



Rapport annuel d'activité 2016

Centre National de référence des *Borrelia*

Professeur Benoît JAULHAC
Laboratoire de Bactériologie
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg
PTM - 1 rue Koeberlé
67000 STRASBOURG

Table des matières

1. Missions et organisation du CNR.....	7
2. Activités d'expertise.....	7
2.1. Évolutions des techniques au cours de l'année 2016	7
2.1.1. Techniques développées ou en développement :	7
2.1.2. Evaluation de trousse d'immuno-empreinte (western-blot) pour confirmation de la sérologie <i>Borrelia</i> (anciennement <i>B. burgdorferi</i> sensu lato).....	10
2.1.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires en 2016 :.....	14
2.2. Activités d'expertise de l'année 2016	14
2.2.1 Expertise en sérologie de <i>Borrelia</i> (anciennement <i>B. burgdorferi</i> sl) durant la mandature	14
2.2.2. Etude de la synthèse intrathécale spécifique anti <i>Borrelia</i>	23
2.2.3 Activité d'expertise en PCR du CNR <i>Borrelia</i>	25
2.2.4 Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique distribués, issus des collections du CNR	31
3. Activités de surveillance	31
3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	31
3.1.1. Surveillance nationale des cas de suspicion de borréliose de Lyme	31
3.1.2. Infections à <i>B. miyamotoi</i>	40
3.1.3. Surveillance nationale des manifestations cutanées de borréliose de Lyme.....	41
3.1.4. Surveillance des arthrites de Lyme PCR positives dans les échantillons articulaires, données 2010-2016	44
3.1.5. Surveillance des cas d'anaplasmose granulocytaire humaine.....	45
3.2. Surveillance du vecteur <i>Ixodes ricinus</i> par le CNR en Alsace	45
3.2.1. Objectifs de la campagne de collecte de 2016	45
3.2.2. Choix des sites et méthode de collecte.....	46
3.2.3. Analyse des données de densité des nymphes en 2016.....	48
3.2.4. Analyse des données d'infection des nymphes en Alsace et en Bretagne en 2016	53
3.3. Participation aux réseaux de surveillance.....	60
3.3.1. Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France – Réseau Sentinelles.....	60
3.3.2. Contribution à la surveillance internationale.....	60
3.4. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance - Réseau ALSA(CE)TIQUE (Participation à la surveillance de 3 maladies transmises par les tiques en Alsace)	61
4. Alerte.....	62
5. Activités d'information, de formation et de conseil.....	63
5.1. Enseignement, formation et stagiaires.....	63
5.1.1 Enseignement.....	63
5.1.2. Formation médicale continue aux professionnels de santé	64

5.1.3.	Accueil de stagiaires	64
5.2.	Guides élaborés (contenu, modes de diffusion).....	65
5.3.	Diffusion de l'information et site internet	66
5.3.1.	Rétro-information aux partenaires	66
5.3.2.	Diffusion grand public de l'information.....	66
5.4.	Activités de conseil aux professionnels.....	67
5.4.1.	E-mails / fax / lettres.....	67
5.4.2.	Participation à l'organisation par l'ANSM d'un Contrôle de Qualité Externe (EEQ)..	70
5.4.3.	Organisation d'un Contrôle de Qualité Externe (EEQ) proposé aux LABM par le CNR	71
5.5.	Activités d'expertises auprès des agences de sécurité sanitaire, HAS, ECDC.....	72
6.	Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR.....	73
6.1.	Activités de recherche en cours.....	73
6.1.1.	Analyse de la persistance de <i>Borrelia</i> et de l'organotropisme de <i>Borrelia</i> pour la peau par une approche protéomique	73
6.1.2.	Mise au point d'une technique de diagnostic précoce de <i>Borrelia</i> dans des biopsies cutanées d'érythème migrant par spectrométrie de masse	74
6.1.3.	Mise au point d'une technique d'identification des tiques et de détection de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato et autres pathogènes dans les tiques par techniques de protéomique (spectrométrie de masse).....	74
6.1.4.	Aspects épidémiologiques de la borreliose de Lyme en zone d'endémie.....	75
6.2.	Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR	76
6.2.1.	Publications nationales.....	76
6.2.2.	Publications internationales.....	77
6.2.3.	Communications nationales	78
6.2.4.	Communications internationales	78
6.2.5.	Conférences sur invitation, congrès, séminaires	78
6.2.6.	Contribution à des chapitres ou des ouvrages	78
7.	Coopération avec les laboratoires de santé & animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux	79
	Annexe 1 : Missions & organisation du CNR.....	80
1.1.	Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR Borrelia.....	80
1.2.	Description de l'équipe du CNR Borrelia	80
1.3.	Description détaillée des locaux et de l'équipement du CNR Borrelia.....	81
1.4.	Description de la démarche qualité du laboratoire	83
	Annexe 2 : Techniques existantes du CNR.....	88
2.1.	Liste des techniques disponibles pour le diagnostic et l'identification.....	88
2.2.	Liste des techniques disponibles pour le typage	89
2.3.	Collections de souches, immun-sérums disponibles	90

DONNEES DU CNR BORRELIA

Résumé analytique

Missions du CNR *Borrelia*

Le CNR a pour mission de **développer les moyens** afin d'assurer et de **faire progresser** le **diagnostic** et la **surveillance épidémiologique clinique et vectorielle** de pathogènes des genres *Borrelia* et *Borrelia*.

Enjeux de santé publique

Pathogènes

Le genre *Borrelia* comprend les espèces de ***Borrelia* agents de fièvres récurrentes** transmis par tiques dites « molles » du genre *Ornithodoros* présentes en Afrique au Proche-Orient, en Asie et en Amérique du Nord. En Europe, les cas d'importation sont anecdotiques. Un intérêt particulier s'est porté récemment sur ***Borrelia miyamotoi***, transmise par piqûre de tiques « dures » du genre *Ixodes*, présentes en Europe.

Le **nouveau genre *Borrelia*** comprend les agents de la borreliose de Lyme (ancien complexe d'espèces *B. burgdorferi* sensu lato). Les agents de la borreliose de Lyme sont transmis à l'Homme par **piqûre de tiques du genre *Ixodes*** en Europe, en Amérique du Nord, et en Asie.

Epidémiologie

La **borreliose de Lyme est la plus fréquente** et la plus médiatique des zoonoses de l'**Hémisphère Nord**. L'incidence en France est estimée actuellement à 51 cas/100 000 habitants, soit environ 33 000 cas par an (réseau Sentinelles 2015). Cette incidence situe la France dans la moyenne haute des incidences européennes (données ECDC).

Afin d'évaluer son impact sur l'incidence actuelle de l'infection, le CNR, en association avec les autres structures impliquées en épidémiologie, participe à plusieurs études/enquêtes : étude de l'incidence de la borreliose de Lyme en poursuivant sa collaboration avec le «réseau Sentinelles» (Inserm-UPMC), et Santé Publique France, étude avec la CIRE Nord-Est dans le cadre de la mise en place de l'étude épidémiologique humaine ALSACETIQUE. Les données de l'étude ALSACETIQUE sont en cours d'analyse.

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 est l'indicateur qui reflète le mieux le risque pour l'Homme. Nous avons étudié la densité en nymphes sur de nouveaux sites afin de commencer à comparer la situation entre l'Alsace et la Bretagne, qui ont des climats assez différents, lors des prochaines années.

Sur une période de 5 ans, nous avons observé des variations interannées du taux d'infection des nymphes par *Borrelia* selon les années, sans tendance globale à l'augmentation. Nous avons aussi constaté la présence de *Borrelia miyamotoi*, bactérie nouvellement décrite comme parfois pathogène pour l'Homme et présente tant dans l'Est que dans l'Ouest de la France, le CNR n'a pas détecté de cas humain à ce jour dans notre pays. Nous avons enfin mis en évidence la présence d'*Anaplasma phagocytophilum* chez *Ixodes ricinus* dans l'Ouest de la France, sans description de cas humain à ce jour, nécessitant une surveillance clinique accrue de cette espèce au rôle pathogène avéré.

Surveillance clinique et biologique

Après une piqûre de tique infectée, la maladie évolue en deux phases, précoce et disséminée. La phase précoce est localisée au point de piqûre et correspond à l'érythème migrant (EM). L'EM, la plus fréquente des manifestations cliniques, est pathognomonique de la borreliose de Lyme. Sans traitement, l'infection peut régresser ou dans 10 % à 20% des cas, disséminer par voie sanguine vers ses organes cibles profonds (système nerveux central et périphérique, articulations, notamment) et la peau. A la différence de ce qui est observé dans

les fièvres récurrentes, la bactériémie dans la borréliose de Lyme est modérée et fugace. La recherche de la bactérie dans le sang quand le patient est apyrétique ou souffrant de signes chroniques a donc peu d'intérêt dans la borréliose de Lyme.

Compte tenu de la faible spécificité des manifestations cliniques de la maladie en dehors de l'érythème migrant, la positivité de tests biologiques est requise dans les recommandations diagnostiques de tous les pays européens pour étayer ou confirmer le diagnostic de borréliose de Lyme.

Le CNR assure une surveillance basée sur l'analyse de fiches de renseignements cliniques et de prélèvements adressés au CNR pour suspicion de borréliose de Lyme. Au cours des 5 années précédentes, le nombre de prélèvements adressés au CNR est en augmentation régulière. Leur analyse ne permet cependant pas d'objectiver une augmentation significative des cas certains d'infection à *Borrelia*. Le type et la fréquence des manifestations cliniques de la maladie sont stables ainsi que les espèces impliquées dans ces infections avec une nette prédominance de *B. afzelii*, quelle que soit la nature du tissu infecté.

Diagnostic, recherche et formation des professionnels de santé

La borréliose de Lyme pose plusieurs problèmes spécifiques, à savoir :

- Les manifestations cliniques secondaires et tardives de cette affection protéiforme constituent des challenges en médecine. Le diagnostic ne pouvant, en dehors du stade d'EM, être uniquement clinique. Le CNR s'investit, à cet égard, avec d'autres acteurs, dans des actions de formation des professionnels de santé
- Le diagnostic biologique de cette maladie est difficile. En effet, les *Borrelia* sont très rarement détectées dans des échantillons humains et sont difficiles à cultiver. Par ailleurs, bien qu'utile sur les prélèvements biopsiques cutanés ou synoviaux, la recherche par PCR est par contre très peu sensible sur LCR. Les méthodes de diagnostic direct sont donc peu utiles en routine dans les neuroborrélioses. Le CNR s'investit dans le développement de nouveaux outils diagnostiques basés sur la protéomique.
- Le diagnostic indirect sérologique de ce pathogène présente de nombreuses limitations. Ainsi la sérologie est négative dans un cas sur deux à la phase initiale cutanée, phase qui est la forme clinique plus fréquente. Aux stades secondaires et tardifs, en l'absence à ce jour de marqueur biologique d'évolutivité, une sérologie de Lyme positive peut aussi, comme beaucoup de sérologies, être d'interprétation difficile par suite : de réactions croisées, d'une séroprévalence élevée dans la population générale en zone d'endémie ou par la variabilité des résultats entre les trousseaux sérologiques. Le CNR travaille sur l'évaluation des coffrets de sérologie par Western Blot présents sur le marché français.
- La Borréliose de Lyme se présente donc parfois comme une nébuleuse clinique assortie de limitations biologiques dans lesquelles le rôle de conseil du biologiste pour un choix optimal des tests réalisés et une lecture critique des résultats de laboratoire est essentiel. Le risque de contracter pendant une activité de loisir une infection à *Borrelia* passant inaperçue pendant plusieurs mois voire des années avant les manifestations cliniques et la possibilité de formes chroniques répondant mal au traitement amplifie l'anxiété chez certains patients voire chez certains professionnels de santé. Le CNR s'investit quotidiennement pour aider les professionnels de santé dans leur exercice

1. Missions et organisation du CNR

La description détaillée est présentée en **annexe 1**.

En préambule, il peut être important de rappeler que suite à un remaniement taxonomique récent, qui fait encore débat, on distingue actuellement deux genres bactériens : les genres *Borrelia* et *Borrelia*.

Le genre *Borrelia* comprend dorénavant exclusivement les espèces de *Borrelia* agents de fièvres récurrentes (*Borrelia recurrentis*, cosmopolite) ou de tiques dites « molles » du genre *Ornithodoros* (*B. crocidurae*, *B. hermsii*, *B. hispanica*, *B. duttonii*...), présentes en Afrique du Nord, en Afrique centrale, au Proche-Orient, en Asie et en Amérique du Nord. Elles ne sont classiquement pas présentes en Europe et les cas européens sont des cas d'importation fort rares actuellement. Un intérêt particulier s'est porté récemment sur l'espèce *Borrelia miyamotoi*, transmise, comme les espèces de *Borrelia*, par piqûre de tiques « dures » du genre *Ixodes* présentes en Europe.

Le nouveau genre *Borrelia* comprend les espèces responsables de la borréliose de Lyme (ancien complexe d'espèces ou groupe *B. burgdorferi* sensu lato). Au sein de ce genre constitué actuellement de 21 espèces. *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*, *B. burgdorferi*, *B. bavariensis* sont les principales espèces actuellement isolées chez l'Homme.

2. Activités d'expertise

La description des techniques disponibles au CNR est présentée en **annexe 2**.

2.1. Évolutions des techniques au cours de l'année 2016

2.1.1. Techniques développées ou en développement :

2.1.1.1. Mise au point d'une méthode PCR pour la détection et l'identification de PCR *B. mayonii*

La borréliose de Lyme est causée par plusieurs espèces bactériennes du genre *Borrelia* (ancien complexe d'espèces ou groupe *B. burgdorferi* sensu lato). Les manifestations cliniques de la borréliose de Lyme incluent des manifestations cutanées, articulaires et neurologiques. La fièvre associée à une borréliose de Lyme ne dépasse en général pas les 38 °C.

La découverte d'une nouvelle espèce de *Borrelia*, *B. mayonii* en février 2016 (*Pritt BS, et al. Identification of a novel pathogenic Borrelia species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study. Lancet Infect Dis, 2016*) remet en cause ce paradigme. En effet, les 6 patients décrits présentent pour 3 d'entre eux une fièvre > 38 °C (avec des pics à 39 °-40 °C). Cette fièvre est probablement causée par une bactériémie importante (si importante que l'examen direct d'un prélèvement sanguin montrait la présence des spirochètes, comme dans le cas des *Borrelia* des fièvres récurrentes).

La détection des différentes espèces de *Borrelia* (*B. burgdorferi* sl) est effectuée au CNR par PCR en temps réel utilisant une sonde Taqman® ciblant une région du gène *flaB* (codant la flagelline) conservée au sein des espèces de *Borrelia*.

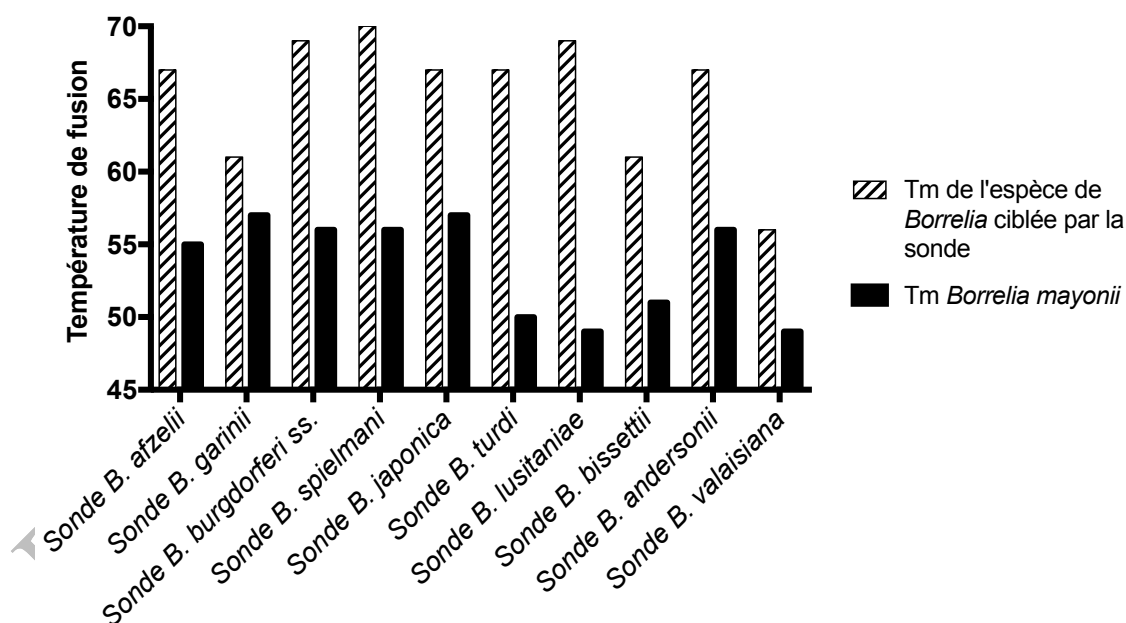
Nous avons d'abord vérifié que cette nouvelle espèce, *B. mayonii*, était bien détectée par notre PCR *Borrelia* utilisée depuis de nombreuses années, puis que cette nouvelle espèce n'avait pas été à l'origine d'identification erronées dans les études précédentes du CNR.

Nous avons ensuite « designé » une sonde spécifique pour *B. mayonii*. Pour cela, la séquence partielle du gène de la flagelline de *B. mayonii* a été analysée *in silico* et les amorces actuellement utilisées au laboratoire alignées. Le gène partiel *flaB* de *B. mayonii* (475 pb) a été synthétisé par la société GenCust Europe (Dudelange, Luxembourg). À défaut de posséder la souche (non disponible à l'ATCC début 2016, cet ADN synthétique nous a permis de tester la sensibilité de notre PCR pan-*Borrelia* et de connaître la température de fusion de l'amplicon vis-à-vis des différentes sondes de FRET décrites plus haut. La souche de référence de *B. mayonii* a été commandée dès que disponible, à l'automne 2016.

L'alignement du gène partiel de la flagelline avec les amorces *Borrelia* du CNR a montré qu'il n'y avait pas de mésappariement entre les amorces utilisées et la séquence du gène publié et que notre PCR pan-*Borrelia* pouvait détecter *B. mayonii*, avec la même sensibilité que les autres espèces de *Borrelia*.

Les tests réalisés grâce au gène synthétique montraient que le fragment de gène ciblé par les amorces était correctement amplifié. De plus, la température de fusion du duplex « produit d'amplification du gène de la flagelline de *B. mayonii*/sonde de typage » se distinguait des autres espèces de *Borrelia* quelle que soit la sonde utilisée.

Comportement des sondes de typage d'espèce du CNR vis-à-vis de l'ADN synthétique de *Borrelia mayonii* :



La prévalence des espèces de *Borrelia* sp. parmi les tiques a été déterminée par le CNR *Borrelia* sur 3122 nymphes d'*Ixodes ricinus* au cours des 3 années de surveillance (2013, 2014, 2015). Une étude rétrospective sur le génotypage espèces de *Borrelia* parmi les nymphes infectées n'a pas montré d'atypicité, il n'y a donc eu aucune tique qui aurait pu être infectée par *B. mayonii* et qui aurait été mal identifiée.

Nous avons ensuite recherché *B. mayonii* dans notre DNAtèque de sang de patients conservés à -80 °C dans le cadre de syndrome fébrile après piqûre de tique. Cette DNAtèque est constituée des échantillons adressés au laboratoire pour la recherche diagnostique d'anaplasmose par PCR depuis le 1^{er} janvier 2010.

Nous avons testés des ADN collectés du 1 janvier 2010 jusqu'au 28 juillet 2016. Sur les 575 extraits d'ADN testés, aucun ne s'est révélé positif.

B. mayonii ne semble donc pas être présente en France, du moins pour le moment. Ceci est logique, cette espèce ayant actuellement une répartition géographique limitée à deux états des USA (Minnesota et Wisconsin). Le CNR *Borrelia* dispose néanmoins maintenant d'un outil de typage permettant de d'identifier rapidement une infection liée à cette espèce chez un patient qui reviendrait de voyage dans un de ces états des USA, par exemple.

2.1.1.2. Techniques en développement :

* *Typage des souches par MLST*

Nous avons débuté fin 2016 un projet de typage moléculaire par Multi Locus Sequence Typing (MLST) des souches cliniques de *B. afzelii* isolées au CNR *Borrelia*. La technique MLST a été choisie pour faire ce typage car hormis le NGS, c'est la méthode la plus performante, et surtout parce qu'une banque de plus de 600 profils MLST, notamment européens, est disponible de façon ouverte sur internet (site <http://borrelia.mlst.net>). Ce projet permettra de mieux définir l'épidémiologie des infections à *Borrelia* au niveau national et de situer par rapport à l'épidémiologie moléculaire internationale ainsi que d'enrichir cette base de données

Le but est de disposer de cette méthode au CNR afin de pouvoir :

- (i) typer les différentes souches de *Borrelia* de la collection du CNR, notamment les différentes souches de *B. afzelii* qui sont les plus fréquentes en France et en Europe
- (ii) Etudier la circulation géographique de souches de *Borrelia* et pouvoir comparer nos profils avec ceux rapportés dans d'autres pays d'Europe
- (iii) Si possible de mettre ensuite au point cet outil (par PCR nichée si nécessaire) pour pouvoir typer directement les ADN de prélèvements cliniques et de prélèvements

de tiques sans culture préalable ou de prélèvements positifs en PCR mais négatifs en culture.

- (iv) Etudier la possibilité d'association entre certains profils MLST et les formes disséminées de la borréliose de Lyme

Pour ce projet, huit gènes de ménage ont été choisis sur le chromosome de *Borrelia* spp. (*nifS*, *clpA*, *rplB*, *pyrG*, *recG*, *clpX*, *pepX*, *uvrA*), sur la base des différents travaux de MLST de G. Margos du CNR allemand des *Borrelia* (qui a accepté de nous accompagner sur ce projet) et de Coipan (Pays-Bas 2016).

La mise au point « in silico » des manipulations expérimentales a été réalisée, les primers commandés. Après mise au point des conditions opératoires, la technique sera dans un 1^{er} temps appliquée aux 57 souches de *B. afzelii* du CNR, puis aux autres principales espèces pathogènes (*B. burgdorferi* et *B. garinii*).

*** Mise au point d'une méthode d'identification des tiques du genre Ixodes par spectrométrie de masse MALDI-TOF**

La technologie MALDI-TOF a récemment fait ses preuves pour l'identification des tiques de genres différents en utilisant les 4 pattes de tiques comme matrice. L'objectif de ce projet est de mettre au point un outil et une base de données sur Biotyper (Bruker) pour l'identification des espèces de tiques du genre *Ixodes* à partir des pattes et du demi-idiosome, basé sur l'analyse d'empreintes protéiques obtenues par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Des tiques collectées en France sur le terrain ou sur animaux, appartenant à 10 espèces distinctes, 9 du genre *Ixodes* (*I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. scapularis*, *I. acuminatus*, *I. ventralis*, *I. frontalis*, *I. hexagonus*, *I. vespertilionis* et *I. uriae*) et une du genre *Dermacentor* (*D. reticulatus*) ont été testées. Pour chaque spécimen, les quatre pattes et le demi-idiosome, coupé longitudinalement, ont été disséqués avant d'être testés individuellement par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker). Les résultats de l'identification de l'espèce ont été comparés à ceux obtenus par PCR réalisée sur l'ADN extrait du demi-idiosome restant de chaque tique (séquençage du gène codant la cytochrome oxydase I, COI). 100% des spécimens testés en aveugle vis à vis de la base de données ont été correctement identifiés, quelle que soit la matrice utilisée.

Ces travaux soulignent la robustesse de la spectrométrie de masse MALDI-TOF, pour l'identification des tiques appartenant à des espèces proches. Cette base de données pourra servir à la surveillance entomologique précise sur le terrain, mais également au diagnostic d'une suspicion de maladie vectorielle grâce à l'identification rapide de la tique collectée sur le patient.

2.1.2. Evaluation de troupes d'immuno-empreinte (western-blot) pour confirmation de la sérologie *Borrelia* (anciennement *B. burgdorferi* sensu lato)

Dans le rapport d'activité de 2015, nous avons exposé les matériels et méthodes, ainsi que les résultats de cette évaluation comparative. Son objectif était de comparer les troupes de réactifs pour cette sérologie de confirmation présentes sur le marché français.

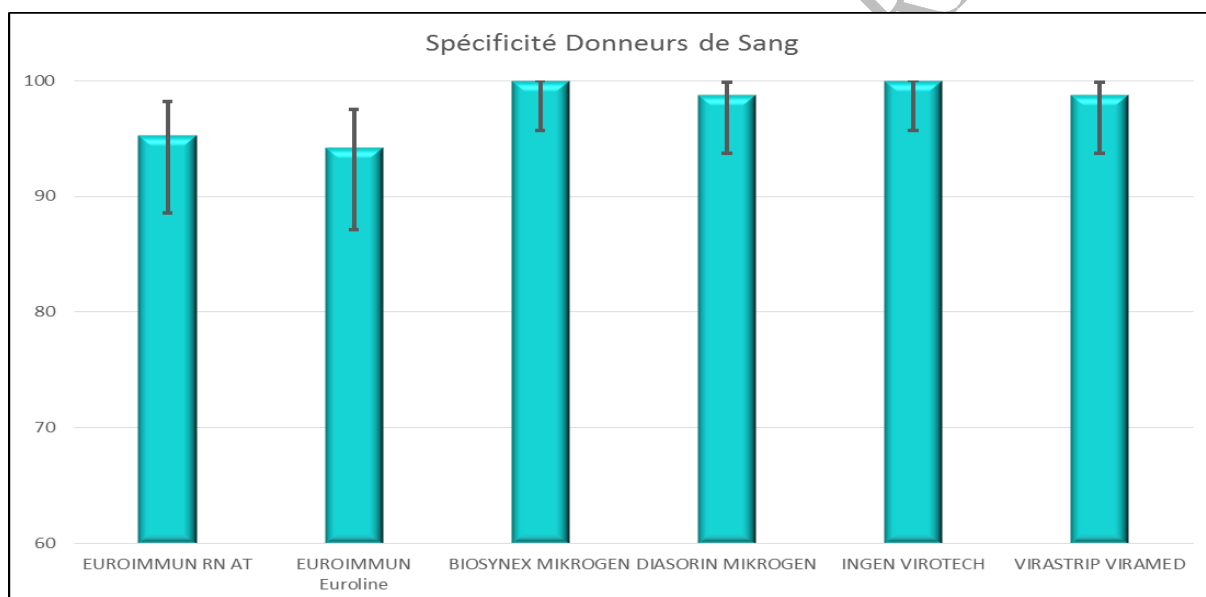
Après restitution des résultats, un fournisseur de deux troupes, bien implanté sur le territoire français, a émis des réserves quant à la méthodologie de ce travail, méthodologie initialement

acceptée par tous. Lors de la remise de leurs résultats, les représentants nationaux de ce laboratoire (PDG et directeur commercial) n'avaient pas émis de réserves particulières. Il s'est avéré en fait que l'algorithme inclus dans le logiciel d'interprétation fourni par le distributeur au CNR n'était pas identique à celui utilisé par la grande majorité des utilisateurs (sans en avoir prévenu le CNR au départ), mais une variante développée par la société à la demande d'un laboratoire privé de biologie médicale, le réactif en lui-même étant strictement identique.

En ce qui concerne la méthodologie de l'étude : ayant été acceptée au début de l'étude par l'ensemble, elle ne saurait être remise en question.

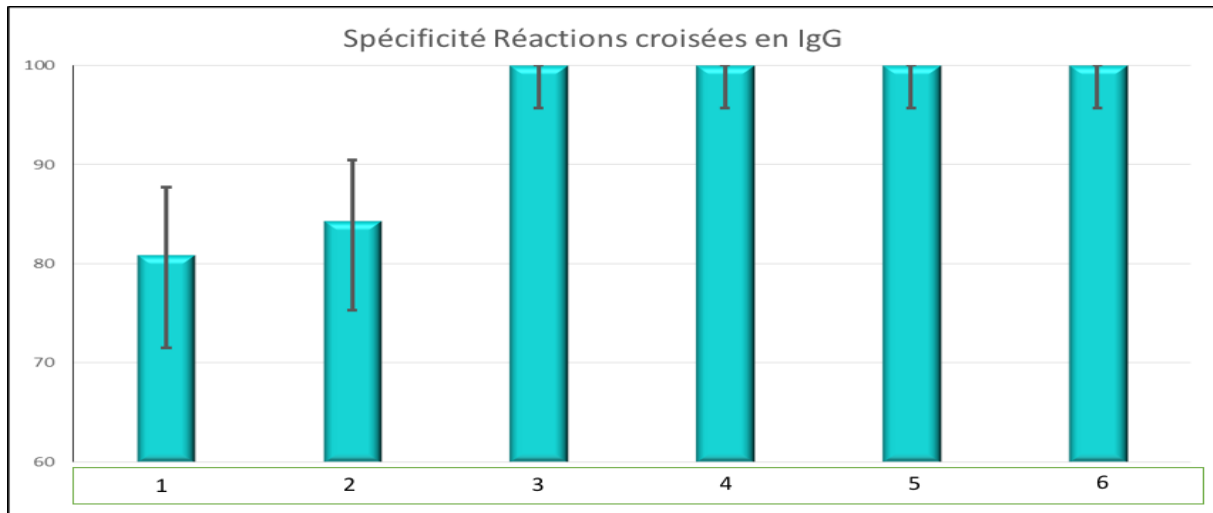
Les résultats ont donc été recalculés fin 2016 en fonction de l'algorithme usuel de cette société, algorithme employé par tous les autres utilisateurs de cette trousse. L'application de ce nouvel algorithme améliore la sensibilité du test mais diminue la spécificité de la trousse, notamment vis-à-vis des sérums de réactions croisées qui demeure médiocre, entre 80% et 90% (cf ci-dessous).

Spécificité IgG sur panel de donneurs de sang



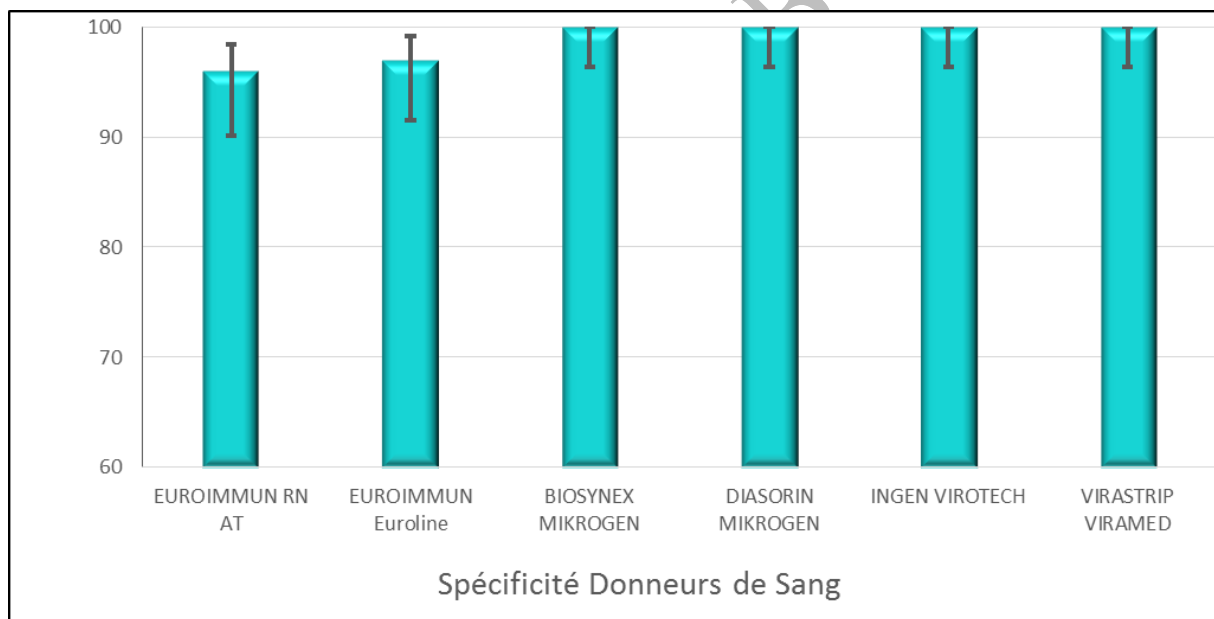
Les trousse IgG testées sur les donneurs de sang, montrent une spécificité variant de 94,2 % à 100 %, satisfaisant pratiquement pour tous les coffrets les recommandations EUCALB. Les variations observées entre les trousse testées sur cette population sont non statistiquement significatives.

Spécificité IgG sur panel de réactions croisées



Des différences entre coffrets IgG apparaissent sur les panels de sérums de réactions croisées. Les valeurs varient de 80,9 % à 100 %, avec deux coffrets statistiquement significativement moins spécifiques que les autres (N°1 et 2).

Spécificité IgM sur panel de donneurs de sang



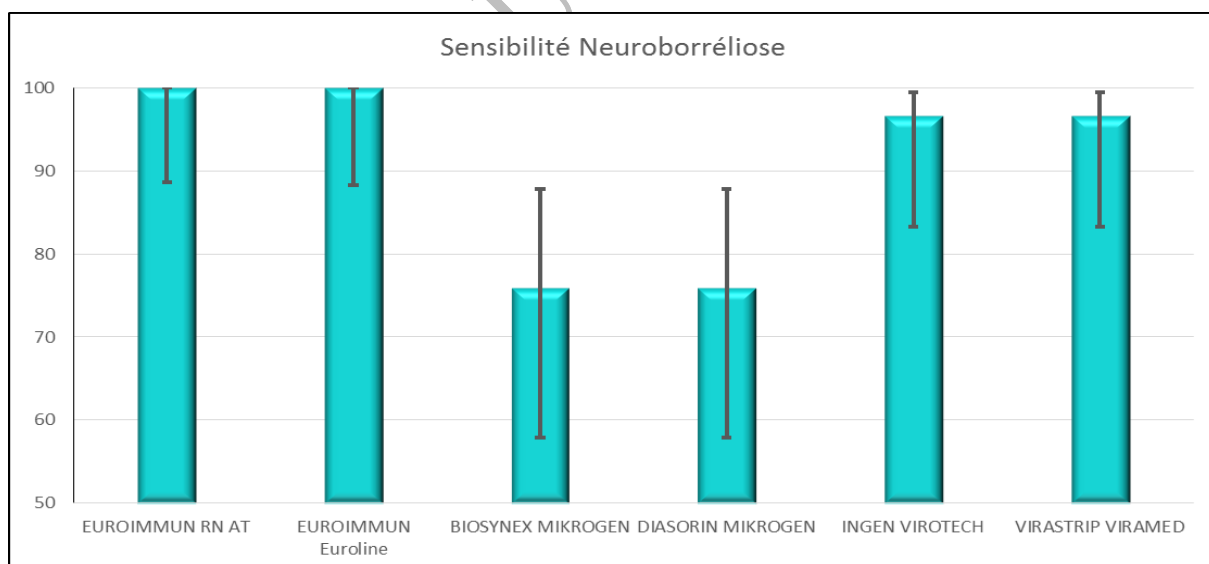
Les trousse IgM testées sur les donneurs de sang, montrent une spécificité variant de 93,9 % à 100 %, satisfaisant pratiquement pour tous les coffrets les recommandations EUCALB.

Spécificité IgM sur panel de réactions croisées



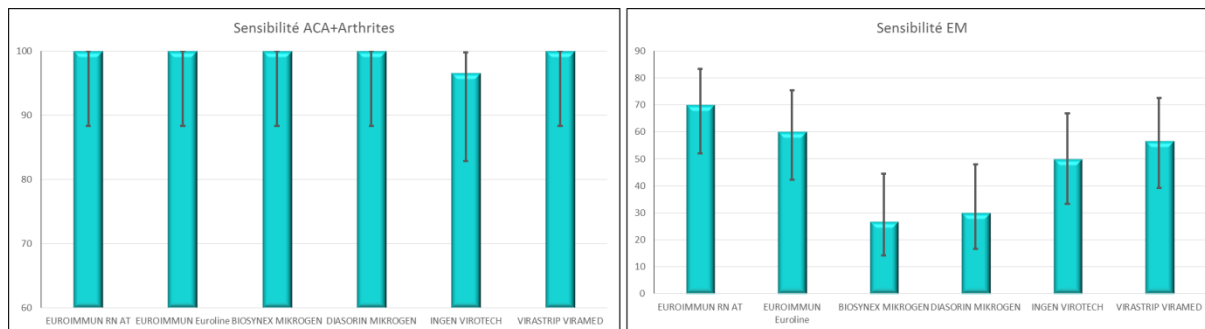
Des différences entre coffrets IgM ont été observées sur le panel de sérums de réactions croisées. Les valeurs varient de 88,5 % à 100 % avec deux coffrets (N°1 et 6) statistiquement significativement moins spécifiques que le coffret 4.

Sensibilité IgG sur panel de neuroborréliose



Des différences entre coffrets IgG apparaissent sur les panels de sérums de neuroborrélioses. Les valeurs varient de 65,5% à 100 %, avec deux coffrets statistiquement significativement moins sensibles que d'autres (N°1 et 2).

Sensibilité IgG sur panel de sérums d'ACA et arthrites et de sérums d'EM



Les valeurs varient de 26,7% à 70 % pour les EM et de 93,3% à 100 % pour les arthrites de Lyme et les ACA.

Ces différences entre les coffrets sont non significatives pour les arthrites de Lyme et les ACA. La sensibilité demeure insuffisante pour utiliser ces tests pour le diagnostic des EM, qui reste clinique.

2.1.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires en 2016 :

Néant

2.2. Activités d'expertise de l'année 2016

2.2.1 Expertise en sérologie de *Borrelia* (anciennement *B. burgdorferi* sI) durant la mandature

En 2016, 9 063 échantillons biologiques ont été réceptionnés par le CNR *Borrelia* accompagnés de demandes de confirmation diagnostique de borréliose de Lyme, principalement pour sérologie, parfois pour PCR (384 dont 58 positifs) ± culture (98 dont 19 positifs).

Sur l'ensemble de ces échantillons, le nombre d'analyses sérologiques réalisées s'élève à 10 658. (ELISA : 7 432 (sérum : 5 375 + LCR : 2 057) + western-blot 2 856 + WBG Sér : 1883 + WBM Sér : 463 + WBG LCR : 510 + synthèse intra-thécale : 370)

Environ 13% de ces analyses ont été réalisées à titre gratuit car elles étaient accompagnées d'une fiche de renseignements cliniques et épidémiologiques, soit 1 938 (Ig Sér : 652 + Ig LCR : 381 + SIT : 110 + WBG Sér : 550 + WBM Sér : 81 + WBG LCR : 164) analyses réalisées sur 1415 prélèvements.

Le recueil de ces fiches de renseignements entre dans le cadre de nos activités de surveillance des cas humains de borréliose de Lyme et est analysé plus loin.

En l'absence de cette fiche ou de compte rendu du cas clinique équivalent, l'analyse a été réalisée et facturée par le CHU de Strasbourg.

Cette activité a été globalement stable sur les 5 années de la mandature du CNR. Le nombre d'échantillons accompagnés d'une fiche de renseignements épidémiocliniques a légèrement progressé d'année en année (cf. Annexes).

2.2.1.1. Sérologies de 1^{ère} intention par ELISA

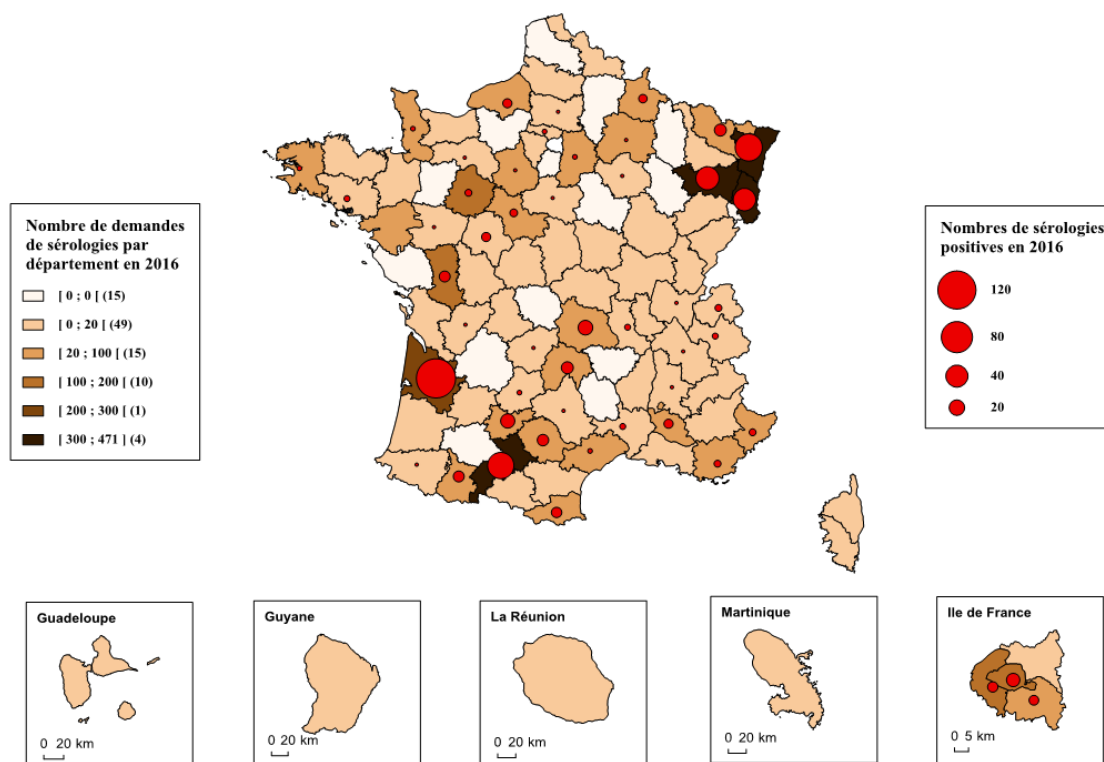
2.2.1.1.1. En 2016

Le CNR a réalisé 7 432 sérologies par ELISA sur 5 375 sérums et 2 057 sur LCR. Cette activité est globalement stable depuis le début du mandat du CNR. Ces échantillons provenaient de 82 départements répartis sur le territoire national dont 4 départements d'outre-mer (Guyane, La Réunion, Martinique, Guadeloupe).

Origine géographique (hors CHU de Strasbourg) des résultats positifs pour les sérologies de dépistage adressées au CNR des *Borrelia* en 2016

En France, les demandes représentaient 3 909 analyses, hors CHU de Strasbourg. La carte ci-dessous objective le nombre d'analyses adressées au CNR par département demandeur et le nombre d'analyses positives en sérologie de 1^{ère} intention par ELISA :

Répartition des sérologies demandées en 2016 (hors CHU Strasbourg)



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

Ces 3 909 demandes nationales (hors CHU de Strasbourg) concernaient :

- 1 810 sérums dont 548 (30,3 %) étaient positifs et 105 (5,8 %) étaient douteux
- 948 LCR dont 293 (30,9 %) étaient positifs

Au total, 946 prélèvements étaient positifs (21,8 %) ou douteux (2,7 %) en ELISA. La spécificité de ces résultats a été confirmée par immuno-empreinte, conformément aux recommandations nationales et européennes.

Demandes de sérologie de 1^{ère} intention par ELISA provenant d'Alsace en 2016

En Alsace, zone d'endémie de la borréliose de Lyme, les demandes en 2016 représentaient 5625 analyses, soit environ 2 fois plus que les demandes nationales.

Parmi celles-ci, 504 (9,0 %) provenaient de CH ou de laboratoires privés et 5 121 (91%) du CHU de Strasbourg.

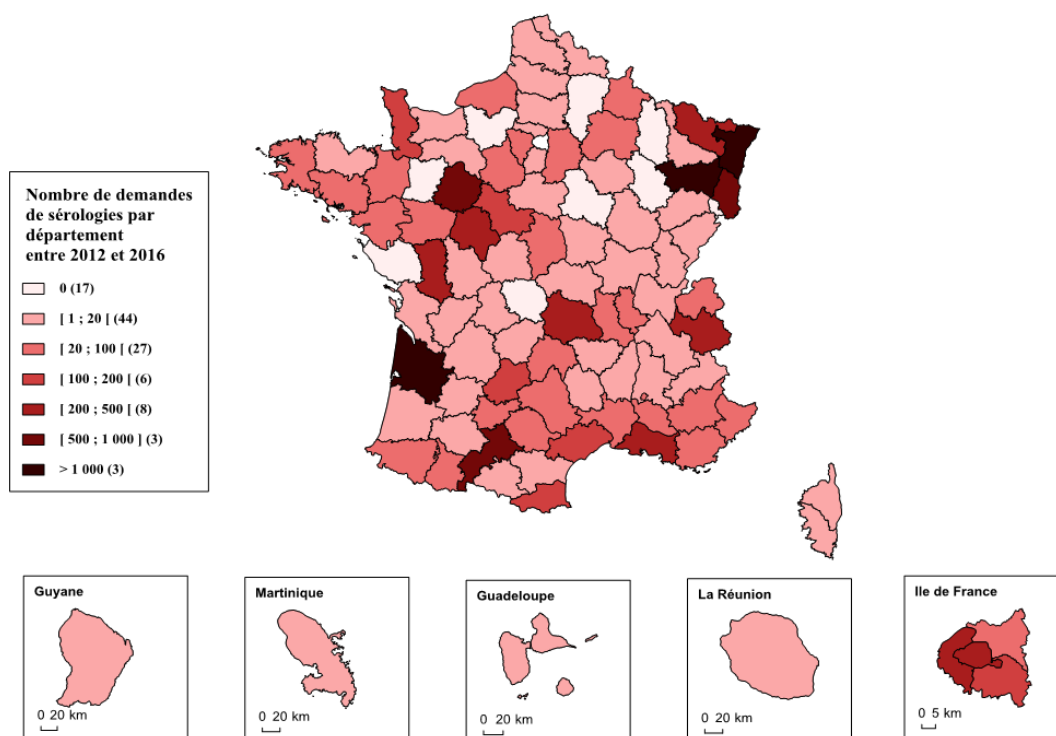
Les 504 demandes d'Alsace hors CHU étaient réparties de la façon suivante :

- 271 sérums dont 82 (30,3 %) positifs ou douteux
- 192 LCR dont 30 (20,8 %) positifs ou douteux

Sur ces 504 demandes hors CHU, 122 (24,2 %) étaient positives ou douteux en ELISA. La spécificité de ces résultats a été confirmée par immuno-empreinte.

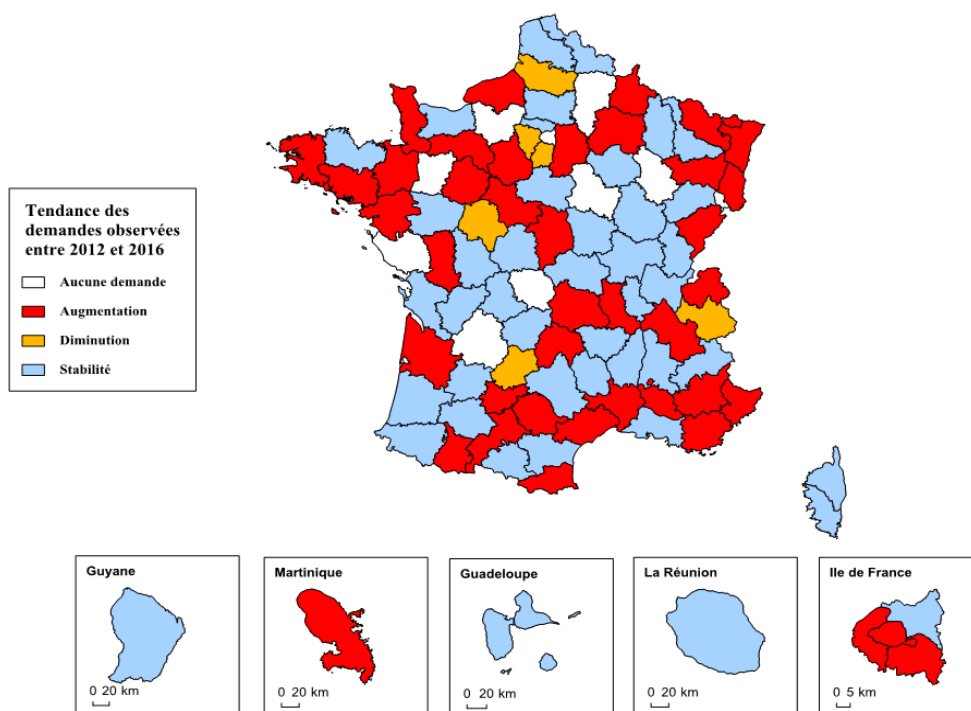
2.2.1.1.2. Bilan des 5 années de mandature du CNR *Borrelia*

Répartition des sérologies demandées entre 2012 et 2016 (hors CHU Strasbourg)



Il existe une bonne couverture nationale du CNR avec 13 départements adressant plus de 100 sérums/an pour le dépistage sérologique en ELISA, répartis dans les différentes grandes régions de France. Cette répartition permettrait de détecter une éventuelle augmentation inhabituelle du nombre de positifs dans une partie du territoire.

Evolution des demandes de sérologies entre 2012 et 2016 (hors CHU Strasbourg)

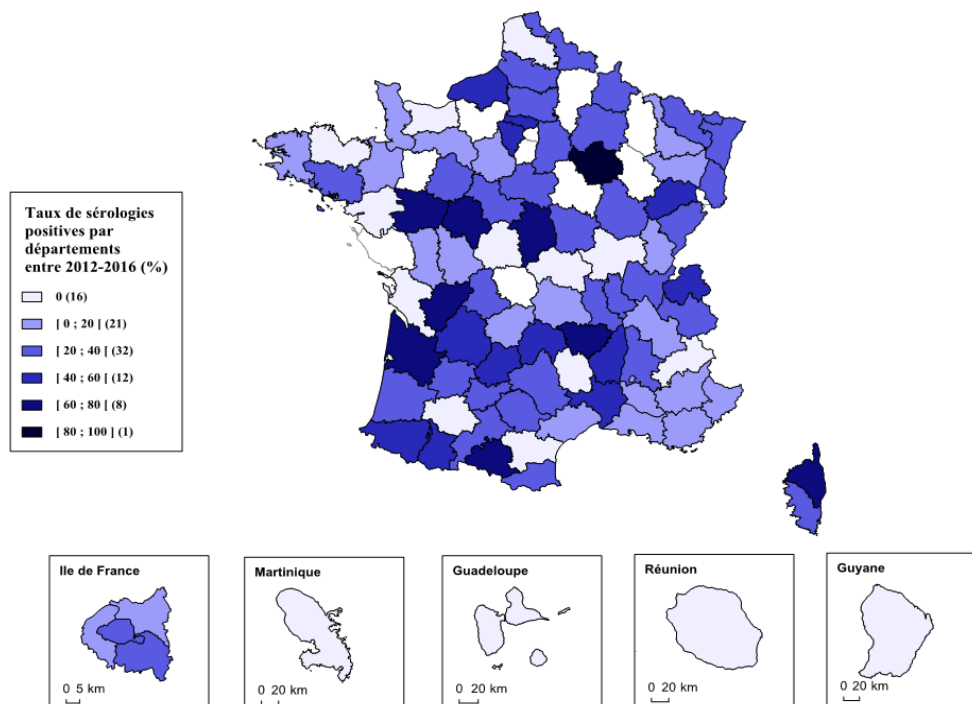


Carte réalisée avec Cartes & Données - © Artique

La répartition des demandes est globalement similaire sur les 5 années. On constate néanmoins une augmentation du nombre de demandes adressés au CNR pour 41 départements français et une diminution dans 6 départements.

Pour ces analyses ELISA réalisées, le pourcentage de positifs varie selon les départements français :

Taux de positivité des sérologies demandées entre 2012-2016 (hors CHU Strasbourg)



Carte réalisée avec Cartes & Données - © Artique

Cette carte de répartition du taux de positivité ne se superpose pas à la prévalence de *Borrelia* dans les tiques ni à celle de l'incidence nationale de la borréliose de Lyme (données du réseau Sentinelles).

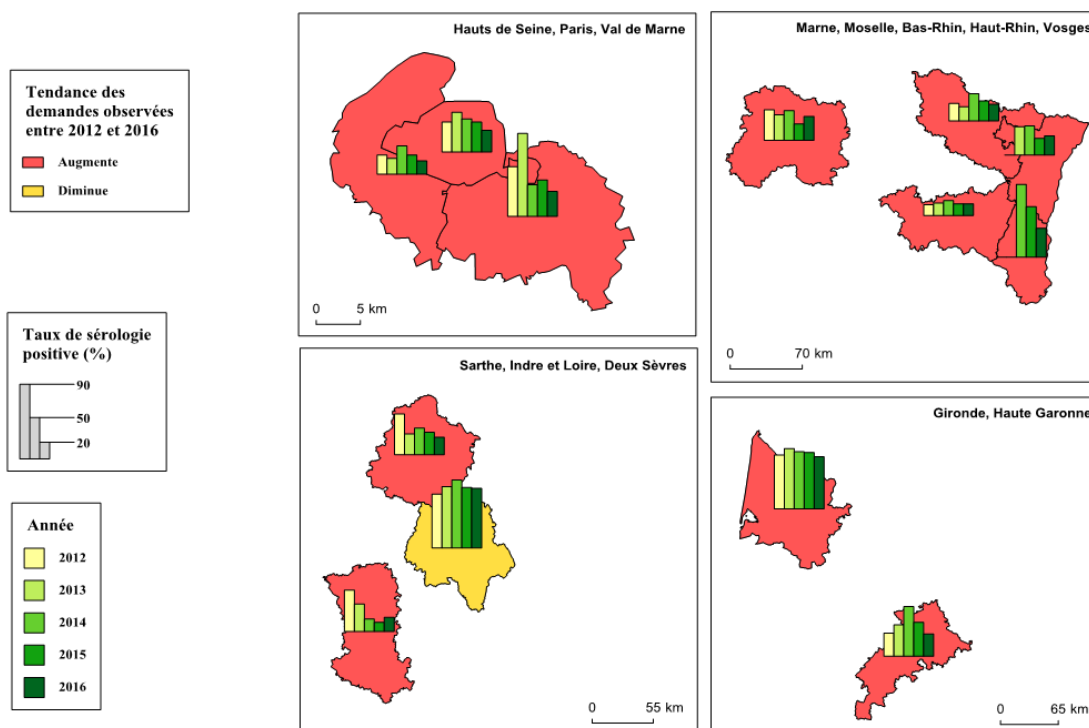
Ceci montre que les laboratoires publics ou privés ayant recours au CNR le font dans plusieurs contextes :

- sous-traitance régulière de leurs analyses *Borrelia* par ELISA, dans le cas par exemple de laboratoires à faible activité sur ce paramètre
- confirmation des sérologies positives réalisées chez eux (départements à taux de positivité de 40 à 100%)
- confirmation de la négativité des sérologies réalisées chez eux. Cette demande est en augmentation, liée à la médiatisation de la borréliose de Lyme.

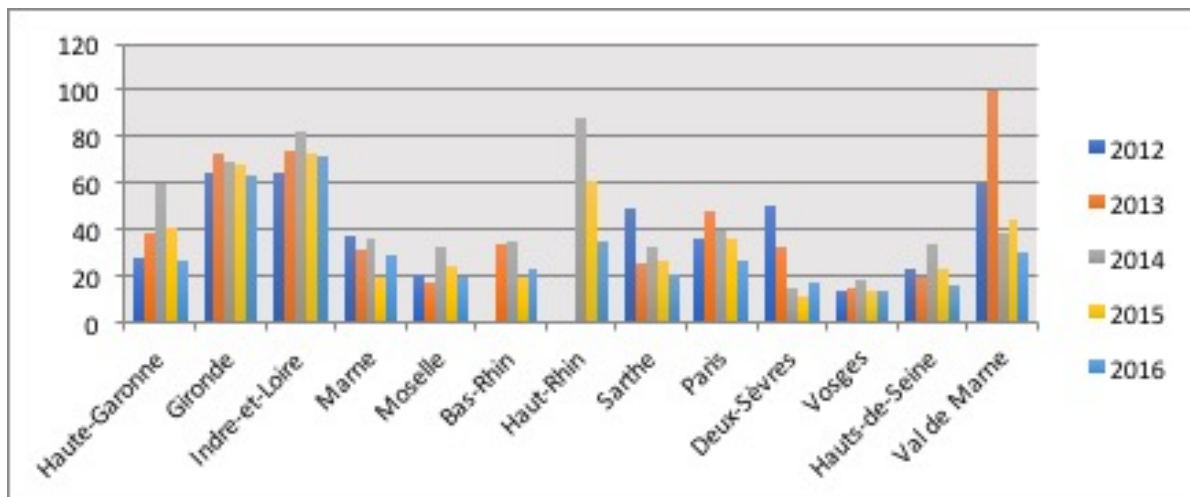
Cela s'illustre en Limousin par exemple, zone d'endémie pour la borréliose. Le pourcentage d'analyses positives réalisées par le CNR est de 0% en Haute-Vienne alors qu'il est de 20% en Corrèze où l'incidence est similaire. On retrouve cette différence en Ariège (stabilité du nombre de demandes, taux de positif 0%) versus le département voisin des Pyrénées-Atlantiques (stabilité du nombre de demandes, taux de positif 11%).

Parmi les 13 départements mentionnés plus haut avec un nombre de demandes annuelles > 100 /an en 4 ans), 12 sont en augmentation. Nous avons analysé ces demandes et l'évolution du taux de sérologies positives sur les 5 ans :

Evolution des demandes des départements avec plus de 100 demandes par an (hors CHU Strasbourg)



Carte réalisée avec Cartes & Données - © Artique



On constate parmi les départements adressant au CNR, un nombre croissant de demandes sur les 5 ans dans 2 départements (les Deux-Sèvres et le Val de Marne). Nous observons en parallèle de cette augmentation du nombre de demandes, une diminution du taux de positifs détectés.

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

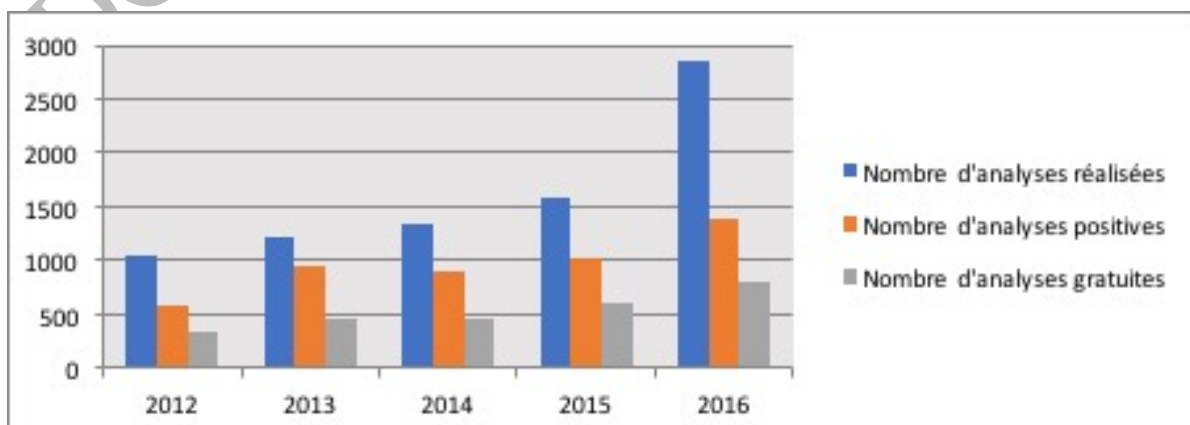
2.2.1.2.1. En 2016

En 2016 ont été réalisées 2 856 sérologies de confirmation par immuno-empreinte. Cette activité est en augmentation de 8,7% par rapport à 2015 (2 628 analyses réalisées).

Dans 22,8 % des cas, seul le WB était demandé sur des sérums déjà dépistés positifs en ELISA par les laboratoires demandeurs. Le but du WB étant de confirmer la spécificité des anticorps dépistés, il n'est pas systématiquement réalisé par certains laboratoires, notamment en faible zone d'endémie, qui préfèrent externaliser cette prestation.

Ces confirmations en WB ont été réalisées sur 2 396 sérums (WBGS 1949 et WBMS 447) et 520 LCR. Sur ces 2 916 analyses, 1 396 étaient positives par WB, soit 47,9 %. Donc, près d'un tiers des échantillons initialement détectés positifs ou douteux en ELISA étaient de faux positifs. Ce taux élevé de réactions croisées en ELISA en routine objective l'importance de l'analyse de confirmation par WB avant de conclure à la positivité de la sérologie de Lyme.

Activité d'expertise sur les 5 années du CNR :



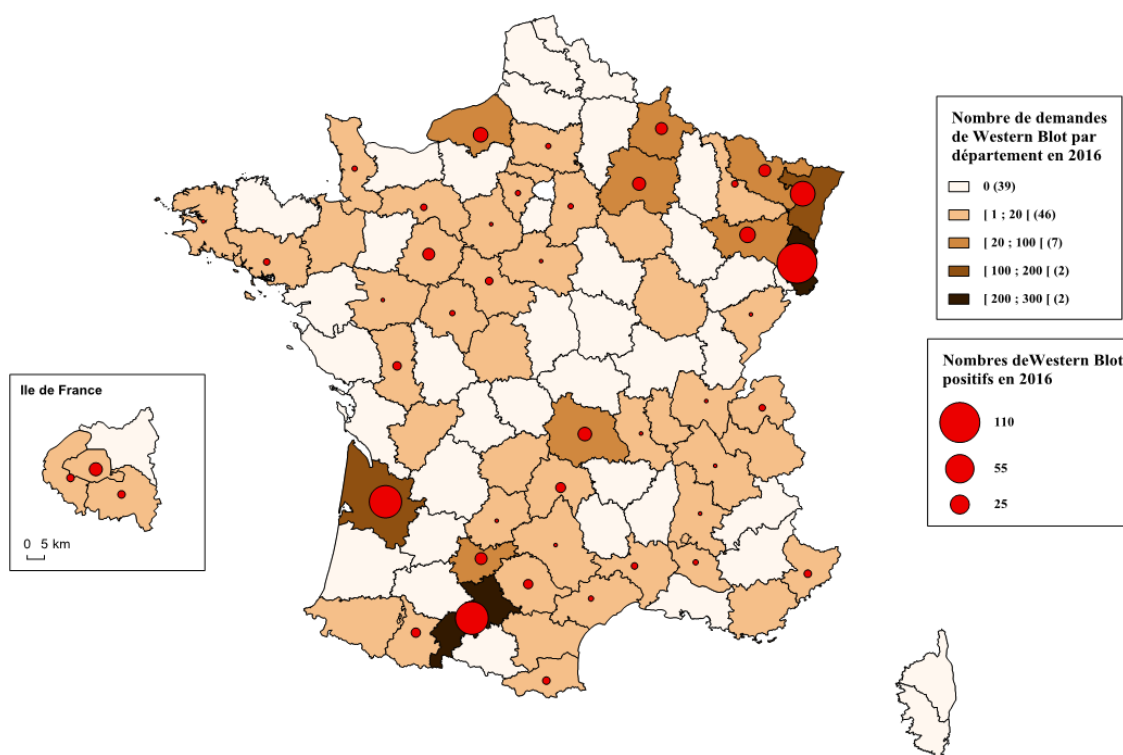
Cette activité du CNR augmente au fur et mesure des années des ans de mandature. Le nombre d'échantillons accompagnés d'une fiche de renseignements épidémioclinique a aussi légèrement progressé de façon proportionnelle au nombre d'analyses réalisées.

Répartition des sérums testés en WB et des résultats positifs pour les sérologies de confirmation adressées au CNR des Borrelia en 2016 en France (hors région Alsace) :

Les demandes de confirmation sérologique provenaient de 57 départements français répartis sur le territoire national, soit une stabilité par rapport à 2015 avec 59 départements demandeurs.

Ces demandes, hors CHU de Strasbourg, représentaient 1 220 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 blanc 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.

Répartition géographique des Western Blot effectués en 2016 (hors CHU Strasbourg)



Ces demandes nationales (hors CHU) concernaient :

- 2 396 sérums dont 1 043 (43,5 %) positifs
- 520 LCR dont 353 (67,9%) positifs.

En moyenne, la spécificité des anticorps a été confirmée par WB pour 41,3 % des prélèvements initialement dépistés positifs ou douteux en ELISA. Sur l'ensemble de ces demandes, 546 prélèvements, soit 22,8 %, ont été adressés uniquement pour confirmation par WB. Parmi ces 546 demandes, 205 (37,5 %) étaient positives.

La similitude des pourcentages de sérums confirmés par WB dans les différents départements peut correspondre à une amélioration de la standardisation de la spécificité des trousse ELISA utilisées sur l'ensemble du territoire.

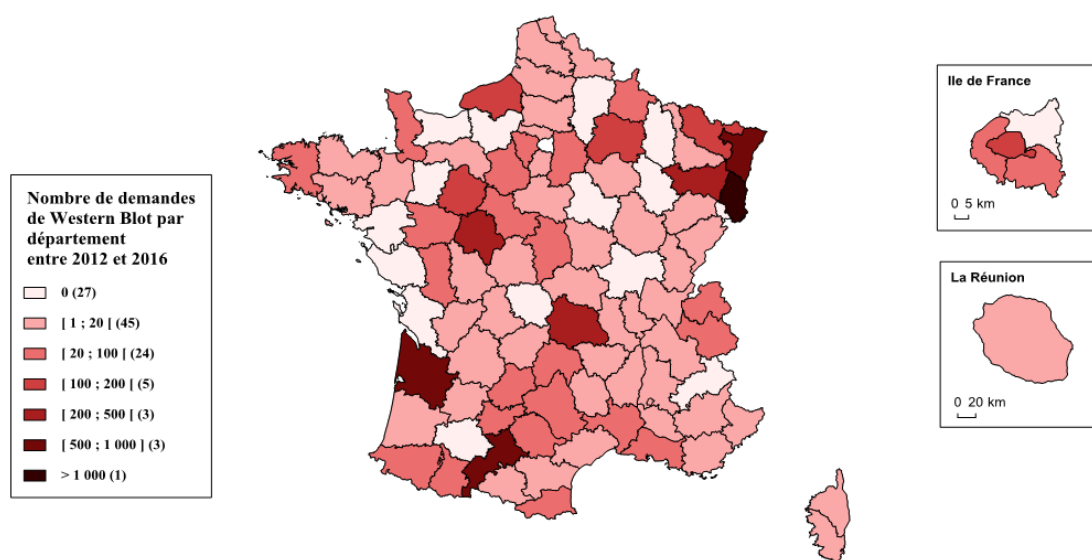
Répartition des sérums testés en WB en Alsace et des résultats positifs pour les sérologies de confirmation adressées CNR des *Borrelia* en 2016 :

Cette année, 1 253 western-blot réalisés par notre laboratoire ont été prescrits en Alsace. Parmi ces analyses, 567 (45,3 %) étaient positives. Selon la nature du prélèvement, les demandes étaient réparties de la manière suivante :

- 1 078 sérums dont 472 (43,8 %) positifs
- 175 LCR dont 95 (54,3 %) positifs

Les demandes du CHU de Strasbourg étaient majoritaires, elles représentaient 1 100 analyses (87,8 %). Les demandes hors CHU ont généré 153 analyses (12,2 %). La spécificité des anticorps a été confirmée par WB pour 40,7 % des prélèvements initialement dépistés positifs ou douteux en ELISA, soit une valeur identique à la moyenne des autres départements français.

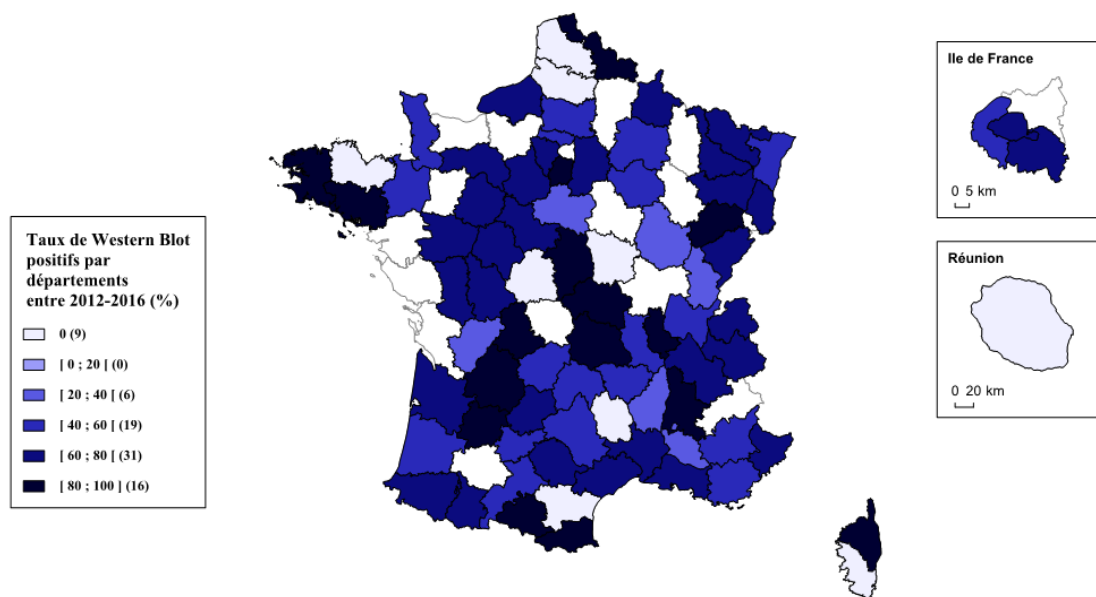
Répartition des Western Blot effectués entre 2012 et 2016 (hors CHU Strasbourg)



2.2.1.2.2. Bilan sur les 5 années de mandature du CNR *Borrelia*

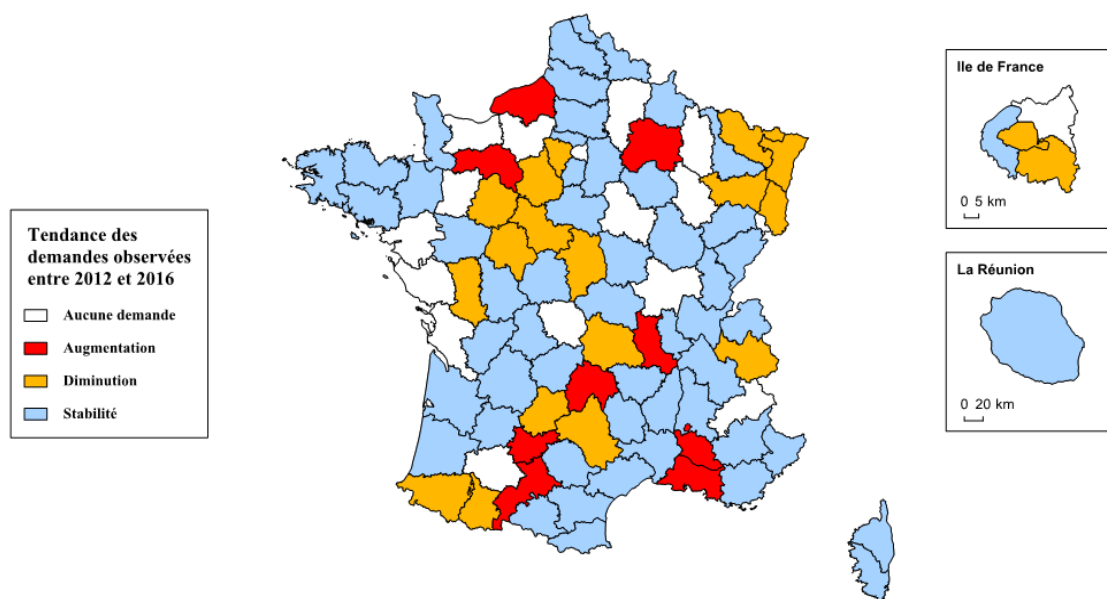
Il existe une bonne couverture nationale de l'activité de confirmation par WB du CNR, avec seulement 27 départements non demandeurs :

Taux de positivité des Western Blot entre 2012-2016 (hors CHU Strasbourg)



Carte réalisée avec Cartes & Données - © Artique

Evolution des demandes de Western Blot entre 2012 et 2016 (hors CHU Strasbourg)



Carte réalisée avec Cartes & Données - © Artique

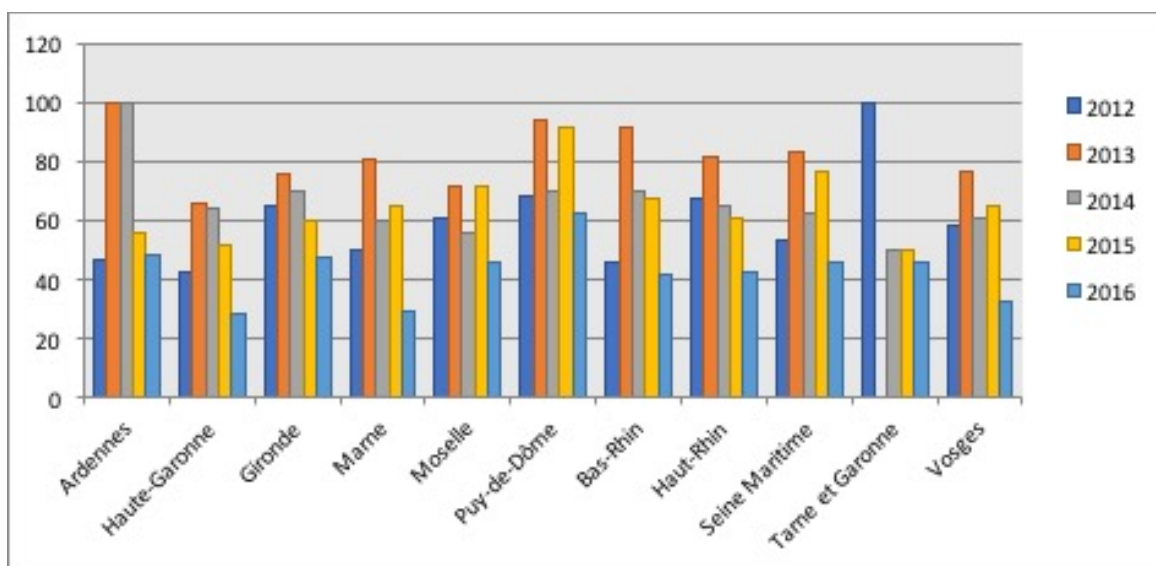
De même que la carte des sérologies de 1^{ère} intention par ELISA, cette carte de répartition du taux de positivité en western-blot ne se superpose pas à la prévalence de *Borrelia* dans les tiques ni à celle de l'incidence nationale de la borréliose de Lyme.

On retrouve la même tendance, avec :

- des départements à fort taux de positivité en western-blot (60 à 100%). Cela correspond probablement à des laboratoires ayant recours au CNR, pour confirmer des sérologies positives ou douteuses par ELISA, comme prévu par la NABM,

- quelques départements à faible taux de positivité (<20%). Ceci correspond probablement à des laboratoires nous adressant leurs sérums « *tout venant* » ou négatifs, pour lesquels ils souhaitent confirmer la négativité.

Cela s'illustre par exemple en région Ile-de-France où l'incidence est similaire quel que soit le département.



Sur les 5 années, environ 58 % des demandes étaient positives en moyenne. Ce pourcentage est en diminution par rapport aux autres années (49% en 2012, 82% en 2013, 68% en 2014 et 65% en 2015). Cette diminution du pourcentage d'analyses positives peut être liée en partie à une augmentation de la prescription de cette sérologie liée la couverture médiatique importante du sujet depuis plusieurs années.

2.2.2. Etude de la synthèse intrathécale spécifique anti *Borrelia*

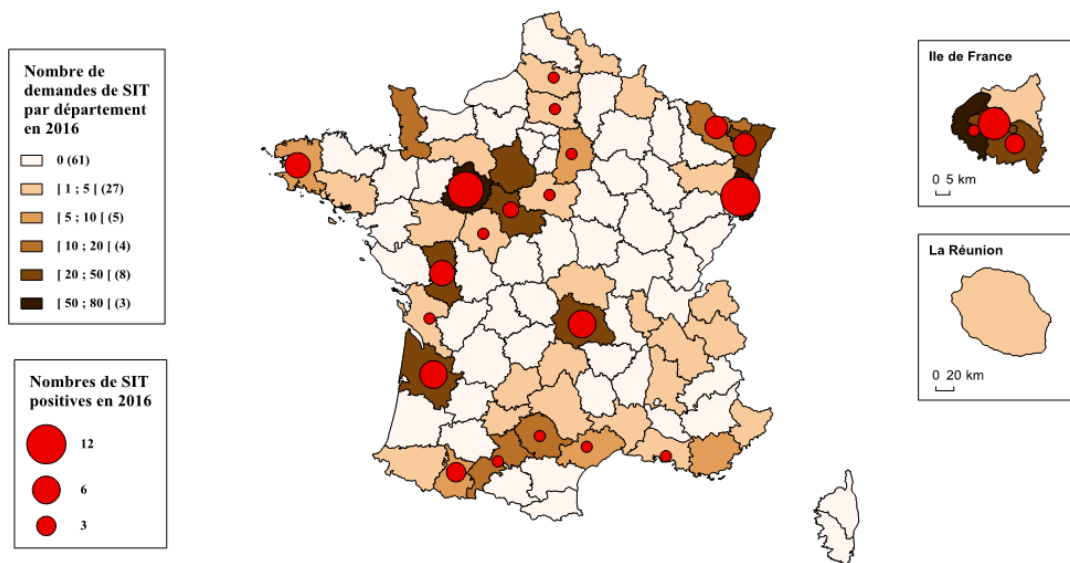
Les neuroborrélioses représentent en France et en Europe, la forme disséminée la plus fréquente de la borréliose de Lyme. La mise en évidence d'une synthèse intrathécale (SIT) spécifique d'anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* sensu lato fait ainsi partie en Europe, à la différence des USA, des critères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

Dans le cadre de nos conseils aux professionnels de santé, nous avons continué en 2016, 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.

2.2.2.1. En 2016

L'ensemble des demandes de synthèse intrathécale s'élevait à 1566, dont 1189 (75,9%) n'ont *in fine* pas été réalisées en raison de sérologie négative dans le sérum et/ou le LCR. Dans ce cas, la recherche de SIT n'est pas indiquée.

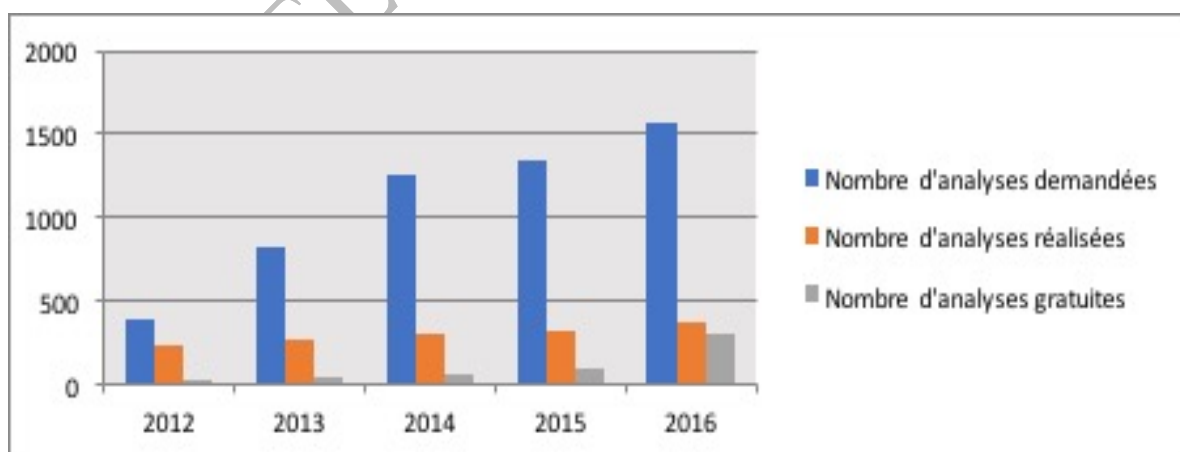
Répartition géographique des SIT demandées en 2016 (hors CHU Strasbourg)



En 2016, 96 analyses, soit 25,5 %, étaient positives, permettant d'affirmer dans ce cas le diagnostic de neuroborréliose. Dans 8 % des cas, le résultat de la SIT était douteux et ne permettait ni d'affirmer ni d'infirmer le diagnostic.

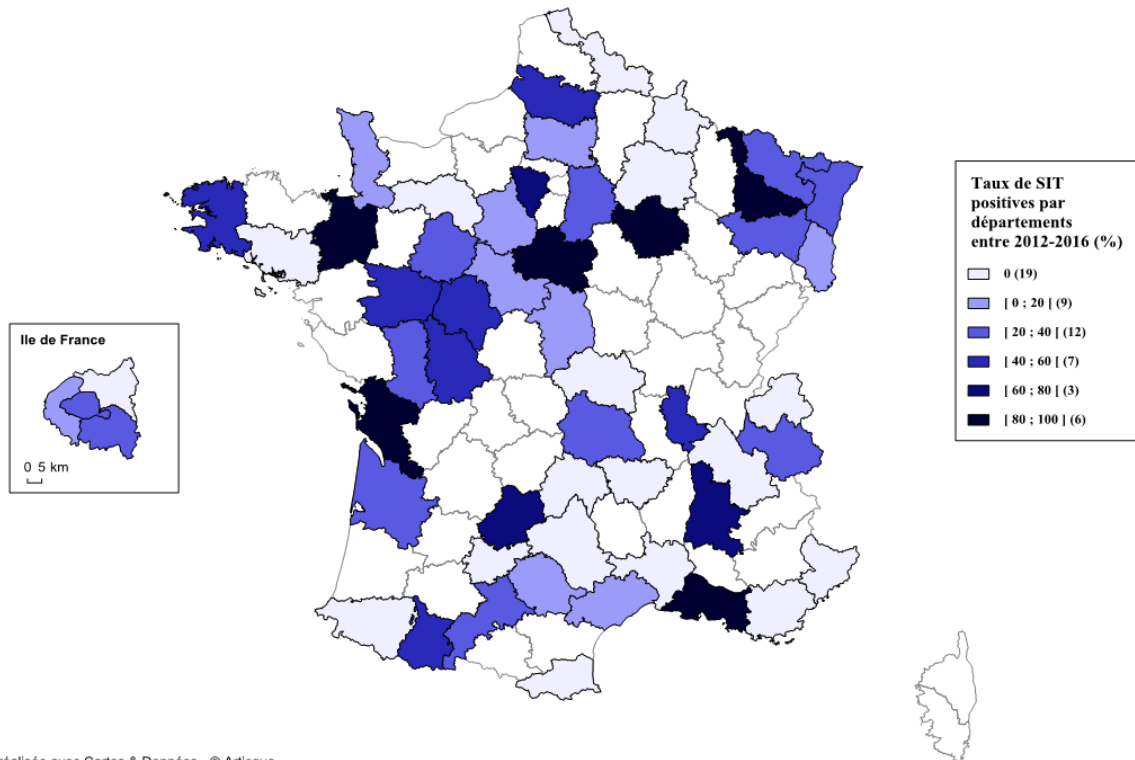
Parallèlement, les cliniciens du CHU de Strasbourg en ont prescrit 957 en 2016, et 30 autres analyses ont été réalisées pour différents laboratoires (principalement de CH et de LAM).

2.2.2.2. Bilan de l'activité de confirmation des neuroborrélioses par synthèse intrathécale sur les 5 années de mandature du CNR *Borrelia*



Les demandes de SIT ont significativement augmenté pendant les 5 ans du CNR. Ainsi, le nombre de SIT réalisées au CNR qui est passé de 239 en 2012 à 377 en 2016. Le nombre de SIT positives est lui resté stable cependant.

Taux de positivité des synthèses intrathécales demandées entre 2012-2016 (hors CHU Strasbourg)



En 5 ans, de nombreux laboratoires demandent des « SIT **sans** sérologie », c'est-à-dire que le dosage ELISA est préalablement fait par le laboratoire demandeur, le CNR réalisant alors uniquement la SIT. La couverture nationale de réalisation de ce paramètre s'est améliorée, passant de 17 départements demandeurs en 2012-2013 à 45 départements en 2014, 2015 et 2016. Ceci est probablement lié à une meilleure communication sur l'utilité de ce paramètre pour la confirmation du diagnostic des neuroborrélioses.

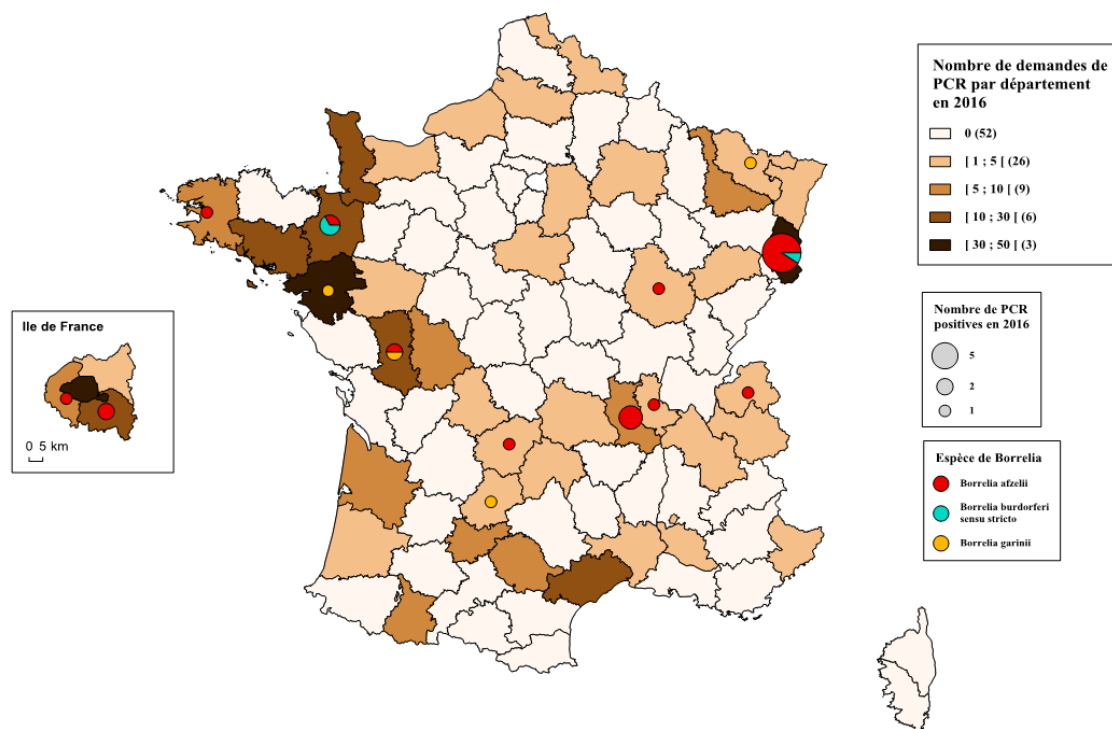
2.2.3 Activité d'expertise en PCR du CNR *Borrelia*

2.2.3.1. Recherche de *Borrelia* dans les prélèvements humains par PCR en 2016

Pour la recherche de *Borrelia* par PCR en 2016, 395 prélèvements provenant de 45 départements ont été adressés au CNR (carte ci-dessous). Ce nombre de demande a augmenté de 20 % par rapport à l'année 2015.

Parmi ces demandes, 8,7 % n'ont pas pu être réalisées car la nature de l'échantillon biologique n'était pas indiquée pour l'analyse (sérum, frottis de peau, abcès, sang sur tube EDTA).

Répartition des prélèvements analysés en PCR en 2016
Répartition des espèces des analyses positives



Parmi les prélèvements analysables (365), on comptait 157 LCR, 96 prélèvements articulaires et 112 prélèvements divers (biopsies : cutanée, de tissu profond ; extrait ADN ; humeur aqueuse ; sang placentaire ; fragment de valve cardiaque et hémocultures). Sur 365, 42 étaient positifs, soit 11,5 %.

* Parmi les LCR, qui sont adressés en majorité (43 %), aucun n'était positif.

* Parmi les prélèvements articulaires, 11 étaient positifs (11,5 %) : 3 à *B. burgdorferi*, 5 à *B. afzelii*, 3 à *B. garinii*. L'origine géographique des 11 cas d'arthrite de Lyme était diverse : Saint Mandé, Rennes, Niort, Saint Nazaire, Cahors, Strasbourg, Pringy. Dans les cas cliniquement renseignés, le tableau clinique correspondait toujours à une mono-arthrite du genou.

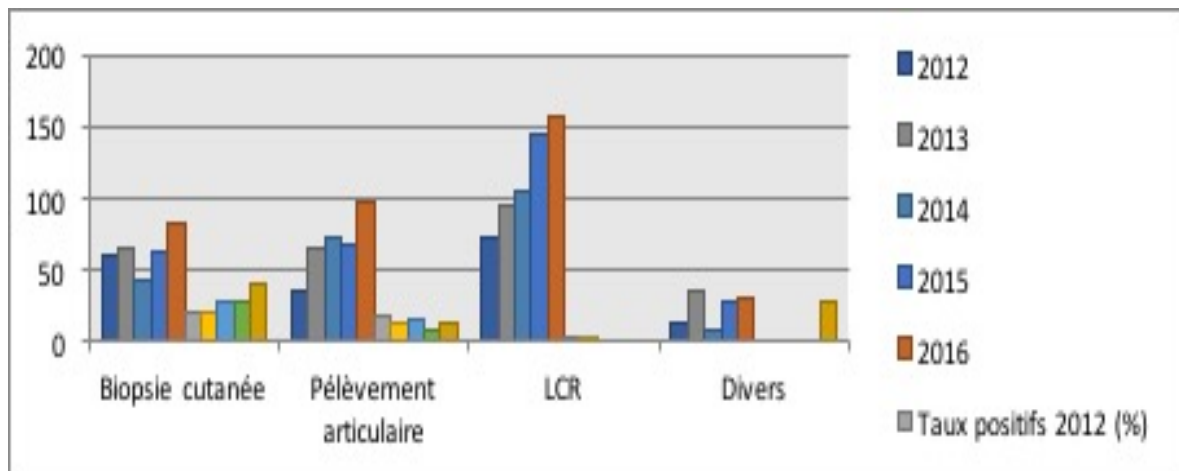
* Parmi les 112 prélèvements divers, 32 biopsies cutanées étaient positives (28,6 %), 29 à *B. afzelii*, 1 à *B. burgdorferi*, 1 à *B. garinii* et **1 seule co-infection à *B. afzelii* et *B. garinii***. Dans les biopsies positives, 16 provenaient du « protocole biopsies cutanées » et les 16 autres ont été adressées soit par un hôpital (CHU de Dijon, CHU de Saint Etienne, CHU de Strasbourg, CHU de Lyon, CH de Boulogne Billancourt, CH de Créteil) soit par un médecin spécialiste en dermatologie ou rhumatologie.

Espèces de Borrelia détectées en PCR en 2016 selon la nature des prélèvements

Espèce de Borrelia	Prélèvements articulaires	LCR	Biopsies cutanées	Extraits d'ADN*	Total
<i>B. afzelii</i>	5 (liquide synovial)	0	30	0	35
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	3 (liquide synovial)	0	1	0	4
<i>B. garinii</i>	3 (liquide synovial)	0	2	0	5
<i>B. non typable</i>	0 (liquide synovial)	0	0	8*	8

* extraits d'ADN : analyses effectuées dans le cadre d'un EEQ

Demandes de PCR de *Borrelia* sur prélèvements humains de 2012 à 2016

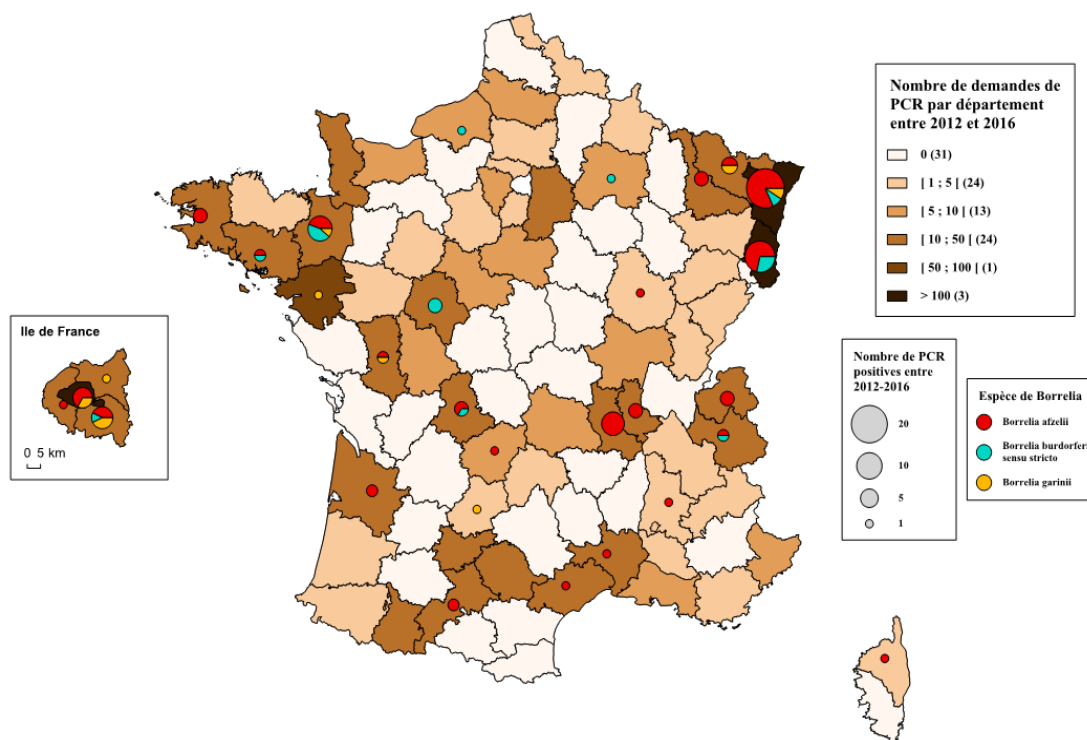


Le nombre de prélèvements adressés au CNR pour recherche de *Borrelia* a progressé de 2012 à 2016. L'analyse des variations de la nature des prélèvements montre que ce sont les LCR ont doublé en 5 ans.

Le taux de positivité des LCR en PCR est extrêmement faible, entre 0 et 1% par an. Le manque de sensibilité de la recherche directe de *Borrelia* par PCR dans le LCR et donc la quasi absence d'indication de cet examen biologique sont encore trop méconnus des prescripteurs. Les cas de suspicion de neuroborréliose doivent principalement être explorés par sérologie concomitante dans le sérum et le LCR prélevés le même jour, avec (si les sérologies sont positives) recherche de la SIT spécifique. La PCR est à limiter aux 2 premières semaines d'évolution des signes cliniques, lorsque la réponse humorale est encore absente.

Le pic de PCR positives sur échantillons divers en 2016, correspond à des extraits d'ADN spécifiques de différentes espèces de *Borrelia* d'un contrôle de qualité externe (QCMD) auquel le CNR a participé en 2016. Une dizaine de PCR a alors été réalisée. Les résultats obtenus étaient tous conformes.

Répartition des prélèvements analysés en PCR entre 2012 et 2016
Répartition des espèces des analyses positives

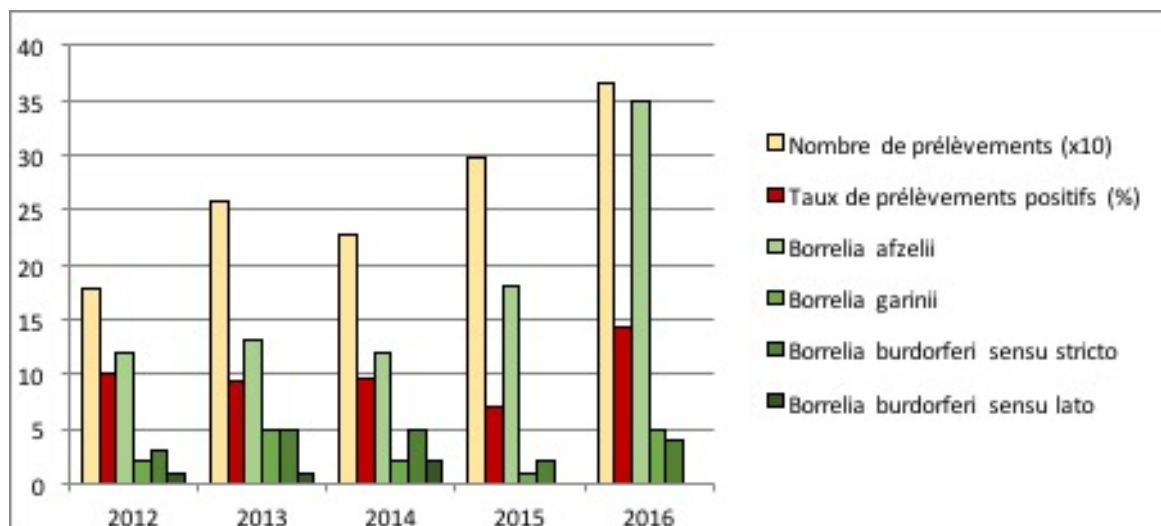


Sur les 5 années écoulées, un total de 67 départements nous ont envoyés au moins un échantillon et 32 ont eu au moins un échantillon positif par PCR durant la même période.

Espèces de Borreliella détectées en PCR entre 2012 et 2016 en fonction de la nature des prélèvements

<i>Espèce de Borreliella</i>	<i>Biopsies cutanées</i>	<i>Prélèvements articulaires</i>	<i>LCR</i>	<i>Total</i>
<i>B. afzelii</i>	76	14	0	90
<i>B. burgdorferi ss</i>	3	16	0	15
<i>B. garinii</i>	5	8	1	15
<i>B. burgdorferi non typable</i>	1	2	1	4

L'espèce la plus fréquente en France dans les échantillons humains est *B. afzelii* (70,3%), suivie de *B. burgdorferi* (14,8%) puis *B. garinii* (11,7%). L'espèce causale n'a pu être déterminée pour 12 échantillons positifs (8 en 2016) en raison d'un signal en PCR trop faible pour pouvoir être séquencé.



Cette répartition entre les espèces de *Borrelia* pathogènes est stable sur les 4 premières années (2012, 2013, 2014 et 2015) avec une nette prédominance de *B. afzelii* en 2016.

Le taux d'échantillon positif est stable sur les 3 premières années (50% environ, en accord avec la littérature européenne). Sur les 2 années suivantes, on observe une diminution du taux de prélèvements positifs alors qu'on a une augmentation de nombre de prélèvements reçus. Ce taux est plus bas en raison d'une augmentation du nombre de LCR analysés en 2015 et 2016, dont le taux de positif est très faible dans tous les pays d'Europe.

Au total, *B. afzelii* est l'espèce majoritaire en France. **Sur les 124 prélèvements humains positifs durant cette mandature, aucun échantillon humain n'a été détecté positif pour une autre espèce de *Borrelia* (*B. valaisiana*, *B. spielmanii*, *B. lusitaniae*, *B. bissetii*, ...) à ce jour, alors que celle-ci sont occasionnellement trouvées dans les tiques.** Ces dernières espèces ne représentent donc pas une cause régulière d'infection humaine à *Borrelia* en France, de même que dans les autres pays européens.

Cette répartition globale des espèces pathogènes pour l'Homme en France est similaire à celle observée dans les pays voisins (Allemagne, Suisse). A noter que les arthrites de Lyme sont en France le plus souvent dues à *B. burgdorferi* (16/39 positifs, soit 41% des cas)

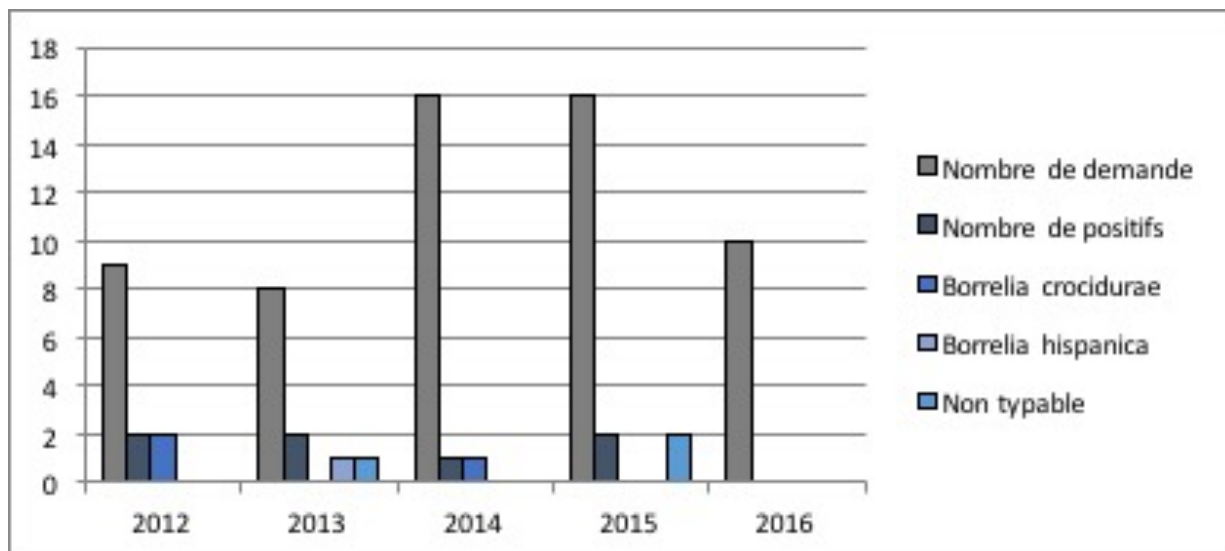
2.2.3.2 Détection de *Borrelia* de fièvres récurrentes sur prélèvements humains

En 2016, nous avons réceptionné 10 demandes d'analyses pour suspicion de fièvre récurrente entre mars et novembre 2016. Les prélèvements provenaient d'un peu partout en France : Nord-Est (Darnetal n=1, Mulhouse n=1, Strasbourg n=1), Nord-Ouest (Saint Brieux n=1), Sud-Est (Ales n=1), Sud-Ouest (Périgueux n=1, Bordeaux n=1) et du Centre de la France (Garches n=2, Nevers n=1).

Les patients étaient : 3 femmes entre 16 et 54 ans, 5 hommes entre 26 et 73 ans et de 2 enfants (garçon et fille) de 4 et 9 ans. La majorité de ces patients présentaient une fièvre récurrente accompagnée ou non d'autres signes. Divers symptômes parfois peu spécifiques étaient associés suivant les cas : rash cutané, escarre d'inoculation, asthénie, syndrome grippal récurrent, l'un des patients présentait des épisodes fébriles tous les 2 mois pendant 5 jours depuis 3 ans... Quatre de ces demandes d'analyses faisaient suite à un retour de voyage (Sénégal, Thaïlande, Cuba, Réunion). Les 6 autres demandes correspondaient à des recherches pour des patients présentant une fièvre sans cause apparente et sans facteur de risque : pas de

voyage à l'étranger, sans récurrence de l'épisode fébrile. Sur ces 10 échantillons analysés, aucun n'était positif.

Au total sur la mandature, le CNR *Borrelia* a analysé 59 échantillons pour recherche de *Borrelia* agents de fièvre récurrente.



Deux espèces ont été identifiées dans les différents cas positifs au CNR entre 2012 et 2016 : *Borrelia crocidurae* et *Borrelia hispanica* :

- les 3 cas dûs à *Borrelia crocidurae* avaient pour origine des voyages au Sénégal (n=2) et au Maroc (n=1)
- un patient dont le prélèvement est positif à *Borrelia hispanica* revenait d'un voyage au Maroc

Les deux patients positifs pour des espèces de *Borrelia* du groupe fièvres récurrentes non typables après séquençage avaient pour origine des voyages au Sénégal (2 cas et 3 prélèvements).

Origine géographique des suspicions de fièvres récurrentes analysées entre 2012-2016 (lorsque des données de voyage étaient disponibles)



2.2.4 Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique distribués, issus des collections du CNR

En 2016, le CNR a adressé les matériels biologiques suivants aux laboratoires et unités de recherche figurant dans le tableau ci-dessous :

Matériel biologique	Date	Souche	Projet	Destinataire
Culture bactérienne	13/12/2016	<i>B. afzelii</i>	"Impact of chronic bacterial infection on NKT cell lymphomagenesis in mice and humans"	Rémy Robinot Laboratoire INSERM U1052/CRCL Lyon
Culture bactérienne	07/09/2016	<i>B. afzelii</i>	"Impact of chronic bacterial infection on NKT cell lymphomagenesis in mice and humans"	Rémy Robinot Laboratoire INSERM U1052/CRCL Lyon
Biopsies cutanées	05/09/2016	/	Protéomique <i>Borrelia</i>	Dr Laurence Sabatier IPHC-ECPM, Laboratoire de spectrométrie de Masse Bio-Organique Strasbourg
Tiques	11/01/2016	/		Lionel Almeras CNR des Rickettsie Marseille

3. Activités de surveillance

3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

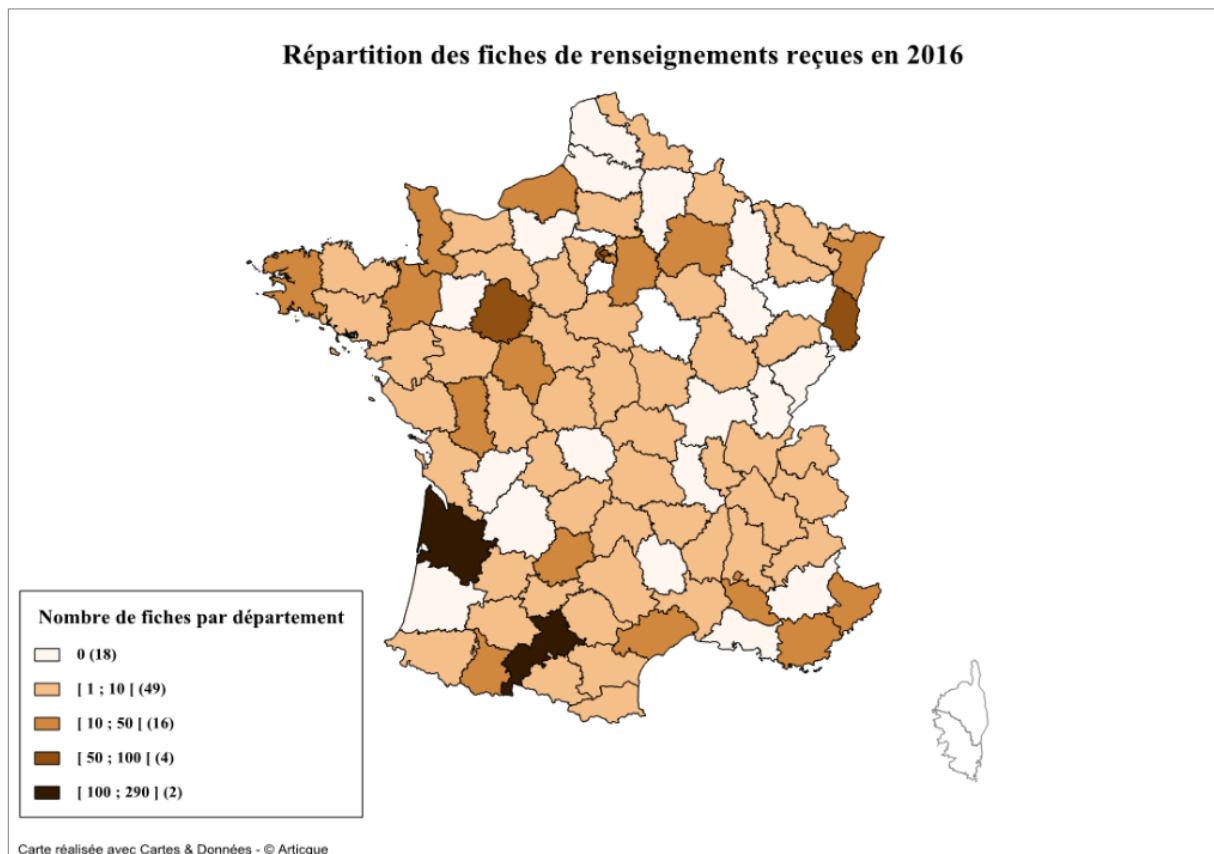
3.1.1. Surveillance nationale des cas de suspicion de borréliose de Lyme

Le CNR centralise tout au long de l'année des données provenant de fiches de renseignements associées à des prélèvements pour demande d'analyse et d'expertise. Il centralise également de nombreux appels téléphoniques de divers interlocuteurs (médecins généralistes et spécialistes, dont les biologistes médicaux et divers courriers électroniques ou papier et fax).

Le recueil des fiches de renseignements permet d'extraire des informations importantes pour l'analyse épidémiologique comme l'âge des patients, le sexe, les facteurs de risque, les signes cliniques, etc. Les données recueillies sont saisies dans un fichier Excel® contenant la retranscription manuelle des fiches de renseignements de chaque année du CNR des *Borrelia* ainsi que les résultats biologiques issus du serveur de résultats d'analyses des prélèvements qui nous ont été envoyés. Chaque cas est ensuite classé en différentes catégories en fonction des critères diagnostique de l'EUCALB (European Concerted Action on Lyme).

Durant l'année 2016, 1228 fiches de renseignements ont été reçues contre 827 en 2015, soit une augmentation de près de 48%. On constate une constante augmentation de ce nombre par rapport aux années précédentes. En effet, en 2014 on avait une augmentation de 15% vs 2013 et en 2015 on avait une augmentation de 36% vs 2014. Cette augmentation du nombre de demandes d'analyse est probablement corrélée, entre autre, à la couverture médiatique intense depuis au moins 3 ans.

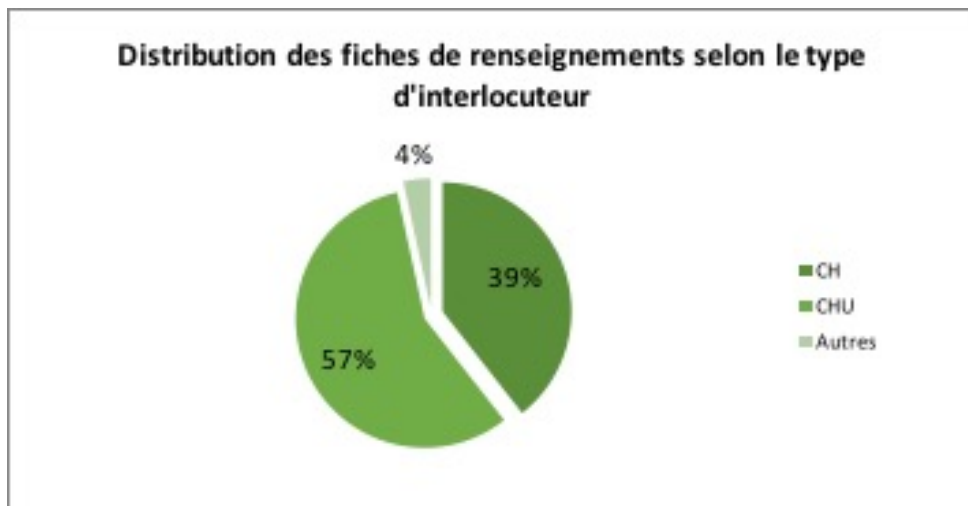
Les fiches reçues couvrent quasiment tout le territoire français. La majorité des fiches réceptionnées provenaient de Centres Hospitaliers Universitaire (702/1228 soit 57.2%) et de Centres Hospitalier régionaux (484/1228 soit 39.4%). Au total, 96,6% des demandes provenaient d'un hôpital (95,2% en 2015 et 90,3% en 2014).



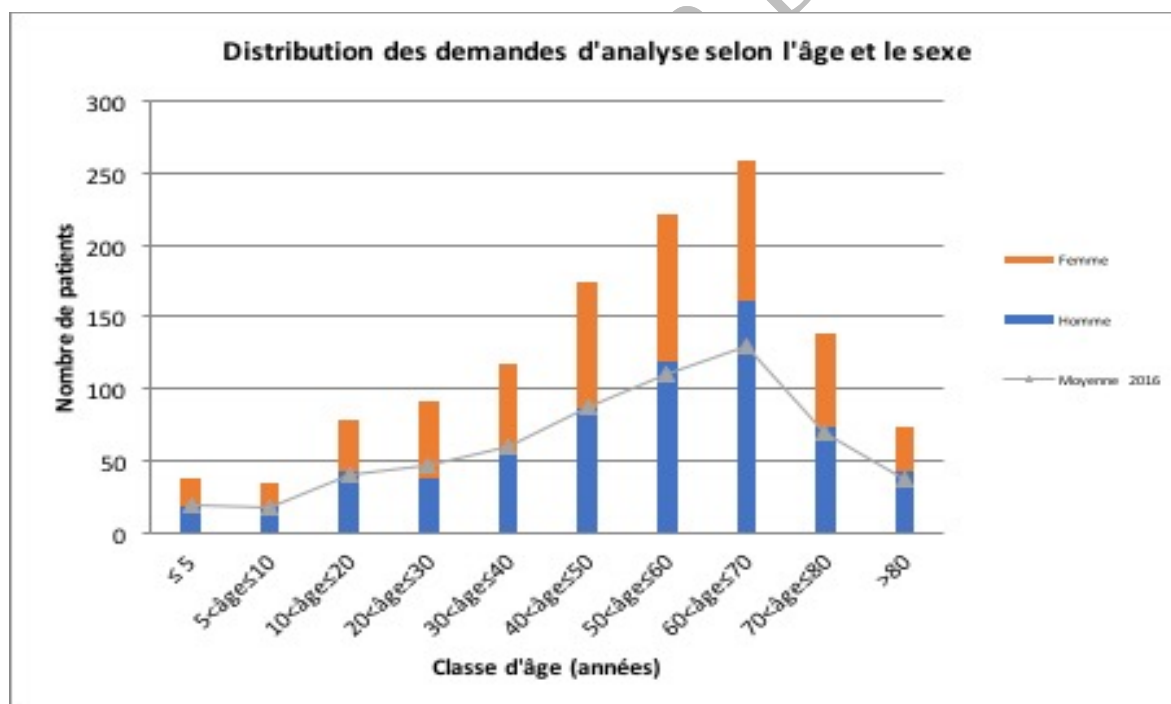
Parmi ces fiches, 31% (381/1228) ont été jugées non exploitables en 2016 car elles étaient insuffisamment remplies, voire vides d'informations épidémiologiques, contre 19,2% en 2015 et 7,2% en 2014. Afin de pallier cette insuffisance, nous avons modifié la fiche de renseignement en ajoutant certaines mentions de mise en garde et 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.

Les fiches qui ont pu être analysées proviennent principalement des CHU comme Toulouse (289 fiches soit 23,5%), Bordeaux (154 fiches soit 12,5%), Garches (58 fiches soit 4,7%) ou Paris (54 fiches soit 4,4%) ou des CH comme Le Mans (84 fiches soit 6,8%) ou Colmar (68 fiches soit 5,5%).

Le reste des demandes provient d'environ 110 autres établissements répartis sur l'ensemble du territoire. Dans ces derniers, le nombre de demandes varie globalement de 1 à 50 (soit 0,1 à 4% des fiches de renseignements).



La majorité des demandes émanent de centres hospitaliers dont l'examen de dépistage (ELISA) est positif et souhaitent donc une confirmation de ce résultat de la part du CNR par la technique du Western Blot. Il existe également des cas plus complexes nécessitant la mesure du taux d'IgG dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), la mesure de la synthèse intra-thécale et parfois la recherche du génome bactérien par PCR dans les prélèvements biologiques (sang, LCR, liquide articulaire, biopsie, ...).



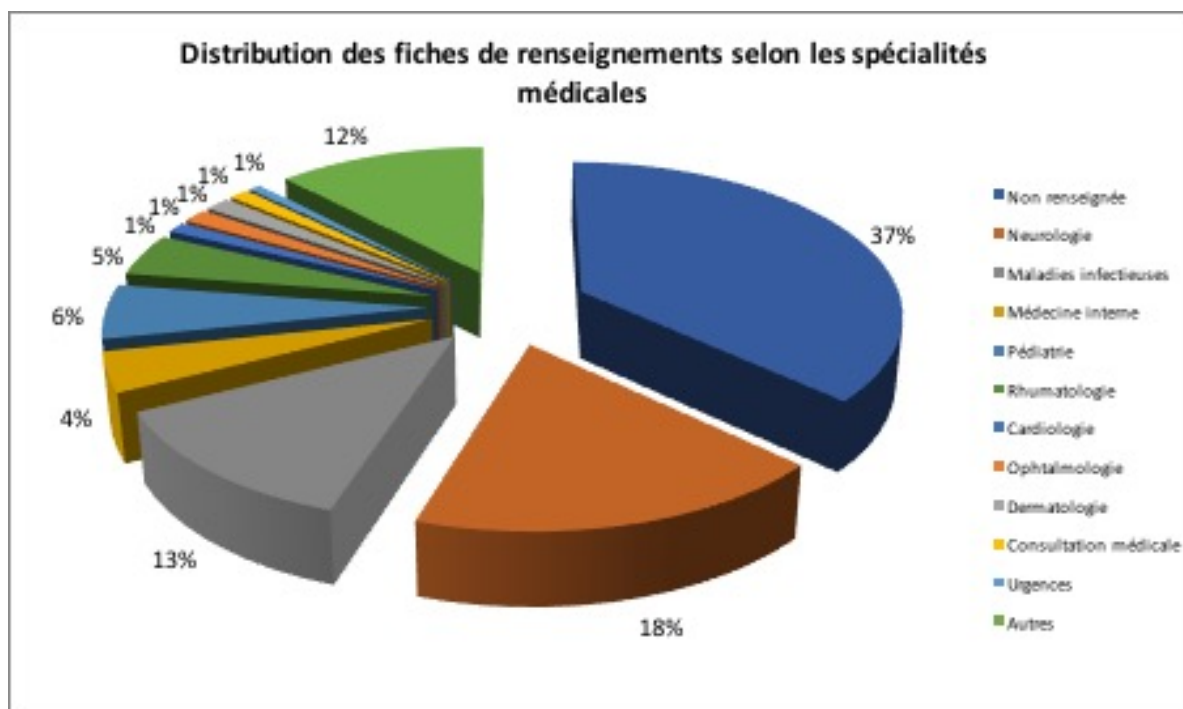
Le graphique ci-dessus représente le nombre de patients en fonction de l'âge et du sexe. On recense en 2016, 53% de cas masculins (655/1228) et 47% de cas féminins (573/1228). En faisant un test de comparaison de proportions (test Z suivant une loi normale centrée réduite avec un risque $\alpha=5\%$), on note une différence significative entre les hommes et les femmes, avec plus d'hommes analysés, ce qui est conforme à la littérature. Ce sexe ratio des patients reste globalement stable depuis 2013 (1.1 en 2016, 1.2 en 2015, 1.2 en 2014 et 1.1 en 2013).

L'âge des patients analysés varie de 5 mois à 100 ans en 2016. Cette fourchette s'est un peu élargit par rapport à 2015 où l'âge variait de 1 an à 95 ans. De plus, il n'y a pas de différence significative dans la distribution des hommes et des femmes dans les différentes classes d'âge

sauf pour la classe des 20 < âge ≤ 30 ans où il y a légèrement plus de femmes et pour la classe des 60 < âge ≤ 70 ans où il y a beaucoup plus d'hommes.

On constate également que les patients de 40 à 70 ans sont les plus concernés par les analyses pour le diagnostic de borréliose : cette catégorie est probablement plus exposée au risque de contamination (augmentation du temps de loisirs en pleine nature lié à la retraite).

La répartition des fiches épidémiologiques en fonction des spécialités hospitalières a évolué par rapport aux années précédentes. En effet, on note une augmentation de la proportion de fiches de renseignements dont la spécialité n'était pas renseignée (37% en 2016 contre 19% en 2015).



De façon générale, la part de la neurologie est stable depuis 2012, c'est la spécialité la plus demandeuse avec 18% des demandes. Ceci est dû au fait que les diagnostics délicats s'orientent le plus souvent vers la suspicion de neuroborréliose et que les neuroborrélioses sont la forme disséminée la plus fréquente en Europe.

Les autres fiches analysables, soit 45% des fiches, provenaient d'autres spécialités : maladies infectieuses (13%), pédiatrie (6%), rhumatologie (5%), médecine interne (4%), ...

La catégorie « Autres » regroupe des spécialités peu représentées car peu demandeuses comme la microbiologie, la réanimation, l'hématologie, l'ORL, la gériatrie, la biologie médicale, la néphrologie, ...

Définition des cas selon l'EUCALB

Les différents cas recensés pendant l'année 2016 ont été classés par type d'atteinte d'après les critères diagnostiques de l'EUCALB.

Erythème migrant (EM) :

- *EM certain* : EM ≥ 5cm et constaté par un médecin
- *EM possible* : description d'une lésion cutanée atypique attribué par le médecin à une infection par *Borrelia*

- *EM improbable* : EM non constaté par un médecin avec une description clinique incertaine

Lymphocytome borrelien (LB) :

- *LB certain* : LB dans une ou plusieurs zone(s) froide(s) de la peau (lobe/hélix de l'oreille, mamelon, scrotum) accompagné d'une sérologie positive.

Acrodermatite chronique atrophiante (ACA) :

- *ACA certaine* : ACA diagnostiquée par un médecin, accompagnée d'une concentration élevée en IgG spécifiques dans le sérum
- *ACA possible* :
 - o ACA diagnostiquée par un médecin mais sérologie non réalisée
 - o Renseignement cliniques insuffisants accompagnés d'une concentration élevée en IgG spécifiques dans le sérum et d'une PCR positive sur biopsie cutanée
- *ACA indéfinissable* : absence de données cliniques accompagné d'une concentration élevée en IgG spécifiques dans le sérum

Neuroborréliose (NB) :

- *NB certaine* : clinique correspondante aux critères de l'EUCALB + pléiocytose dans le LCR (liquide céphalorachidien) + SIT > 2 (synthèse intrathécale)
- *NB probable* :
 - o Clinique correspondante aux critères de l'EUCALB + pléiocytose dans le LCR + $1.7 \leq \text{SIT} \leq 2$
 - o Clinique correspondante aux critères de l'EUCALB + pléiocytose dans le LCR + SIT non réalisée
- *NB possible* :
 - o Clinique inadéquate avec les critères de l'EUCALB + pléiocytose dans le LCR + SIT > 2
 - o Clinique correspondante aux critères de l'EUCALB ± pléiocytose dans le LCR + sérologie dans le LCR très positive + SIT non réalisée
- *NB peu probable* : clinique correspondante aux critères de l'EUCALB + SIT < 1.5
- *NB improbable* :
 - o Clinique correspondante aux critères de l'EUCALB mais sérologie dans le LCR négative
 - o LCR envoyé dans le cadre d'une suspicion de neuroborréliose (clinique inconnue ou en inéquation avec les critères de l'EUCALB) mais sérologie dans le LCR négative
- *NB indéfinissable* : clinique en inéquation avec les critères de l'EUCALB ± pléiocytose dans le LCR + sérologie dans le LCR et/ou SIT non réalisée(s)

Arthrite de Lyme (ART) :

- *ART certaine* : mono-arthrite d'une grosse articulation (principalement du genou) accompagnée d'une concentration élevée en IgG spécifiques dans le sérum
- *ART possible* : clinique « douteuse » (renseignements cliniques insuffisantes ou inadéquats) accompagnée d'une sérologie positive en IgG
- *ART improbable* :
 - o Mono-arthrite d'une grosse articulation accompagnée d'une sérologie (IgG) négative ou faiblement positive

- Manifestation(s) articulaire(s) autre(s) que mono-arthrite d'une grosse articulation ± sérologie positive en IgG (NB : sont classés dans cette catégorie des manifestations articulaires autres que mono-arthrite (polyarthrite) avec des sérologies parfois très positives)
- *ART indéfinissable* :
 - Mono-arthrite d'une grosse articulation sans sérologie réalisée
 - Manifestation articulaire de type non renseigné accompagnée d'une concentration élevée en IgG spécifiques dans le sérum

Atteinte cardiaque (CARD) :

- *CARD certaine* : clinique correspondante aux critères de l'EUCALB accompagnée d'une sérologie positive
- *CARD possible* : clinique douteuse accompagnée d'une sérologie positive
- *CARD improbable* : clinique en inéquation avec les critères de l'EUCALB ± sérologie positive

Manifestations oculaires (OCC) :

- *OCC certaine* : clinique correspondante aux critères de l'EUCALB accompagnée d'une sérologie positive
- *OCC possible* : clinique correspondante aux critères de l'EUCALB accompagnée d'une sérologie faiblement positive
- *OCC improbable* : clinique correspondante aux critères de l'EUCALB accompagnée d'une sérologie négative

Répartition des cas cliniques en fonction du type d'atteinte clinique

Les différents cas analysés au CNR en 2016 ont été classés par type d'atteinte d'après les critères diagnostiques de l'EUCALB et les renseignements complémentaires utiles.

En 2016, comme les autres années, les demandes d'aide au diagnostic concernent principalement les patients avec des atteintes neurologiques soit 30% des demandes (45,4% en 2015, 51,5 en 2014, 54% en 2013). Les atteintes cutanées arrivent en deuxième position (6,9% en 2015, 7,8% en 2014 et 15% en 2013) suivis par les atteintes articulaires (9,9% en 2015, 9% en 2014 et 16,9% en 2013).

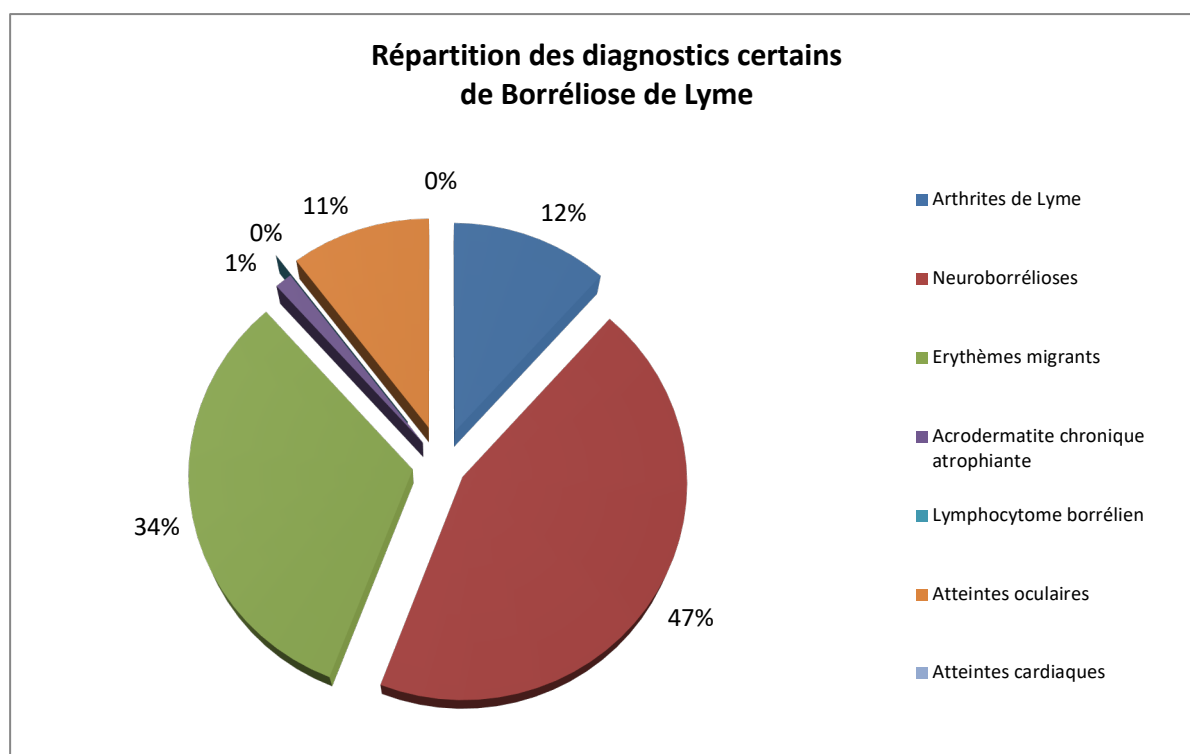
Les atteintes cutanées regroupent les suspicions d'érythèmes migrants (83,7%), d'acrodermatite chronique atrophiantes (11,6%) et de lymphocytomes borréliens (4,7%). Cependant, 60,5% des cas adressés au CNR comme atteintes cutanées correspondent à des symptômes divers et variés (lésions papuleuse, éruptions cutanées, urticaire, lésions prurigineuses, adénopathies, lésions érythémateuses non migrantes, ...).

Les autres types d'atteintes (cardiaque, oculaire) sont plus rares représentant respectivement 0,5% et 1,8% des demandes d'analyse.

En 2016, on note que 50% des cas adressés au CNR sont « hors critères EUCALB ». Chez la plupart de ces patients « hors critères EUCALB », une borréliose a été suspectée face à des symptômes peu ou non spécifiques (algies, asthénie, fièvre, vertiges, troubles mnésiques, lésions cutanées atypiques, ...) voire inappropriés (anémie, cancer, douleurs dentaires, vomissements, ...). De plus, on note aussi que 11,7% des cas adressés au CNR sont classés

inexploitables en raison du manque d'attention lors du remplissage des fiches de renseignement par les médecins prescripteurs ou par absence totale de fiche de renseignements.

Au total, parmi les données analysées en 2016, 77 patients soit 6,3% seulement (contre 9,4% en 2015, 13,3% en 2014 et 18,7% en 2013) 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 note :

- 34 cas de neuroborrelioses (NB) – (47%)
- 25 cas d'érythèmes migrants (EM) – (34%)
- 9 cas d'arthrite de Lyme (ART) – (12%)
- 8 cas d'atteintes oculaires dues à *Borrelia* (OCC) – (11%)
- 1 cas d'acrodermatite chronique atrophiante (ACA) – (1%)
- 0 cas de lymphocytome borrélien (LB) – (0%)
- 0 cas d'atteintes cardiaques dues à *Borrelia* (CARD) – (0%)

Le taux de 47% de neuroborreliose (NB) est cohérent avec la littérature indiquant que les NB sont les manifestations disséminées les plus fréquentes en Europe. Ce taux est en constante augmentation sur ces dernières années (44,6% en 2015, 37% en 2014).

Le taux de 34% d'érythème migrant (EM) a ré-augmenté par rapport aux années précédentes (28,4% en 2015, 30,9% en 2014, 49,5% en 2013). Il est logique que le taux d'EM recensé par le CNR soit inférieur au taux de NB car le diagnostic des EM est essentiellement clinique. De plus, on trouve très peu d'EM ayant une forme atypique nécessitant une analyse de la part du CNR.

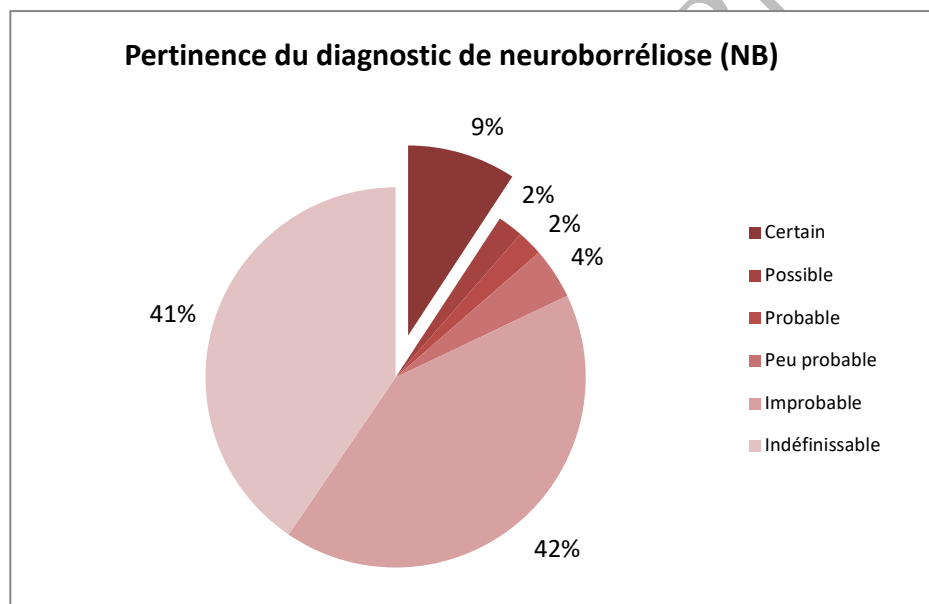
Le taux d'arthrite de Lyme (ART) recensé au CNR est de 12% en 2016. Ce taux continue de diminuer au fil des années (14,9% en 2015, 22,2% en 2014).

Les différents facteurs de risque des patients présentant un diagnostic de Lyme certain, recensé en 2016 ont été évalués. Parmi ces patients, 51% n'ont pas renseigné s'ils étaient exposés à un facteur de risque ou non. En étudiant les fiches où ces facteurs sont renseignés, on note de façon logique que le risque de présenter une atteinte à *Borrelia* est plus important en pratiquant une activité de loisir en pleine nature (24%) qu'en étant en contact avec des animaux (6%). De plus, 19% des patients déclarent être exposés à ces deux facteurs de risques.

Face à ses observations, l'activité d'information du CNR reste primordiale afin de sensibiliser les prescripteurs à l'importance d'un remplissage suffisant des fiches de renseignements pour pouvoir analyser les tendances.

1) Neuroborréliose

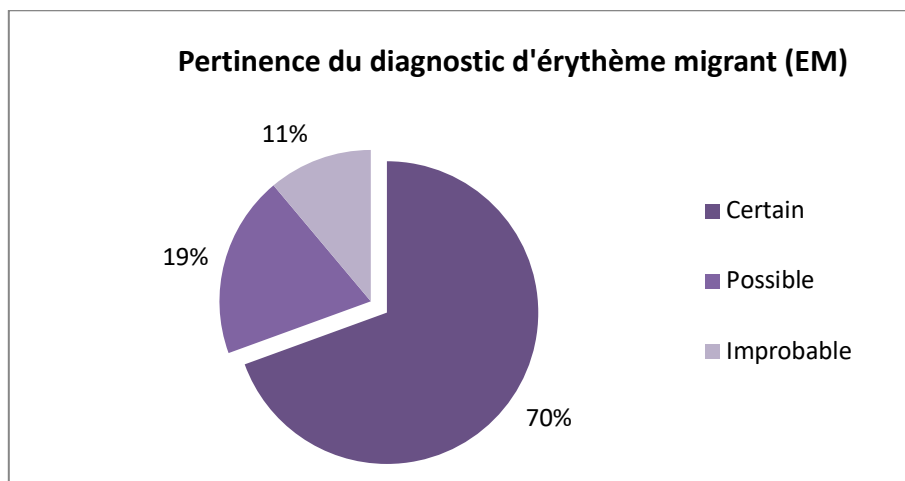
Parmi les cas suspectés de NB, seuls un petit nombre ont été classés dans la catégorie de neuroborréliose certaine. Le graphique ci-dessous illustre la répartition de la certitude du diagnostic de NB parmi tous les cas suspectés.



La pertinence du diagnostic de NB est semblable à celle de 2015, mis à part pour les catégories « NB improbable » et « NB indéfinissable ». En effet, en faisant un test Z suivant une loi normale centrée réduite avec un risque $\alpha = 5\%$, on observe une différence significative entre 2016 et 2015. Il y avait plus de cas de « NB improbable » en 2015 (56%) par rapport à 2016 (42%) mais il y avait moins de cas de « NB indéfinissable » en 2015 (29%) par rapport à 2016 (41%).

2) Erythème migrant (EM)

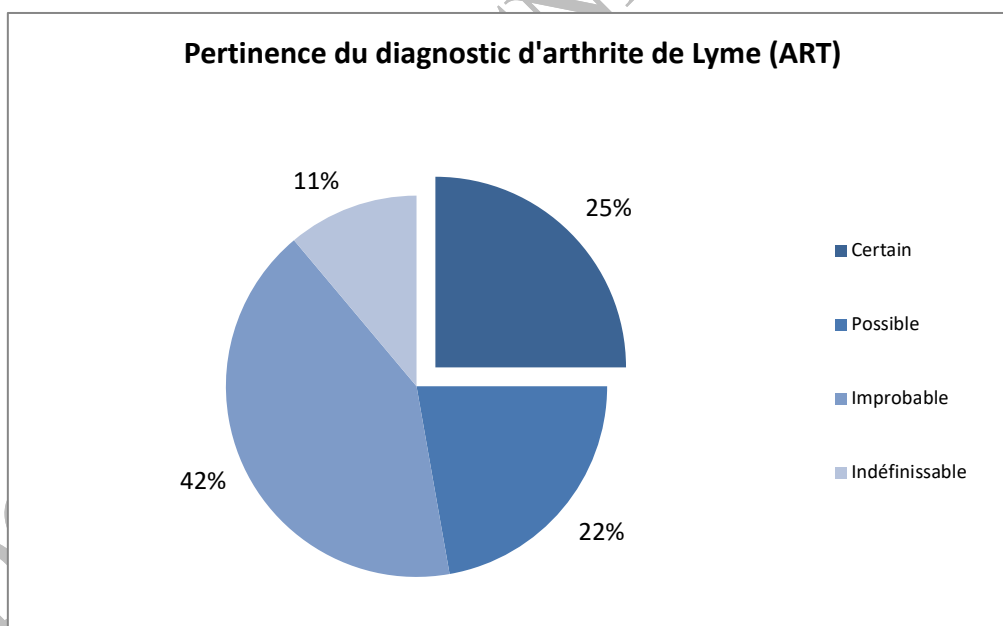
Le diagnostic d'EM est dit certain lorsque ce dernier a été constaté par un médecin et seulement si son diamètre est supérieur ou égal à 5cm. Le graphique ci-dessous illustre la répartition de la certitude du diagnostic d'EM parmi tous les cas suspectés.



La pertinence du diagnostic d'EM est semblable à celle de 2015. En effet, en faisant un test Z suivant une loi normale centrée réduite avec un risque $\alpha = 5\%$, on n'observe aucune différence significative selon les différentes catégories.

3) Arthrite de Lyme (ART)

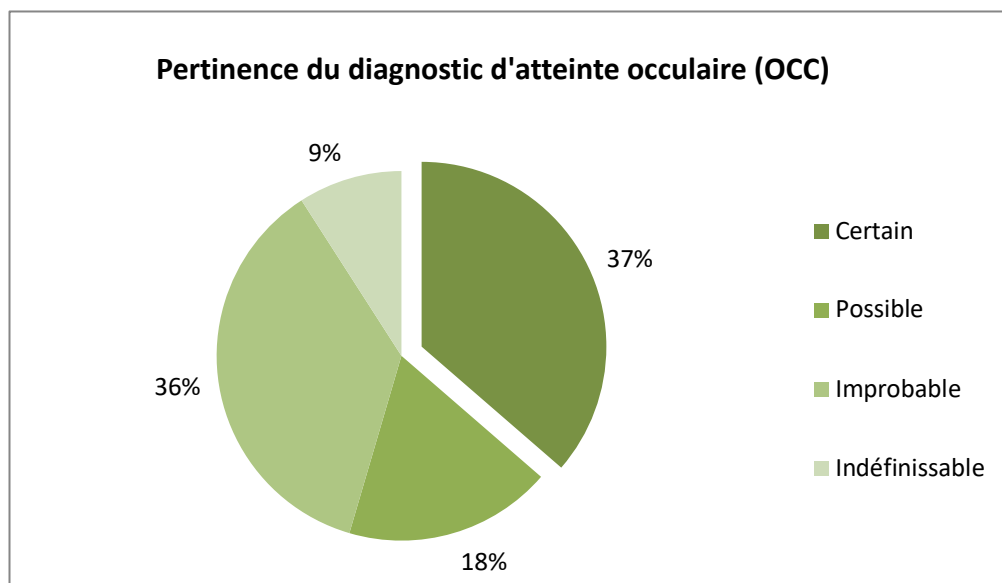
Le diagnostic certain d'arthrite de Lyme nécessite une sérologie élevée dans le sérum. A défaut, le diagnostic sera dit « possible », « improbable » ou « indéfinissable ». Le graphique ci-dessous illustre la répartition de la certitude du diagnostic d'ART parmi tous les cas suspectés.



La pertinence du diagnostic d'ART est semblable à celle de 2015, mis à part pour la catégorie « ART improbable ». En effet, en faisant un test Z suivant une loi normale centrée réduite avec un risque $\alpha = 5\%$ on observe une différence significative entre 2016 et 2015 avec moins de cas dans la catégorie « ART improbable » en 2016 (42%) qu'en 2015 (71%), indiquant une meilleure documentation clinique et biologique des cas analysés.

4) Atteintes oculaires (OCC)

Le diagnostic d'atteintes oculaires se fait d'une part sur la description des signes cliniques, et d'autre part sur la positivité de la sérologie. Le graphique ci-dessous illustre la répartition de la certitude du diagnostic d'OCC parmi tous les cas suspectés.



La pertinence du diagnostic d'OCC est semblable à celle de 2015, mis à part pour la catégorie « OCC certain ». En effet, en faisant un test du χ^2 à 1ddl et avec un risque $\alpha = 5\%$, on observe une différence significative entre 2016 et 2015. Il y avait plus de cas dans la catégorie « OCC certain » en 2016 (37%) par rapport à 2015 (8%).

Conclusion

Nous pouvons conclure que les patients atteints d'une borréliose de Lyme certaine sont issus de profils nombreux et variés et ne représentent qu'une petite partie des fiches de renseignements reçues par le CNR.

Les demandes présentaient des diversités géographiques, thématiques et provenaient de divers interlocuteurs, la majorité des demandes étant celle des cliniciens à propos de la demande diagnostique et analytique en cas de suspicion de borréliose de Lyme.

Le diagnostic de maladie de Lyme reste délicat et l'interprétation des différentes analyses n'est pas toujours aisée pour les prescripteurs. Il devrait en résulter une optimisation des programmes à mettre en place pour optimiser l'activité du CNR et cibler les personnes pour lesquelles les actions de formation.

3.1.2. Infections à *B. miyamotoi*

Borrelia miyamotoi est un agent de fièvre récurrente (FR) décrit pour la première fois en 1995 au Japon chez *Ixodes persulcatus*. Le premier cas d'infection humaine à *B. miyamotoi* a été décrit en Russie en 2011. Puis en 2013, le 1^{er} cas humain a été rapporté en Europe (Hollande) chez un patient profondément immunodéprimé (Hovius et al. 2013) et chez *Ixodes ricinus*. C'était la 1^{ère} fois que des *Borrelia* de fièvres récurrentes étaient mises en évidence chez des

tiques dures. En 2016, un autre cas humain a été signalé en Allemagne chez un patient également profondément immunodéprimé (Boden et coll., Emerg Infect Dis. 2016). Au total, deux entités cliniques semblent coexister : un syndrome fébrile 15 jours après piqûre de tique, qui sans traitement pouvant évoluer vers des récurrences ; de rares cas de méningo-encéphalites chez des patients très immunodéprimés

Nous avons mis au point en 2015 une méthode PCR en temps réel pour ces *Borrelia* de fièvres récurrentes. afin de pouvoir aussi rechercher ces pathogènes dans les tiques *Ixodes ricinus* et chez des patients. Le spectre de détection a été validé sur des ADN de différentes souches de *Borrelia* de fièvres récurrentes. La spécificité a été validée sur des souches de *Borrelia* agent de maladie de Lyme. La sensibilité de la technique est de 10 fg/μl d'ADN présent dans la prise d'essai pour toutes ces espèces de *Borrelia* testées. Lorsque l'amplification est positive, 20μL d'amplifiat à 10 pg/μL sont séquencés pour identifier l'espèce.

Nous avons recherché en 2014 et 2015 les *Borrelia* agents de FR sur les plusieurs milliers de nymphes collectées en Alsace et en Bretagne. Au total, tous sites confondus, le taux d'infection par les *Borrelia* agents de fièvres récurrentes est d'environ 2%.

En 2016, nous avons recherché *B. miyamotoi* dans notre DNAtèque de 575 sang de patients conservés à -80 °C et adressés au laboratoire de bactériologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg pour la recherche d'anaplasmose par PCR **depuis le 1^{er} janvier 2010 jusqu'au 28 juillet 2016** dans le cadre de syndrome fébrile après piqûre de tique. **Sur les 575 extraits d'ADN, aucun ne s'est révélé positif.**

Il est possible que *B. miyamotoi*, bien que présent dans 2% des nymphes d'*Ixodes ricinus* en Alsace soit une espèce rarement pathogène, à la différence d'*Anaplasma phagocytophilum* présent aussi dans 2% des nymphes et pour lequel nous mettons en évidence des infections humaines chaque année. La moindre virulence pour l'Homme de certaines espèces de *Borrelia* est connue, *B. valaisiana* par exemple. Cela devra être confirmée sur le mandat à venir du CNR *Borrelia*,

Un partenariat va aussi être développée avec l'équipe du Dr. J. Hovius de l'Université d'Amsterdam, afin d'étudier la séroprévalence de cette espèce en France et de pouvoir la comparer avec la situation dans d'autres pays d'Europe.

3.1.3. Surveillance nationale des manifestations cutanées de borréliose de Lyme

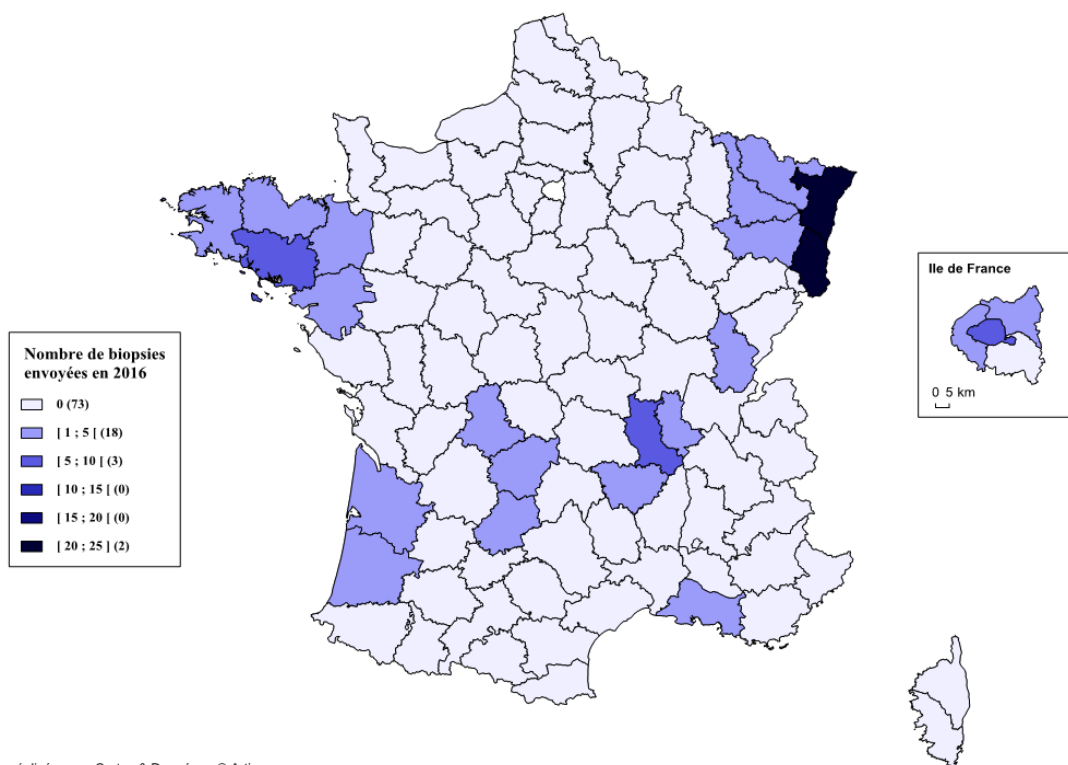
Nous avons poursuivi l'analyse prospective des biopsies cutanées de patients présentant des lésions typiques ou atypiques d'une suspicion d'infection cutanée à *Borrelia* et poursuivi l'étude de la diversité des espèces de *Borrelia* dans les manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France. Ces prélèvements nous ont été adressés de toute la France essentiellement par des dermatologues volontaires pour participer à ce réseau mais également par certains infectiologues et internistes.

Tous les prélèvements viennent d'adultes conformément au protocole validé 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*.

En 2016, nous avons reçu 75 prélèvements, contre 44 en 2015 (+70% par rapport à 2015). Ces biopsies nous ont été adressées de 23 départements différents répartis sur tout le territoire. En grande majorité, les prélèvements provenaient du Nord-Est (cf carte ci-dessous).

Parmi les 75 prélèvements cutanés qui nous ont été adressés, 49 (65 %) l'ont été pour suspicion d'EM, 14 (18 %) pour suspicion d'ACA et 4 (5 %) pour suspicion de lymphocytome borrélien. Dans 7 cas (9 %) les lésions cutanées étaient atypiques (suspicion de morphee ou présence d'érythème diffus avec infiltration lymphocytaire).

Répartition géographique des biopsies en 2016



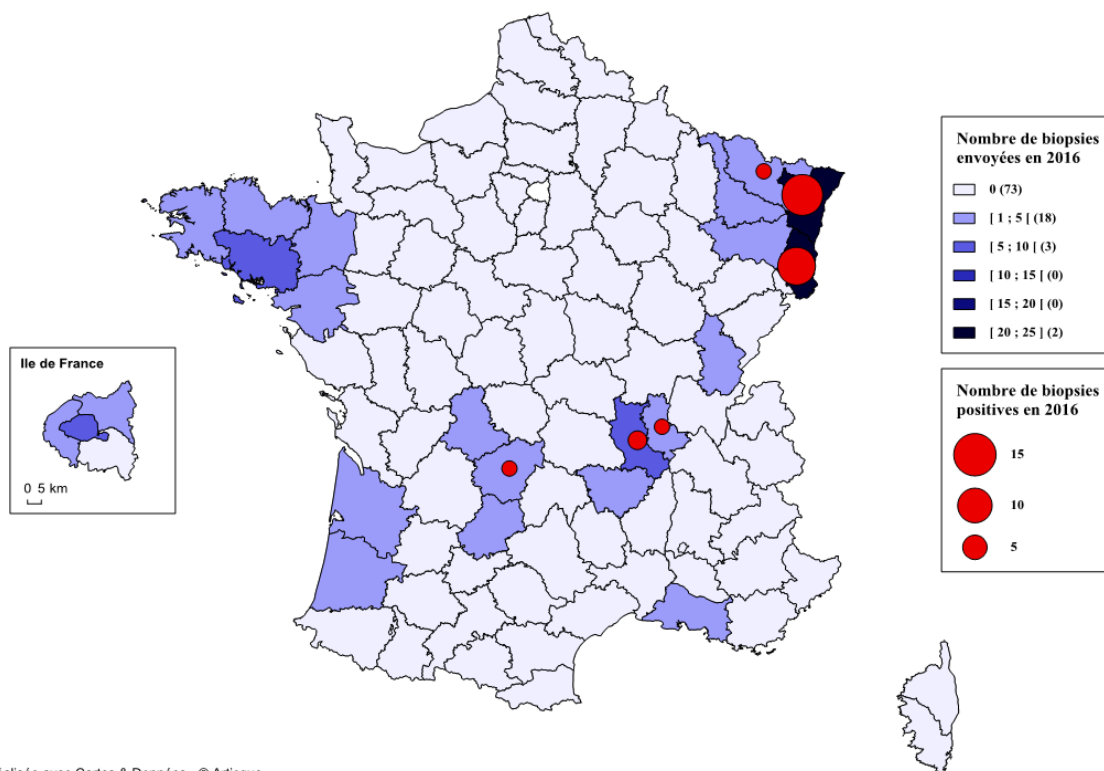
Carte réalisée avec Cartes & Données - © Artique

1

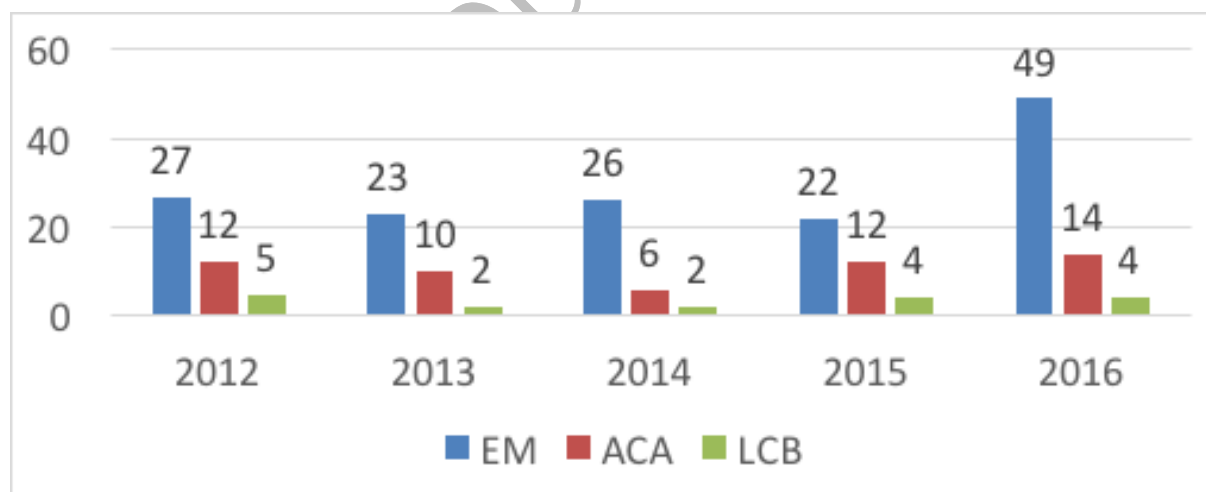
Parmi les centres de prélèvement participants aux protocoles, 10 centres ont envoyé 1 seule biopsie et 13 entre 2 et 14 biopsies. Sur les 75 biopsies reçues au total en 2016, 26 biopsies étaient positives en PCR (soit 34%) dont 12 également en culture (soit 16%). La sensibilité de la culture par rapport à la PCR est de 46%. Nous avons isolé **12 nouvelles souches humaines en 2016**.

Huit biopsies positives provenaient des deux départements alsaciens et ponctuellement de 4 d'autres départements (Moselle, Corrèze, Loire et Rhône).

Répartition géographique des biopsies positives en 2016

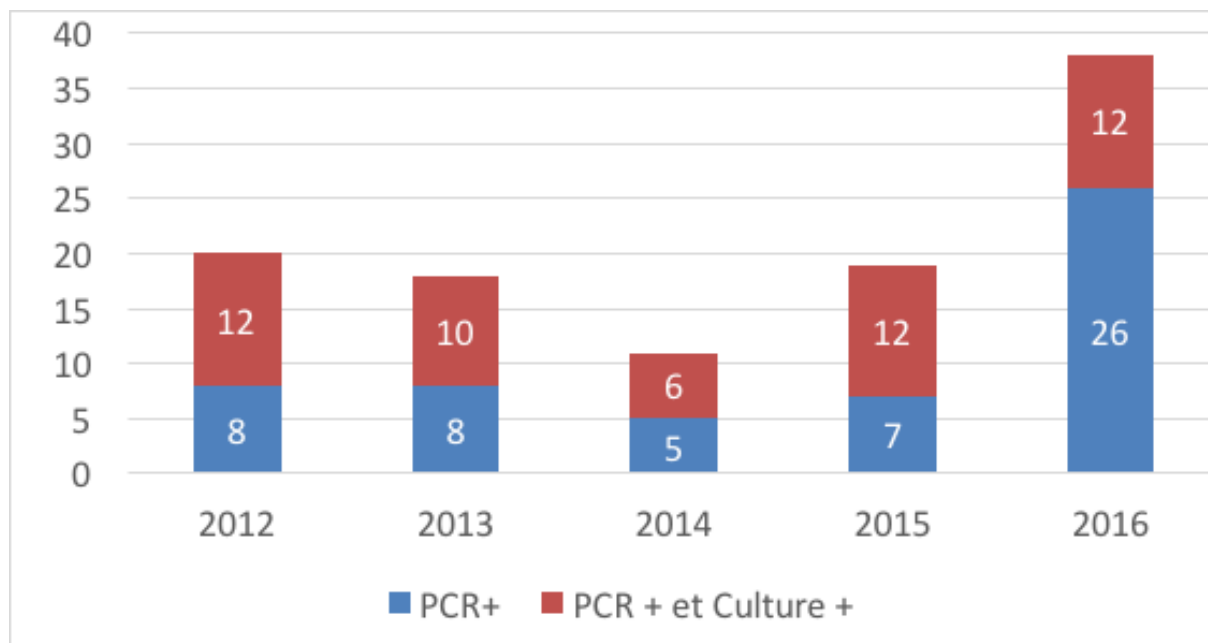


Au total, durant les 5 années de ce mandat, nous avons reçu 218 biopsies cutanées et une trentaine de biopsies tissulaires profondes musculaires ou aponévrotiques. Les prélèvements cutanés étaient de nature diverse : 147 suspicions d'EM, 54 suspicions d'ACA et 17 suspicions d'LB (lymphocytome borrélien) (cf graphique ci-dessous)



Proportions de biopsies (PCR et culture) négatifs et positifs

Durant les 5 années de ce mandat, 54 des 218 (soit 25 %) des prélèvements analysés étaient positifs en PCR et certains en culture également :



Espèces de Borrelia détectées dans les prélèvements cutanés sur les 5 années

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>	2012	2013	2014	2015	2016
<i>B. afzelii</i>	12	8	5	10	24
<i>B. garinii</i>	0	2	1	0	1
<i>B. burgdorferi</i>	1	0	1	0	1
<i>Borrelia</i> non typables	0	0	1	0	0

3.1.4. Surveillance des arthrites de Lyme PCR positives dans les échantillons articulaires, données 2010-2016

Le CNR *Borrelia* de Strasbourg effectue ou participe à la surveillance épidémiologique de la Borréliose de Lyme dans ses différentes formes cliniques. En Europe, les arthrites représentent 5% des formes cliniques associées aux Borrélioses de Lyme. Selon les critères de définitions de cas de l'EUCALB, de fort taux d'IgG anti-*Borrelia* sont présents chez les patients atteints d'arthrites de Lyme. Cependant, dans les zones d'endémie, où la séroprévalence est élevée, la recherche directe de *Borrelia* par PCR dans les liquides articulaires est utile pour étayer l'étiologie borrélienne d'une arthrite.

Entre 2010 et 2016, 40 cas d'arthrites de Lyme PCR positives ont été recensés par le CNR. Ces cas, répartis dans les différentes régions françaises, ont été détectés positifs pour différentes

espèces de *Borrelia*, dont *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* et *B. garinii*. Pour l'ensemble de ces patients, les données clinico-biologiques au moment de l'épisode arthritique (type de manifestation articulaire, manifestations extra-articulaires, sérologie...) ont été recueillies ainsi que les divers facteurs de risques associés aux maladies transmises par les tiques (expositions diverses) ont été étudiées. Le diagnostic final retenu a été dans tous les cas celui d'arthrite de Lyme et ces patients traités par antibiothérapie.

Une sérologie avait été effectuée en parallèle, indépendamment de la PCR, pour ces patients dans différents laboratoires. **Les résultats de sérologie ont été disponibles pour 36 patients et montrent que tous avaient des taux élevés d'IgG anti-*Borrelia*. Aucun cas d'arthrite de Lyme séronégative n'a été observée par le CNR sur les 5 dernières années.**

En association avec le service de Rhumatologie du CHU de Strasbourg, nous nous intéressons actuellement au devenir à long terme de ces patients. Sous forme d'entretien téléphonique, nous avons évalué la guérison de ces arthrites et/ou de ses éventuelles séquelles. Ces données sont en cours de recueil.

3.1.5. Surveillance des cas d'anaplasmose granulocytaire humaine

En 2016, près de 600 prélèvements ont été adressés au laboratoire pour recherche directe (PCR) ou indirecte (sérologie) d'*Anaplasma phagocytophilum*, agent intracellulaire strict de l'anaplasmose granulocytaire humaine et transmis comme *Borrelia* par les tiques dures du genre *Ixodes*.

Parmi ces prélèvements, 99 nous ont été adressés pour PCR *Anaplasma* et 6 étaient positifs. Ces 6 patients présentaient tous des signes évocateurs d'anaplasmose granulocytaire humaine : syndrome pseudogrippal avec fièvre après exposition aux tiques, leuco-neutropénie, thrombopénie, perturbation des enzymes hépatiques. Ils étaient tous originaires d'Alsace.

Sur les 468 sérologies réalisées pour d'*Anaplasma phagocytophilum*, 37 étaient positives en IgG (seuil 1/64 en IFI), dont 3 étaient également positives en IgM (seuil 1/20 en IFI). Parmi ces dernières, toutes étaient négatives en PCR.

En 2016, à l'instar de ce qui a été observé lors des 5 années précédentes, le taux de positivité des prélèvements analysés en PCR *Anaplasma* se situe entre 5 % et 10 % des demandes adressées au CNR.

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

3.2.1. Objectifs de la campagne de collecte de 2016

Dans le cadre des missions du CNR *Borrelia*, la surveillance acarologique a été poursuivie et élargie en 2016 à la Bretagne afin d'investiguer :

- la répartition du vecteur *Ixodes ricinus* en Alsace et en Bretagne,
- le risque acarologique de borréliose de Lyme (BL) en Alsace et en Bretagne,
- le taux de nymphes infectées par *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi* sensu lato mais également par d'autres pathogènes comme *Anaplasma phagocytophilum* ou les *Borrelia* agents de fièvre récurrente (*B. miyamotoi*)).

3.2.2. Choix des sites et méthode de collecte

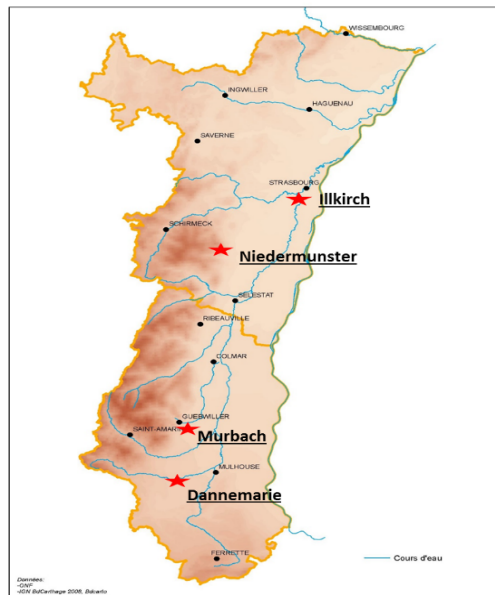
En 2016, afin d'étudier la répartition du vecteur *Ixodes ricinus*, nous avons effectué 38 collectes sur quatre sites répartis dans le Bas-Rhin et le Haut-Rhin (voir carte ci-dessous) et 30 collectes sur trois sites en Bretagne (voir carte ci-dessous).

En Alsace, ces sites ont été choisis en fonction de leur localisation géographique, de l'activité humaine qui s'y déroule et des données bibliographiques, en particulier l'étude du CNR *Borrelia* réalisée en Alsace en 2003 et 2004 (Ferquel et al., 2006). L'enquête épidémiologique humaine réalisée au début des années 2000, avait montré 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.

Nous y avons ajouté le site d'Illkirch qui constitue une zone périurbaine, à risque acarologique également, du fait de sa grande fréquentation.

Répartition des sites investigués en Alsace en 2016



Les sites collectés mensuellement de mars à novembre sont les sites de :

- Niedermunster et d'Illkirch pour le Bas-Rhin,
- Murbach et Dannemarie pour le Haut-Rhin.

En 2016, nous avons intensifié et élargi les travaux de collectes en étudiant la situation acarologique en **Bretagne** grâce à la collaboration du Dr B. Degeilh du CHU de Rennes. Trois sites y ont été collectés : Liffré et deux sites en bois de Soeuvres. L'objectif est de pouvoir comparer ce risque acarologique dans deux grandes régions de France, au Nord-Ouest et au Nord-Est.

Carte de répartition des sites investigués en Bretagne en 2016



Dans tous les sites, la méthode de collecte utilisée a été la même : la technique du drapeau qui privilégie la capture des tiques à l'affût sur la végétation. Trente tirs environ ont été faits par transect. Un tir correspond à 10m et tous les 10m, les tiques présentes sur le tissu sont prélevées vivantes, mises en tube et ramenées au laboratoire où elles sont congelées dans les 24h à -80°C jusqu'à analyse. L'étoffe de tissu faisant 1m², cela permet de définir la densité en tiques par 100 m².

Résultats :

ALSACE

Mois de collecte	Dannemarie		Murbach		Illkirch		Niedermunster	
	Nymphes	Adultes	Nymphes	Adultes	Nymphes	Adultes	Nymphes	Adultes
Février	NC		NC		14	1	2	0
Mars	46	3	88	4	35	0	78	9
Avril	35	12	153	9	21	0	136	44
Mai	46	0	312	7	21	3	181	54
Juin	44	0	285	6	221	15	213	18
Juillet	17	2	166	2	97	1	86	16
Août	14	1	50	2	23	0	47	5
Septembre	5	0	10	0	12	1	42	18
Octobre	0	0	2	0	3	0	7	0
Novembre	1	0	0	0	2	0	3	4
Décembre	NC		NC		NC		NC	
TOTAL	208 + 18		1 066 + 30		449 + 21		795 + 168	

NC : Non collectable (gel, neige, pluie)

BRETAGNE

Mois de collecte	Rennes		Soeuvres 1		Soeuvres 2	
	Nymphes	Adultes	Nymphes	Adultes	Nymphes	Adultes
Février	NR		NR		NR	
Mars	121	NR	206	NR	425	NR
Avril	192	NR	340	NR	695	NR
Mai	241	NR	307	NR	443	NR
Juin	451	NR	31	NR	86	NR
Juillet	227	NR	88	NR	88	NR
Août	113	NR	22	NR	38	NR
Septembre	23	NR	12	NR	46	NR
Octobre	9	NR	10	NR	46	NR
Novembre	5	NR	10	NR	51	NR
Décembre	0	NR	5	NR	41	NR
TOTAL	1 382		1 031		1 959	

NR : Non réalisé

Pour l'Alsace, les collectes ne peuvent en général pas être réalisées en décembre, janvier ni février compte tenu du gel, de la neige ou des précipitations. En hiver, on observe une diapause hivernale avec absence de tiques certains mois comme novembre ou décembre.

La comparaison des données de collectes sur les régions Alsace et Bretagne sur l'année 2016 montre que la Bretagne avec son climat océanique, présente une activité des tiques plus longue durant l'année avec une activité intense dès le mois de mars par différence avec l'Alsace (climat continental), où elle est retardée d'un mois. Ces tendances sur une année nécessitent d'être confirmées par une étude sur plusieurs années.

Au total sur l'ensemble des sites, ce sont 6 890 nymphes qui ont été collectées.

3.2.3. Analyse des données de densité des nymphes en 2016

La densité en nymphes notée D a été calculée sur les différents sites 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.

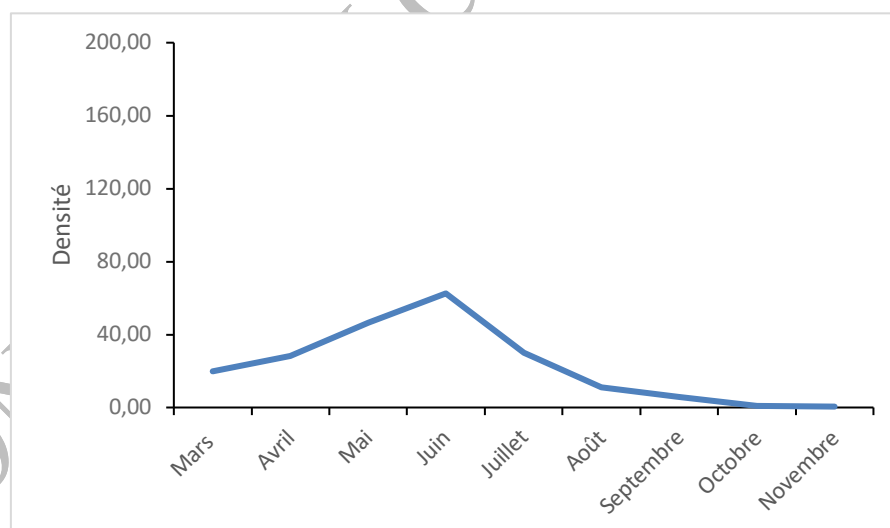
En Alsace, les densités en nymphes les plus élevées ont été observées à Murbach et les densités les plus élevées en adultes à Niedermunster. Ces deux sites constituent des sites de montagne par opposition à Illkirch (périurbain) et Dannemarie (site de plaine agricole).

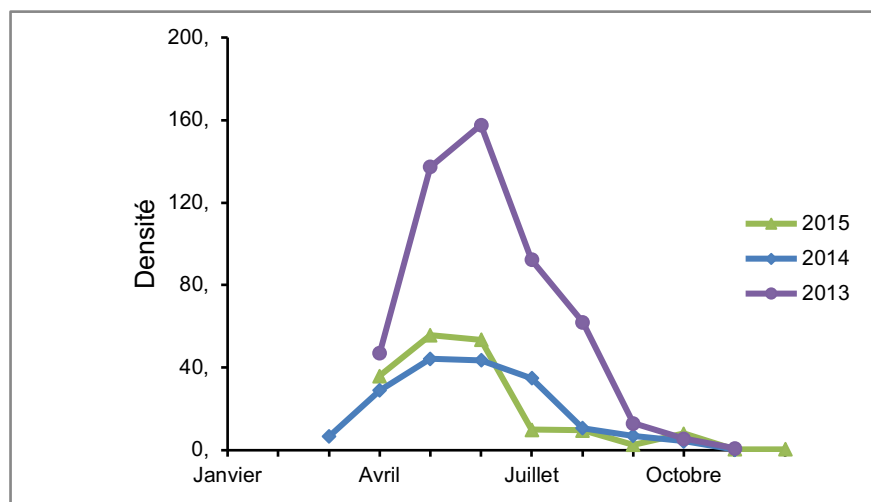
En Bretagne, le climat océanique permet une activité importante des tiques dès le mois de mars. De façon intéressante, la densité en nymphes collectées en 2016, est aussi importante voire plus importante qu'en Alsace alors que ces densités étaient plus basses en 2015.

Densité des nymphes par 100 m² en Alsace en fonction des mois de l'année

Mois de collecte	Total nymphes Alsace 2016	Densité
Mars	247	19,92
Avril	345	28,28
Mai	560	46,67
Juin	763	62,54
Juillet	366	30,00
Août	134	10,98
Septembre	69	5,75
Octobre	12	1,00
Novembre	6	0,50

Densités moyennes globales en Alsace en nymphes selon le mois de collecte en 2016 par rapport aux années précédentes

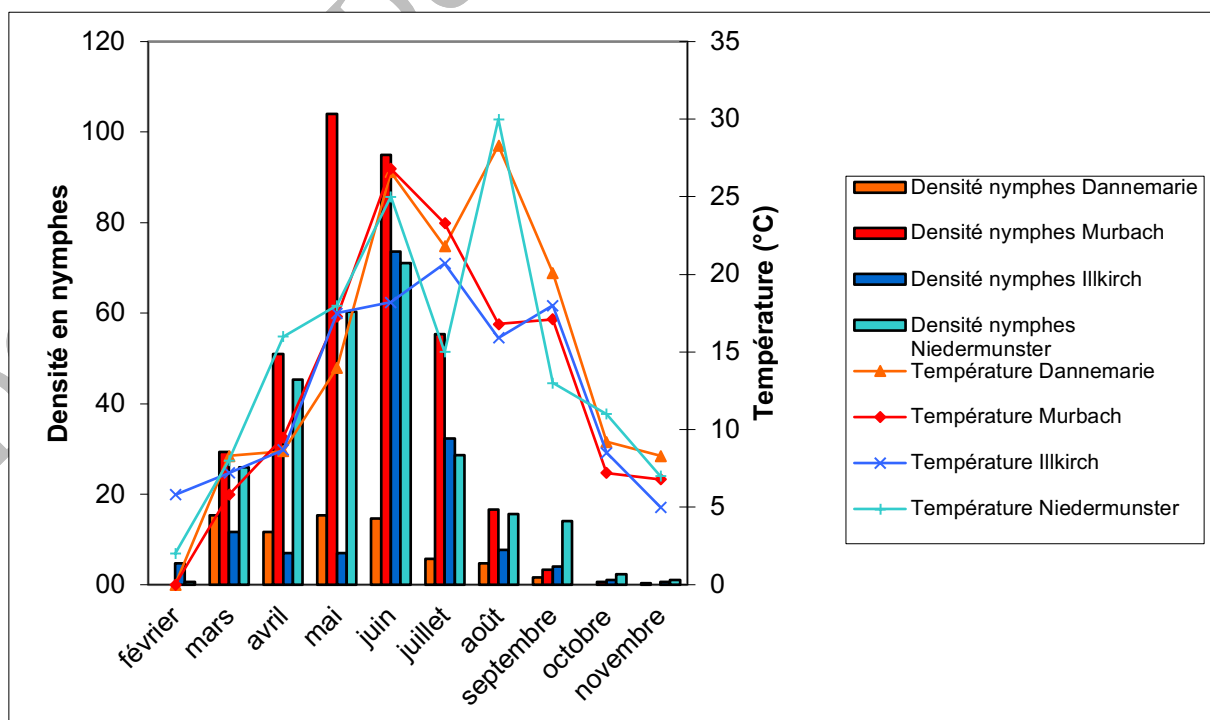




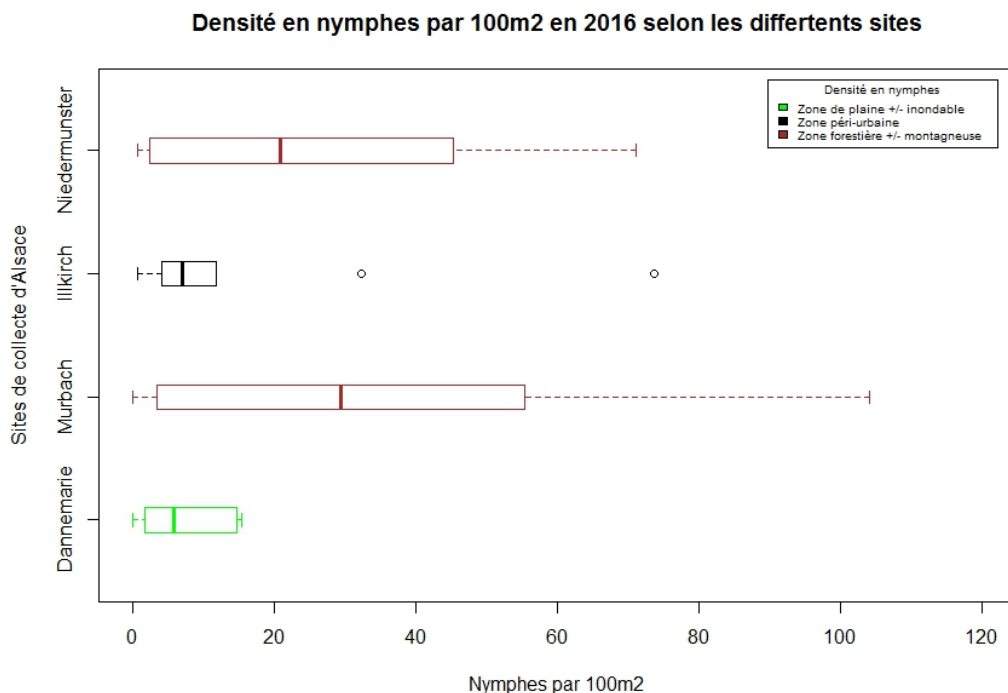
Le risque acarologique est donc variable d'une année sur l'autre. L'année 2016 se rapproche en Alsace des années 2014-2015, la densité élevée de l'année 2013 (> 150 nymphes/100 m²) n'ayant pas à ce jour été à nouveau observées.

En 2016, nous avons commencé également à étudier l'impact de certains facteurs comme la température. Elle constitue un facteur abiotique important qui peut avoir un impact notable sur la densité en tiques du genre *Ixodes*, très sensibles à la dessiccation.

Evolution au cours de l'année 2016 de la densité de nymphes d'*Ixodes* sur les sites en Alsace selon la température



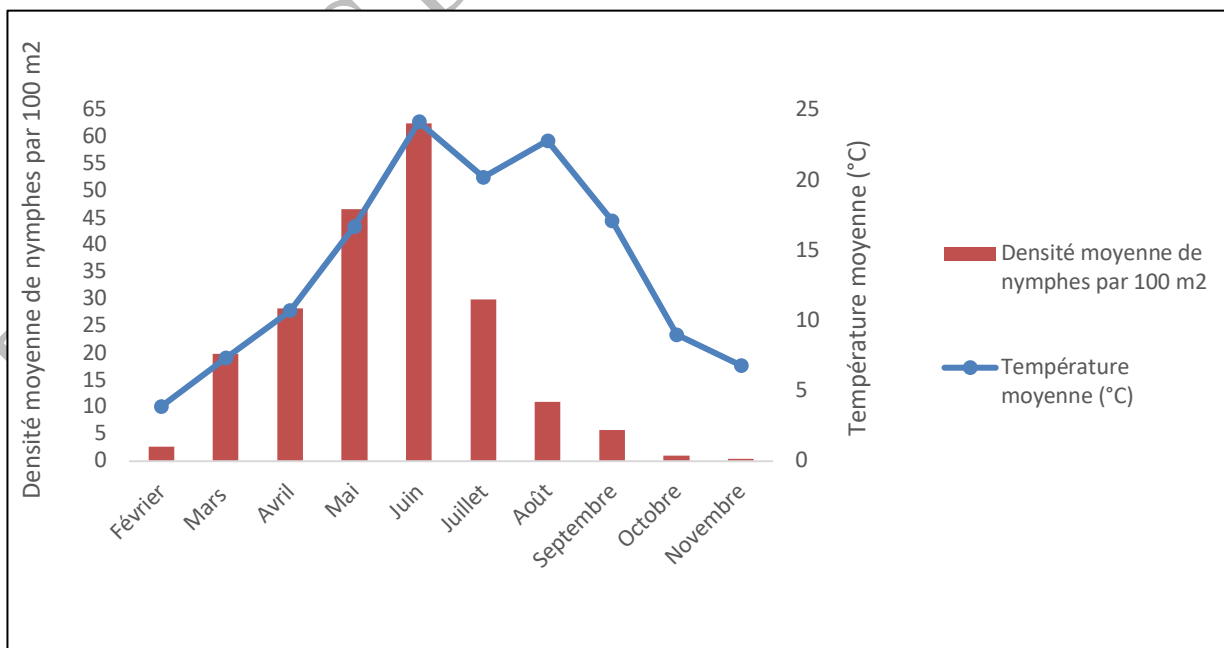
Evolution globale au cours de l'année 2016 de la densité en nymphes d'*Ixodes ricinus* selon la température en Alsace



Il apparaît que les zones forestières de moyenne montagne (Niedermunster et Murbach) sont plus à risque acarologique que les zones de plaine ou les zones périurbaines.

BRETAGNE

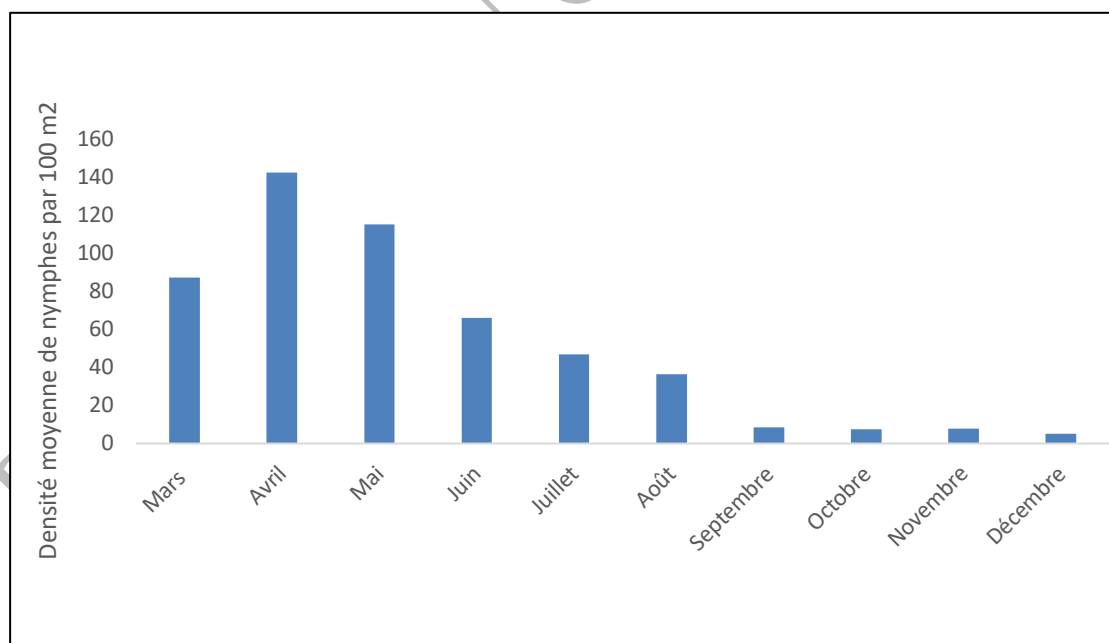
Tableau récapitulatif mensuel de 2016 des densités en nymphes pour 100m2 en Bretagne



Année 2016	Total nymphes Bretagne en 2016	Densité moyenne de nymphes par 100 m ²
Février	NR	NR
Mars	752	87,4
Avril	1227	142,7
Mai	991	115,2
Juin	568	66
Juillet	403	46,9
Août	313	36,4
Septembre	73	8,5
Octobre	65	7,6
Novembre	66	7,7
Décembre	46	5,3
TOTAL	4458	51,8

NR : Non réalisé

Graphique récapitulatif mensuel de 2016 des densités mensuelles en nymphes par 100m2 en Bretagne en 2016



En comparant les sites de l'Est (Alsace) et de l'Ouest de la France (Bretagne), les densités en tiques à la stase nymphale sont plus importantes en 2016 en Bretagne qu'en Alsace au moment du pic d'activité en avril/mai/juin : 87/142/115 pour la Bretagne et 28/46/62 pour l'Alsace. Cette différence entre les deux zones géographiques va être étudiée durant la prochaine mandature du CNR. Elle pourrait être due à une activité plus importante pendant toute l'année

sans vraie diapause hivernale en climat océanique en Bretagne. En climat continental, compte tenu des températures basses en hiver, la population de tiques est moins active et peut être touchée en termes de survie pendant la diapause hivernale.

3.2.4. Analyse des données d'infection des nymphes en Alsace et en Bretagne en 2016

3.2.4.1 Infection des nymphes à *Borrelia burgdorferi*

En 2016, 1 924 nymphes ont été testées pour *Borrelia burgdorferi* par PCR ciblant un gène de *B. burgdorferi* sensu lato (gène *flaB*). Ces nymphes sont issues des collectes effectuées sur 4 sites échantillonnés mensuellement en Alsace et trois sites en Bretagne.

Par site, un échantillonnage de 60 nymphes est sélectionné par les tiques récoltées et chaque tique est testée individuellement pour la détection des agents infectieux sélectionnés.

Taux d'infection globale et densité de nymphes par 100m² infectées par *Borrelia burgdorferi* en 2016 en Alsace et en Bretagne

ALSACE

Parmi les 1 232 nymphes analysées, 209 étaient positives à *B. burgdorferi*, soit un taux moyen d'infection d'environ 17%.

Le détail des taux d'infection par site est indiqué ci-dessous.

Sites	Nymphes testées	Densité en nymphes	Nymphes positives	Densité en nymphes infectées	Taux d'infection (%)
ALSACE	1 232	10,7	209	1,8	16,96
Haut-Rhin	587	10,9	111	2,1	18,9
Bas-Rhin	645	10,5	98	1,6	15,2

BRETAGNE

En 2016, 692 nymphes en Bretagne ont été testées, 85 étaient positives à *B. burgdorferi*, soit un taux d'infection d'environ 12 %. Le détail des taux d'infection par site est indiqué ci-dessous.

Sites	Nymphes testées	Densité totale en nymphes	Nymphes positives	Densité en nymphes infectées	Taux d'infection (%)
-------	-----------------	---------------------------	-------------------	------------------------------	----------------------

BRETAGNE	692	50,8	85	6,2	12,3
-----------------	------------	-------------	-----------	------------	-------------

Si on analyse les deux régions, l'Alsace présente des taux d'infection plus élevés sur deux sites (Murbach et Illkirch) avec 22,7% et 21,7 % respectivement de tiques infectées. Cependant, un site en Bretagne présente un taux d'infection très proche de ces deux sites alsaciens avec un taux d'infection de 17,9 % (Bois de Soevre 1).

3.2.4.2 Infection des nymphes à *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* selon les pays d'Europe de l'Ouest.

Les nymphes ont été testées par PCR ciblant un gène d'*Anaplasma phagocytophilum* (*msp2/p44*). Ces nymphes sont issues des collectes de l'année 2016 d'Alsace et de Bretagne.

Parmi ces 1 924 nymphes analysées, 17 étaient positives en Alsace et 10 étaient positives en Bretagne à *Anaplasma phagocytophilum* soit un taux d'infection de 1,4 % en moyenne, identique en Alsace et en Bretagne.

Ce taux est similaire à ceux déjà obtenus les années précédentes en Alsace qui variaient entre 1 et 2% des tiques infectées. Il est intéressant de noter que ce taux est similaire en Bretagne et en Alsace alors que les cas cliniques humains sont actuellement principalement répertoriés en Alsace. Il conviendrait donc de rechercher aussi ce pathogène en Bretagne chez des patients présentant un syndrome pseudo-grippal estival et pour lesquels une sérologie Lyme serait négative.

**Taux d'infection globale et densité de nymphes pour 100m²
par *Anaplasma phagocytophilum* en 2016 en Alsace**

Sites	Nymphes testées	Densité en nymphes	Nymphes positives	Densité en nymphes infectées	Taux d'infection (%)
ALSACE	1 232	10,7	17	0,1	1,4
Haut-Rhin	587	10,9	3	0,05	0,5
Bas-Rhin	645	10,5	14	0,2	2,2

**Taux d'infection globale et densité de nymphes pour 100m²
par *Anaplasma phagocytophilum* en 2016 en Bretagne**

Sites	Nymphes testées	Densité totale en nymphes	Nymphes positives	Densité en nymphes infectées	Taux d'infection (%)
BRETAGNE	692	50,8	10	0,7	1,4

3.2.4.3 Infection des nymphes par les *Borrelia* agents de fièvre récurrente dont *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. A ce jour, aucun cas n'a été signalé en France.

Nous avons cherché à savoir si cette espèce de *Borrelia*, ou d'autres espèces responsables de fièvre récurrente, était présente en Alsace. La surveillance de ce pathogène dans les tiques *Ixodes* était réalisé par le CNR depuis 2013 en Alsace et a été étendue en 2016 à la Bretagne.

Taux d'infection globale et densité de nymphes pour 100m² par *Borrelia miyamotoi* en 2016 en Alsace et en Bretagne

Sites	Nymphes testées	Densité en nymphes	Nymphes positives	Densité en nymphes infectées	Taux d'infection (%)
ALSACE	1232	10,7	28	0,2	2,3
Haut-Rhin	587	10,9	18	0,3	3,1
Bas-Rhin	645	10,5	10	0,2	1,6

Sites	Nymphes testées	Densité totale en nymphes	Nymphes positives	Densité en nymphes infectées	Taux d'infection (%)
BRETAGNE	692	50,8	10	0,7	1,4

En 2016, nous avons analysé un échantillonnage de 1924 nymphes en Alsace et en Bretagne, 38 étaient positives, soit 2,3 % de nymphes infectées par *Borrelia miyamotoi* en moyenne sur le territoire Alsacien et 1,4 % en moyenne en Bretagne.

3.2.4.4. Analyse des pathogènes dans les nymphes dans leur globalité

NB : pour des raisons de disponibilité du personnel technique (congé maladie et congé maternité) au CNR Borrelia durant 2016, la détermination précise des différentes espèces de Borrelia au sein du complexe B. burgdorferi sensu lato a été limitée en 2016 à l'espèce B. afzelii, qui est celle circulant le plus fréquemment tant dans les tiques qu'en pathologie humaine, en Europe et en Alsace.

D'autre part, pour les sites collectés en Bretagne, la détermination des pathogènes dans les tiques n'a été faite que d'Avril à juin 2016, pic d'activité des tiques. Ces données seront également complétées ultérieurement.

Ces données seront complétées durant l'2017 au retour à la normale des effectifs.

ALSACE

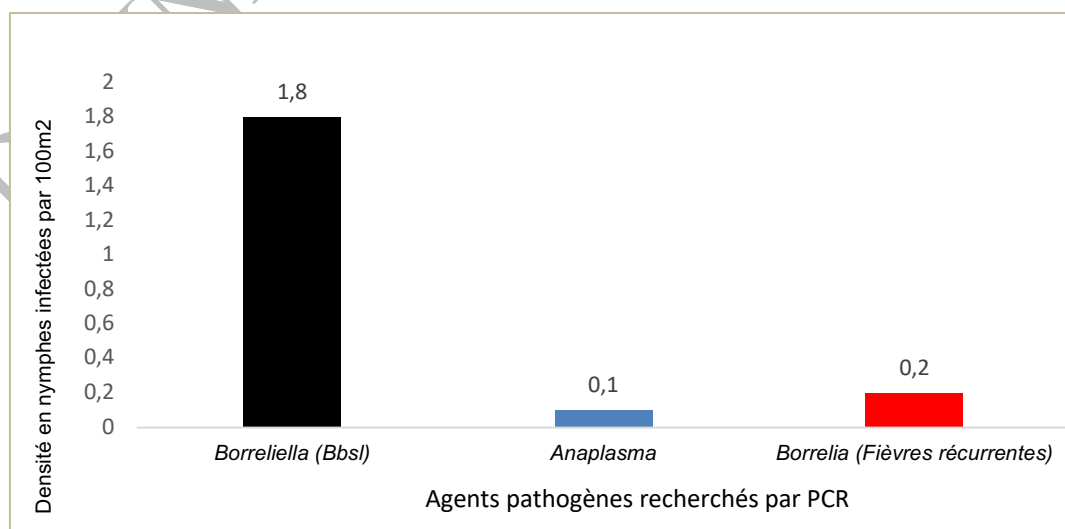
Site	Espèce	Taux de nymphes infectées par au moins une bactérie (%)
Dannemarie	2 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 22 <i>Borrelia afzelii</i> 6 <i>Borrelia spp.*</i> +2 Co-infections <i>Borrelia**</i> 3 <i>Borrelia miyamotoi</i>	15,22 (35/230)
Murbach	1 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 21 <i>Borrelia afzelii</i> 56 <i>Borrelia spp.*</i> +4 Co-infections <i>Borrelia**</i> 13 <i>Borrelia miyamotoi</i> 2 <i>Borrelia spp***</i>	27,17 (97/357)
Illkirch	4 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 19 <i>Borrelia afzelii</i> 32 <i>Borrelia spp.*</i> +4 Co-infections <i>Borrelia**</i> 6 <i>Borrelia miyamotoi</i> 1 <i>Borrelia***</i>	26,09 (66/253)
Niedermunster	10 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 9 <i>Borrelia afzelii</i> 33 <i>Borrelia spp.*</i> 1 Co-infection <i>Borrelia**</i> 2 <i>Borrelia miyamotoi</i> 1 <i>Borrelia spp***</i>	14,03 (55/392)

* espèces de *Borrelia* autres que *B. afzelii* en cours d'identification

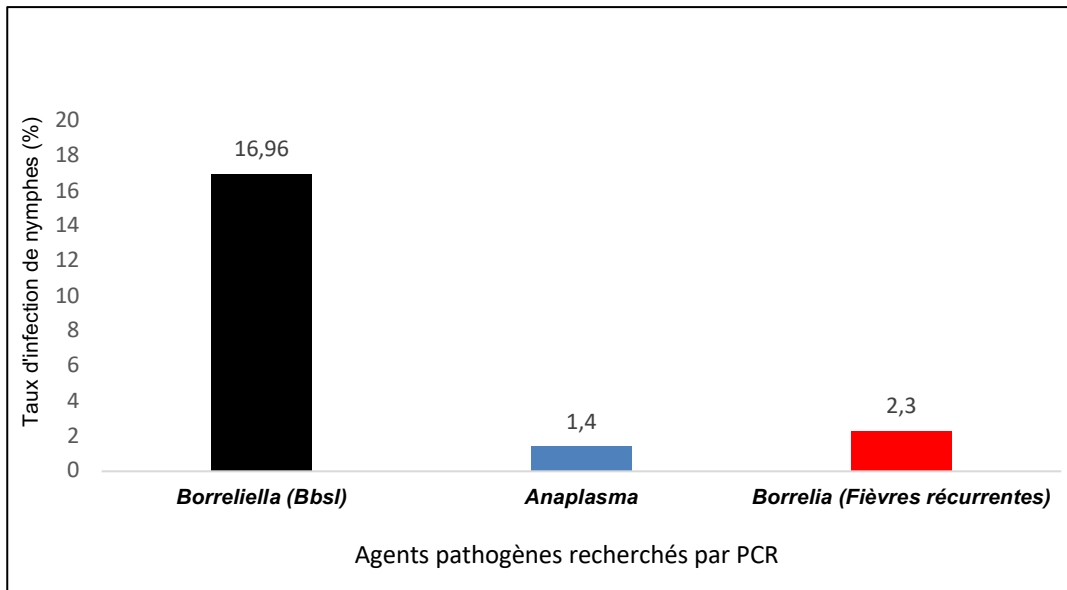
** tique présentant une co-infection de différentes espèces de *Borrelia* dont *B. afzelii*

*** détermination en cours de l'espèce de *Borrelia* agent de fièvre récurrente

Densité de nymphes d'*Ixodes ricinus* infectées par 100 m² en Alsace en 2016



Taux d'infection des nymphes d'*Ixodes ricinus* en Alsace en 2016



BRETAGNE

Espèces détectées dans les tiques collectées en 2016 (mars-avril-mai-juin) sur les sites de Bretagne

Site	Espèce
Forêt de Rennes	3 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 34 <i>Borreliella spp</i> * 2 Co-infections <i>Borreliella</i> ** 3 <i>Borrelia spp</i> ***
Bois de Soevre 1	1 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 8 <i>Borreliella afzelii</i> 22 <i>Borreliella spp</i> * 8 Co-infections <i>Borreliella</i> ** 3 <i>Borrelia spp</i> ***
Bois de Soevre 2	6 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 1 <i>Borreliella afzelii</i> 9 <i>Borreliella spp</i> * 1 Co-infection <i>Borreliella</i> ** 4 <i>Borrelia spp</i> ***

* espèces de *Borreliella* autres que *B. afzelii* en cours d'identification

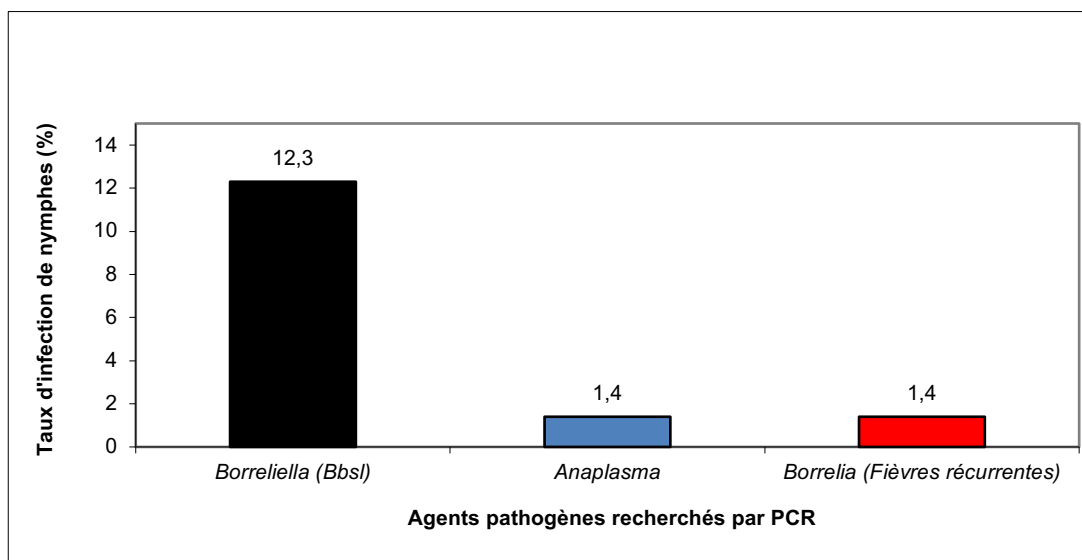
** tique présentant une co-infection de différentes espèces de *Borreliella* dont *B. afzelii*

*** détermination en cours de l'espèce de *Borrelia* agent de fièvre récurrente

NB : Les taux d'infection ne sont pas mentionnés car ils sont encore incomplets à ce stade.

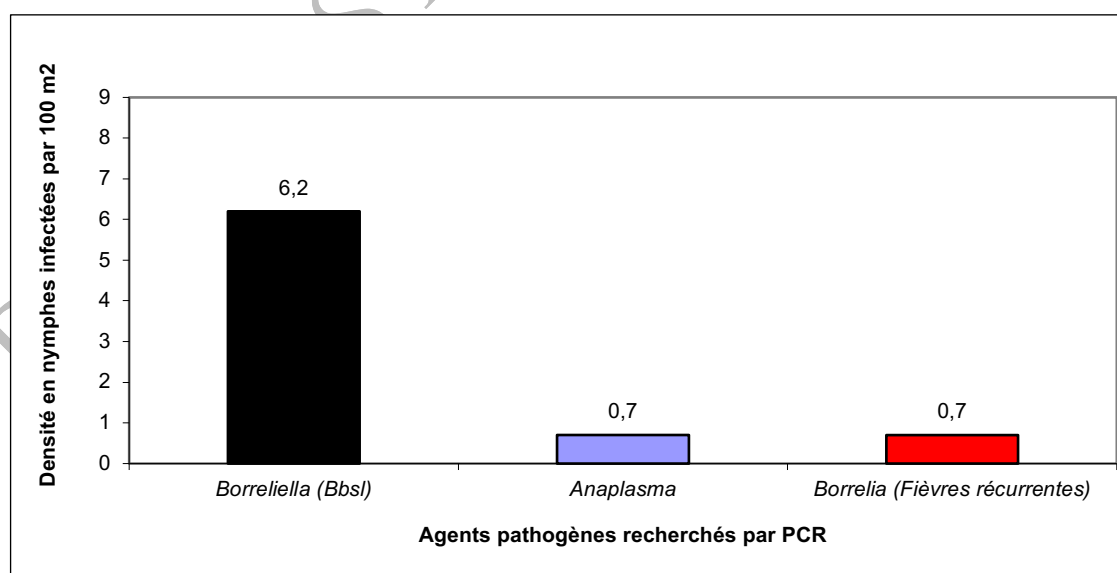
On constate qu'il existerait a priori un gradient Est-Ouest d'espèces de *Borrelia* présentes dans les tiques. Ainsi le pourcentage de tiques infectées par des espèces autres que *B. afzelii* représente 44% des espèces présentes dans les tiques en Alsace (71/163 tiques positives), avec des variations importantes selon les sites. Ce pourcentage est beaucoup plus faible en Bretagne (12% soit 9/65 tiques positives) où l'ensemble des autres espèces est majoritaire.

Taux d'infection des nymphes d'*Ixodes ricinus* en Bretagne en 2016



Le taux moyen d'infection des nymphes par *Anaplasma phagocytophilum* est similaire depuis plusieurs années, situé entre 1 et 2%. De même, le taux d'infection des nymphes par *Borrelia* du groupe fièvre récurrente se situe entre 1 et 2%.

Densité de nymphes d'*Ixodes ricinus* infectées par 100 m² en Bretagne en 2016



3.3. *Participation aux réseaux de surveillance*

3.3.1. **Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France – Réseau Sentinelles**

Ce travail prospectif 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 les années précédentes

Le CNR participe à des réunions téléphoniques trimestrielles ou semestrielles 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 2015, le réseau a publié dans Eurosurveillance, **l'incidence annuelle de la borréliose de Lyme estimée au niveau national à 51 cas/100 000 habitants avec de fortes disparités régionales** (>150 cas/100 000 habitants en Limousin et en Alsace par exemple). La validation des cas 2016 n'est pas terminée au jour de ce rapport.

3.3.2. **Contribution à la surveillance internationale**

3.3.2.1. **Réseau EUCALB - ESGBOR**

Le CNR des *Borrelia* a participé comme les années précédentes au groupe **ESGBOR** (European Study Group on Lyme Borreliosis) créé au sein de l'ESCMID. Benoît Jaulhac fait partie du bureau du groupe. A la fin 2016, le groupe ESGBOR comprend 75 membres de 30 pays. Le groupe ESGBOR se réunit annuellement lors du congrès de l'ECCMID (Amsterdam en 2016).

- En 2016, le CNR des *Borrelia* a participé à un travail du groupe sur la place des tests biologiques dans le diagnostic de la borrléiose de Lyme. L'article sous la forme d'une revue collective sera finalisée au début de l'année 2017 et soumis pour publication à *Clinical Microbiology and Infection*, dont le comité éditorial a accepté le principe.

- Le CNR des *Borrelia* participe à l'apport de la technique MLST dans la connaissance des espèces de *B. burgdorferi* si en Europe.
- Un autre travail collectif a débuté sur la comparaison des protocoles de traitement antibiotique des différentes formes de borréliose de Lyme dans les différents pays européens.

Parallèlement, le groupe répond aux demandes des praticiens, biologistes et patients qui s'adressent à lui. B. Jaulhac participe à cette activité européenne.

3.4. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance - Réseau ALSA(CE)TIQUE (Participation à la surveillance de 3 maladies transmises par les tiques en Alsace)

Durant cette mandature du CNR, un réseau piloté par la CIRE (cellule inter-régionale d'épidémiologie) Nord-Est a mis en place une étude épidémiologique « Alsacétiques ». Cette étude prospective porte sur 3 maladies transmises par les tiques : la borréliose de Lyme, l'encéphalite à tiques (TBEV) et l'anaplasmose granulocytaire humaine Cette étude s'est déroulée du 1^{er} janvier 2014 au 31 décembre 2015.

Les caractéristiques des cas recensés permettront d'améliorer leur prévention et leur traitement, d'estimer l'incidence de ces pathologies et aussi de comparer cette incidence à celle observée lors du précédent réseau de 2003-2004.

Au total, 388 médecins ont participé au réseau, soit 11 % des praticiens d'Alsace. Parmi eux, 41% ont participé à une session de formation organisée au début de l'étude et animées par un binôme CNR – Infectiologue. Parmi ces médecins participants, seuls 6% ont arrêté leur participation en cours d'étude. Les participants étaient majoritairement des médecins généralistes libéraux (82%) et 38 (10%) des hospitaliers.

Ce signalement a été 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.

En 2016, comme lors des deux années précédentes, le comité de pilotage, dont fait partie le CNR *Borrelia*, l'ARS Alsace et plusieurs infectiologues, s'est réuni 2 fois par an pour valider les cas déclarés par les médecins selon des critères de définition de cas définis au préalable sur la base des référentiels européens, définissant des cas certains et des cas probables.

L'analyse épidémiologique, réalisée par la CIRE Nord-Est, a pour objectifs : (i) d'évaluer l'incidence régionale des pathologies transmises par les tiques, dont celle de la borréliose de Lyme par rapport à l'étude épidémiologique humaine précédente de 2001- 2003, (ii) de corrélérer ces données humaines avec les données vectorielles du CNR recueillies durant la même période.

En septembre 2016, a eu lieu une réunion de discussion des principaux résultats descriptifs de l'étude afin de les valider au sein du COPIL Alsa(ce)tique et de réfléchir ensemble à leur valorisation scientifique.

Un 2^{ème} bulletin relatif à l'étude a été validé afin d'être mis à disposition sur les sites internet de Santé publique France et de l'ARS. Il comprend les résultats descriptifs qui seront complétés par une analyse descriptive des déclarations de cas exclus, ainsi qu'une comparaison des résultats avec l'étude réalisée en 2001-2003 (réalisée dans les limites méthodologiques imposée par les différences de définitions de cas entre les 2 études).

4. Alerte

Durant la mandature 2012-2016, le CNR *Borrelia* a été fréquemment sollicité par de nombreux interlocuteurs, médecins (cliniciens et biologistes), patients (démarches individuelles et associations de patients), instances médicales officielles et sociétés savantes, INVS, DGS. Ces sollicitations correspondent à des actions directement ou indirectement liées à la divergence de pratiques cliniques et biologiques ne correspondant pas aux recommandations nationales ou européennes diagnostiques et thérapeutiques de la borréliose de Lyme.

Modalités d'interface avec Santé Publique France

Le contexte épidémiologique de la borréliose de Lyme est moins propice à la notion d'alerte épidémiologique que d'autres pathogènes bactériens ou viraux. Classiquement, le nombre de cas de borréliose peut varier progressivement par suite d'un contact accru de la population avec les tiques, par suite d'une augmentation du nombre de tiques ou par suite de l'augmentation de leur taux d'infection. La surveillance habituelle est donc généralement suffisante.

Néanmoins, en effectuant une surveillance vectorielle et humaine dans certaines régions, le CNR est à même de faire remonter à l'InVS toute augmentation anormale du nombre de cas observés ou qui seraient signalés au CNR par les ARS par exemple, ou toute survenue d'une pathologie non usuelle qui pourrait apparaître comme due à une infection par *Borrelia*.

Dans de tels contextes, le CNR transmet sans délai ces informations à Santé publique France et vérifie la réalité des données biologiques et des critères de définition des cas remontés au CNR.

Cette alerte couvre potentiellement :

- **une augmentation rapide anormale du nombre de cas de borréliose de Lyme**, observés par le CNR ou qui lui seraient signalés par des cliniciens du territoire français ou par les ARS par exemple :

- **la survenue d'une nouvelle forme clinique ou d'une forme clinique rare de borréliose de Lyme**. Ainsi, le CNR a durant son mandat fait état et publié un cas d'endocardite de Lyme et un cas d'atteinte articulaire du gros orteil.
- **une augmentation de la fréquence de détection dans *Ixodes ricinus* d'un agent pathogène rare peu isolé jusqu'à présent**, tel que *B. miyamotoi*, *Anaplasma phagocytophilum*, identifiés actuellement dans 2% environ des tiques.
- **la détection dans *Ixodes ricinus* d'un agent pathogène non isolé jusqu'à présent**, tel que :
 - * une autre espèce de *Borrelia* agent de fièvres récurrentes car notre méthode PCR permet leur recherche systématique en même temps que *B. miyamotoi*
 - * *B. mayonii*, non encore détecté en Europe mais présent dans quelques états des USA. Notre méthode PCR pour *Borrelia* couvre sa recherche systématique
- **une augmentation de la détection des cas humains d'anaplasmose**. Ce pathogène ne fait pas partie des *Borrelia-Borrelia* mais il est transmis à l'Homme par *Ixodes ricinus*

et son importance clinique est indéniable et la fréquence de ces manifestations cliniques non exceptionnelle, au moins dans le Grand-Est de la France. .

Le signalement de ces alertes se fera comme dans le mandat précédent par mail et appel téléphonique au département maladies infectieuses de Santé publique France.

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

5.1. Enseignement, formation et stagiaires

5.1.1 Enseignement

« *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^{ème} et 4^{ème} année - Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg.

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

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

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

« **La borréliose de Lyme** » - **N. BOULANGER**, Faculté de pharmacie de Strasbourg, 6^{ème} année.

« **Les tiques et maladies transmises** », **N. BOULANGER** - Faculté de pharmacie de Strasbourg, 3^{ème} année.

« **Rôle des arthropodes dans la transmission des pathogènes : exemple de la borréliose de Lyme** »- **N. BOULANGER**, Faculté de Médecine, Master 1 de physiopathologie moléculaire et cellulaire.

« **Borréliose de Lyme : actualités** », **N. BOULANGER**, Faculté de Médecine, Master de physiopathologie moléculaire et cellulaire.

« **Borréliose de Lyme : la bactérie, la tique, l'hôte : qui manipule qui ?** », **N. BOULANGER**, Faculté des Sciences, cours dispensé aux étudiants du Master 2 de microbiologie.

5.1.2. Formation médicale continue aux professionnels de santé

- UTIP – Formation continue pour les pharmaciens d'officine : **N. BOULANGER**
UTIP Nancy : Les tiques : mieux les connaître pour mieux s'en protéger. Nancy, 3 mars 2016.
- CSF Diagnosis in theory and practice : **S. DE MARTINO** : Neuroborrélioses, données du CNR France. Wurzburg Allemagne, 14 septembre 2016.

5.1.3. Accueil de stagiaires

Stage obligatoire – 5^e année Pharmacie – terrain de stage CNR *Borrelia*

- Tutorat médical - Florian DUTA - Stage Internat du 04/01 au 30/04/2016 - Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg ; « Etude épidémiologique des fiches de renseignements du CNR *Borrelia* ».
- Tutorat médical - Valentin DO SACRAMENTO - Stage Industrie-Recherche du 04/01 au 30/04/2016 - Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg ; « Etude épidémiologique des fiches de renseignements du CNR *Borrelia* ».
- Tutorat médical - Laurent HANDWERCK - Stage Officine du 02/05 au 31/08/2016 - Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg ; « La neuroborréliose : manifestations cliniques et biologiques et analyse de données sur la période janvier 2012-juin 2016 ».

Stage de Master M1 :

- Viviane Espinassouze, 20 juin au 17 juillet 2016, Stage de Master 1-Limoges
- Lou Kawka, 4 au 19 juillet 2016, Stage de Master 1 -Physiopathologie, Strasbourg

Stage de Master M2 :

- Pierre Boyer : Décembre 2015- Juin 2016 - Master Infectiologie de Marseille
- Khaddy Diop : Janvier – Juin 2016 - Master physiopathologie, Strasbourg
- Jonathan Wolfgramm : Janvier-Juin 2016 - Master microbiologie, Strasbourg.

Thèse de doctorat, participation à des jurys

- Direction de thèse d'Université - N. BOULANGER - B. JAULHAC : Valérie GOLDSTEIN: septembre 2012 – octobre 2017 « 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 2017 : « Rôle de la latence cutanée de *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans la physiopathologie de la borréliose de Lyme », AHU en médecine.
- Andrea GOMEZ : Septembre 2016- Février 2017 : doctorante stagiaire pour 6 mois. Collaboration avec l'Université de Neuchâtel sur l'épidémiologie de la borréliose de Lyme.
- Membres du jury de thèse de Médecine de l'Université de Strasbourg – Faculté de Médecine de Strasbourg de Marine TOPIN, 2016, N° 105, intitulée « L'évaluation des connaissances de la population générale sur la prévention de la maladie de Lyme, en Alsace ». B. JAULHAC et N. BOULANGER.
- Membres du jury de thèse de Pharmacie de l'Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie intitulée « *Candidatus Neoerhlichia mikurensis* » par Alban VIVIEN, le 18 avril 2016. B. JAULHAC et N. BOULANGER.

5.2. Guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

* Plaquettes pratiques pour les cliniciens et les biologistes

Sous l'égide de la Direction Générale de la Santé, le CNR a participé en 2015 à la réalisation de deux plaquettes d'information faisant le point sur le diagnostic clinique et biologique de la borréliose de Lyme.

Ces plaquettes ont ensuite été validées par plusieurs sociétés savantes et collèges professionnels (infectiologie, rhumatologie, dermatologie, neurologie, microbiologie, médecine générale) puis diffusées aux professionnels au courant du premier semestre 2016. Elles expliquent la démarche diagnostique en fonction des renseignements anamnestiques et cliniques et les limites de la sérologie pour l'aide au diagnostic de la borréliose de Lyme.

Elles sont disponibles sur le site de la DGS :

<http://social-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/maladies/maladies-infectieuses/article/maladie-de-lyme>

* Plaquette de prévention grand public

Sous l'égide de l'IREPS Alsace, le CNR a participé en 2016 à la réalisation d'une plaquette d'information faisant le point la prévention primaire et secondaire contre les tiques et les piqûres de tiques.

Cette plaquette est disponible sur le site de l'IREPS Alsace:

<http://www.irepsalsace.org/enfantetnature/>

5.3. Diffusion de l'information et site internet

5.3.1. Rétro-information aux partenaires

Un fois les informations validées pour leur diffusion, le retour d'information est effectué par mail adressé par liste de mailing et mise à disposition sur le site web du CNR

5.3.2. Diffusion grand public de l'information

➤ Médias

En 2016, 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. Parmi celles-ci :

- Inauguration de panneau de prévention contre les tiques et conférence sur les tiques. Pfaffenheim, 2 Juin 2016
- Article sur la prévention contre les tiques et les répulsifs. Le quotidien du Pharmacien, mai 2016 (Journaliste Caroline Nidelet)
- Article pour les « Dernières nouvelles d'Alsace », Journaliste Hannah Strobel, vendredi 8 juillet 2016
- Reportage sur les tiques, FR3 Alsace, Journaliste Anne-Laure Herbet, vendredi 15 juillet 2016
- Conférence sur les tiques et maladies transmises- Journée de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, 15 octobre 2016
- Reportage sur les activités de recherche du groupe Borréliose de Lyme – Novembre 2016 – Université de Strasbourg. Journaliste Baptiste Cogitore.
- <http://www.recherche.unistra.fr/index.php?id=25634>
Emission télévisée : Journal de 19h - « Alsace 20 : maladie de Lyme » ; Le 17 novembre 2016, Strasbourg.
- <http://www.alsace20.tv/VOD/Actu/24h-en-alsace/Maladie-Lyme-qui-faut-il-vraiment-avoir-peur-1YTY82DNwc.html>
- Salon du livre de Colmar, 26-27 novembre 2016 : Présentation du livre : « Sur les traces de la Maladie de Lyme » N. Boulanger, P. Haberer, T. Pfeiffer.

➤ Le site internet du CNR *Borrelia*

- Adresse site : <http://www.chru-strasbourg.fr/Les-centres-de-reference/Borrelia>
- Date de création : 2013

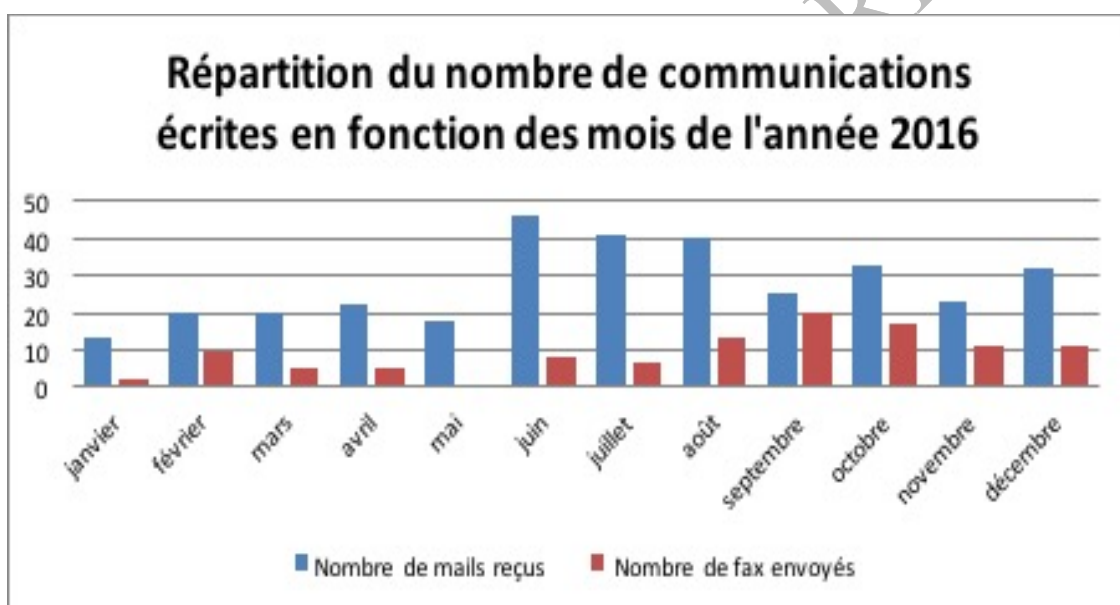
5.4. Activités de conseil aux professionnels

5.4.1. E-mails / fax / lettres

L'activité du CNR *Borrelia* est analysée ci-dessous à partir d'un fichier Excel contenant la saisie manuelle des E-mails et fax de l'année 2016. 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.

Nous avons recensé 446 communications écrites durant l'année 2016. Parmi ces communications écrites, il y avait 334 e-mails, 110 fax et 2 courriers.

Le graphique ci-dessous décrit la répartition de ces communications écrites en fonction des différents mois de l'année. On observe une répartition relativement homogène des demandes durant l'année avec une augmentation en juin, juillet et août. Le nombre de demandes varie de 20 à 35 par mois, avec des pics autour de 40 en été. En moyenne, le CNR recense une demande par jour tout au long de l'année.

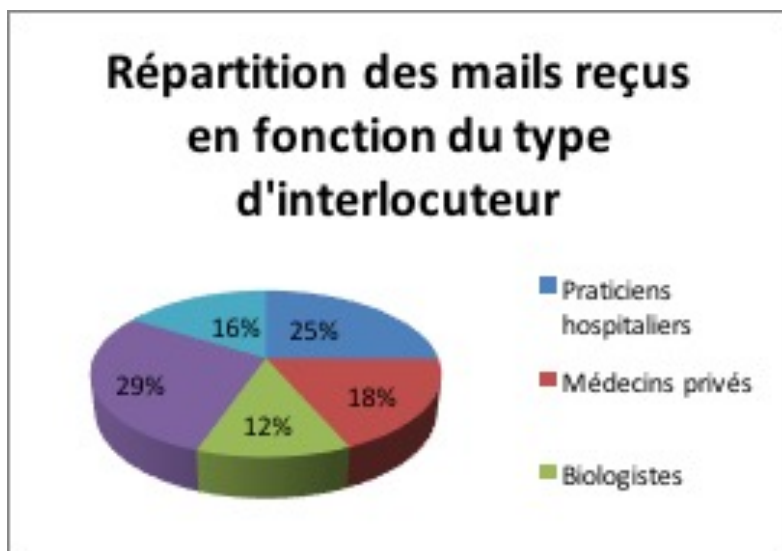


➤ Fax

Parmi les 110 fax envoyés, 96% représentaient des résultats d'analyses demandés majoritairement par des médecins. Les autres demandes correspondaient à des envois de documentation

➤ E-mails

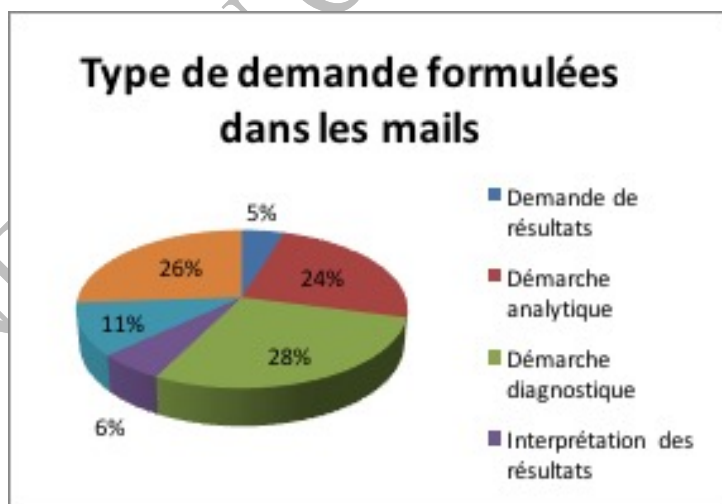
Les e-mails ont été analysés en fonction du type d'interlocuteur et de la demande formulée :



Les demandes provenaient essentiellement des praticiens hospitaliers et des médecins privés qui représentent à eux deux 43% des mails reçus au CNR. La demande des patients est également élevée et représente 29% des mails reçus. Par ailleurs, on recensait 16% d'e-mails provenant d'autres interlocuteurs comme des journalistes (9%), des organismes liés à la santé et à la recherche (ARS, DRCI).

La majorité des mails étaient envoyés dans l'optique d'une démarche diagnostique (28% contre 30% en 2015). Les demandes concernant une démarche analytique représentaient 24% des demandes formulées dans les e-mails.

Dans la catégorie « Autres » qui représente 26% des e-mails reçus, on retrouve principalement des demandes d'informations précises (ex : épidémiologie, modes de transmission...).



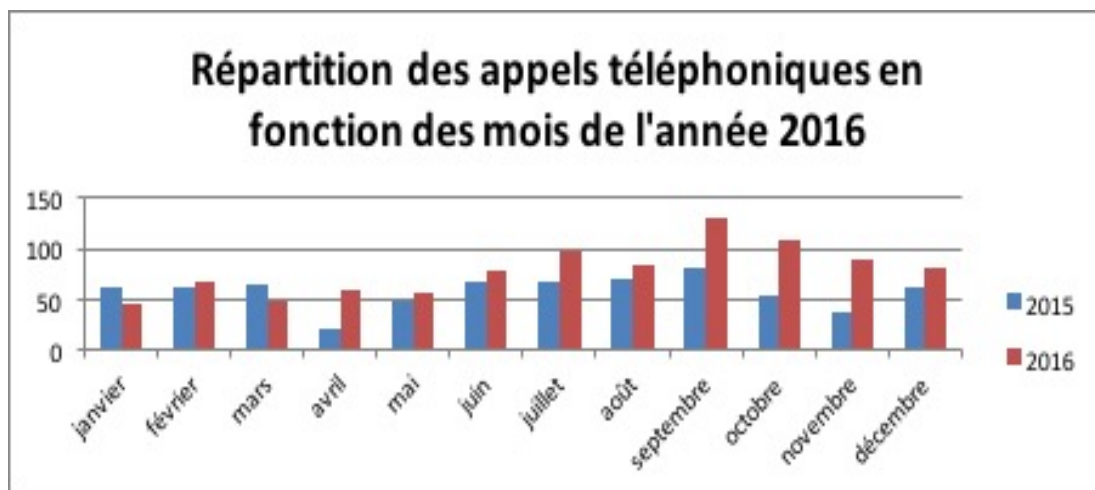
➤ **Communications téléphoniques**

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 2016. Nous avons extraits de ce fichier certaines informations à partir des conversations téléphoniques : date, durée de la communication, interlocuteur, sa provenance géographique et le thème de la discussion. Les résultats obtenus sont les suivants :

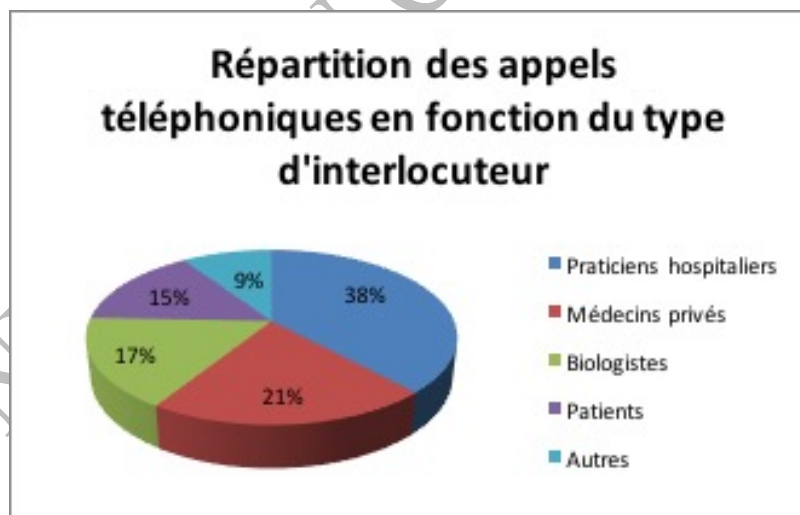
Le CNR a reçu 942 appels durant l'année 2016, contre plus de 689 en 2015 (+37%) (certains appels non tracés), soit 95h passées au téléphone. Parmi ces appels, 287 appels (30,5%) ont été

réceptionnés directement par les biologistes du CNR et 655 appels (69,5%) ont été réceptionnés par les techniciennes du CNR. La durée d'un appel est en moyenne de 6 minutes. 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 :

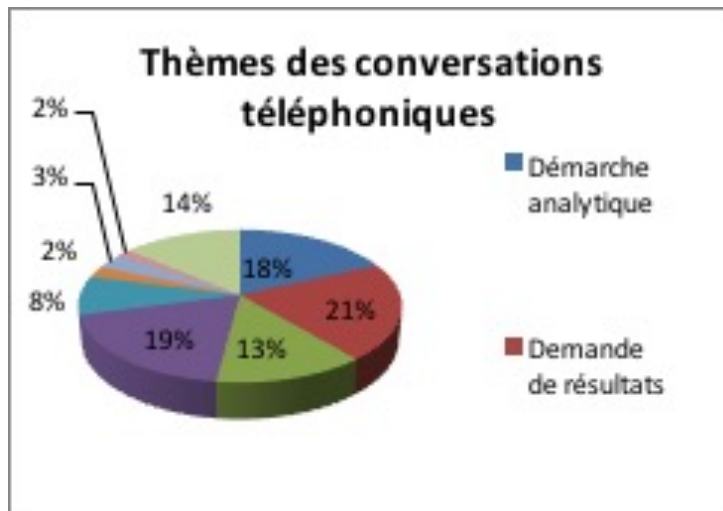


On observe une nette augmentation du nombre d'appels à partir du mois de juin avec une moyenne de 54,4 appels par mois pour le début d'année, contre 95,7 appels par mois pour la période de juin à décembre.



La majorité des communications téléphoniques ont été entretenues avec des médecins (59%), toutes spécialités et origines confondues. En général, ce sont des praticiens hospitaliers qui rencontrent des problèmes avec leurs patients et qui demandent conseil au CNR. Dans 17% des cas, les interlocuteurs étaient des biologistes et 15% étaient des patients. Les 9% des appels restants concernaient d'autres personnes (ARS, DRCI, journalistes etc.).

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



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

Les **demandes de résultats** étaient prépondérantes et s'élevaient à 21%, tandis que les **démarches diagnostiques cliniques** et les **démarches analytiques** étaient respectivement de 19% et 18%. Les demandes **d'interprétation des résultats** représentaient 13% des appels tandis que les conseils sur les démarches **d'envoi des prélèvements** en représentaient 8%. Enfin les autres thèmes regroupaient, en proportion égale (environ 2%), des **conseils sur les borrelie** et des **conseils thérapeutiques**.

En conclusion, cette analyse de près de 1 388 communications révèle que l'activité du CNR des *Borrelia*, a enregistré une forte hausse par rapport à 2015. Il ne s'agit pas seulement d'une activité analytique et d'expertise, le conseil et l'information occupent également une place importante.

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 borrelie de Lyme.

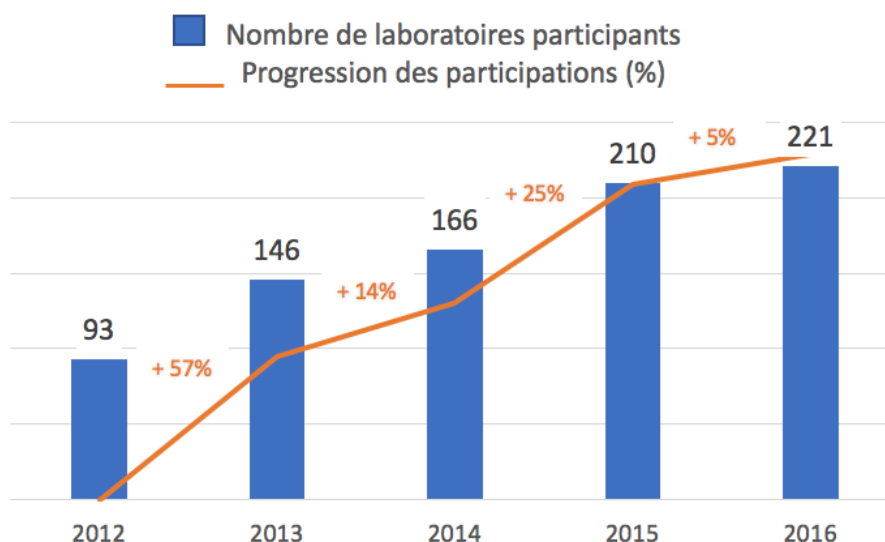
Le diagnostic de maladie de Lyme est délicat et l'interprétation des différentes analyses n'est pas toujours aisée pour certains prescripteurs. Cette activité de conseil permet d'optimiser les programmes à mettre en place afin d'aider aux mieux ces prescripteurs.

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

Préparation commune ANSM-CNR d'un EEQ de sérologie *Borrelia* pour l'année 2017 (Dr. Muriel Fromage). Choix ces profils des sérums qui seront proposés et propositions par le CNR de situations cliniques.

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

Durant les 5 années du mandat, avec l'aide logistique d'une association de biologistes, nous avons proposé chaque année aux laboratoires d'analyses médicales volontaires un contrôle de qualité externe (EEQ) pour la sérologie de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Nous avons diffusé tous les trimestres (4x/an) un sérum aux laboratoires participants, initialement de la région Nord-Est, puis depuis 2015, de tout le territoire national. En 2016, 221 laboratoires ont participé à cet EEQ.



La dernière analyse de cet EEQ en 2016 révèle que, parmi les 221 laboratoires participants, jusqu'à 13 trousse EIA différentes ont été utilisées. Onze d'entre elles permettaient la détection séparée des IgG et des IgM anti *B. burgdorferi*, les 2 autres permettaient la détection des Ig totales, ces techniques IgG+IgM combinées sont depuis 2015 de moins en moins utilisées : 1,5 % en 2016, ce taux est stable par rapport à 2015, en nette diminution par rapport aux années précédentes : - 4,5 % par rapport à 2014 et -19,5 % par rapport à 2013, où 20% des laboratoires participants utilisait ce genre de trousse. Il ya donc une évolution notable des pratiques des LABM sur ce paramètre.

En 2016, la proportion des différents coffrets ELISA utilisés est stable par rapport à 2015. Ainsi la technique IgG et IgM séparées de BioMérieux est largement majoritaire, utilisée par près de 60% des laboratoires. Parmi les autres coffrets, c'est Diasorin qui représente, comme les 4 années précédentes, le 2^{ème} choix en terme de fréquence d'utilisation (près de 30%).

Une technique de confirmation (WB ou immunoblot) a ensuite été réalisée par près de 30 % des participants. Ceux-ci utilisent des coffrets de divers fournisseurs (Bioadvance, Alldiag, Diasorin, Ingen, Viramed).

Le détail des 4 sérums fournis par le CNR et le % de réponses adéquates est résumé dans le tableau suivant :

	IgG	IgM	Réponses exactes en IgG (%)	Réponses exactes en IgM (%)
sérum 1	+	-	99	98
sérum 2	-	-	99	99
sérum 3	+	-	99	99
sérum 4	+	douteux	99	92

Dans l'ensemble les résultats techniques sont très bons, hormis lors du dosage des IgM douteux (sérum 4), où les participants ont répondu négatifs.

Il a été observé qu'une trousse de détection des IgT présentait une sensibilité insuffisante sur le sérum 3 positif en IgG. Ce manque de performance a été signalé au fabricant.

5.5. Activités d'expertises auprès des agences de sécurité sanitaire, HAS, ECDC

➤ Expertises nationales

- Expert en tant que membre de réseaux

N. Boulanger :

- Membre du **réseau CNEV: Centre National Expertise des Vecteurs**. Responsable. Dr. F. Chandre. Expert pour les tiques. Membre du consortium CNEV.
- Membre **du réseau REID** (Réseau des Interactions durables : Maladies à Tiques). Réunion annuelle tenue en 2016 à Montpellier/Sète. Dans ce cadre, un projet de rédaction de livre sur les tiques a été finalisé en 2016. Coordinatrices : K. McCoy et N. Boulanger. IRD Editions.

➤ Expertises internationales

B. Jaulhac : participation à des réunions de l'ECDC

En 2016, une réunion sur les modalités de surveillance en Europe de la borréliose de Lyme et notamment de la neuroborréliose a eu lieu en janvier 2016 à Stockholm Le CNR y participait en tant qu'animateur de 2 tables rondes. Les critères communs de définition de cas pour la surveillance dans les différents pays d'Europe ainsi que les options du spectre des manifestations cliniques pouvant faire l'objet d'une surveillance ont été discutés

- *Expertise pour l'Attribution de financements :*

ANSES : demande d'expertise pour l'attribution de thèse de doctorat sur les tiques et la salive, Janvier 2016.

- *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, Tick and Tick Borne diseases,

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. Mise au point d'une technique de diagnostic précoce de *Borrelia* dans des biopsies cutanées par spectrométrie de masse.
2. Mise au point d'une technique de détection de *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans les tiques par spectrométrie de masse
3. Analyse de la persistance de *Borrelia* et de l'organotropisme de *Borrelia* pour la peau par une approche protéomique
4. Aspects épidémiologiques de la borréliose de Lyme en zone d'endémie.

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

6.1.1.1. 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 tardive.

6.1.1.2. Partenariats

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

6.1.1.3. Etat d'avancement

Borrelia burgdorferi ss a été inoculé par deux voies d'administration, intradermique et intrapéritonéale chez la souris. Après dissémination, à 40 jours, des tiques sont déposées sur la

peau. Elles deviennent positives quel que soit le protocole, en absence de bactériémie, soulignant le rôle de la peau comme site de latence.

Des biopsies de souris ont été prélevées à 40 jours afin de rechercher des protéines de *Borrelia* par LC-MS/MS (liquid chromatography-mass spectrometry). Des protéines bactériennes ont été identifiées dans la peau des souris infectées et pourraient donc constituer des marqueurs d'infection active de *Borrelia*. Nous avons plusieurs candidats intéressants à l'étude.

Ce travail se poursuit afin d'identifier des marqueurs de l'infection à *Borrelia* lors de la phase tardive. Ces marqueurs vont être testés comme candidats pour un nouveau diagnostic par protéomique ciblée (Selected Reaction Monitoring / Mass spectrometry).

Ce travail fait l'objet d'une thèse de Doctorat par Antoine GRILLON, AHU au laboratoire de bactériologie, actuellement en 4^{ème} année de thèse d'université.

Un financement ANR « DIABOLYC : Diagnostic Borréliose de Lyme Cutané » a été obtenu en 2016 sur cette thématique de diagnostic au stade tardif.

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

6.1.2.1. Objectifs

Comparer au stade de l'érythème migrant les performances d'une technique de spectrométrie de masse détectant des protéines bactériennes dans la peau aux deux techniques existantes : la PCR et la culture de *Borrelia*.

6.1.2.2. Financement de ce travail

Après obtention d'un projet « IDEX : étude pluridisciplinaire » auprès de l'Université de Strasbourg sur ce sujet d'un montant de 60 Keuros pour réaliser la phase de mise au point sur modèle murin, ce travail a obtenu un financement PHRC interrégional en 2016.

6.1.3. Mise au point d'une technique d'identification des tiques et de détection de *Borrelia burgdorferi* sensu lato et autres pathogènes dans les tiques par techniques de protéomique (spectrométrie de masse)

6.1.3.1. Objectifs

Mettre au point une technique rapide :

- d'identification des tiques par spectrométrie de masse, MALDI TOF
- de détection des pathogènes dans les tiques collectées sur le terrain par protéomique (LC-MS/MS) en remplacement de la PCR.

6.1.3.2. Partenariats

Ce travail se fait en étroite collaboration avec l'équipe de recherche URMITE de Marseille (Drs L. Almeras et P. Parola) et la plateforme de protéomique de Strasbourg (IPHC- Prof L. Sabatier et étudiante en thèse P. Cantero).

6.1.3.3. Etat d'avancement

Le travail est réalisé par un étudiant en master M2 en 2016 (Pierre Boyer) et une étudiante en thèse d'Université (P. Cantero).

Pour la constitution d'une banque de données de tiques pat MALDI TOF, nous avons commencé à initier cette banque pour le genre *Ixodes* et *Dermacentor*.

Cette approche fonctionne bien en utilisant que les pattes, le reste du corps pouvant être utilisé pour l'identification de pathogènes par PCR et /ou protéomique. Ce travail sera finalisé en 2017.

Pour la recherche de pathogènes, nous avons initialement enté de détecter *Borrelia* dans les tiques par une approche non ciblée par protéomique de type MALDI-TOF, puis par protéomique ciblée, visant la protéine OspA par spectrométrie de masse. Les essais ont été peu concluants, nous avons entrepris la détection par une approche non ciblée, basée sur une technique de protéomique non ciblée la LC-MS/MS.

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

6.1.4.1 Objectifs

- étude à 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

6.1.4.2 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).

6.1.4.3 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 d'une publication (Dr Valérie Goldstein)

De plus, certains facteurs abiotiques (nature du sol, température et humidité) pouvant influencer la densité vectorielle ont été analysés. La partie de l'étude sur les facteurs abiotiques fait l'objet d'une autre publication soumise à « Parasites and vectors », (Dr V. Goldstein)

La soutenance de la thèse d'Université du Dr Valérie Goldstein, déjà diplômée de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, est prévue pour l'année 2017.

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

6.2.1. Publications nationales

1. Belkacem A, Patey O, Breuil J, **Jaulhac B**, De Martino S, Caraux Paz P.
Neuroborréliose de Lyme : revue rétrospective de 32 cas. Med Mal Infect. 2016 ; 46 (4 Suppl 1):130.
2. Lenormand C, **Jaulhac B**, Lipsker D.
Manifestations cutanées de la borréliose de Lyme
In EMC - Dermatologie, 2016.

DONNEES DU CNR BORRELLIA

6.2.2. Publications internationales

1. Bernard Q., Gallo RL., Jaulhac B., Nakatsuji T., Luft B., Yang X., **Boulanger N.**
Ixodes tick saliva suppresses the keratinocyte cytokine response to TLR2/TLR3 ligands during early exposure to Lyme borreliosis.
Exp Dermatol. 2016;25(1):26-31- **IF : 3,762.**
2. Lenormand C., **Jaulhac B.**, Debarbieux S., Dupin N., Granel-Brocard .F, Adamski H., Barthel C., Cribier B., Lipsker D.
Expanding the clinicopathological spectrum of late cutaneous Lyme borreliosis (acrodermatitis chronica atrophicans [ACA]) : A prospective study of 20 culture- and/or polymerase chain reaction (PCR)-documented cases.
J Am Acad Dermatol. 2016;74(4):685-92- **IF = 4,523.**
3. Leeflang MM., Ang CW., Berkhout J., Bijlmer HA., Van Bortel W., Brandenburg AH., Van Burgel ND., Van Dam AP., Dessau RB., Fingerle V., Hovius JW., **Jaulhac B.**, Meijer B., Van Pelt W., Schellekens JF., Spijker R., Stelma FF., Stanek G., Verduyn-Lunel F., Zeller H., Sprong H.
The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis.
BMC Infect Dis. 2016 ;25 (16):140- **IF : 2,90.**
4. Rigaud E., **Jaulhac B.**, Garcia-Bonnet N., Hunfeld KP., Féménia F., Huet D., Goulvestre C., Vaillant V., Deffontaines G., Abadia-Benoist G.
Seroprevalence of seven pathogens transmitted by the *Ixodes ricinus* tick in forestry workers in France .
Clin Microbiol Infect. 2016;22(8):735.e1-9- **IF=5,059.**
5. N'Guyen Y., Lesaffre F., Metz D., **de Martino S.**, **Jaulhac B.**, Andréoletti L.
No serological evidence for *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in patients with dilated cardiomyopathy in Northern France.
Infect Dis (Lond). 2016 ;48(10):763-4- **IF = 1,495.**
6. Jung S., Schickel JN., Kern A., Knapp AM., Eftekhari P., Da Silva S., **Jaulhac B.**, Brink R., Soulas-Sprauel P., Pasquali JL., Martin T., Korganow AS.
Chronic bacterial infection activates autoreactive B cells and induces isotype switching and autoantigen-driven mutations.
Eur J Immunol. 2016; 46:131-46- **IF : 4,034.**
7. Meddeb M., Koebel C., **Jaulhac B.**, Schramm F.
Comparison between a Broad-Range Real-Time and a Broad-Range End-Point PCR Assays for the Detection of Bacterial 16S rRNA in Clinical Samples
Ann. Clin. Lab. Sci., 2016 Jan;46(1)18-25.
8. Margos G., Marosevic D., Cutler S.; Derdakova M., Diuk-Wasser M., Emler S.; Fish D.; Gray J.; Hunfeld K-P.; **Jaulhac B.**; Kahl O.; Kovalev S.; Kraiczy P.; Lane R.S.; Lienhard R.; Lindgren P-E.; Ogden N. ; Ornstein K.; Rupprecht T.; Schwartz I.; Sing A.; Straubinger R-K.; Strle F.; Voordouw M.; Rizzoli A.; Stevenson B.; Fingerle V.
There is inadequate evidence to support the division of the genus *Borrelia*
Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology 2016, Dec. 8 (10) 1099.

6.2.3. Communications nationales

1. Belkacem A., Patey O., Breuil J., **Jaulhac B.**, De Martino S., Caraux Paz P.
Neuroborréliose de Lyme : revue rétrospective de 32 cas
Communication affichée
17^{es} Journées Nationales d'Infectiologie, Lille 2016- ZOO-01-
Médecines et maladies infectieuses 46, 2016, 130-131.

6.2.4. Communications internationales

1. Westermann B., Grillon A., Schnell G., **Jaulhac B.**, **Boulanger N.**, Ehret-Sabatier L.
Discovery and targeted proteomics on cutaneous biopsies infected by Borrelia for the diagnosis of Lyme disease. 64th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 5-9, 2016, San Antonio, Texas.

6.2.5. Conférences sur invitation, congrès, séminaires

- **Boulanger N.** Lyme borreliosis and skin interface: better knowledge for better diagnostics and better vaccines. Northtick meeting. Orenas Castle (Suède), 2-4 février 2016.
- **Boulanger N.** Maladies transmises par les tiques
Sénat: Séance OPECST
Office Parlementaire d'Evaluation des Choix Scientifiques et Technologiques
7 avril 2016.
- **Boulanger N.** Workshop, NIH, Rockville, Etats-Unis Skin immunology and arthropod vectors. 19 septembre 2016.
- **Jaulhac B.** invité – Académie nationale de Médecine – Paris, Septembre 2016
- **Jaulhac B.** Les borrélioses : actualités 2016
Colloque des biologistes du Grand-Est – Ventron
28 avril 2016.
- **Jaulhac B.**
Séminaire « La maladie de Lyme : la reconnaître, la prendre en charge »
Unité de Formation ANDPC – MAFORM, Paris
26 novembre 2016.
- **Jaulhac B.**
Conférence « Actualités sur la borréliose de Lyme en 2016 »
Association Libérale Santé Proximité, Brive-la-Gaillarde
05 décembre 2016.

6.2.6. Contribution à des chapitres ou des ouvrages

1. **Boulanger N.**, Pechère M. et JC., Durupt F., Lipsker D.
Dermatoses microbiennes : Flore cutanée normale et mécanismes de défense contre l'infection

In : Encyclopédie de Dermatologie et Infections sexuellement transmissibles
6^{ème} édition, Elsevier Masson. *sous presse* (2016).

2. Bonnet S., **Boulanger N.**
Ixodes tick saliva: a potent controller at the skin interface of early *Borrelia burgdorferi*
sensu lato transmission
Chapitre 14: Arthropod vector: controller of disease transmission, volume 2: vector saliva-
host pathogen interactions.
Editeurs: S. K. Wikel, S. Aksoy, G. Dimopoulos. Elsevier, *sous presse*
 3. **Boulanger N.**, McCoy. K.
Chapitre de livre: Les tiques, pour l'ouvrage
Entomologie médicale et vétérinaire
Editeurs G. Duvallet et V. Robert. *sous presse*.
 4. **Boulanger N.**, Haberer P., Pfeiffer T.
Sur les traces de la maladie de Lyme : le loup, la tique et la forêt. De qui faut-il vraiment
avoir peur ?
Editons : I.D. l'Edition, 2016.
 5. **Boulanger N.**, Degeilh B., Guigen C.
ANOFEL – Ouvrage collectif. Les tiques. Sous presse
- 7. Coopération avec les laboratoires de santé & animale, d'hygiène
alimentaire, environnementaux**

Néant

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1. Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR Borrelia

- Développer et diffuser des méthodes pour le diagnostic des différentes formes de borréliose
- Développer des techniques de typage de *Borrelia*
- Evaluer les tests sérologiques commercialisés
- Apporter aux LABM 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)

1.2. Description de l'équipe du CNR Borrelia

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

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

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

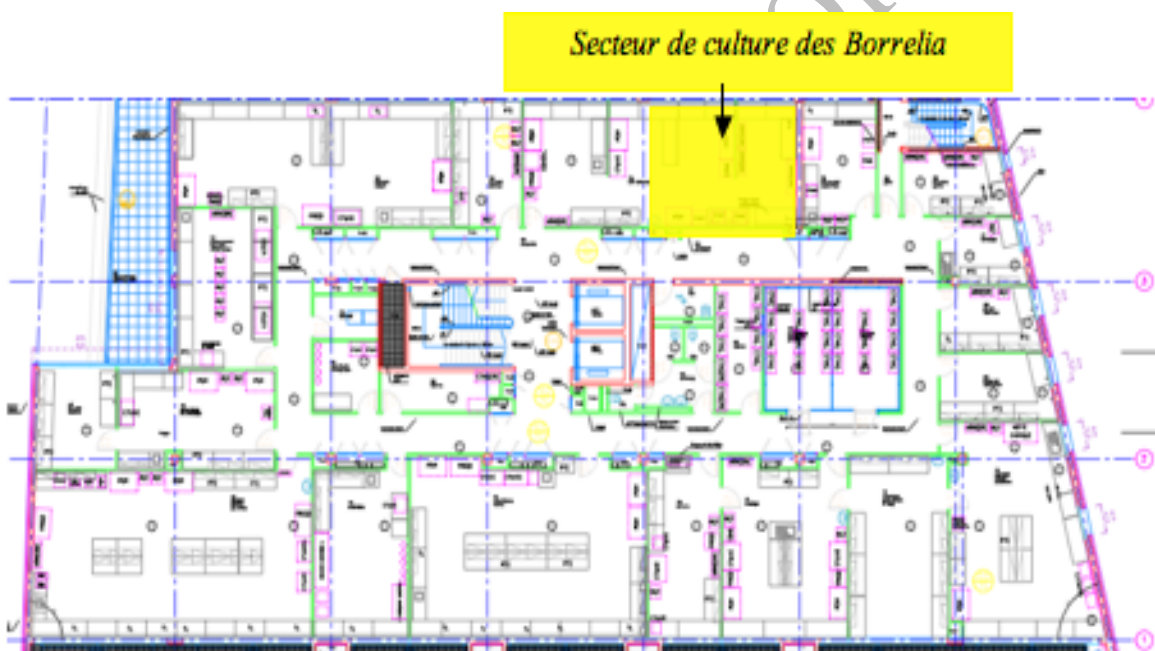
Surface, plan :

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.

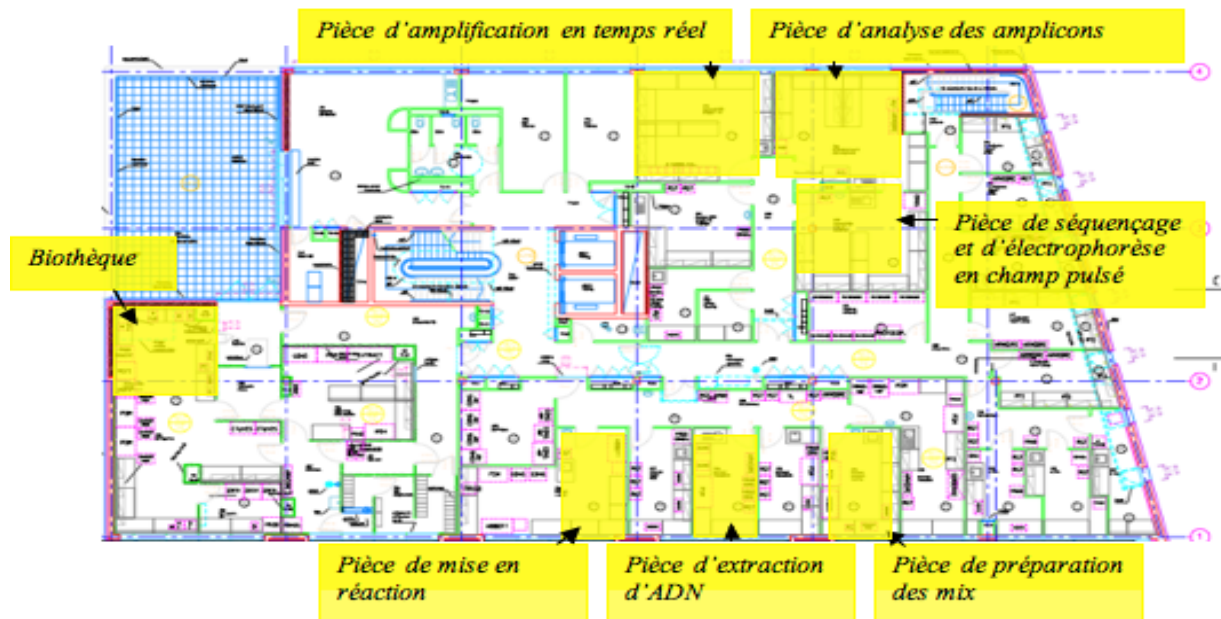
Rez-de-chaussée : secteur sérologie automatisée et manuelle, sérothèque, souchothèque

La souchothèque et les tiques sont conservées à -80°C, la sérothèque est conservée à -30°C. Elles sont situées dans une pièce séparée à accès réglementé et tracé par badge nominatif

1^{er} étage - secteur de culture :



2^{ème} étage - secteur biologie moléculaire :



Les différents secteurs de biologie moléculaire (préparation des mix, extraction, mise en réaction, amplification, analyse des amplicons) sont séparés les uns des autres par des sas en dépression ou en surpression selon l'activité. La tenue de protection est changée systématiquement lors du passage d'une zone à l'autre.

La Biothèque à -80°C (échantillons biologiques humains, ADN extraits) est située à cet étage dans une pièce séparée à accès réglementé et tracé par badge nominatif.

Principaux équipements du CNR *Borrelia* :

- ▶ 1 PSM
- ▶ Etuves de culture microbiologique à 30°C , 33°C et à 37°C (avec ou sans enrichissement en CO_2) toutes équipées d'un système d'enregistrement en continu de la température.
- ▶ Microscopes dont un microscope à fond noir (Leica) et un à contraste de phase pour l'observation des *Borrelia* avec système d'enregistrement d'images fixes et mobiles.
- ▶ Loupe binoculaire (Leica) à lumière froide pour la dissection des tiques
- ▶ Réfrigérateurs à $+4^{\circ}\text{C}$, congélateurs à -30°C (conservation des sérums) et à -80°C (conservation des souches bactériennes, des ADN et des tiques). Une connexion à un système d'alerte centralisé en temps réel 24H/24 est en place.
- ▶ Deux appareils de PCR en temps réel (Roche 480, ABI 7500)
- ▶ Accès à deux automates pour ELISA (BEP III, BEP 2000)
- ▶ Accès à un appareillage pour western-blot (Bio-Rad)
- ▶ Accès à deux extracteurs d'acides nucléiques (Roche, BioMérieux)
- ▶ Accès à un appareil de PCR en temps réel (Roche Light Cycler 2.0)
- ▶ Accès à appareillage d'électrophorèse d'ADN
- ▶ Accès à système d'acquisition d'images (Bio-Rad)
- ▶ Accès à hotte à produit chimique
- ▶ Accès à un autoclave
- ▶ Accès à séquenceur capillaire (ABI)
- ▶ Accès à une animalerie infectieuse agréée n° A 67 482 37.

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 bénéficier des outils et supports mis en place au sein 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 :

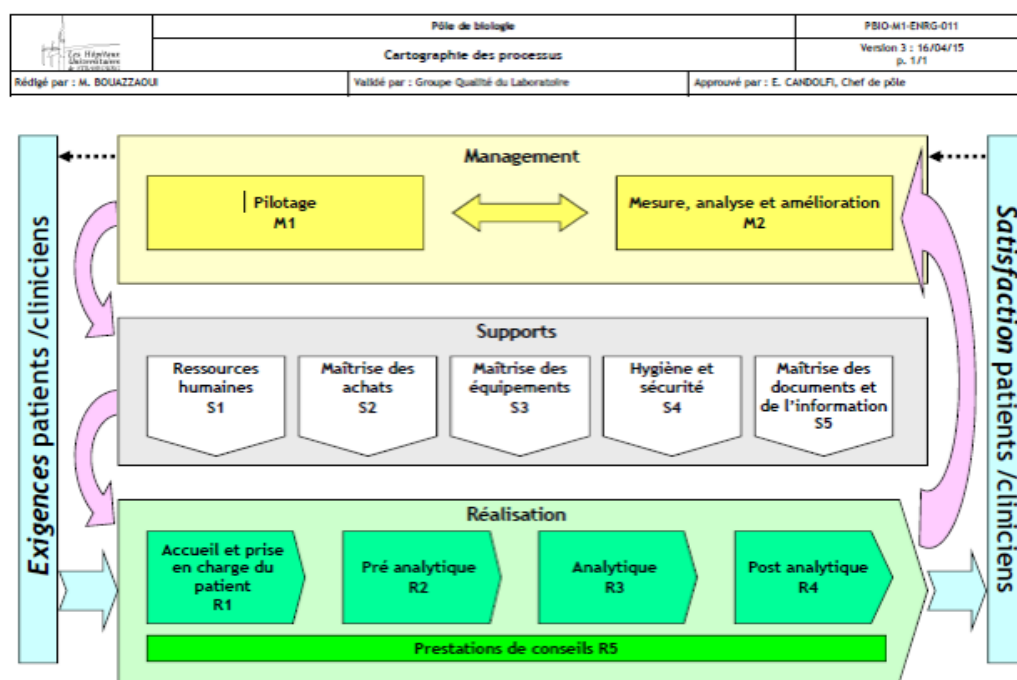
➤ **Les processus de management dont la finalité est de :**

1. Définir la politique qualité et les objectifs « qualité »
2. Décliner la politique et les objectifs en actions,
3. 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 aux attentes des clients et des partenaires.

Une cartographie décrit les différents processus du laboratoire et leurs interactions :



La démarche qualité du CNR s'est mise en place progressivement depuis 2012 en parallèle à celle du pôle de biologie. Le CNR a ainsi pu bénéficier des outils mis en place au niveau du pôle de biologie :

1. Acquisition d'un logiciel de gestion des événements indésirables (EI) Norméa® par les HUS avec déploiement au pôle de Biologie et au CNR en 2014
2. Mise en place d'un système documentaire basé sur l'approche processus
3. Acquisition d'un logiciel de gestion documentaire Norméa® par les HUS avec déploiement prévu au pôle de Biologie fin 2016 puis au CNR en 2017
4. Une organisation qualité avec le groupe qualité des laboratoires composé des pilotes et copilotes de processus, des référents spécifiques, des responsables qualité des structures, des cadres de santé et de la cellule qualité du pôle

Éléments mis en place :

- Réception et enregistrement des envois extérieurs d'échantillons biologiques (sérum, LCR, biopsies cutanées en vue de la réalisation de sérologies, PCR spécifiques et culture)
- Rédaction de modes opératoires (MOPE) spécifiques de l'activité du CNR (37 MOPE)
- Traçabilité de la gestion du matériel et des réactifs utilisés dans le cadre des activités du CNR (Suivi des enceintes thermostatées utilisées pour le stockage des réactifs et des échantillons en continu via un système centralisé ; suivi des équipements via un logiciel de Gestion des Maintenances Assistée par Ordinateur ou GMAO ; gestion des réactifs et consommables par lot et par arrivage)
- Mise en place de fiches de non conformités et traitement de ces non conformités, avec acquisition du logiciel Norméa depuis 2014

- Instauration et suivi des contrôles internes de qualité (CIQ) en sérologie et en biologie moléculaire. En sérologie, les CIQ étaient initialement produits par le CNR lui-même à partir de sérums bien définis, puis remplacés depuis 2013 par des contrôles commerciaux : Accurun® monoparamétriques IgG et IgM en plus des contrôles des trousses.
- Inscription aux programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ) :
 - de Labquality® depuis 2013 comprenant 4 évaluations par an pour la sérologie de Lyme
 - et de QCMD® depuis 2015 comprenant 8 à 12 échantillons par an pour la PCR de détection et de typage *Borrelia*.

Cette démarche s'est poursuivie en 2016.

Ci-dessous les actions réalisées au sein du CNR concernant chaque processus.

Processus de management

Pilotage de la qualité :

- Le CNR des *Borrelia* s'intègre dans la politique qualité du pôle de Biologie.
- Au même titre que le chef du pôle de biologie, le Pr Jaulhac s'est engagé à soutenir la démarche qualité du CNR.

Mesure, analyse et amélioration :

- Contrôles internes de qualité :
 - Des CIQ continuent à être intégrés à chaque série d'analyse.
 - Pour la sérologie de Lyme, outre les CIQ proposés par le fournisseur et après évaluation de CIQ commerciaux indépendants, le CNR a opté pour une utilisation de trois CIQ dans chaque série analytique en microplaque (contrôles négatif et positif de trousses, ainsi qu'un contrôle positif commercial indépendant en IgG et en IgM).
 - La qualification de chaque lot de CIQ est réalisée sur une période probatoire. Elle permet de définir la moyenne et l'écart-type acceptable pour chaque CIQ. Les résultats des différents CIQ sont saisis dans des tables de calculs permettant la réalisation de courbes de suivi (diagrammes de Levey Jennings). L'exploitation des résultats est réalisée à chaque série d'analyse en suivant les règles définies par Westgard. Une conduite à tenir a été établie en cas de dérive des CIQ. Elle est détaillée dans le mode opératoire BACT-M2-MOPE-002, intégré au système de management de la qualité (SMQ) du laboratoire.
 - Pour la recherche de *Borrelia* et *Borrelia* par biologie moléculaire, des CIQ (témoins positif d'amplification, négatif d'extraction), continuent également à être intégrés à chaque série d'analyse.

➤ Evaluations externes de la qualité (EEQ) :

- Le CNR s'est inscrit de 2014 à 2014 au programme d'EEQ de Biologie

prospective® et en 2015 au programme d'EEQ organisé par Labquality® comprenant 2 sérums 4 fois par an pour le sérodiagnostic de dépistage de la maladie de Lyme : nous avons obtenu 100 % de conformité depuis 2012.

- Le CNR s'est également inscrit pour 2015 au programme d'EEQ organisé par QCMD® comprenant 10 échantillons par an pour la recherche de *Borrelia* par biologie moléculaire.

En 2015, nous avons obtenus 100 % de conformité pour les 10 échantillons analysés contenant les ADN spécifiques de différentes espèces de *Borrelia* (*B. miyamotoi*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* et *B. bavariensis*).

Traitement des événements indésirables :

➤ Audits qualité :

- Le CNR suit la politique d'audit définie par le pôle de Biologie.
- En décembre 2015, un audit qualité interne a été confié à un prestataire extérieur (cabinet Duranton®) en vue de la présentation à l'accréditation du sérodiagnostic de dépistage de la maladie de Lyme.
- **2 écarts ont été notifiés :**
 - Enceinte thermostatée de stockage des réactifs non cartographiée à la date prévue.
 - Absence de formalisation de l'habilitation du personnel médical en charge de la validation de méthode.
 - Ces 2 écarts seront levés en 2016.

Processus support

Ressources humaines :

- Les fiches d'habilitation et de maintien d'habilitation ont été mises en place en 2016.

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 du Plateau Technique de Microbiologie ont été cartographiées en 2016. Celles du CNR sont prévues en 2017.

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 patients. Il travaille avec des réseaux de médecins prescripteurs.

Processus préanalytique :

- Amélioration des procédures de réception, d'enregistrement et d'envoi des échantillons biologiques mises en place en 2012 : 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.
- Poursuite de la rédaction et réactualisation des modes opératoires préanalytiques (cf : liste des fichiers informatiques « MOPE » du CNR *Borrelia*).

Processus analytique :

- Finalisation du dossier de validation de méthode de la détection des IgG et IgM spécifiques dirigés contre *Borrelia burgdorferi* sensu lato dans le sérum 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 analyse 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.

Participation du CNR à un EEQ européen de PCR Borreliella (QCMD) :

En 2016, le CNR *Borrelia* a participé au Contrôle Européen de Qualité pour la détection de différentes espèces de *Borreliella* par amplification génique.

Sur l'ensemble des 10 extraits fournis contenant de l'ADN de *Borreliella*, de *Treponema* et deux négatifs, tous les résultats fournis par le CNR ont été conformes.

Annexe 2 : Techniques existantes du CNR

2.1. Liste des techniques disponibles pour le diagnostic et l'identification

*** Techniques de recherche directe des *Borrelia* agents de fièvre récurrentes :**

- **Examen microscopique** : après coloration de Giemsa
- **Culture** à partir du sang ou de tiques disséquées en milieu liquide BSK
- **Inoculation à l'animal** de sang infecté (souris) au sein d'une animalerie agréée
- **Amplification génique *in vitro*** :
 - o PCR classique du genre *Borrelia* avec séquençage du produit amplifié pour identification de l'espèce. Cibles : gènes chromosomiques de l'ADNr 16 S et de la flagelline (Brahim H, EID, 2005 et Assous MV, CMI, 2009).
 - o PCR en temps réel et sonde Taqman® ciblant une région conservée de l'ADNr 16S du genre *Borrelia* (Hovius, JR, 2013). Elle utilise une amorce sens et 2 amorces anti-sens, *Borrelia persica* n'étant pas détectée par la première amorce anti-sens. Un séquençage du produit amplifié est ensuite réalisé pour identification de l'espèce. Cette PCR détecte la nouvelle espèce de *Borrelia miyamotoi*

*** Techniques de recherche directe des *Borreliella*, agents de la borréliose de Lyme :**

Culture

- Culture en milieu liquide BSK-H à partir d'échantillons biologiques humains ou de tiques.
- Culture en milieu BSK-H modifié, optimisé pour la culture de *B. afzelii* et *B. garinii*.

- Culture de souches sur milieu solide, méthode mise au point par le laboratoire (but : production de souches clonales).

Amplification génique in vitro

- Plusieurs PCR en temps réel et sondes TaqMan® sur prélèvements biologiques humains ou de tiques pour la détection de l'ensemble des espèces connues en 2016 de *Borrelia*. Deux cibles sont disponibles en temps réel : gène chromosomique de la flagelline et gène *hbb*.
- PCR en temps réel et sonde TaqMan sur prélèvements biologiques pour recherche d'*Anaplasma phagocytophilum*, un pathogène co-transmis par *I. ricinus*, (cible : gène *msp2* codant la protéine de surface p44).
- PCR universelle sur le gène de l'ADNr 16 pour rechercher d'autres pathogènes transmis par les tiques.

*** Techniques de recherche indirecte de *Borrelia burgdorferi* sensu lato :**

- Sérologie ELISA IgG et IgM séparés (Enzygnost VlsE Siemens®) validée au sein du CNR pour la réalisation de sérologie sanguine, de sérologie sur LCR et pour la recherche d'une synthèse intrathécale spécifique anti *B. burgdorferi* sensu lato.
- Sérologie de confirmation par techniques d'immuno-empreinte « maison » et commerciale sur sérum et/ou LCR des résultats positifs ou douteux lors du dépistage, pour étude des anticorps anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato. La calibration de ces tests a été réalisée à l'aide d'un panel d'anticorps monoclonaux (don gracieux du Dr B. Crowe, Baxter).

Ces techniques de PCR, de culture et de sérologie sont utilisées dans le cadre de l'activité propre du laboratoire associé au CNR ainsi que pour la réalisation de projets de recherche clinique : un PHRC inter-régional « DIABOLYC » et le projet de recherche « biopsies cutanées » financé partiellement sur bourse de la SFD.

*** Techniques d'étude de *Borrelia* et *Borrelia* in vivo :**

(Réalisées au sein d'une animalerie infectieuse agréée)

- Inoculation à l'animal (souris C3H et rats Lewis) sensibles à l'infection par différentes espèces de *Borrelia*.
- Inoculation à l'animal (souris BalB/C) sensibles à l'infection par *Borrelia crocidurae*
- Développement d'une lignée de tiques *Ixodes ricinus* infectées par différentes souches de *Borrelia*.
- Développement d'une lignée de tiques *Ornithodoros* pour étude des *Borrelia* agents de fièvre récurrentes.

2.2. Liste des techniques disponibles pour le typage

- Typage direct sur prélèvements ou sur culture par sondes fluorescentes spécifiques des principales espèces des différentes espèces de *Borrelia* : 12 sondes actuellement disponibles pour identifier *B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. afzelii*,

B. valaisiana, *B. spielmanii* et *B. lusitaniae* ainsi que pour *B. andersonii*, *B. bissettii*, *B. japonica*, *B. tanuki*, *B. turdi* et pour *B. mayonii*.

- Typage direct sur prélèvements ou sur culture par PCR puis séquençage pour les résultats atypiques obtenus avec la méthode précédente et pour les espèces de *Borrelia* des fièvres récurrentes. Développement à venir pour de nouvelles espèces (*B. miyamotoi* par exemple)
- Développement à venir d'une technique de typage intra-espèce pour les *Borrelia* par MLST

2.3. Collections de souches, immun-sérums disponibles

* Nous possédons une **collection de sérums et de LCR**, composée de :

- 221 sérums et 80 LCR de patients atteints des différentes formes cutanées, articulaires et neurologiques de la borréliose de Lyme, diagnostiquées selon les critères européens de l'EUCALB
- 149 sérums et 10 LCR de différentes réactions croisées avec la sérologie *Borrelia*
- collections de sérums de patients piqués par des tiques
- de 2500 sérums de la Mutualité Sociale Agricole dans le cadre d'un partenariat

La présence d'anticorps spécifiques dans ces sérums et LCR a été confirmée par western-blot IgG et/ou IgM. Les sérums et LCR sont stockés en aliquotes de 0,5 ml à -30°C.

Au cours des années du mandat précédent, cette collection a été régulièrement utilisée et renouvelée pour des études de performance de coffrets de sérologie.

* Nous disposons à la fin 2016 d'une **collection de 144 souches humaines** de 6 espèces pathogènes de *Borrelia* (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. bissettieae*, *B. spielmanii* et *B. bavariensis*).

Parmi celles-ci, 85 souches sont à très faible nombre de passages in vitro, car isolées au CNR à Strasbourg, gage de leur virulence originelle confirmée, pour certaines sur modèle murin. Ces 85 souches se répartissent ainsi :

- 8 souches de *B. burgdorferi* isolées d'EM, dont 1 souche isolée d'un EM multiple (EMM) chez un patient ayant séjourné aux USA
- 15 souches de *B. garinii* isolées d'EM (13 souches), de lymphocytome cutané bénin (1 souche) et de LCS d'un patient atteint de neuroborréliose (1 souche)
- 62 souches de *B. afzelii* isolées d'EM (46 souches), de lésions d'EMM (4 souches dont 2 de localisations différentes chez un même patient), de lymphocytome cutané bénin (3 souches), d'acrodermatite chronique atrophiante (8 souches), de myosite (1 souche).

Par ailleurs :

- 59 autres souches humaines, nous ont été gracieusement fournies par des collègues européens ou américains. Elles ont été isolées d'EM, de lymphocytome borrélien, d'arthrite, d'ACA et de LCS de patients atteints de neuroborréliose. Après accord du détenteur initial, ces souches peuvent être fournies par notre intermédiaire.
- 12 souches à bas passage in vitro isolées de tiques, provenant de 8 espèces de *Borrelia* différentes : *B. afzelii*, *B. andersonii*, *B. bissettieae*, *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. Après accord du détenteur initial, ces souches peuvent être fournies par notre intermédiaire.

Nous détenons aussi des souches des espèces suivantes de *Borrelia* agents de fièvres récurrentes :

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

Toutes ces souches sont répertoriées avec leur provenance géographique, leur donateur (le cas échéant), leur nombre de passage en culture in vitro et stockées en aliquotes de 0,5 ml à -80°C. Elles sont disponibles dans le cadre d'études collaboratives. Après accord du détenteur initial, ces souches peuvent être fournies par notre intermédiaire.

2.4. Bases de données de séquences

Nous disposons d'une base de données Maldi-TOF (Biotyper, Bruker) pour 79 souches de *Borrelia*.

DONNEES DU CNR BORRELIUM