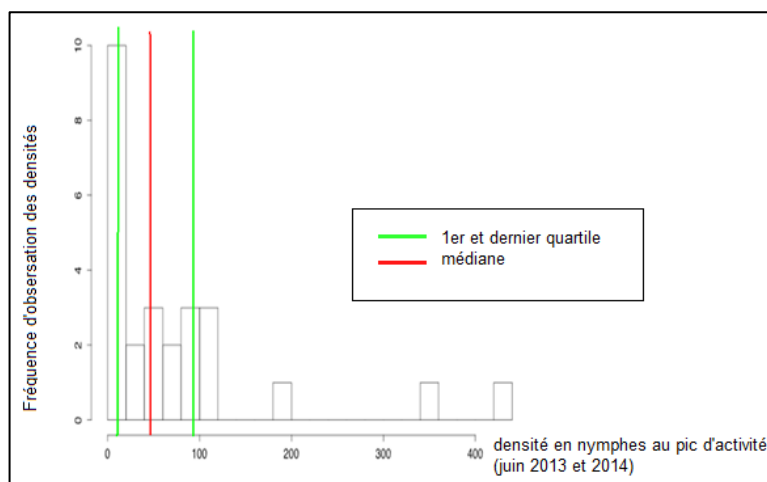


D'après ce diagramme, le site de Murbach se démarque des autres sites investigués. Murbach est une petite vallée très encaissée et très fermée qui semble constituer un écosystème particulier pour les tiques.

Afin de connaître les facteurs biotiques et abiotiques qui pourraient impacter la densité en nymphes, il serait intéressant d'approfondir nos études sur ce site.

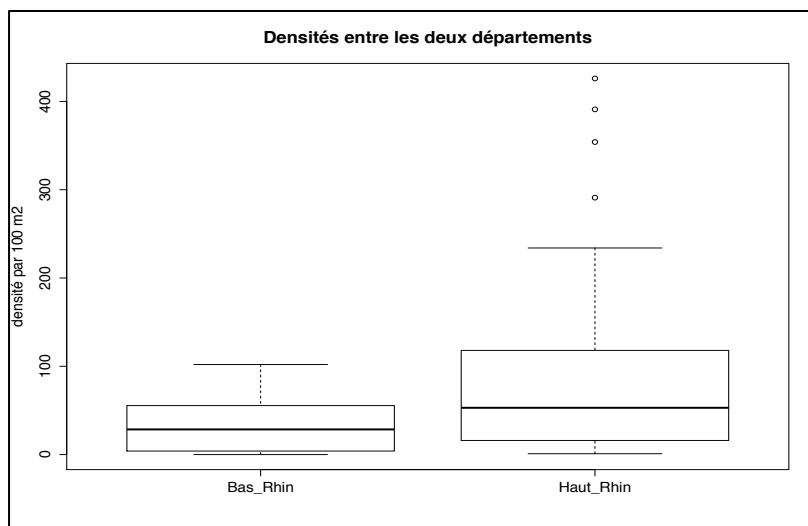
De plus, nous avons également réalisé une analyse statistique bivariée en prenant en compte le mois et le site de collecte. Les sites d'Appenthal et de Murbach possèdent des densités moyennes en nymphes comparables et statistiquement différentes des autres sites. L'ensemble des autres sites ont des densités en nymphes inférieures par rapport aux sites de Murbach et d'Appenthal. Les sites péri-urbains d'Illkirch et de Pourtalès présentent des densités que l'on peut assimiler à celles observées pour des sites plus éloignés du continuum urbain, comme les sites du Firstplan ou du Chêne Voltaire. Cette dernière observation permet d'objectiver que la densité en nymphes peut donc être de même grandeur dans un site péri-urbain (Illkirch) ou dans un site forestier (Firstplan).

L'histogramme suivant représente les densités de nymphes au moment du pic d'activité pour 2013-2014



La médiane (*en rouge*) de la densité en nymphes en Alsace pour 2013-2014 au moment du pic d'activité est de 47 nymphes/ 100m². Le 1^{er} quartile (*en vert*) est de 12 nymphes/ 100m²,

c'est à dire que 25 % des collectes des sites alsaciens possèdent en 2013/14 une densité en nymphes inférieure à 12 nymphes par 100m². Le 3^{ème} quartile (*en vert*) est de 94 nymphes/100m² c'est à dire que 25 % des collectes des sites effectuées en Alsace en 2013/14 ont une densité en nymphes supérieures à 94 nymphes par 100 m². Considérant les mesures sur le terrain, effectuées au pic d'activité en 2013 et 2014, les densités en nymphes semblent équivalentes voire légèrement augmentées dans le Haut-Rhin (cf diagramme en boîte à moustache ci-dessous).



Comparaison des densités en nymphes entre Haut-Rhin et Bas-Rhin (données compilées 2013/2014)

3.2.4. Taux d'infection des nymphes en Alsace en 2014

En 2014, 3034 nymphes ont été testées par biologie moléculaire pour un gène ciblant *Borrelia burgdorferi* sensu lato (gène FlaB). Ces nymphes sont issues des collectes sur l'année 2014, effectuées sur 13 sites dont 11 sites ont été échantillonnés mensuellement et 2 sites ponctuellement. Parmi les 3034 nymphes analysées, 233 sont positives à *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Tableau : Taux d'infection globale des nymphes en 2014

Site	Nymphes testées	Nymphes positives	Pourcentage	IC ₉₅
Appenthal	423	32	7,6	[5,4; 10,5]
Murbach	417	56	13,4	[10,5; 17]
Rimbach	292	17	5,8	[3,7; 9,1]
Wasserbourg	272	21	7,7	[5,1; 11,5]
Firstplan	254	19	7,5	[4,8; 11,4]
Chêne Voltaire	177	6	3,4	[1,6; 7,2]
Sattel	204	10	4,9	[2,7; 8,8]
Niedermunster	219	11	5,0	[2,9; 8,8]
Dannemarie	134	3	2,2	[0,8; 6,4]
Daubensand	100	12	12,0	[7; 19,8]
Petite Camargue	91	7	7,7	[3,8; 15]
Portalès	154	11	7,1	[4; 12,3]
Illkirch	297	28	9,4	[6,6; 13,3]
Alsace	3034	233	7,7	[6,8; 8,7]

Bas-Rhin	770	62	8,1	[6,3 ; 10,2]
Haut-Rhin	2264	171	7,6	[6,5; 8,7]

3.2.5. Densités en nymphes infectées/100m²

3.2.5.1. Densité en nymphes infectées/100 m² en 2014

L'évaluation du risque acarologique de borréliose de Lyme est réellement représentée par la mesure de la densité en nymphes infectées/100m². Le tableau suivant synthétise les données sur la prévalence de l'infection à *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans les nymphes.

Site	Densité en nymphes	Taux d'infection	Densité en nymphes infectées
Appenthal	36	7,6	2,7
Chêne Voltaire	9	3,4	0,3
Dannemarie	4	2,2	<0,1
Daubensand	26	12	3,1
Firstplan	17	7,5	1,3
Illkirch	14	9,4	1,3
Murbach	40	13,4	5,4
Niedermunster	12	5	0,6
Petite Camargue	11	7,7	0,8
Pourtalès	10	7,1	0,7
Rimbach	13	5,8	0,8
Sattel	16	4,9	0,8
Wasserbourg	20	7,7	1,5

3.2.5.2 Densité en nymphes infectées/100m² en Alsace

Grâce aux deux paramètres présentés ci-dessus : densité en nymphes et taux d'infection, nous pouvons établir la densité en nymphes infectées au moment du pic d'activité.

Tableau : Densité en nymphes infectées en Alsace en 2013 et 2014

Mois	Lieu	Densité en nymphes infectées par 100 m ²		
		2013	2014	
Mai	Illkirch	1	3	
	Pourtalès	2	0	
	Dannemarie	1	< 1	
	Petite Camargue	NR	< 1	
	Daubensand	NR	7	
	Vallée de Guebwiller			
	Rimbach	11	< 1	
	Appenthal	9	12	
	Murbach	35	8	
	Vallée de Munster			
	Wasserbourg	10	3	

	Firtsplan	14	3
	Sattel	NR	2
	Chêne Voltaire	6	< 1
Juin	Illkirch	6	2
	Pourtalès	10	7
	Dannemarie	< 1	< 1
	Petite Camargue	< 1	NR
	Daubensand	< 1	< 1
	Vallée de Guebwiller		
	Rimbach	13	< 1
	Appenthal	17	3
	Murbach	62	13
	Vallée de Munster		
	Wasserbourg	6	1
	Firtsplan	39	2
Sattel	4	< 1	
Chêne Voltaire	0	1	

Dans le tableau ci-dessus, nous constatons que les densités en nymphes infectées peuvent varier très fortement d'une année sur l'autre même au moment du pic d'activité. Ceci est en lien avec les variations interannuelles des densités en nymphes. Le site de Murbach présente un risque acarologique vraisemblablement plus important par rapport aux autres sites et de façon répétée.

3.2.6. Evolution des densités en nymphes entre 2003 et 2014

Nous avons mesuré la variation éventuelle de la densité en nymphes et en nymphes infectées en Alsace 10 ans après l'étude faite en 2003-2004 par E. Ferquel. Pour cela, les sites géographiques exacts de l'étude de 2003-2004 ont été repris en 2013-2014 et collectés d'avril à octobre. Le site de Munster correspond à 4 points de collecte (Chêne Voltaire, Firtsplan, Sattel et Wasserbourg) et le site de Guebwiller à 3 points de collecte (Appenthal, Murbach et Rimbach).

3.2.6.1 Comparaison des densités obtenues en 2003-2004 et celles obtenues en 2013 et 2014 en fonction du mois de collecte

En 2013, notre étude comparative montrait que la tendance n'était pas à l'augmentation. Les données obtenues en 2014 confirment que les densités en nymphes ne sont pas statistiquement supérieures à celles enregistrées une décennie plus tôt (tableau ci-dessous).

Densités en nymphes- sites de collectes pour l'étude n+10 ans

Densité en nymphes									
Mois	Lieu	2003	IC	2004	IC	2013	IC	2014	IC
Avril	Dannemarie	NC	NC	40	[29-51]	10,6	[3,4-17,9]	3	[1-16]
	Guebwiller	NC	NC	307,7	[156,2-459,3]	81,7	[46,9-116,4]	31	[5-181]
	Munster	51	[34; 69]	246,4	[37,7-455,1]	73,9	[41,1-106,7]	44	[1-74]
Mai	Dannemarie	NC	NC	41,3	[24,1-58,4]	17,5	[10-25]	8	[6-49]
	Guebwiller	248	[54; 442]	488	[303-673]	300,5	[220-381]	148	[20-544]
	Munster	103	[78; 129]	398	[26,4-771]	88,9	[62-116]	43	[4-221]
Juin	Dannemarie	NC	NC	35	[19,2-50,8]	1,3	[0-4]	13	[4-13]
	Guebwiller	308	[53; 563]	238	[101-375]	299,2	[117-482]	52	[15-148]
	Munster	110	[56; 164]	177	[0-384]	93,9	[7-181]	15	[3-60]
Juillet	Dannemarie	29	[28; 31]	34,4	[21,4-47,4]	11,9	[2-22]	9	[3-22]
	Guebwiller	203	[97; 308]	255	[62,8-447,2]	77,1	[0-165]	42	[9-244]
	Munster	84	[84; 150]	214,5	[0-471]	7,8	[5-10]	21	[2-99]
Août	Dannemarie	NC	NC	non collecté		6,3	[1-11]	3	[1-9]
	Guebwiller	NC	NC	non collecté		58,5	[0-123]	14	[4-99]
	Munster	NC	NC	non collecté		25,9	[1-51]	11	[1-40]
Septembre	Dannemarie	6	[5; 8]	21,3	[11,9-30,6]	2,5	[0,4-5]	2	[0,3-4]
	Guebwiller	39	[20; 58]	58,5	[10,4-106,7]	26	[9-43]	9	[1-45]
	Munster	31	[4; 58]	33,8	[2,5-65]	6,3	[3-9,5]	2	[0,2-18]
Octobre	Dannemarie	NC	NC	non collecté		2,5	[0,4-5]	0	[0,2-2]
	Guebwiller	53	[9; 97]	15,6	[0,1-31,2]	6,7	[3-11]	5	[1-27]
	Munster	30	[24; 35]	14,4	[0,4-28,3]	0,9	[0-2]	2	[0,1-11]

En rouge sont indiquées les observations pour lesquels il existe une différence significative entre **2004** et **2013** et/ou **2014**

De plus, nous avons cherché à évaluer si les taux d'infection ont évolué sur une décennie. Les taux d'infection agrégés des nymphes pour les sites de Dannemarie, Munster et Guebwiller en 2014 sont résumés dans le tableau ci-dessous :

3.2.6.2 Taux d'infection des nymphes

➤ Taux d'infection des nymphes à *Borrelia burgdorferi* sl en 2014

Site	Nymphes testées	Nymphes positives	Prévalence	IC _{95%}
Dannemarie	134	3	2,2	[0,8 ; 6,4]
Guebwiller	1127	105	9,3	[7,8 ; 11,1]
Munster	901	56	6,2	[4,8 ; 8,0]

Le site de Guebwiller possède le taux d'infection le plus élevé. Cependant, considérant les intervalles de confiance à 95 % des taux d'infection (IC), la prévalence de *Borrelia burgdorferi* sl dans les nymphes à Guebwiller est statistiquement plus élevée que celle du site de Dannemarie. Il n'y a pas de différence significative entre les autres sites.

➤ Taux d'infection des nymphes à *Borrelia burgdorferi* sl en 2003/2004 et 2013/2014

Le tableau ci-dessous récapitule les taux d'infection sur la période de 10 ans d'étude

Site	2003	2004	2013	2014
Guebwiller	9,6	21,9	11,4	9,3
	[7,3; 12,6]	[18,2; 20,6]	[9,7; 13,5]	[7,8; 11,1]
Munster	17,1	24,1	8,9	6,2
	[14,4; 20]	[20,7; 22,2]	[7,2; 10,8]	[4,8; 8,0]
Dannemarie	10,4	12,5	4,35	2,2
	[4,5; 22,2]	[7,4; 20,2]	[1,5; 12]	[0,8; 6,4]

Entre 2003 et 2004, les taux d'infection sont statistiquement différents pour Guebwiller et Munster mais pas pour Dannemarie.

Entre 2013 et 2014, les taux d'infection ne sont pas statistiquement différents entre les deux années, quel que soit le site investigué.

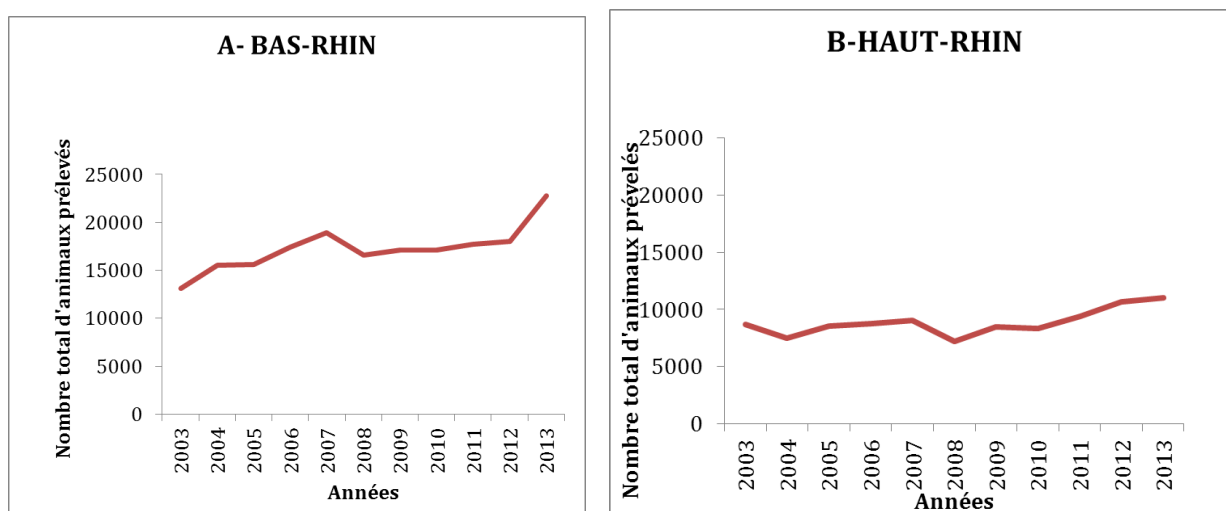
Entre 2004 et 2013/2014, les taux d'infection sont statistiquement différents.

Nous observons donc un pic des taux d'infection des nymphes en 2004 par rapport aux autres années de l'étude.

Afin de mettre en perspective ces observations, nous nous sommes intéressés à un facteur biotique : la densité en cervidés.

Nous souhaitons voir si l'évolution de cette population d'animaux peut impacter la densité en nymphes. En effet, ces animaux constituent un hôte privilégié pour les repas sanguins des tiques adultes (Anderson, 1988). La population d'animaux à bois (appartenant à la famille des ongulés) est un élément essentiel au maintien de la population de tiques dans un écosystème donné. Cependant, ces animaux à bois (ainsi que le bétail) ne sont pas des hôtes compétents pour *Borrelia burgdorferi* sl, bien qu'ils contribuent significativement à la multiplication de la population vectorielle (Degeilh, 2007; Gilbert, Maffey, Ramsay, & Hester, 2012; Telford, Mather, Moore, Wilson, & Spielman, 1988).

Ci-dessous, est représentée l'évolution des prélèvements en cervidés (cerfs élaphe, chevreuils, et daims) dans les deux départements alsaciens entre 2003 et 2013 (données ONCFS : office national de la chasse et faune sauvage).



Prélèvements en cerf élaphe, chevreuil et daim, (A) Bas-Rhin 2003/2013 (B) 2003/2013 (Données ONCFS)

La gestion des cervidés se réalise au travers des plans de chasse définis au niveau régional ou départemental. Les objectifs de gestion prennent en compte la notion d'équilibre qui doit subsister entre les populations de cervidés et leur habitat. Les évaluations des effectifs des populations se font en amont de la décision de plan de chasse. Pour évaluer ces effectifs, l'ONCFS utilise des indicateurs dits ICE pour indicateurs de changement écologique.

Sur les deux courbes ci-dessus, nous constatons que les quantités en cervidés prélevés augmentent depuis 2003 et que le prélèvement est toujours bien supérieur dans le Bas-Rhin par rapport au Haut-Rhin (Guebwiller, Munster et Dannemarie). Les quantités en cervidés semblent donc être régulées plus fortement dans le Bas-Rhin. Aussi, (cf tableau récapitulatif des taux d'infection), nous observons que les taux d'infection des nymphes à *B. burgdorferi* sl entre ces deux départements sont équivalents statistiquement pour ce qui est des données de 2013 et 2014 (et 2012).

3.2.7 Répartition des espèces de *B. burgdorferi* sl dans les nymphes collectées en 2014

En 2014, 3034 nymphes ont été testées par biologie moléculaire pour un gène ciblant *Borrelia burgdorferi* sensu lato (gène FlaB). Ces nymphes sont issues des collectes sur l'année 2014, effectuées sur 13 sites dont 11 sites ont été échantillonnés mensuellement et 2 sites ponctuellement.

Parmi les 3034 nymphes analysées, 233 sont positives à *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Site	Nymphes testées	Nymphes positives	Pourcentage	IC ₉₅
Appenthal	423	32	7,6	[5,4; 10,5]
Chêne Voltaire	177	6	3,4	[1,6; 7,2]
Dannemarie	134	3	2,2	[0,8; 6,4]
Daubensand	100	12	12,0	[7; 19,8]

Firstplan	254	19	7,5	[4,8; 11,4]
Illkirch	297	28	9,4	[6,6; 13,3]
Murbach	417	56	13,4	[10,5; 17]
Niedermunster	219	11	5,0	[2,9; 8,8]
Petite Camargue	91	7	7,7	[3,8; 15]
Pourtalès	154	11	7,1	[4; 12,3]
Rimbach	292	17	5,8	[3,7; 9,1]
Sattel	204	10	4,9	[2,7; 8,8]
Wasserbourg	272	21	7,7	[5,1; 11,5]

Afin de savoir précisément par quelle(s) espèce(s) ces nymphes sont infectées, nous avons réalisé le typage des espèces par biologie moléculaire.

Répartition des différentes espèces de *Borrelia* par site de collecte en 2014 :

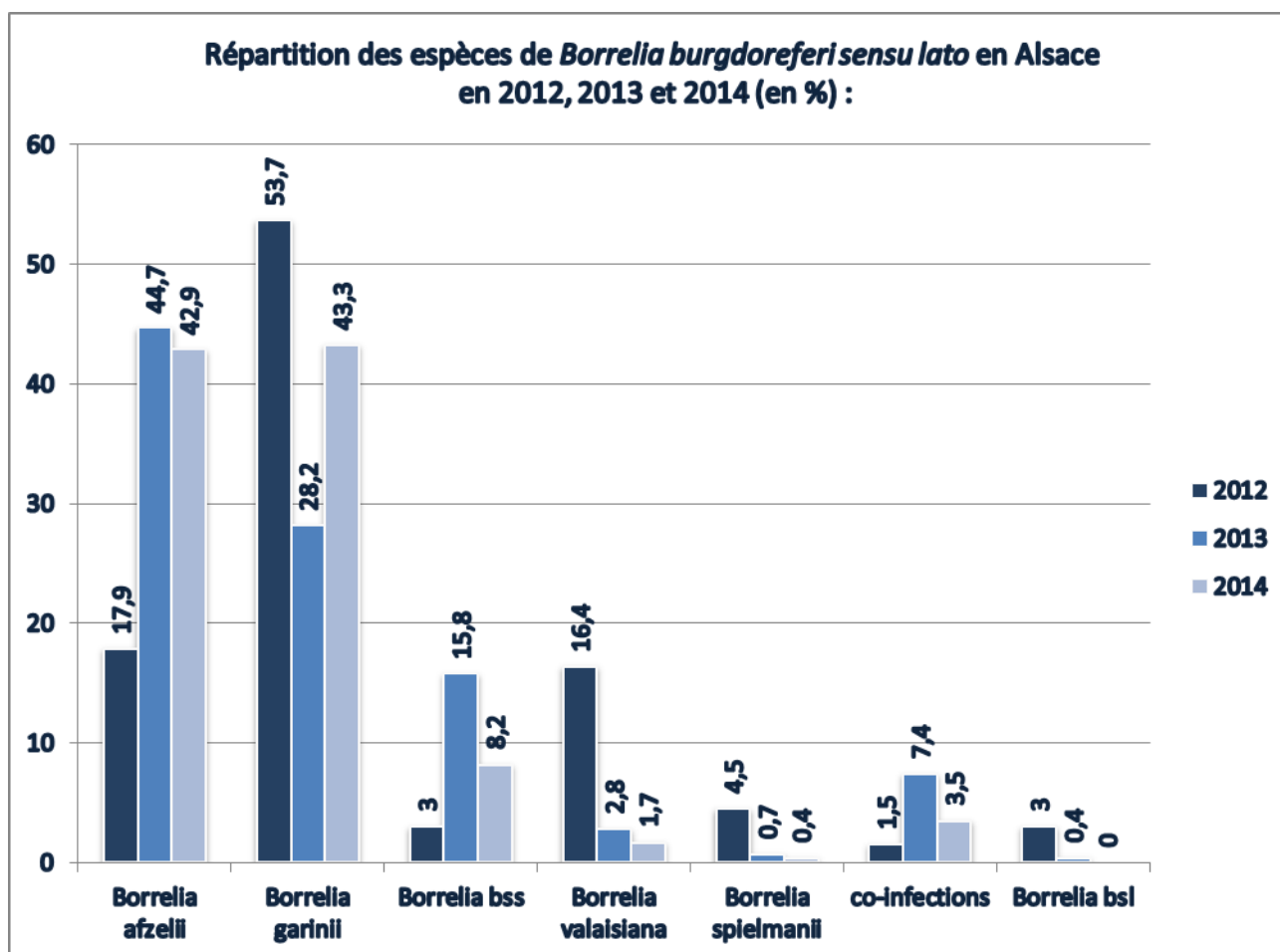
Espèces de <i>Borrelia</i> Sites de collectes	Total nymphes		<i>B afzelii</i>	<i>B garinii</i>	<i>Bb ss</i>	<i>B valaisiana</i>	<i>B spielmanii</i>	co-infection
	Testées	Positives						
<i>Appenthal</i>	423	32	14	12	2	2	-	2
<i>Chêne Voltaire</i>	177	6	1	5	-	-	-	-
<i>Dannemarie</i>	134	3	1	1	-	-	1	-
<i>Daubensand</i>	100	12	9	3	-	-	-	-
<i>Firstplan</i>	254	19	2	14	2	-	-	1
<i>Illkirch</i>	297	28	12	9	4	-	-	3
<i>Murbach</i>	417	56	27	17	9	2	-	1
<i>Niedermunster</i>	219	11	2	9	-	-	-	-
<i>Petite Camargue</i>	91	7	6	1	-	-	-	-
<i>Pourtalès</i>	154	11	10	1	-	-	-	-
<i>Rimbach</i>	292	17	5	11	1	-	-	-
<i>Sattel</i>	204	10	4	5	-	-	-	1
<i>Wasserbourg</i>	272	21	7	13	1	-	-	-
TOTAL	3034	233	100	101	19	4	1	8

En Alsace, sur les différents sites de collecte, on trouve *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia valaisiana* et *Borrelia spielmanii*. Les deux espèces les plus fréquentes sont *Borrelia afzelii* et *Borrelia garinii*, les autres espèces notamment *Borrelia burgdorferi* sensu stricto sont en proportions moins importantes.

En 2014, plusieurs nymphes présentent une co-infection à deux espèces de *Borrelia* :

- 4 nymphes positives pour *Borrelia garinii* et *Borrelia valaisiana*
- 2 nymphes positives pour *Borrelia afzelii* et *Borrelia burgdorferi* sensu stricto
- 2 nymphes positives pour *Borrelia garinii* et *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

L'analyse des données collectées par le CNR depuis 2012 montre que la répartition des espèces n'est pas constante au fil des années étudiées (voir graphique ci-dessous).



Comme le montre le diagramme ci-dessus, la répartition des espèces est variable au fil du temps en Alsace, néanmoins les deux espèces les plus fréquentes sont de façon constante *Borrelia afzelii* et *Borrelia garinii*.

Cette répartition est également variable pour un même site d'une année sur l'autre. Nous avons comparé la répartition des espèces sur les sites collectés en 2013 et 2014 (voir tableau suivant).

Tableau comparatif des espèces détectées sur les sites de collecte en 2013 et 2014 :

Site	2013		2014	
	Espèces	Taux infection	Espèces	Taux infection
Appenthal	11 <i>Borrelia afzelii</i> 8 <i>Borrelia garinii</i> 1 <i>Borrelia burgdorferi</i> ss 6 co-infections	7,14 % (26/364)	14 <i>Borrelia afzelii</i> 12 <i>Borrelia garinii</i> 2 <i>Borrelia burgdorferi</i> ss 2 <i>Borrelia valaisiana</i> 2 co-infections	7,57 % (32/423)
Chêne Voltaire	5 <i>Borrelia afzelii</i> 4 <i>Borrelia garinii</i> 2 <i>Borrelia burgdorferi</i> ss 1 <i>Borrelia spielmanii</i>	6,86 % (12/175)	1 <i>Borrelia afzelii</i> 5 <i>Borrelia garinii</i>	3,39 % (6/177)
Dannemarie	2 <i>Borrelia afzelii</i> 1 <i>Borrelia garinii</i>	4,35 % (3/69)	1 <i>Borrelia afzelii</i> 1 <i>Borrelia garinii</i> 1 <i>Borrelia spielmanii</i>	2,24 % (3/134)
Daubensand	1 <i>Borrelia garinii</i>	6,25 % (1/16)	9 <i>Borrelia afzelii</i> 3 <i>Borrelia garinii</i>	12 % (12/100)
Firsrtplan	8 <i>Borrelia afzelii</i> 6 <i>Borrelia garinii</i> 15 <i>Borrelia burgdorferi</i> ss 3 <i>Borrelia valaisiana</i> 2 co-infections	13,93 % (34/244)	2 <i>Borrelia afzelii</i> 14 <i>Borrelia garinii</i> 2 <i>Borrelia burgdorferi</i> ss 1 co-infection	7,48 % (19/254)
Haguenau	1 <i>Borrelia burgdorferi</i> ss 1 co-infection	4,17 % (2/48)	Site non collecté	
Illkirch	17 <i>Borrelia afzelii</i> 10 <i>Borrelia garinii</i> 4 <i>Borrelia burgdorferi</i> ss 1 <i>Borrelia burgdorferi</i> sl 2 co-infections	13,18 % (34/258)	12 <i>Borrelia afzelii</i> 9 <i>Borrelia garinii</i> 4 <i>Borrelia burgdorferi</i> ss 3 co-infections	9,43 % (28/297)
Murbach	38 <i>Borrelia afzelii</i> 9 <i>Borrelia garinii</i> 19 <i>Borrelia burgdorferi</i> ss 4 co-infections	17,42 % (70/402)	27 <i>Borrelia afzelii</i> 17 <i>Borrelia garinii</i> 9 <i>Borrelia burgdorferi</i> ss 2 <i>Borrelia valaisiana</i> 1 co-infection	13,43 % (56/417)
Niedermunster	9 <i>Borrelia afzelii</i> 8 <i>Borrelia garinii</i> 4 <i>Borrelia valaisiana</i> 2 co-infections	6,13 % (23/375)	2 <i>Borrelia afzelii</i> 9 <i>Borrelia garinii</i>	5,02 % (11/219)
Petite Camargue	0 positive	(0/3)	6 <i>Borrelia afzelii</i> 1 <i>Borrelia garinii</i>	7,69 % (7/91)
Petite Pierre	1 <i>Borrelia burgdorferi</i> ss	1,61 % (1/62)	Site non collecté	
Pourtalès	8 <i>Borrelia afzelii</i> 2 <i>Borrelia garinii</i> 1 co-infection	7,86 % (11/140)	10 <i>Borrelia afzelii</i> 1 <i>Borrelia garinii</i>	7,14 % (11/154)
Rimbach	14 <i>Borrelia afzelii</i> 11 <i>Borrelia garinii</i> 1 <i>Borrelia spielmanii</i>	8,7 % (26/299)	5 <i>Borrelia afzelii</i> 11 <i>Borrelia garinii</i> 1 <i>Borrelia burgdorferi</i> ss	5,82 % (17/292)
Sattel	5 <i>Borrelia afzelii</i> 8 <i>Borrelia garinii</i> 1 co-infection	6,03 % (14/232)	4 <i>Borrelia afzelii</i> 5 <i>Borrelia garinii</i> 1 co-infection	4,9 % (10/204)
Wasserbourg	10 <i>Borrelia afzelii</i> 12 <i>Borrelia garinii</i> 2 <i>Borrelia burgdorferi</i> ss 1 <i>Borrelia valaisiana</i> 2 co-infections	8,21 % (27/329)	7 <i>Borrelia afzelii</i> 13 <i>Borrelia garinii</i> 1 <i>Borrelia burgdorferi</i> ss	7,72 % (21/272)

3.2.8. Recherche d'autres pathogènes dans les tiques

► *Anaplasma phagocytophilum*

La famille des Anaplasmataceae regroupe les bactéries des genres *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* et *Wolbachia* qui sont des organismes intracellulaires stricts des cellules eucaryotes. *A. phagocytophilum* se multiplie sous forme de morula dans les globules blancs. 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.

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.

En 2014, 3034 nymphes ont été testées par biologie moléculaire ciblant un gène d'*Anaplasma phagocytophilum* (*msp2/p44*). Ces nymphes sont issues des collectes de l'année 2014 (collectes sur 13 sites dont 11 sites sont échantillonnés mensuellement et 2 sites ponctuellement).

Parmi ces 3034 nymphes analysées, 29 sont positives à *Anaplasma phagocytophilum* soit 0,96 %. L'étude faite en 2013 au cours de laquelle nous avons testé 2762 tiques avait permis de détecter un taux d'infection très similaire de 0,94 %.

Cette année, nous avons détecté 1 nymphe infectée à la fois par *Borrelia garinii* et par *Anaplasma phagocytophilum*, cette nymphe a été collectée sur le site de Murbach au mois de septembre.

De plus nous avons détecté 2 nymphes infectées à la fois par *Anaplasma phagocytophilum* et une *Borrelia* du groupe fièvre récurrente (en cours de séquençage). L'une d'elles a été collectée sur le site de Daubensand en juin et la deuxième sur le site du Firstplan en juillet.

► *Borrelia* agents de fièvre récurrente et en particulier *Borrelia miyamotoi*

Borrelia miyamotoi, agent de fièvre récurrente (FR) a été décrit pour la première fois en 1995 au Japon chez *Ixodes persulcatus*. Le premier cas humain a été décrit récemment en Russie en 2011. En 2013, le 1^{er} cas humain a été rapporté en Europe 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. En 2013, nous avons analysé un échantillonnage de 431 tiques testées sur 14 sites, 8 étaient positives, soit en moyenne 1,85 % de nymphes infectées par *Borrelia miyamotoi* sur le territoire Alsacien.

En 2014, nous avons complété nos analyses pour la recherche de *Borrelia* agents de FR sur les 2565 nymphes non testées en 2013. Nous avons également analysé 3034 nymphes collectées en Alsace en 2014.

Au total, en 2014, tous sites confondus, le taux d'infection par les *Borrelia* agents de FR est de 1,94 % (IC₉₅ = [1,5 - 2,5]).

Il est similaire à celui de 2013 où le taux d'infection était de 1,74 % (IC₉₅ = [1,3 - 2,3]).

La technique utilisée pour la détection est une technique spécifique des *Borrelia* agents de fièvre récurrente, suivi d'un séquençage du fragment de PCR pour identifier l'espèce. En 2013, il s'agissait dans tous les cas de *Borrelia miyamotoi*.

Les fragments de PCR issus des nymphes positives collectées en 2014 sont en cours de séquençage.

En conclusion, le taux moyen d'infection des nymphes par *Anaplasma phagocytophilum* est de 0,96 % en 2014, alors que le taux d'infection des nymphes par *Borrelia* du groupe fièvre récurrente est de 1,94 % en 2014.

3.3. Participation aux réseaux de surveillance

3.3.1 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 2014 à Barcelone lors de l'ECCMID.

Différents axes ont été discutés :

- Paramètres saisonniers influençant au niveau européen 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. Ce travail est devenu possible suite à l'obtention d'un financement allemand indépendant
- Rapprochement voire fusion du groupe avec un autre groupe, l'ESCAR pour la partie *Anaplasma phagocytophilum* et les *Rickettsia* transmises par *I. ricinus* ?
- La rédaction d'un article par le groupe sur la place des tests biologiques dans le diagnostic de la borréliose de Lyme

Deux réunions du bureau du groupe ESGBOR (dont fait partie Benoît Jaulhac) ont aussi été organisées à Vienne afin de :

- participer à une méta-analyse de la littérature sur la valeur des tests sérologiques, étude dirigée par l'Université d'Amsterdam avec le soutien de l'ECDC
- préparer le programme et l'organisation du prochain ICLB (International Conference on Lyme Borreliosis) qui aura lieu à Vienne en septembre 2015

Les membres de ce réseau assurent aussi une hotline européenne pour les praticiens, biologistes et patients qui s'adressent à eux. Six demandes ont été prises en charge par B. Jaulhac en 2014 dans ce cadre.

3.3.2. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

En 2014, le CNR des *Borrelia* a poursuivi ses missions de surveillance de l'incidence humaine de la borréliose de Lyme dans le cadre de deux études collaboratives :

1) avec la CIRE Nord-Est dans le cadre l'étude épidémiologique humaine ALSACETIQUE

Cette étude prospective mise en place en 2013, porte sur 3 maladies transmises par les tiques : la borréliose de Lyme, l'encéphalite à tiques et l'anaplasmose granulocytaire humaine.

Ses objectifs sont de décrire les caractéristiques des cas recensés afin d'améliorer leur prévention et leur traitement, d'estimer l'incidence de ces pathologies et de comparer cette incidence à celle observée lors du précédent réseau de 2003-2004. Cette étude a nécessité la mise en place d'un réseau de médecins volontaires, libéraux et hospitaliers de la région qui signalent mensuellement les nouveaux cas diagnostiqués de borréliose de Lyme, d'encéphalite à tiques et d'anaplasmose granulocytaire humaine. Ce signalement est effectué à l'aide d'un questionnaire individuel court, pouvant être complété en ligne via le portail virtuel voozanoo® dédié mis en place par la CIRE Nord-Est ou sur papier.

Dans ce cadre, en 2014, le CNR a participé à un programme de formation des professionnels de santé participant au réseau. Les biologistes du CNR *Borrelia*, associés aux membres de la CIRE

Est et aux infectiologues, ont dispensé 4 conférences en soirée dans différentes villes d'Alsace: Strasbourg, Colmar, Mulhouse et Haguenau.

Durant toute l'étude, à raison d'une fois par trimestre, nous avons participé à l'analyse et à la validation des cas déclarés, en association avec les membres cités ci-dessus.

2) au niveau national avec le réseau Sentinelles

Cette étude prospective porte sur la borréliose de Lyme et repose sur le réseau des médecins généralistes sentinelles. Elle est coordonnée par l'UMR-S 1136.

Ses objectifs sont de décrire les caractéristiques des cas recensés afin d'améliorer leur prévention et leur traitement, d'estimer l'incidence de ces pathologies et de comparer cette incidence à celle observée lors du précédent réseau de 2003-2004.

Le CNR participe à des réunions téléphoniques trimestrielles de validation des cas et à la relecture du rapport d'activité du réseau Sentinelles pour la partie le concernant. Ces données sont publiées annuellement sur le site du réseau (<https://websenti.u707.jussieu.fr/sentiweb/?page=bilan>).

En 2014, le réseau a publié dans Eurosurveillance, l'incidence annuelle de la borréliose de Lyme estimée au niveau national à 42 cas/100 000 habitants avec de fortes disparités régionales (>150 cas/100 000 habitants en Limousin et en Alsace) et une répartition bimodale (5-10 ans et 50-70 ans). Les érythèmes migrants représentent plus de 93% des manifestations déclarées par le réseau. Son évolution est stable depuis 2009.

4. Alerte

Cette année encore, le CNR *Borrelia* a été sollicité par de nombreux interlocuteurs, médecins (cliniciens et biologistes), et media mais aussi de nombreux patients désespérés et/ou inquiets des informations circulant sur internet parfois relayées par la presse grand public

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

5.1. Information et formation

5.1.1 Enseignement

« *Infections émergentes transmises par les arthropodes* », **S. DE MARTINO**, cours au Master 1 de Microbiologie Médicale, Faculté de Médecine de Strasbourg, cours dispensé chaque année

« *Borrelia* ». **B. JAULHAC**, cours de Bactériologie Médicale, Institut Pasteur Paris, dispensé tous les deux ans.

« *Borrelia* », **B. JAULHAC**, enseignement sciences biocliniques, agents infectieux, 2° cycle Médecine cours dispensé aux étudiants de DFGSM3, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg.

« Modèles animaux de la maladie de Lyme », **B. JAULHAC**, enseignement « Modèles animaux et Mécanismes physiopathologiques », 2° cycle - Médecine, cours dispensé aux étudiants de DFASM1 et DFASM2, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg.

« *Borrelia* », **B. JAULHAC**, cours de Microbiologie Médicale - dispensé aux étudiants de 3° et 4° année - Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg.

« La borréliose de Lyme », **S. DE MARTINO**, cours de DES aux internes de biologie de l'Université de Strasbourg.

« Entomologie médicale » - Faculté de pharmacie de Strasbourg, **N. BOULANGER**, 5^{ème} année : Travaux pratiques :

« La borréliose de Lyme » - Faculté de pharmacie de Strasbourg, **N. BOULANGER**, 6^{ème} année : - Faculté de médecine, **N. BOULANGER** et 3^{ème} année : Les tiques et maladies transmises.

« Rôle des arthropodes dans la transmission des pathogènes » : exemple de la borréliose de Lyme - Faculté de médecine, **N. BOULANGER**, Master de physiopathologie moléculaire et cellulaire.

5.1.2. Formation médicale continue aux professionnels de santé

- **FMC** des biologistes des hôpitaux généraux dans le cadre de l'enquête ALSACETIQUE, **S. DE MARTINO, B. JAULHAC** (2 interventions chacun pendant le premier trimestre 2014, avec de 50 à 70 médecins et biologistes présents à chaque intervention)
- **Atelier Siemens®** La borréliose de Lyme : Actualités, Juin 2014, **B. JAULHAC**
- Conférence sur le diagnostic de la borréliose de Lyme aux infectiologues et internistes l'hôpital de la Pitié Salpêtrière, Paris, Septembre 2014, **S. DE MARTINO**
- **DPC** via Internet pour médecins généralistes, Université de Strasbourg, Sérologie *Borrelia* 2014, **B. JAULHAC**
- **APPEPU** – Formation continue pour les pharmaciens d'officine : Actualités en entomologie médicale. Strasbourg le 10 février 2014, Mulhouse le 17 février 2014, environ 400 pharmaciens mobilisés. **N. BOULANGER**

5.1.3. Information pour les médias grand public et site internet

➤ Médias

En 2014, le CNR a fait l'objet de nombreuses sollicitations de la part des media grand public de la presse écrite ou télévisée, régionaux et nationaux :

- **France 5** (Magazine de la santé, émission d'une heure, mai 2014, reportage sur site)
- **Canal +** (Spécial investigation, émission d'une heure, octobre 2014, reportage sur site)
- **Le Monde** pages scientifiques (3 x 2h1/2 d'interview téléphonique)
- **Le Nouvel Observateur** (2h d'interview téléphonique, octobre 2014)
- **Radio Canada**
 - Ces sollicitations sont intervenues au moment ou après les affaires juridiques concernant les pratiques d'un laboratoire d'analyses médicales fermé par l'ARS pour ses pratiques sur la sérologie de la borréliose de Lyme. Ces 3 affaires juridiques se sont traduites à chaque fois par une condamnation : section disciplinaire du Conseil de l'Ordre des pharmaciens en juin 2014 (en appel), procès à Strasbourg en septembre 2014, section des assurances sociales du Conseil de l'Ordre des pharmaciens en décembre 2014 (en appel).
 - Parallèlement aux sollicitations directes du CNR, de nombreux autres articles sont parus dans la presse régionale ou nationale sur ce sujet pour soutenir ce laboratoire.

➤ Le site internet

- Adresse site : <http://www.chru-strasbourg.fr/Les-centres-de-reference/Borrelia>
- Date de création : 2013
- Rythme des actualisations : annuelles
- Date de la dernière mise à jour : 12 mars 2015

Le site internet du CNR des *Borrelia* a été piraté en début d'année 2015, sa reconstruction est en cours.

5.1.4. Participation à l'organisation par l'ANSM d'un Contrôle de Qualité Externe (EEQ)

En 2014, nous avons participé à l'organisation par l'ANSM d'un EEQ pour l'ensemble des laboratoires français pour la sérologie *Borrelia*.

Trois sérums ont été proposés :

- sérum n°1 : négatif en IgG et en IgM
- sérum n°2 : positif fort en IgG et négatif en IgM
- sérum n°3 : négatif en IgG et positif (faux positif) en IgM.

Ces sérums ont été associés à trois situations cliniques afin de tester leur prestation de conseil des laboratoires auprès des cliniciens prescripteurs en terme de justification de l'examen demandé, d'examens complémentaires et de conseil thérapeutique :

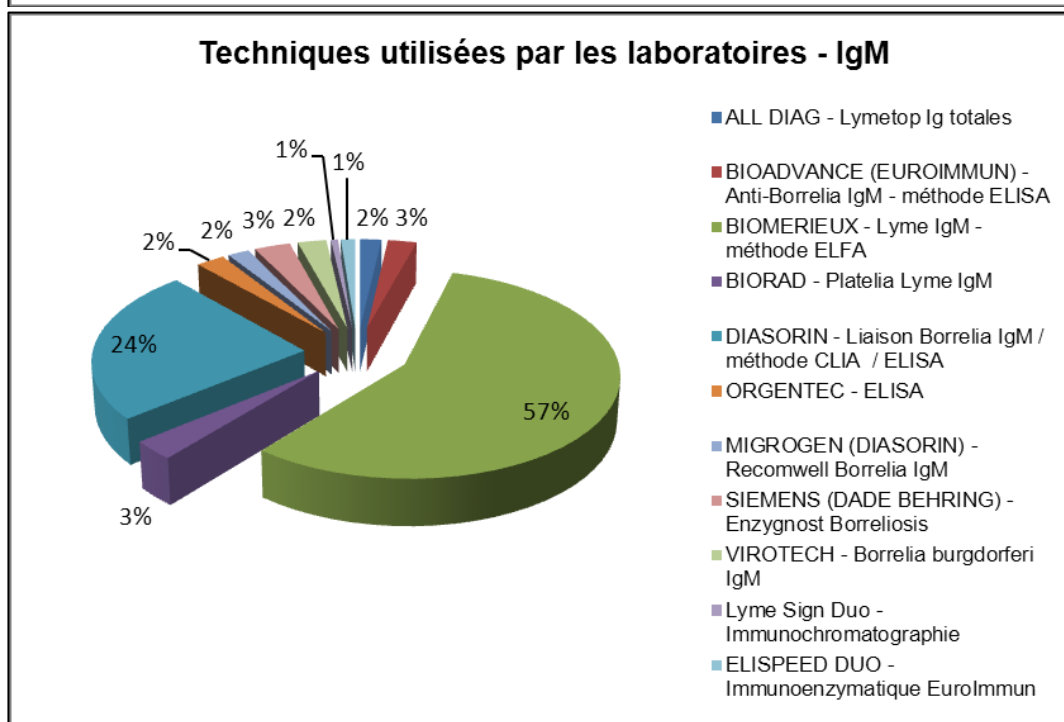
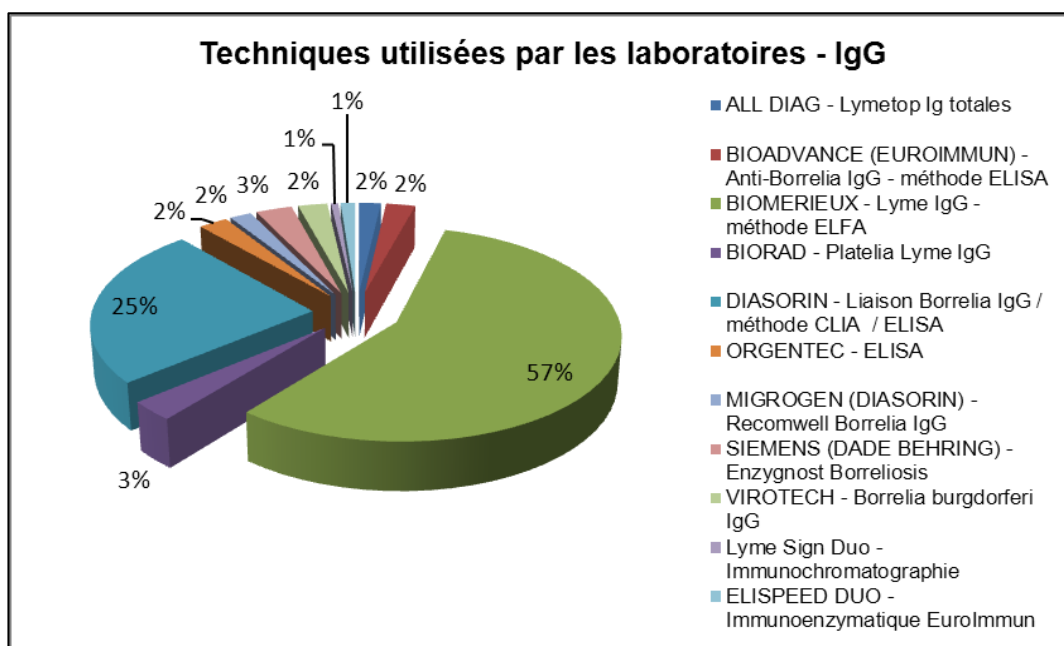
- sérum n°1 et cas d'érythème migrant
- sérum n°2 et cas d'arthrite de Lyme
- sérum n°3 et patient présentant des signes cliniques subjectifs chroniques

L'analyse des résultats par l'ANSM est en cours et sera finalisé en 2015.

5.1.5. Organisation d'un Contrôle de Qualité Externe (EEQ) proposé aux LABM par le CNR

En 2014, nous avons proposé comme les années précédentes aux laboratoires d'analyses médicales 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 166 laboratoires (contre 146 en 2013 et 93 en 2012, soit +71% de participation depuis 2012).

Parmi les 166 laboratoires participants, jusqu'à 11 techniques EIA différentes ont été utilisées. Sept d'entre elles permettaient la détection séparée des IgG et des IgM anti *B. burgdorferi*, les 4 autres permettaient la détection des Ig totales, les techniques IgG+IgM associées étaient en 2014 utilisées par près de 6 % des laboratoires participant à cet EEQ. Ce taux est en nette diminution (-14 %) par rapport à 2013, où 20% des laboratoires participants utilisait ce genre de trousse.



La technique IgG et IgM séparées de BioMérieux est toujours largement majoritaire (57%) dans les laboratoires et représente le choix de près de la moitié des LABM. Parmi les autres coffrets, Diasorin représente comme les deux années précédentes, le 2^{ème} choix en terme de fréquence d'utilisation (25%).

Une technique de confirmation (western-blot – immunoblot) a été utilisée par près de 40 % des participants qui utilisent 5 coffrets de fournisseurs différents : Bioadvance, Alldiag, Mikrogen, Servibio, Viramed.

Les 4 sérums distribués comme contrôles de qualité externe (EEQ) étaient :

- N°1 : **négatif en IgG et IgM** : 100% de réponses exactes en IgM et 98 % en IgG. Il est à noter que près de 8,4 % (10 % en 2013) 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'étant pas conforme aux recommandations de l'EUCALB.

- N°2 : **positif uniquement en IgG** : près de 8% de faux négatifs ont été observés en IgG, majoritairement avec une technique d'immunochromatographie. Ce problème avait déjà été observé en 2013.
- N°3 : **positif en IgG et négatif proche du seuil en IgM** : près de 25% de faux positifs ont été observés en IgM et ce avec la même technique EIA. Moins de 1% de faux négatif ont été observés en IgG (comme en 2013).
- N°4 : **positif en IgG et négatif en IgM** : 6 % de faux négatifs ont été observés en IgG et de 10,3 % de douteux ont été observés en IgM avec diverses techniques.

Au total, lors de 4 séries de contrôle, les faux résultats varient de 2 % à 25 % selon les cas.

Lors de l'EEQ n°3, les 25 % de faux positifs en IgM ont été observés chez des laboratoires utilisant la même trousse commerciale. Un signalement a été transmis au fabricant via la société organisatrice de l'EEQ.

Les faux négatifs en IgG semblent liés à la qualité du coffret d'immunochromatographie commercialisés. Le manque de sensibilité de ce test simple est rapide a déjà été rapporté par le CNR *Borrelia* en 2013 et une action de signalement à l'ANSM par l'association Biologie Prospective avait été proposé au fournisseur pour faire lui-même une déclaration de réactovigilance.

5.1.6. Accueil de stagiaires

Stage obligatoire – 5° année Pharmacie – terrain de stage CNR *Borrelia* :

5 étudiants

Stage de master M1 :

4 étudiants

Stage de master M2 :

2 étudiants

5.1.7. Thèse de doctorat, participation à des jurys

- Thèse de doctorat, **Octobre 2014** : Yssouf A : Identification des arthropodes-vecteurs et des pathogènes associés par spectrométrie de masse MALDITOF. Université d'Aix-Marseille. Rapporteur **N. BOULANGER**.
- Direction de thèse d'Université - **N. BOULANGER - B. JAULHAC** : Quentin BERNARD : septembre 2012 – octobre 2015 : « Analyse moléculaire de la transmission précoce de la borreliose de Lyme - rôle des récepteurs Toll »

- Direction de thèse d'Université - **N. BOULANGER - B. JAULHAC** : Valérie GOLDSTEIN: septembre 2012 – octobre 2015 « Aspects épidémiologiques de la borréliose de Lyme en Europe. » Interne en pharmacie
- Direction de thèse d'Université - **N. BOULANGER - B. JAULHAC**: Antoine GRILLON : septembre 2013 – Octobre 2016 : « Rôle de la latence cutanée de *Borrelia burgdorferi sensu lato* dans la physiopathologie de la borréliose de Lyme » AHU en médecine.

5.2. Guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

REMIC 5^{ème} édition - Référentiel en microbiologie

Chapitre sur *Borrelia burgdorferi sensu lato*

(Contexte épidémiologique et clinique ; Objectifs ; Prélèvements ; Méthodes diagnostiques avec les techniques immunoenzymatiques et d'immuno-empreinte et leur interprétation)

S. DE MARTINO, B. JAULHAC

5.3. Activités de conseil aux professionnels

En 2014, 1016 demandes nous ont été adressées de toute la France dont 256 demandes écrites et 760 appels téléphoniques. Cette activité a augmenté de 5,2 % par rapport à l'année 2013.

Devant l'augmentation des appels de professionnels de santé mais également de nombreux patients, une nouvelle ligne téléphonique d'accueil du CNR *Borrelia* a été ouverte au n° 03 69 55 16 66.

5.3.1 Communications téléphoniques

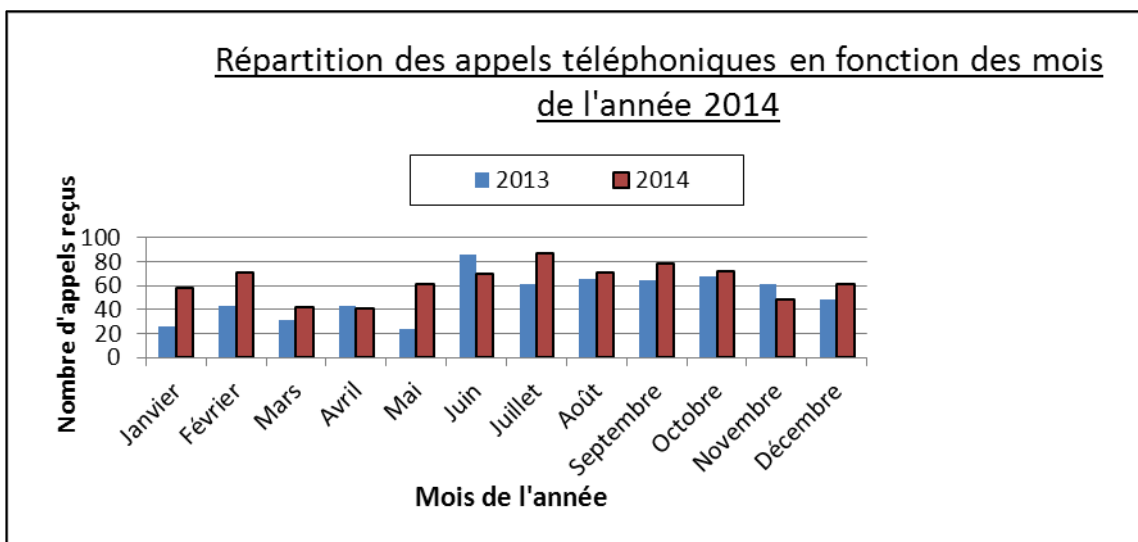
Les données des communications téléphoniques ont été analysées à partir d'un fichier Excel contenant la saisie manuelle des conversations téléphoniques recensées durant l'année 2014. Le principe a été d'extraire de ce fichier certaines informations à partir des conversations téléphoniques : la date, 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 760 appels durant l'année 2014, versus 620 en 2013 (liste non exhaustive car certains appels n'ont pas été tracés) soit près de 63h pour les biologistes et 31 h pour les techniciennes, passées au téléphone.

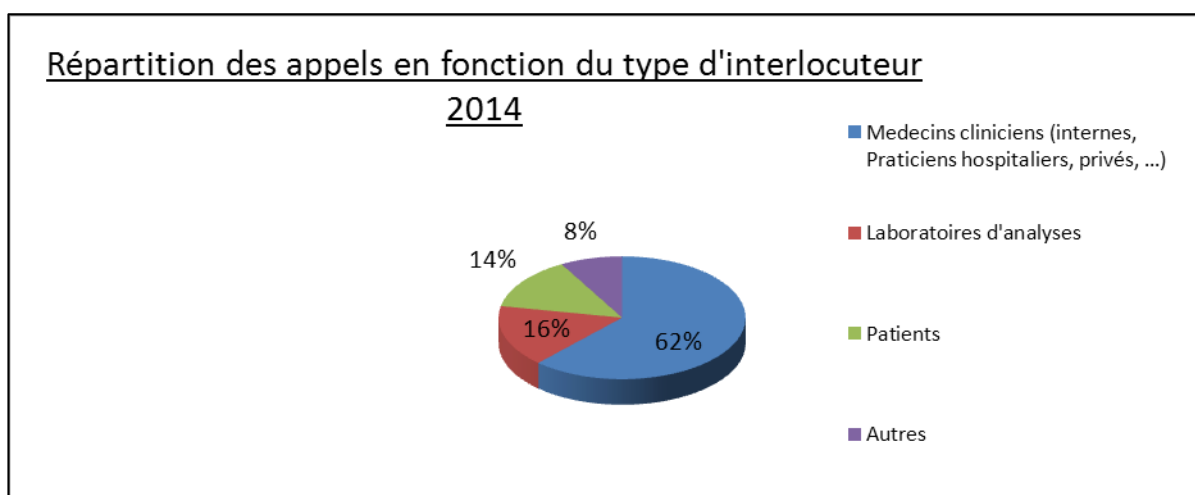
Le CNR a reçu 760 appels durant l'année 2014, versus 620 en 2013 (liste non exhaustive car certains appels n'ont pas été tracés) soit près de 63h pour les biologistes et 31 h pour les techniciennes, passées au téléphone. Cette activité s'est maintenue par rapport à l'année 2013.

Parmi ces appels, 355 appels (46,7%) ont été réceptionnés par les biologistes du CNR et 405 appels (53,3%) ont été réceptionnés par les techniciennes du CNR. La durée d'un appel est en moyenne de 7 min 30. 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 :

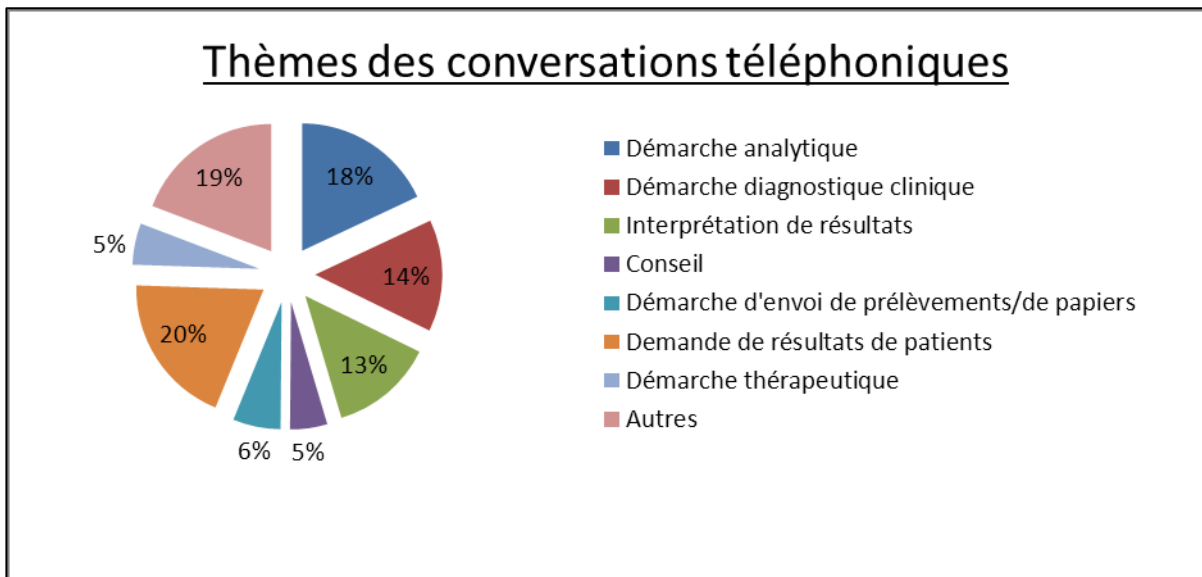


On recense plus d'appels aux mois de juin, juillet, août et septembre avec une moyenne de 76 appels par mois, contre 41 appels par mois pour les mois de mars et d'avril.



La majorité des communications téléphoniques ont été avec des médecins (62%), 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 16% des cas, les interlocuteurs étaient des laboratoires d'analyses et 14% étaient des patients. Les 8% des appels restants concernaient d'autres personnes (ARS, InVS, ministère de la santé, etc.).

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



Le but de ce travail est de voir la répartition des demandes en fonction de l'interlocuteur afin d'essayer d'orienter le fonctionnement ultérieur du CNR vers une sensibilisation de ces personnes sur les questions prioritaires 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 **demandes de résultats de patients** étaient prépondérantes et s'élevaient à 20% tandis que les **démarches diagnostique clinique et d'interprétation des résultats** (sérologie par ELISA et Western Blot) étaient au même niveau (environ 13%).

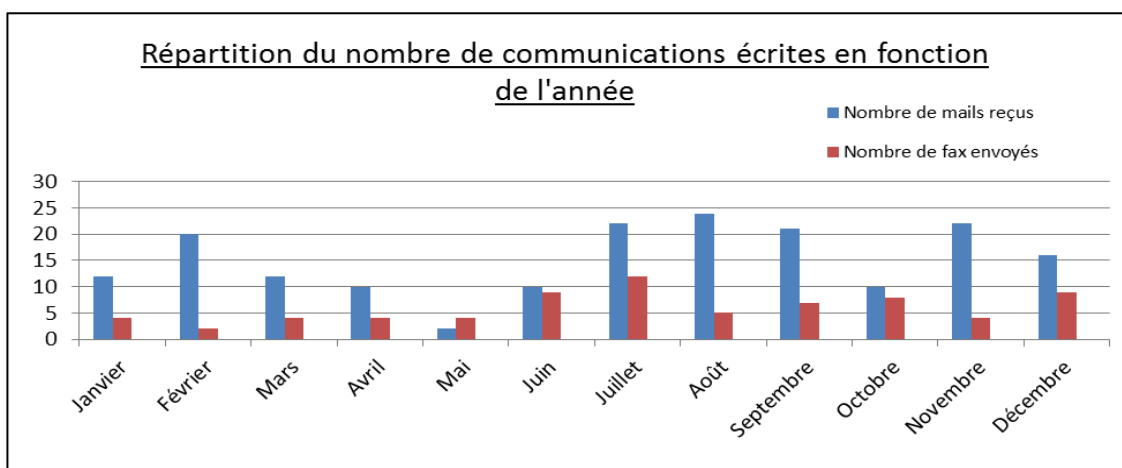
Les conseils à propos des **démarches analytiques** représentaient 18% des appels, de même pour les conseils divers (19%). En ce qui concerne les **conseils divers**, 19 avaient pour sujet les projets de recherche, 17 avaient pour but une demande de consultation avec un spécialiste, et 7 n'ont pas été renseignés. Ces appels étaient essentiellement passés avec des médecins cliniciens pour savoir quelles analyses réaliser et leur intérêt.

Enfin les autres thèmes regroupaient, en proportion égale (environ 6%), des conseils sur les **démarches d'envoi de prélèvements et/ou de papiers** (feuilles de renseignements, ordonnances, ...), et des **conseils thérapeutiques** 5% (traiter ou non ? Quel antibiotique ? Combien de temps ? ...).

5.3.2. E-mails

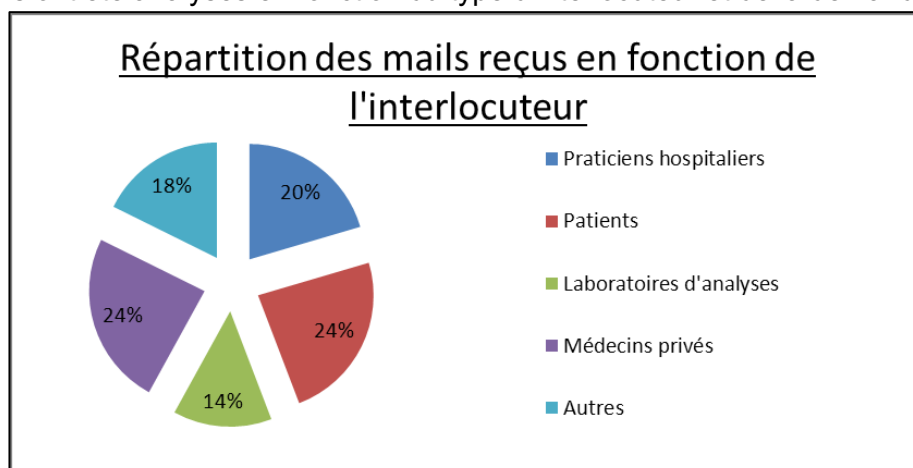
L'activité du CNR *Borrelia* est analysée ci-dessous à partir d'un fichier Excel contenant la saisie manuelle des E-mails et fax de l'année 2014. La base de données a été constituée à partir de l'extraction de chaque mail, de la date, l'émetteur et son destinataire, la provenance géographique et le thème de la demande. Ainsi, nous avons recensé 256 communications par écrit durant l'année 2014. Parmi ces communications écrites, il y avait 181 E-mails et 72 fax.

Le graphique suivant décrit la répartition de ces communications en fonction des mois de l'année



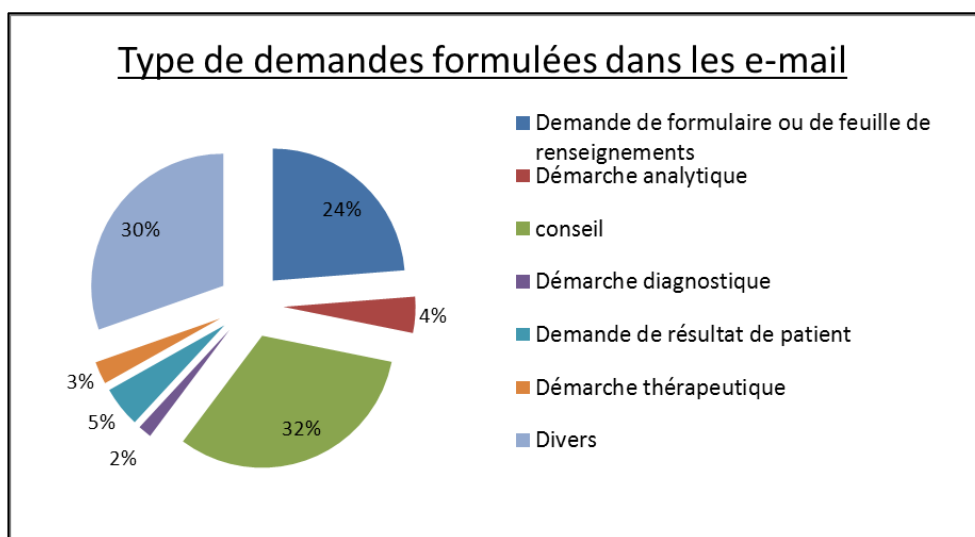
La répartition est relativement homogène des demandes durant l'année avec néanmoins une diminution des demandes durant les mois de mars à juin et du mois de septembre à octobre inclus. Le nombre de demandes varie de 10 à 15 par mois en moyenne, avec des pics au-delà de 20 surtout en été. En moyenne, le CNR recense une demande quotidienne tout au long de l'année.

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



Les demandes provenaient essentiellement des praticiens hospitaliers et des médecins privés qui représentent à eux deux 44% des mails reçus au CNR. La demande des patients est également élevée et représente 25% des mails reçus.

Par ailleurs, on recensait 18% d'e-mail provenant d'autres interlocuteurs comme des journalistes (3%), des organismes liés à la santé (CRIH, ARS).



Dans ces mails, les demandes prépondérantes sont des conseils (32%, soit 10% de plus que l'année précédente).

Les demandes de formulaires d'analyses ou de feuilles de renseignements représentent 24% des demandes formulées dans les e-mails. Dans la catégorie « divers » qui représente 30% des e-mails reçus, on retrouve principalement des demandes d'informations précises (ex : demande de déplacement d'un spécialiste, demande d'ADN de *Borrelia*, recherche d'un sérum...).

5.3.3. Fax

Parmi les 72 fax envoyés, 85% représentaient des résultats d'analyses demandés majoritairement par des médecins et biologistes (75%). Les deux autres demandes correspondaient à des envois de formulaire d'analyse, de feuille de renseignements et des conseils.

En conclusion, cette analyse de près de 1623 communications en 2014 (607 fiches de renseignements, 1016 communications écrites ou téléphoniques) révèle que l'activité du CNR des *Borrelia* n'est pas seulement une activité analytique et d'expertise. Le conseil et l'information occupent aussi une très grande place. Cette activité qui a encore augmenté cette année de 8,2 % est très chronophage. 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 une nécessité d'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. Activités d'expertises auprès de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire

ARS

En 2014, le CNR a poursuivi activement, sous l'égide de l'Agence Régionale de Santé, les réunions du comité de pilotage « Tiques et maladies à tique » avec la CIRE-EST.

Plusieurs réunions du comité de pilotage « Maladies transmises par les tiques » se sont déroulées durant l'année 2014. Ce comité regroupe les acteurs impliqués dans la problématique sus-citée :

le CNR *Borrelia*, les acteurs en lien direct avec la Santé : la médecine du travail, le service des maladies infectieuses du CHU de Strasbourg, la MSA, l'ONF...

➤ **Expertises nationales**

- **Expert en tant que membre de réseaux**

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 2015. Coordinatrices : K. McCoy et N. Boulanger.

➤ **Expertises internationales**

- **Expertise pour l'Attribution de financements :**

Ministère Hollandais de la Santé. Rapport d'Expertise de financements sur les tiques et maladies transmises. Juin 2014. « Midterm review report Strategic Research RIVM (SOR), programme 2011-2014 ».

- **Activités de referee**

N. Boulanger:

Vector Borne and Zoonotic diseases,
Tick and Tick Borne diseases,
PlosOne.

B. Jaulhac :

Médecine & Maladies Infectieuses,
New Microbes & New Infections,
Frontiers in Microbiology

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

6.1. Activités de recherche en cours

Les différents axes sont les suivants :

1. Analyse de la peau dans la transmission précoce de *Borrelia* et de son rôle potentiel dans la peau
2. Analyse de la latence de *Borrelia* par une approche protéomique et de l'organotropisme de *Borrelia* pour la peau
3. Mise au point d'une technique de diagnostic précoce de *Borrelia* dans des biopsies cutanées par spectrométrie de masse.
4. Mise au point d'une technique de détection de *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans les tiques par spectrométrie de masse
5. Analyse du rôle du microbiome cutané sur la transmission précoce de *Borrelia burgdorferi* sensu lato
6. Mise au point d'un vaccin contre la borréliose de Lyme

7. Aspects épidémiologiques de la borréliose de Lyme en zone d'endémie.

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

6.1.1.1. Objectifs

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

6.1.1.2. Apport du CNR

Le CNR accomplit cet axe de recherche en partenariat pour le financement avec la Direction Générale de l'Armement et la Région Alsace.

Ce travail fait l'objet d'une thèse de Doctorat de QUENTIN Bernard.

L'étudiant étudie le rôle du mastocyte dans l'inflammation cutanée initiale et finalise sa thèse pour septembre 2015.

6.1.1.3 Etat d'avancement

L'analyse moléculaire *in vitro* des interactions *Borrelia*-cellules de la peau-tique, met en évidence un rôle essentiel de la tique dans la transmission. La tique par sa piqûre induit une blessure qui active un récepteur de l'immunité innée, le récepteur Toll, TLR3. Cette activation amplifie l'inflammation induite par la bactérie elle-même. De façon intéressante, la salive de tique inhibe dans un premier temps ce processus pour faciliter la transmission puis le développement de *Borrelia*.

Ce travail a fait l'objet d'une présentation au congrès international de Boston sur la maladie de Lyme en août 2013 et une publication est en révision dans *Experimental dermatology* (IF : 4,11).

Pour ce travail, l'étudiant a reçu deux prix :

- Journées scientifiques de la faculté de médecine de Strasbourg (FMTS) en juin 2014 (Présentation orale)
- 4th international symposium on the skin physiology. 20-21 octobre 2014, Vichy, France.
Bernard Q., Gallo R., Jaulhac B., Lipsker D., Nakatsuji T., Luft B., Yang X., **Boulanger N.** (2014) TLR2/TLR3 crosstalk during the early transmission of Lyme borreliosis. (Présentation orale)

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

6.1.2.1. 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, surtout dans la phase chronique.

6.1.2.2. Partenariats

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

Ce travail se poursuit afin d'identifier des biomarqueurs de l'infection à *Borrelia* lors de la phase chronique. Ces biomarqueurs pourraient constituer des candidats pour un nouveau diagnostic en protéomique ciblée (Selected Reaction Monitoring / Mass spectrometry).

Ce travail fait l'objet d'une thèse de Doctorat, par Antoine GRILLON, AHU en bactériologie, actuellement en 2^{ème} année de thèse d'université.

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

6.1.3.1. 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*.

6.1.3.2. Partenariats

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

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), le CH de Colmar (Dr MARTINOT), le CHU de Besançon, de Metz et de Reims.

6.1.3.3. 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). Nous nous sommes placés au 7^{ème} jour après infection intradermique à la seringue de *B. burgdorferi* ss.

Sur biopsies cutanées, nous avons préalablement recherché l'ensemble des protéines bactériennes présentes par LC-MS/MS : 25 ont été identifiées. Parmi ces 25 protéines, se trouvait OspC que nous avons choisie pour rechercher spécifiquement par SRM-MS/MS dans la peau de souris et qui y a été retrouvée. Afin de valider la méthode pour une application éventuelle chez l'Homme, nous l'avons testée sur 3 biopsies d'érythème migrant de patients infectés par *B. afzelii*. De façon tout à fait intéressante, OspC a été retrouvée chez les trois patients.

Afin de valider la technique de diagnostic précoce à plus large échelle, nous avons déposé un projet « IDEX : étude pluridisciplinaire » auprès de l'Université de Strasbourg sur ce sujet afin d'obtenir un accès à plus de patients. Nous avons obtenu 60 Keuros pour le financement de ce travail.

6.1.3.4. Publication de ce travail

Ce travail vient d'être accepté en publication sous la référence :

Schnell G, Boeuf A, Westermann B, Jaulhac B, Lipsker D, Carapito C, Boulanger N, Ehret-Sabatier L. Discovery and targeted proteomics on cutaneous biopsies infected by Borrelia to investigate Lyme disease. Mol Cell Proteomics. 2015 Feb24. pii: mcp.M114.046540. IF : 7,25

6.1.4. Mise au point d'une technique de détection de *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans les tiques par spectrométrie de masse

6.1.4.1. Objectifs

Mettre au point une technique rapide de détection des pathogènes dans les tiques collectées sur le terrain par protéomique en remplacement de la PCR.

6.1.4.2. Partenariats

Ce travail se fait en étroite collaboration avec l'équipe de recherche URMITE de Marseille (Drs L. Almeras et P. Parola).

6.1.4.3. Etat d'avancement

Le travail avait été initié par un étudiant en master M2 en 2013. Nous avons tenté de détecter *Borrelia* dans les tiques par une approche ciblée, visant la protéine OspA par spectrométrie de masse. Peu concluant, nous avons entrepris la détection par une approche non ciblée, basée sur un profil global des protéines par spectrométrie de masse.

Ce travail est fait actuellement par un master M2 (D. Arenas).

6.1.5. Aspects épidémiologiques de la borréliose de Lyme en zone d'endémie

6.1.5.1 Objectifs

- étude N+10 ans de la densité en vecteur en Alsace
- évaluation des facteurs abiotiques sur la densité en nymphes en Alsace.
- évaluation du biotope et analyses statistiques associées

6.1.5.2 Partenariats

Partenariat avec l'ONF, avec la faculté de géographie de Strasbourg et avec Mickael Schaeffer (ingénieur biostatisticien au pôle de santé publique du CHU de Strasbourg)

6.1.5.3 Etat d'avancement

Afin de suivre l'évolution de la densité du vecteur *Ixodes ricinus* en Alsace, des campagnes de collectes sur le terrain ont été organisées depuis 2012 et ont permis une nouvelle exploration des sites investigués en 2003-2004 par l'ancien CNR *Borrelia*.

Ce travail fera l'objet d'une soumission : étude N+10 (par Docteur Valérie Goldstein)

De plus, certains facteurs biotiques et abiotiques pouvant influencer la densité vectorielle ont été analysés. La partie de l'étude sur les facteurs abiotiques fera l'objet d'une publication (Dr Valérie Goldstein)

La soutenance de la thèse de science du Dr Valérie Goldstein, déjà diplômée de la faculté de pharmacie de Strasbourg, est prévue pour l'année 2015.

6.2. Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR

6.2.1. Publications nationales

Boulanger N. (2014). La peau : un acteur clef dans les pathologies à transmission vectorielle. **Lettre du CNEV** (Centre National d'Expertise sur les Vecteurs, Numéro 5, mai 2014)

Boulanger N. (2014). Prévention contre les tiques. *Dermatologie Actualités* N 141, Avril-Mai 2014.

F. BLANC, **B. JAULHAC**, Y. HANSMANN, J.L. DIETEMANN, C. TRANCHANT
Borréliose de Lyme et neuroborréliose - EMC – Neurologie, 2014.

6.2.2. Publications internationales

Bernard Q., **Jaulhac B.**, **Boulanger N.** 2014. Smuggling across the border: How arthropod-borne pathogens evade and exploit the host defense system of the skin. **J Invest Derm.**, 134:1211-9 - IF : 6,19

Pages F., Dautel H., Duvallet G., deGentile L., **Boulanger N.** 2014. Repellents for human use: prevention of tick bites and tick-borne diseases. **Vector borne and zoonotic diseases**, 14(2):85-93 IF: 2,73

F. Schramm, M. Gauthier-Clerc, JC Fournier, KD McCoy, C. Barthel, D. Postic, Y. Handrich, Y. Le Maho, **B. Jaulhac.** 2014. First detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in king penguins (*Aptenodytes patagonicus halli*). **Ticks Tick Borne Dis.**, 5 :939-42. IF: 2,35.

A. Vandenesch, C. Turbelin, E. Couturier, C. Arena, **B. Jaulhac**, E. Ferquel, V. Choumet, C. Saugeon, E. Coffinieres, T. Blanchon, V. Vaillant, T. Hanslik. 2014. Incidence and hospitalisation rates of Lyme borreliosis, France, 2004 to 2012. **EuroSurveillance**, 19: pii: 20883. IF : 4, 65.

R.B. Dessau, V. Fingerle, J. Gray, K.P. Hunfeld, **B. Jaulhac**, O. Kahl, W. Kristoferitsch, G. Stanek, F. Strle. The lymphocyte transformation test for the diagnosis of Lyme borreliosis has currently not been shown to be clinically useful. 2014. **Clin. Microbiol. Infect.**, 20: 786-7 13. IF : 4,57.

F. Blanc, N. Philippi, B. Cretin, C. Kleitz, I. Berly, B. Jung, S. Kremer, I.J. Namer, F. Sellal, **B. Jaulhac**, J. De Seze. Lyme Neuroborreliosis and Dementia. 2014. **J. Alzheimers Dis.** 41: 1087-93. IF : 4,17.

6.2.3. Communications nationales

Bernard Q., Gallo R., Nakatsuji T., **Jaulhac B.**, **Boulanger N.** Le Crosstalk TLR2/TLR3 au niveau de la peau et son implication dans la physiopathologie de la Borréliose de Lyme. Montpellier, REID, Février 2014.

Goldstein V., George JC., **Zilliox L.**, Delena C., **Jaulhac B.**, Ferquel E., **Boulanger N.** Surveillance du vecteur *Ixodes ricinus* en Alsace en 2012 et 2013. Montpellier, REID, Février 2014

Grillon A., Westermann B., **Jaulhac B.**, Sabatier L., **Boulanger N.** Tropisme cutané de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto dans le développement de la borréliose de Lyme : mise en évidence sur un modèle murin. Journées de Microbiologie de Strasbourg, 3 Avril 2014.

Goldstein V., **Jaulhac B.**, George JC, **Zilliox L.**, Delena C., Ferquel E., **Boulanger N.** Borréliose de Lyme : Surveillance du vecteur *Ixodes ricinus* en Alsace en 2012 et 2013. Société Française de Parasitologie, Reims, 21-23 Mai 2014.

Bernard Q., Gallo R., **Jaulhac B.**, Lipsker D., Nakatsuji T., Luft B., Yang X., **Boulanger N.** Potential role of the crosstalk TLR2/TLR3 during the early transmission of Lyme borreliosis. Journée de la fédération de Médecine de Strasbourg, 1-2 juillet 2014. Prix de thèse pour Quentin Bernard.

Grillon A. Twizeyimana E, Schramm F., **Zilliox L.**, **Jaulhac B.**, **De Martino, S.** Caractéristiques des arthrites de Lyme PCR positives dans les liquides et tissus articulaires ; données 2012-2014. RICAI 27 novembre 2014, Paris.

6.2.4. Communications internationales

De Martino S., Jaulhac B, Boulanger N., Gastinger G., Reitzer C., Hansmann Y., Christmann D. Survey of three tick borne diseases in Alsace, France: Lyme disease, Tick Borne Encephalitis and Anaplasmosis. Journée Internationale OMS sur les maladies à Transmission vectorielle. Fribourg, Allemagne, 7 avril 2014

Bernard Q., Gallo R., **Jaulhac B.**, Lipsker D., Nakatsuji T., Luft B., Yang X., **Boulanger N.** (2014) TLR2/TLR3 crosstalk during the early transmission of Lyme borreliosis. 20-21 octobre 2014, Vichy, France. 4th international symposium on the skin physiology. Premier prix de recherche pour Quentin Bernard.

Bernard Q., Gallo R., Nakatsuji T., **Jaulhac B., Boulanger N.** The TLR2/TLR3 crosstalk in the skin and its involvement in the physiopathology of Lyme borreliosis. *Gordon conference on Spirochetes, Ventura, California, January 18-24, 2014*

Schnell G., Westermann B., Bœuf A., **Jaulhac B., Boulanger N.,** Sabatier L. SRM as a new efficient detection tool for the early diagnosis of Lyme disease. 62nd Conference American Society for mass spectrometry, June 15-19, 2014. Baltimore, USA.

Westermann B, Schnell G., Grillon A., Boeuf A., **Jaulhac B., Boulanger N.,** Ehret-Sabatier L. (2014). Discovery and targeted proteomics for the diagnosis of lyme disease. Brixen/Bressanone, Italie, 3 au 09 août 2014.

Schnell, G., Bœuf, A., Westermann, B., **Jaulhac, B.,** Carapito, C., **Boulanger, N.,** Sabatier, L. SRM as a new efficient detection tool for the early diagnosis of the Lyme disease : 20th International Mass Spectrometry Conference (IMSC), 24-29 août 2014, Genève, Suisse

Q. Bernard, R. Gallo, T. Nakatsuji, **B. Jaulhac, N. Boulanger.** Le Crosstalk TLR2/TLR3 au niveau de la peau et son implication dans la physiopathologie de la Borréliose de Lyme. Communication orale, REID, février 2014, Montpellier.

V. Goldstein, J.C. George, **L. Zilliox,** C. Delena, **B. Jaulhac,** E. Ferquel, **N. Boulanger.** Surveillance du vecteur *Ixodes ricinus* en Alsace en 2012 et 2013. Communication orale, REID, février 2014, Montpellier.

S. de Martino, B. Jaulhac. Identification of *Borrelia burgdorferi* complex species using Maldi-Tof Mass Spectrometry, it's possible. Communication affichée, 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelone, 10-13 mai 2014, Espagne.

G. Schnell, B. Westermann, A. Boeuf, **B. Jaulhac, N. Boulanger**, I. Sabatier. SRM as a new efficient detection tool for the early diagnosis of Lyme disease. Communication affichée, 62nd Conference American Society for mass spectrometry, June 15-19, **Baltimore Convention Center**, 2014, USA

6.2.5. Conférences sur invitation, congrès, séminaires

B. JAULHAC

- Session de Formation ARS ALSA(CE)TIQUE – Institut de Formation des soins infirmiers – CH Mulhouse, le 23 janvier 2014
- Session de Formation ARS ALSA(CE)TIQUE – Institut de Formation des soins infirmiers – Haguenau, le 06 février 2014
- Réunion du Comité Scientifique ESGBOR, Vienne, du 31 janvier au 01^{er} février 2014
- Réunion scientifique « Sérologie Microbienne » Laboratoire de Microbiologie CHU de Nancy, le 25 février 2014
- Congrès de la Société Française de Microbiologie, Paris, du 30 mars au 01^{er} avril 2014
- Orateur « Ticks and tick-borne pathogens », 24th ESCMID à Barcelone du 10 au 13 mai 2014
- Ateliers SIEMENS « La Maladie de Lyme » à Paris, du 21 au 22 mai 2014
- Orateur - ECDC Meeting « Lyme Borreliosis » à Amsterdam, du 23 au 24 octobre 2014
- Session de Formation ARS ALSA(CE)TIQUE – Institut de Formation des soins infirmiers – CH Colmar, le 05 Juin 2014
- Interview « Le Monde » Maladie de Lyme, Paris, le 11 novembre 2014

S. DE MARTINO

- Session de Formation ARS ALSA(CE)TIQUE hôpitaux Civils – Centre de Formation COLMAR, 30 janvier 2014
- ESCMID Postgraduate Education Course « Pratical Diagnosis of Arthropod-Borne Infections, Marseille, du 17 au 19 mars 2014
- 24th ESCMID – Barcelone, du 10 au 13 mai 2014
- Intervenant Conférence débat « Maladie de Lyme » Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière Paris, le 19 mars 2014
- Journée échanges sur la démarche d'accréditation – INVS Saint Maurice le 14 novembre 2014

N. BOULANGER

- Prévention des maladies transmises par les tiques. Séminaire DPPS, 13 mai 2014, Agence Régionale de Santé, Alsace.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés

Développer et diffuser des méthodes pour le diagnostic des différentes formes de borréliose
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)

Description détaillée de l'équipe

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 2014 avec les moyens humains constants 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, 10 % ETP hospitalier payés sur les crédits affectés au CNR

Madame Laurence ZILLIOX : Ingénieur Biologiste Hospitalier, 100% ETP affectée au CNR et payés sur les crédits affectés au CNR

Madame Danièle NAPOLITANO : technicienne 60% ETP affectée au CNR et payés sur les crédits affectés au CNR

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

	<i>Médecins biologistes</i>	<i>Praticiens attachés</i>	<i>Ingénieur/ Technicien</i>	<i>Total</i>
<i>en Équivalent Temps Plein (ETP)</i>	0,2	0,6	1,6	2.4
<i>Nombre de personnes</i>	2	2	2	6

L'organigramme du CNR est intégré à l'organigramme du plateau technique de Microbiologie (cf page suivante).

BUREAU PTM

- **Coordonnateur** : JAULHAC Benoît
 - **Responsables UF Disciplines** :
 UF 3431 Bactériologie : JAULHAC Benoît

- **Responsables UF STAP** :

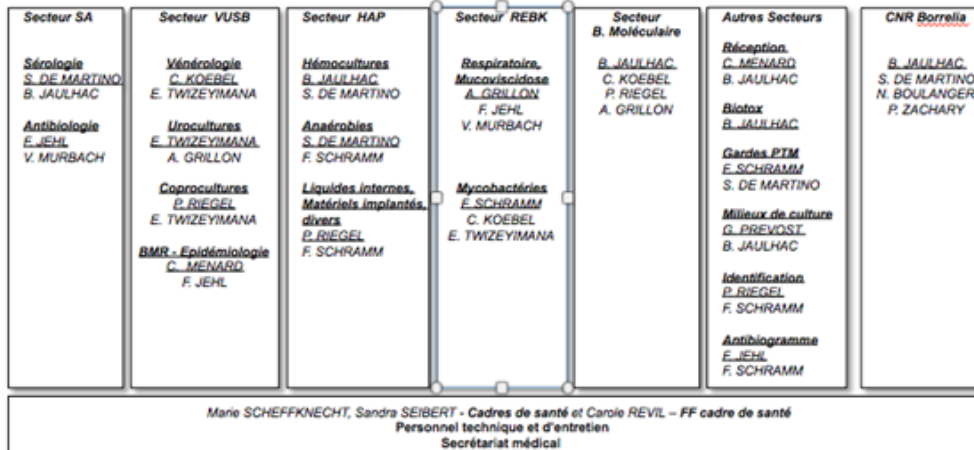
Laboratoire de Bactériologie		BACT-M1-ENRG-001
Organigramme fonctionnel du Laboratoire de Bactériologie		Version 3 : 14/02/2014 p. 1/1
Rédigé par : C. MENARD	Approuvé par : B. JAULHAC	

Responsable Médical
Benoît JAULHAC

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

UF 3431

UF 3432



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

Responsable : DE MARTINO Sylvie

Biologistes :

cf. Organigramme fonctionnel bactériologie (BACT-M1-ENRG-001)

cf. Organigramme fonctionnel par

**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 : SCHEFFKNECHT Marie
médical

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

GROUPE QUALITE

Coordonnateur PTM : JAULHAC Benoît

Coordonnatrice qualité : WENDLING Marie-Josée (RQ Virologie)

Responsables qualité (RQ) UF disciplines :

MENARD Céline (Bactériologie)

FILISSETTI Denis (Parasitologie)

BELOTTI Laure (Hygiène Hospitalière)

Cadre de santé : SCHEFFKNECHT Marie, SEIBERT Sandra et REVIL Carole (faisant fonction)

Techniciens référents :

MIDEY Mélanie

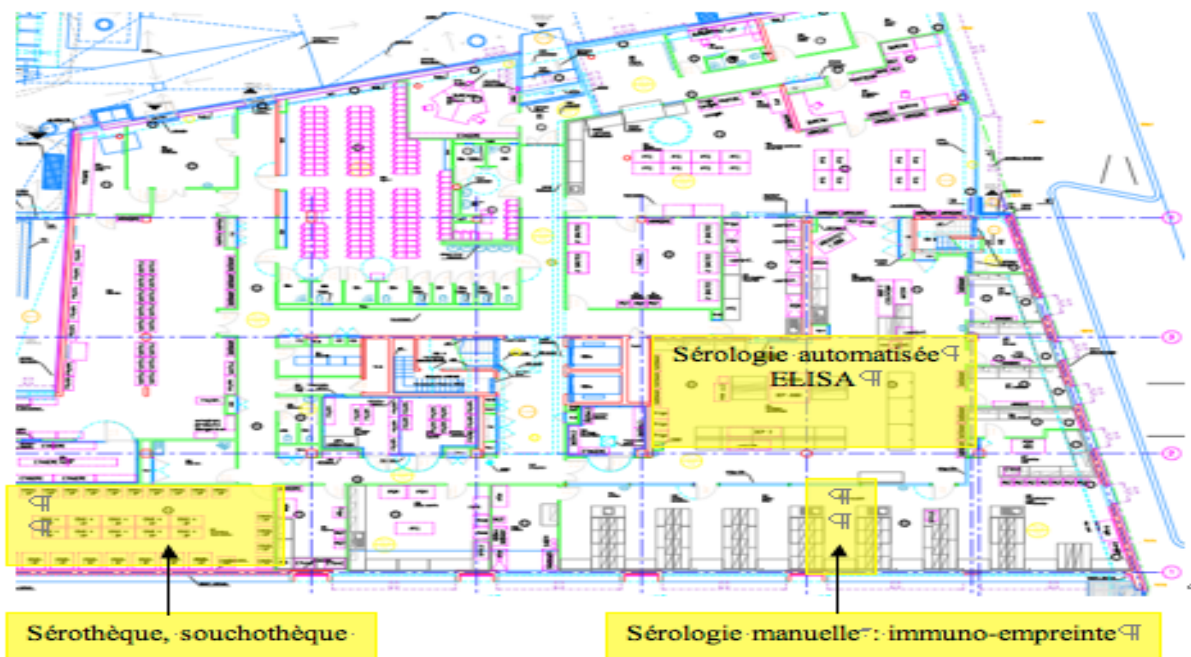
SOHN Véronique

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

Surface, plan :

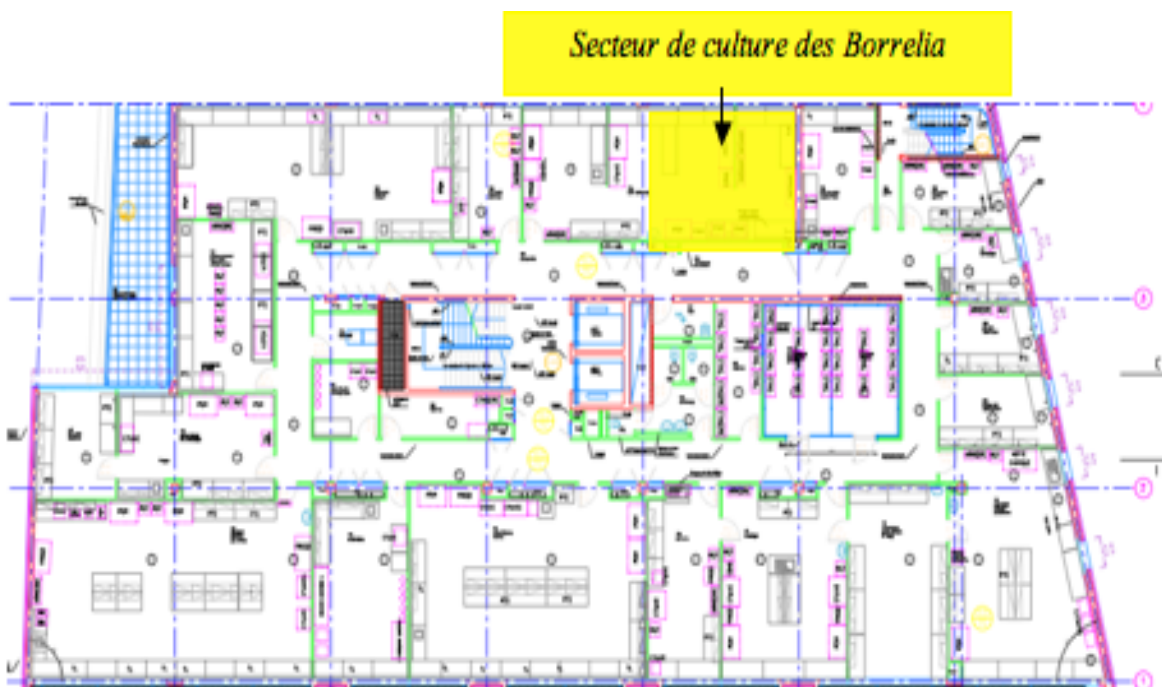
Depuis 2012, le CNR est localisé au sein du Plateau Technique de Microbiologie (bâtiment de 3 500 m² utiles). Son activité s'effectue en fonction des analyses à réaliser dans les différents Secteurs Techniques d'Activité Partagée (STAP) présentés ci après.

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

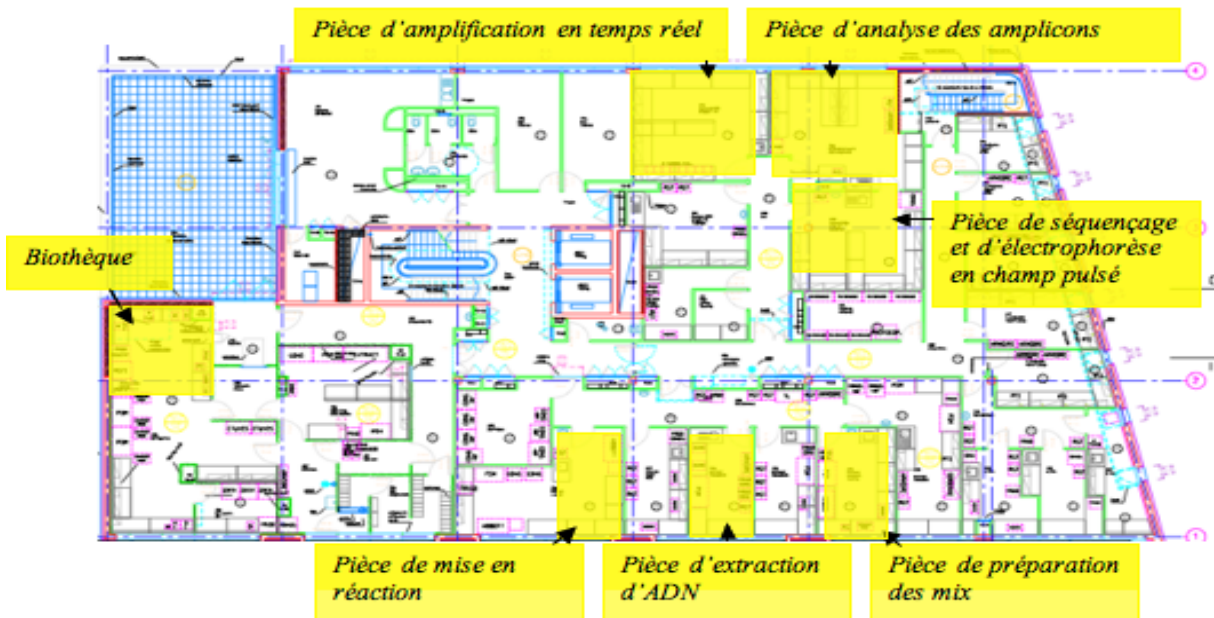


La souchothèque et la sérothèque sont situées dans une pièce séparée à accès réglementé et tracé par badge nominatif

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
- 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).

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage

A. Techniques diagnostiques disponibles :

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

a. Culture

- i. 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*)
- ii. Culture en milieu liquide BSK additionné de sérum pour les souches de *Borrelia* de fièvres récurrentes
- iii. Culture de souches de *Borrelia burgdorferi* sensu lato sur milieu solide mis au point par le laboratoire (production de souches clonales)

b. Amplification génique spécifique in vitro

- i. 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*
- ii. 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),
- iii. 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).
- iv. PCR pour le diagnostic de fièvres récurrentes ciblant l' espace intergénique 16S-23S ADN
- v. PCR en temps réel pour détection d'agents de fièvres récurrentes dans les tiques : Recherche directe d'agents de fièvres récurrentes 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. Référence : 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).

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

Protocole de préparation de *Borrelia* pour analyse sur Maldi-TOF, et tests de 79 souches de référence des principales espèces et obtention pour chacune de ces souches de spectres moyens de référence.

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

- a. **Sérologie de dépistage en ELISA quantitative IgG et IgM** séparés (utilisation du coffret Enzygnost VlsE Siemens®) pour la détection d'anticorps anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato sur sérum, plasma, LCR et pour la recherche d'une synthèse intrathécale spécifique anti *B. burgdorferi* sensu lato
- b. **Sérologie de confirmation par immunoempreinte** sur sérum et/ou LCR des résultats positifs ou douteux lors du dépistage par une technique de western blot «maison» pour étude de la spécificité 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).

B. 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.
- Inoculation Maintien de lignées de tiques *Ixodes ricinus*

2.2 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence description : nombre de souches, caractérisation

- **Description souches de *Borrelia* du CNR**

Nous disposons en 2014 d'une **collection de 120 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*). Nous avons enrichi notre collection de deux souches d'EM en 2014.

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

Il s'agit de :

- 8 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)
- 40 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'EMM, 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*

○ Description d'immun-sérums de référence

En 2014, 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 aliquotes 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 2014

<i>Formes cliniques</i>	<i>Sérums</i>	<i>LCR</i>
<i>EM</i>	208	/
<i>NB</i>	141	137
<i>ACA</i>	48	/
<i>LCB</i>	26	/
<i>ART</i>	56	/
<i>Autres (EMM, Myosite, cardioborréliose, uvéite...)</i>	8	1
<i>Total</i>	487	137
<i>Autres échantillons (étude des réactions croisées)</i>	210	45

Une partie de ces sérums sont actuellement utilisés pour l'évaluation des coffrets d'immuno-empreinte débutée en 2014.

○ Conditions de stockage

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

○ Conditions de mise à disposition de ces collections

- Les souches isolés par nos soins sont répertoriées avec leur nombre de passage de

culture in vitro et stockées en aliquotes 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.

Liste des techniques (diagnostic/identification, typage)

Techniques recommandées par le CNR *Borrelia* en cas de suspicion de borréliose de Lyme

Les recommandations de techniques par le CNR *Borrelia* sont issues des recommandations européennes pour le diagnostic des borrélioses. Selon la définition des cas cliniques en vigueur (cf tableau ci-dessous), le diagnostic biologique de routine repose essentiellement sur les tests sérologiques. La mise en évidence par culture (laboratoire spécialisé) ou par PCR des ne sont considérés que comme des techniques pouvant fournir éventuellement des preuves complémentaires, non essentielles.

Critères diagnostique de l'EUCALB de la borréliose de Lyme

Web site of European Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB): http://meduni09.edis.at/eucalb/cms_15/index.php

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-radicularitis, 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 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.

La sérologie de Lyme repose sur un double test sérologique.

En premier lieu, par le dépistage d'anticorps anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato, par ELISA le plus souvent. Puis, si ce test est positif ou douteux, il est nécessaire de confirmer la spécificité des anticorps détectés par immunoempreinte. Le CNR recommande l'application séquentielle stricte de ces deux types de tests et ne cautionne pas l'utilisation en première instance de l'immunoempreinte. Cette dernière peut mener, en cas d'ELISA négatif (i.e. : d'anticorps indétectables) à un manque de spécificité menant à un dérive d'interprétation de résultats faussement positifs.

Ainsi, selon les manifestations cliniques menant à la suspicion de borréliose de Lyme, le tableau suivant indique les techniques recommandées pour étayer le diagnostic. Les techniques de sérologie constituent un outil majeur fournissant des preuves essentielles au diagnostic. En revanche, l'absence de mise en évidence par culture ou PCR sur prélèvements humains, du fait d'une faible sensibilité globale, ne peut constituer une preuve suffisante pour éliminer le diagnostic. C'est pourquoi, ces techniques sont considérées comme complémentaires pour le diagnostic de borréliose de Lyme.

Techniques biologiques recommandées pour le diagnostic de borréliose de Lyme

Cas clinique	Techniques biologiques recommandées pour le diagnostic	Preuves biologiques essentielles au diagnostic	Preuves biologiques ou clinique complémentaires éventuelles
Erythème migrant (EM)	Aucune, le diagnostic est clinique	aucune	Détection de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. par culture et/ou PCR sur biopsie cutanée
Lymphocytome borrélien (rare)	Sérologie en deux temps sur le sérum :	Séroconversion ou sérologie positive *	Histologie. Détection de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. par culture et/ou PCR sur biopsie EM récent ou concomitant
	<ul style="list-style-type: none"> - dépistage (ELISA le plus souvent) - puis confirmation de la spécificité des anticorps (ssi ELISA positif ou douteux), par immunoempreinte (western blot le plus souvent) 		
Acrodermatite chronique atrophicante	Sérologie en deux temps sur le sérum :	Taux élevés d'anticorps spécifiques*	Histologie. Détection de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. par culture et/ou PCR sur biopsie
	<ul style="list-style-type: none"> - dépistage (ELISA le plus souvent) - puis confirmation de la spécificité des anticorps (ssi ELISA positif ou douteux), par immunoempreinte (western blot le plus souvent) 		
Neuroborreliose de Lyme	Cytologie du LCR	Pléiocytose dans le LCR et détection de synthèse intrathécale spécifique d'anticorps**	Détection de <i>B. burgdorferi</i> s.l. par culture et/ou PCR dans le LCR. Synthèse intrathécale d'IgM totales, et/ou d'IgG et/ou d'IgA. Anticorps spécifiques sériques. EM récent ou concomitant
	Sérologie en deux temps sur le sérum et le LCR prélevés le même jour :		
Arthrite de Lyme	Sérologie en deux temps sur le sérum :	Taux élevés d'anticorps spécifiques*	Analyse du liquide synovial. Détection de <i>B. burgdorferi</i> s.l. par PCR et/ou culture sur liquide synovial et/ou biopsie synoviale
	<ul style="list-style-type: none"> - dépistage (ELISA le plus souvent) - puis confirmation de la spécificité des anticorps (ssi ELISA positif ou douteux), par immunoempreinte (western blot le plus souvent) 		
Cardite de Lyme (rare)	Sérologie en deux temps sur le sérum :	Présence d'anticorps spécifiques*	Détection de <i>B. burgdorferi</i> s.l. par PCR et/ou culture sur biopsie endomyocardique. EM récent ou concomitant et/ou désordres neurologiques.
	<ul style="list-style-type: none"> - dépistage (ELISA le plus souvent) - puis confirmation de la spécificité des anticorps (ssi ELISA positif ou douteux), par immunoempreinte (western blot le plus souvent) 		
Manifestations oculaires (rare)	Sérologie en deux temps sur le sérum :	Présence d'anticorps spécifiques*	Manifestation de borréliose de Lyme récentes ou concomitantes. Détection de <i>B. burgdorferi</i> s.l. par PCR et/ou culture sur humeur aqueuse.
	<ul style="list-style-type: none"> - dépistage (ELISA le plus souvent) - puis confirmation de la spécificité des anticorps (ssi ELISA positif ou douteux), par immunoempreinte (western blot le plus souvent) 		

* Les taux d'anticorps spécifiques peuvent augmenter en réponse à la progression de l'infection, ou diminuer après abrogation du processus infectieux. Des prélèvements répétés à 3 mois peuvent être nécessaires afin d'objectiver une séroconversion ou séroévolution des taux d'IgG; ces prélèvements doivent être testés en parallèles pour éviter les variations inter-essais.

**dans les cas très précoces de neuroborreliose, la synthèse intrathécale d'anticorps spécifiques peut être absente.

Techniques sérologiques de dépistage disponibles

En 2014, l'ANSM, nous a fourni une liste qui rejoint celle que nous avons réalisée en 2012 par recoupements des techniques utilisées par les laboratoires réalisant des EEQ. La liste ci-dessous présente les tests commerciaux actuellement disponibles. Il éatit à noter la commercialisation d'un automate d'immunoblot de nouvelle génération en 2013. Il permet une automatisation de l'analyse à partir du tube primaire (identification des tubes, dilutions, incubations, lavages) ainsi que la transmission des résultats dans le système informatique du laboratoire. Les bandes révélées sont scannées et évaluées par un logiciel de traitement d'image. Ce logiciel peut être connecté en bidirectionnel à une interface du laboratoire

Liste des tests de dépistage sérologique et de confirmation de la spécificité des anticorps anti-*Borrelia burgdorferi sensu lato*

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	Servbio	Servbio	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		Servbio	G	SG (S)	Dot	
ViraStripe Borrelia kit IgM		Servbio	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	

Techniques recommandées par le CNR *Borrelia* en cas de suspicion de fièvres récurrentes à *Borrelia*

Cas clinique	Technique biologique d'aide au diagnostic recommandée	Preuve biologique essentielle au diagnostic	Preuve biologique ou clinique complémentaire éventuelle
Fièvres récurrentes	Détection de <i>Borrelia</i> de fièvres récurrentes par PCR sur sang total et, si positif, typage de l'espèce de <i>Borrelia</i> en cause.	Présence d'ADN spécifique dans le sang	Détection de <i>Borrelia</i> sur frottis sanguin coloré au May Grünwald Giemsa

FICHE DE RENSEIGNEMENTS BORRELIOSÉ DE LYME

Médecin prescripteur :	Laboratoire :
Hôpital et service :	Biologiste :

Nature du prélèvement :	Date : /_/_/___/___/
Examen demandé : Sérodiagnostic : <input type="checkbox"/>	PCR <input type="checkbox"/> Culture : <input type="checkbox"/>

PATIENT: Nom :	Prénom :	Sexe : <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> H
Date de naissance : /_/_/___/___/	Code postal du domicile : /_/_/___/	
Profession :		

FACTEURS DE RISQUE :	
- Activités de loisirs : <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Si oui, nature :	
- Contacts avec des animaux ? <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Si oui, lesquels ? :	
- Exposition aux tiques (fréquentation de milieux forestiers...) : <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui	
- Antécédents de piqûre de tique ? <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Si oui, <input type="checkbox"/> unique ou <input type="checkbox"/> multiple?	
- Antécédent d'érythème migrant : <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Si oui, constaté par un médecin <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
- Notion de piqûre de tique précédant l' épisode actuel : <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui	
Si oui, date de cette piqûre : /_/_/___/___/ Durée de l'attachement : <input type="checkbox"/> heures ou <input type="checkbox"/> jours	
Sur quelle partie du corps :	
Lieu de la piqûre (commune, forêt, vallée) : Département : /_/_/	

SYMPTOMATOLOGIE <u>AU MOMENT</u> DU DIAGNOSTIC : Date des premiers symptômes : /_/_/___/___/	
Date du diagnostic : /_/_/___/___/	
<input type="checkbox"/> Manifestations générales	
<input type="checkbox"/> Syndrome algique <input type="checkbox"/> Syndrome fébrile : °C <input type="checkbox"/> Asthénie	
<input type="checkbox"/> Manifestations cutanées	
<input type="checkbox"/> Erythème migrant (> 5 cm) <input type="checkbox"/> Lymphocytome <input type="checkbox"/> Acrodermatite <input type="checkbox"/> Autre (à préciser) :	
Localisation :	
<input type="checkbox"/> Manifestations neurologiques	
<input type="checkbox"/> Atteinte méningée : <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Si oui, <input type="checkbox"/> atteinte clinique <input type="checkbox"/> uniquement biologique	
<input type="checkbox"/> Atteinte périphérique :	
Si oui, <input type="checkbox"/> Paralyse faciale <input type="checkbox"/> Radiculite Localisation :	
<input type="checkbox"/> Atteinte d'une autre paire crânienne, si oui, laquelle :	
<input type="checkbox"/> Atteinte centrale : <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Si oui, laquelle :	
CYTOLOGIE DU LCR : <input type="checkbox"/> Non faite <input type="checkbox"/> Si oui, date : /_/_/___/___/ <input type="checkbox"/> Lymphocytose :/ mm ³	
<input type="checkbox"/> Manifestations articulaires Articulation(s) touchées(s) :	
<input type="checkbox"/> Arthralgies seules <input type="checkbox"/> Arthrite aiguë <input type="checkbox"/> Arthrite chronique	
<input type="checkbox"/> Mono-arthrite <input type="checkbox"/> Oligo-arthrite <input type="checkbox"/> Polyarthrite	
<input type="checkbox"/> Autres manifestations (à préciser) : <input type="checkbox"/> Cardiaques <input type="checkbox"/> Oculaires :	

Traitement antibiotique : <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui
Nature et posologie : du : /_/_/___/___/ au : /_/_/___/___/

**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 borreliose de Lyme est positive. Pour déterminer cet index, les volumes minimum nécessaires sont de **0,8 mL de LCR** et **1 mL de sérum prélevés le même jour**.
il est nécessaire de nous communiquer valeurs du dosage pondéral des IgG totales dans ce sérum et ce LCR. Si cela ne peut être réalisé, cocher la case ci-dessous.)
- DOSAGE PONDERAL DES IgG TOTALES**, dans le **sérum** et dans le **LCR** à faire réaliser par le laboratoire d'immunobiochimie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

Informations complémentaires liées au patient

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

ELISA SERUM (Réactif :, seuil :.....)

- IgM :
- IgG :

ELISA LCR (Réactif:, seuil :.....)

- IgM :
- IgG :

WB SERUM (Réactif :))

- IgG : kDa*
- IgM : kDa*

WB LCR (Réactif :))

- IgG : kDa*
- IgM : kDa*

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

DOSAGE PONDERAL DES IgG TOTALES :

- IgG totales du sérum : g/L
- IgG totales du LCR : mg/L