

Rapport annuel d'activité

2019

**Centre de national de référence
des *Borrelia***

**Année d'exercice
2018**

DONNEES DU CNR BORRELIA

Résumé analytique

La borréliose de Lyme est la plus fréquente et la plus médiatique des zoonoses de l'Hémisphère Nord. L'incidence en France est estimée actuellement à 69 cas/100 000 habitants, (réseau Sentinelles 2017), ce qui situe la France dans la moyenne haute des incidences européennes.

Surveillance clinique, biologique et vectorielle

○ Surveillance clinique et biologique humaine :

- En 2018, la surveillance du CNR a couvert 70 départements ; elle s'est basée sur l'analyse des prélèvements réceptionnés au CNR ainsi que l'étude des fiches de renseignements associées :
 - *Le CNR en 2018 a reçu 9 221 échantillons biologiques, 449 couples sérums/ LCR et 626 demandes de PCR ainsi que 1311 fiches de renseignements exploitables qui concernaient dans 43 % des cas des troubles neurologiques et 5 % des troubles articulaires. L'analyse des données de ces fiches montre 17,3 % de cas de Lyme certains ou probables et 54 % de cas improbables.
 - *Le western-blot a permis de confirmer l'ELISA dans 34,6 % des cas et est donc nettement recommandé devant un ELISA positif ou douteux.
 - *La synthèse intrathécale n'a pas confirmé le diagnostic de neuroborréliose dans 65 % des cas où le LCR est séropositif pour *Borrelia*.
 - *Aucune arthrite de Lyme séronégative n'a été observée en 11 ans. Les demandes de recherche de *Borrelia* par PCR sur liquide synovial ont augmenté de 71 % en 2018 par rapport à 2017.
 - *Le CNR a diagnostiqué deux cas de fièvres récurrentes à *B. crocidurae*, toutes 2 venant du Sénégal. Le CNR n'a confirmé par PCR aucun cas de suspicion d'infection à *A. phagocytophilum*.
- Le CNR participe au réseau Sentinelles depuis 2009. En 2017, le réseau a estimé le taux d'incidence annuel de la BL à 69 cas/100 000 habitants (IC 95% : 58 – 80) avec de fortes disparités régionales.
- Nous avons typé par MSLT toutes les souches de *B. afzelii* isolées au CNR de Strasbourg et nous avons enrichi la base de données mondiale de 27 nouveaux profils alléliques.

○ Surveillance vectorielle :

- En 2018, différence de densité de nymphes entre l'Alsace et la Bretagne, soit 41 et 27 nymphes/100 m² respectivement. Tendances à l'augmentation en Alsace, stable en Bretagne par rapport à 2017.
- Le taux d'infection par *Borrelia* est différent dans les 2 régions françaises (17 et 8 % respectivement). Les espèces de *Borrelia* détectées dans les tiques sont majoritairement *B. afzelii* et *B. garinii* (68 %) soit une stabilité par rapport à 2017 ; *B. afzelii* est plus fréquente en Alsace, *B. afzelii* et *B. garinii* sont équivalentes en Bretagne. *B. burgdorferi* (12 %) et *B. valaisiana* (12 %) sont moins fréquentes.
- Le taux d'infection par *A. phagocytophilum* est faible dans les 2 régions (0,3 à 0,7 %).
- Le taux d'infection par *B. miyamotoi* est faible dans les 2 régions (1,7 à 3,8 %).

Diagnostic, recherche et formation des professionnels de santé

- En 2018, le CNR a isolé 11 souches humaines de *Borrelia* et a détecté 36 biopsies d'érythème migrant positives par PCR.
- Le CNR a développé une nouvelle technique pour la mise en évidence de *Candidatus Neohhrlichia mikurensis*
- Le CNR a proposé à près 230 laboratoires sur le territoire un EEQ en sérologie de Lyme.
- L'activité de conseil du CNR est stable par rapport à 2017. En 2018, nous avons répondu à 283 mails et 1 127 appels téléphoniques.

Le CNR a publié en 2018 trois articles de rang B et un article de rang A en 1^{er}, 2^{ème} ou dernier

auteur.

Analytical summary:

Lyme borreliosis is the most frequent and the most newsworthy zoonosis of the northern hemisphere. The incidence in France is currently around 69 cases per 100 000 inhabitants, (Sentinels 2017 network), that places France in the high average of the European incidences.

Clinical, biological and vectorial surveillance:

○ *Human clinical and biological surveillance :*

- In 2018, the surveillance covered 70 departments and it is based both on the analysis of the samples received in the CNR and the study of the associated datasheets:
 - * The CNR received 9,221 serologies, 449 serums/cerebrospinal fluid (CSF) pairs samples and 626 PCR analysis as well as 1,311 exploitable datasheets which concerned in 43 % of the cases of neurological disorders and in 5 % of articular disorders. The data analysis shows 17.3 % of cases of certain or likely Lyme cases and 54 % of improbable Lyme cases.
 - * Western-blot analysis allowed to confirm ELISA results in 34.6 % of the cases only and is thus highly recommended in front of ELISA positive or doubtful results.
 - * The antibody index did not confirm diagnosis of neuroborreliosis in 65 % of the cases where the CSF serology is positive for *Borrelia*.
 - * No seronegative case of Lyme arthritis was observed over 11 years of the CNR activity. The number of PCR analysis for *Borrelia* on synovial liquid has increased by 71 % in 2018.
- The CNR diagnosed two cases of relapsing fever to *B. crocidurae*, both coming from Senegal.
- The CNR infirmed all suspicions of *A. phagocytophilum* infection by PCR.
- The CNR participates in the Sentinels network since 2009. In 2017, the network estimated the annual incidence of Lyme borreliosis to be 69 cases/100 000 inhabitants (CI 95% : 58 – 80) with strong regional variations.
- We typed by MSLT the *B. afzelii* collection of strains isolated in Strasbourg, and we enriched the global database with 27 new allelic profiles.

○ *Vectorial surveillance:*

- In 2018, density difference of nymphs between Alsace and Bretagne is respectively 41 and 27 nymphs per 100 m². Tendency to increase in Alsace and stable in Bretagne.
- In these two regions, the rate of tick infection by *Borrelia* was not similar (17 and 8 % respectively). The species of *Borrelia* detected in the ticks were mainly *B. afzelii* and *B. garinii* (68 %), as in 2017. *B. afzelii* was more frequent in Alsace; *B. afzelii* and *B. garinii* was more frequent in Bretagne. *B. burgdorferi* (12 %) and *B. valaisiana* (12 %) were less frequent.
- The infection rate by *A. phagocytophilum* is low in both regions (0.3 to 0.7 %)
- The infection rate by *B. miyamotoi* is also low in both regions (1.7 to 3.8 %).

Diagnosis, research and formation of the healthcare professionals

- In 2018, the CNR isolated 11 human strains of *Borrelia* and detected 36 erythema migrans biopsies as positive by PCR.
- The CNR developed a new technique for the identification of *Candidatus Neohhrlichia mikurensis* by PCR.
- In 2018, the CNR proposed to about 230 laboratories an EEQ for Lyme serology.
- The advice activity of the CNR is stable compared to 2017. In 2018, we answered 283 e-mails and 1,127 phone calls.

In 2018, the CNR published three articles of rank B and an article of rank A, in 2nd or last author.

DONNEES DU CNR BORRELIA

1	Missions et organisation du CNR	1
2	Activités d'expertise	2
2.1	Évolutions des techniques	2
2.1.1	Evolution de la méthode de détection moléculaire des espèces de <i>Borrelia</i> par PCR en temps réel.....	2
2.1.2	Mise au point d'une PCR de détection de <i>Candidatus Neohhrlichia mikurensis</i>	3
2.2	Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse.....	3
2.3	Techniques transférées vers d'autres laboratoires	4
2.4	Collections de matériel biologique.....	4
2.5	Activités d'expertise.....	5
2.6	Activités de séquençage	5
3	Activités de surveillance	6
3.1	Description du réseau de partenaires.....	7
3.2	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	8
3.2.1	Surveillance humaine.....	8
3.2.2	Surveillance vectorielle.....	23
3.3	Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux.....	32
3.4	Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	32
3.4.1	Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France et le réseau Sentinelles.....	32
3.5	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	32
3.5.1	Etude de la diversité des espèces de <i>Borrelia</i> dans les manifestations cutanées de la borréliose de Lyme (PRI 3977).....	32
3.5.2	Etude des manifestations articulaires de la borréliose de Lyme	34
3.5.3	PHRC « DIABOLYC : Diagnostic Borréliose de Lyme Cutané ».....	34
4	Alerte.....	35
5	Activités de rétro-information, de formation et de conseil	35
5.1	Conseil et expertise aux professionnels de santé	35
5.1.1	Plan National de Diagnostic des Soins (PNDS) Lyme et autres Maladies Vectorielles à Tiques (MVT).....	35
5.1.2	Liste des enseignements.....	35
5.1.3	Formation médicale continue aux professionnels de santé.....	36
5.1.4	Information pour les médias grand public et site internet.....	38
5.1.5	Accueil de stagiaires	38
5.1.6	Thèse de doctorat, participation à des jurys.....	39
5.2	Conseil et expertise aux autorités sanitaires.....	39
5.3	Conseil pour d'autres cibles	41
5.4	Conseil aux professionnels.....	41
5.4.1	Organisation annuelle d'un Contrôle de Qualité Externe (EEQ) proposé par le CNR.....	41

5.4.2	Activités de conseil et organisation des communications écrites et orales.....	43
6	Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR.....	48
6.1	Activités de recherche en 2018 en lien direct avec les missions et activités du CNR ...	48
6.1.1	Analyse de la persistance et de l'organotropisme de <i>Borrelia</i> dans la peau par une approche protéomique de <i>Borrelia</i> : application à un diagnostic tardif de la borréliose de Lyme.	48
6.1.2	Mise au point d'une technique de diagnostic précoce de <i>Borrelia</i> dans des biopsies cutanées par spectrométrie de masse	49
6.1.3	Mise au point d'une technique d'identification de tiques par spectrométrie de masse, notamment d'Ixodes.....	50
6.1.4	Analyse du rôle du microbiome cutané dans l'attraction des tiques et sur la transmission précoce de <i>Borrelia</i>	50
6.1.5	Développement d'un vaccin canin contre la borréliose de Lyme.....	51
6.1.6	Mise au point d'un modèle murin de fièvres récurrentes à <i>Borrelia crocidurae</i>	51
6.2	Liste des publications et communications en 2018.....	52
6.2.1	Publications nationales.....	52
6.2.2	Publications internationales	52
6.2.3	Communications nationales.....	53
6.2.4	Communications internationales.....	53
6.2.5	Conférences sur invitation, congrès, séminaires.....	54
6.2.6	Rédaction de livre ou de chapitres de livre.....	55
7	Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux.....	55

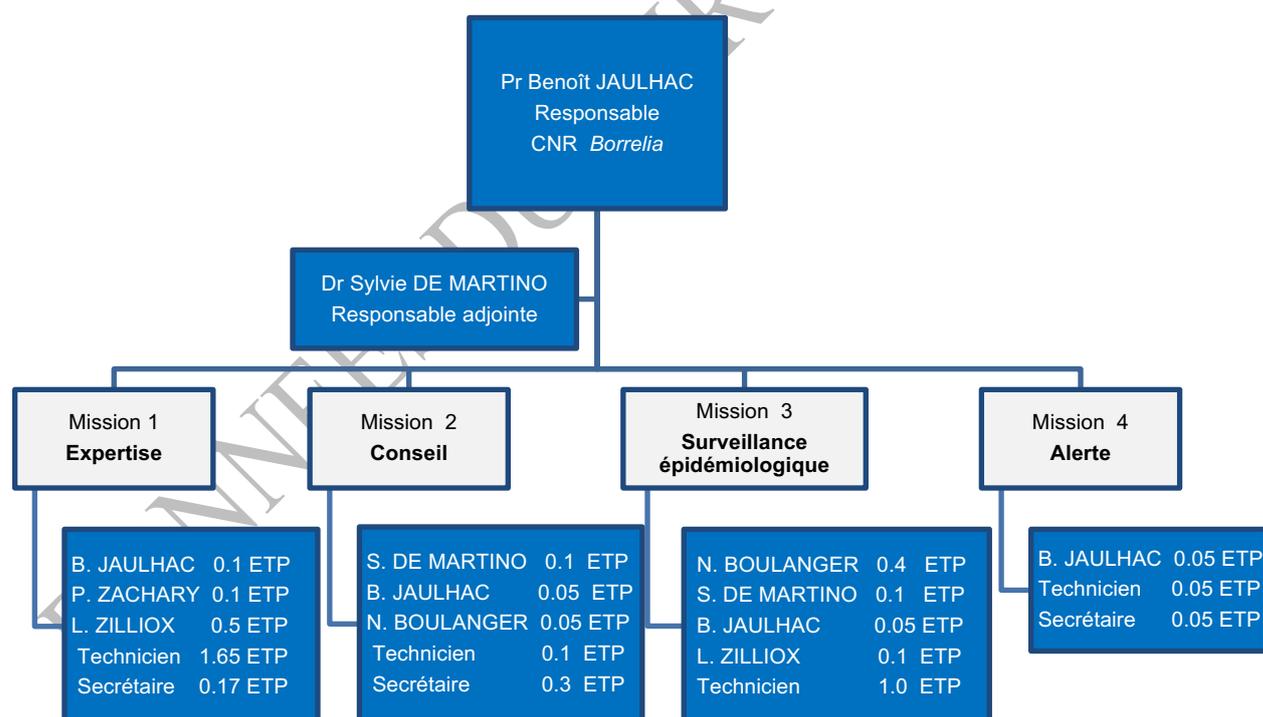
1 Missions et organisation du CNR

En préambule, nous rappelons que suite à un remaniement taxonomique récent, qui fait encore débat dans la communauté scientifique, on distingue actuellement deux genres bactériens : les genres *Borrelia* et *Borrelia*.

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 19 espèces dénommées, *B. garinii*, *B. afzelii* et *B. burgdorferi* sont les 3 principales espèces actuellement détectées chez l'Homme.

Le genre *Borrelia* comprend dorénavant exclusivement les espèces responsables de fièvres récurrentes, principalement transmises par des tiques dites « molles » du genre *Ornithodoros* (*B. crocidurae*, *B. hermsii*, *B. hispanica*, etc.), présentes en Afrique, 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. Un intérêt particulier s'est porté récemment sur 2 espèces : *Borrelia miyamotoi*, présente aux Etats-Unis et en Europe et *Borrelia mayonii*, présente en Etats-Unis, ces 2 espèces sont transmises, comme les espèces de *Borrelia*, par piqûre de tiques « dures » du genre *Ixodes*.

Organigramme du CNR *Borrelia* en 2018 :



2 Activités d'expertise

Evolutions 2018 :

- Evolution de la méthode de détection moléculaire par PCR en temps réel des espèces de *Borrelia*
- Utilisation d'une méthode MLST pour typer les souches humaines de *Borrelia*
- Mise au point d'une nouvelle technique pour la mise en évidence de *Candidatus Neohhrlichia mikurensis*, adaptée de Jahfari *et al.*, 2016.

2.1 Évolutions des techniques

2.1.1 Evolution de la méthode de détection moléculaire des espèces de *Borrelia* par PCR en temps réel

Le passage de la méthode de PCR réalisée jusqu'alors au CNR sur un LightCycler 2.0 vers un LightCycler 480 (Roche) se justifie par le besoin d'une meilleure praticabilité (plaques 96 puits au lieu de capillaires en verre, moins ergonomiques et plus fragiles), ainsi que le format permettant une plus grande capacité pour l'analyse de séries d'échantillons, notamment pour le suivi de l'épidémiologie vectorielle (96 puits vs. 32 capillaires).

La cible de la PCR employée pour la détection moléculaire des espèces de *Borrelia*, reste le gène de la flagelline B, *flaB* (1011 pb), appartenant au génome de base ou « *core genome* » de l'ensemble des *Borrelia*. Cette cible est très utilisée en Europe par suite de la diversité des espèces de *Borrelia*. Le choix s'est portée sur l'amplification d'une région conservée de 200 pb de *flaB* en raison de l'existence de régions géniques hautement similaires entre les différentes souches pour l'hybridation des amorces.

Compte-tenu de la diversité croissante des espèces génomiques nouvellement décrites (9 nouvelles espèces depuis 2010 sur les 19 actuellement validées), l'adéquation entre d'une part les séquences des amorces et de la sonde Taqman® du genre *Borrelia* et d'autre part le polymorphisme nucléotidique des souches de *Borrelia*, a été vérifiée à partir des séquences de la banque NCBI Genbank (187 séquences). Ainsi, après étude *in silico*, une sonde Taqman® supplémentaire a été ajoutée au mélange réactionnel afin d'optimiser la détection de certaines séquences polymorphiques minoritaires.

La sensibilité diagnostique de cette nouvelle technique sur LC480 a été ensuite précisée sur des ADN purifiés de 23 souches appartenant aux 19 espèces du groupe *Borrelia*. Cette méthode a permis de détecter 100% des souches et espèces de *Borrelia*. La sensibilité analytique de la méthode est en cours d'évaluation fine au CNR. Cette méthode possède également une excellente spécificité : la spécificité a été testée avec des ADN purifiés : de *Borrelia* appartenant au groupe des fièvres récurrentes, avec d'autres spirochètes, avec d'autres bactéries ou parasites, et de l'ADN humain. Aucune réaction croisée n'a été observée. Enfin, cette méthode est suffisamment discriminante pour permettre l'identification des souches au rang d'espèce à partir de sondes nucléotidiques spécifiques d'espèces, objectif recherché, ou à partir du séquençage des produits d'amplification le cas échéant.

Au total, cette méthode de PCR « maison » *Borrelia* adaptée sur LC480 est performante tant du point de vue de sa sensibilité diagnostique que de sa spécificité. Après validation de la sensibilité analytique de cette méthode, celle-ci sera employée en routine au CNR des *Borrelia* en 2019.

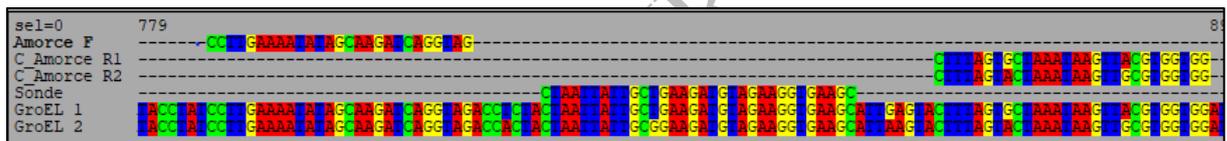
2.1.2 Mise au point d'une PCR de détection de *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*

En 2018, nous avons aussi développé une technique PCR pour la mise en évidence de *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. En effet ce micro-organisme a été détecté dans les tiques de plusieurs pays européens, dont la France (1). Il a été également décrit comme responsable de syndromes fébriles après piqûre de tiques chez des patients immunodéprimés, mais aussi chez quelques patients apparemment immunocompétents.

Les amorces et sondes ont été adaptées de la publication de Jahfari et al. qui rapporte une PCR en temps réel sur la plateforme LightCycler 480 (Roche Diagnostics Nederland B.V, Almere, Netherlands) (2).

Le gène cible est GroEL qui code une protéine chaperonne. Cette cible est communément utilisée pour mettre en évidence les bactéries de la famille des *Anaplasmataceae*. Néanmoins, *in silico*, les amorces développées par Jahfari et al. (2) ne permettaient pas d'inclure un polymorphisme décrit dans la base de données GeneBank. Nous avons donc développé une autre amorce reverse, utilisée de façon équimolaire avec l'amorce originellement décrite dans la publication (voir ci-dessous les alignements de séquences). La sensibilité a été évaluée à 3,32 copies/ μ L de matrice.

L'outil sera maintenant disponible pour investiguer la présence de *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* à la fois les tiques et les patients fébriles après piqûre de tiques.



Bibliographie

1. Portillo A, Santibáñez P, Palomar AM, Santibáñez S, Oteo JA. 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' in Europe. *New Microbes New Infect.* 2018 Jan 6;22:30–6.
2. Jahfari S, Hofhuis A, Fonville M, van der Giessen J, van Pelt W, Sprong H. Molecular Detection of Tick-Borne Pathogens in Humans with Tick Bites and Erythema Migrans, in the Netherlands. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Oct;10(10):e0005042.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

En 2018, le CNR a débuté l'évaluation des coffrets commerciaux de biologie moléculaire détectant *Borrelia* par PCR en temps réel disponible sur le marché français. En effet, le nombre de ces coffrets a nettement augmenté ces dernières années et ils commencent à être utilisés par les laboratoires d'analyses médicales. Cette étude est menée en partenariat avec l'Agence Nationale de Santé et du Médicament (ANSM).

Dans un premier temps, les données disponibles dans les notices des différents coffrets commerciaux participants à l'étude sont évaluées en partenariat avec l'ANSM qui peut obtenir des informations complémentaires des fabricants. Les premières données disponibles montrent une hétérogénéité des méthodes utilisées.

Dans un second temps, des analyses techniques seront réalisées sur l'ensemble de ces coffrets commerciaux afin d'évaluer la sensibilité et la spécificité des coffrets en partenariat avec le CNR allemand des *Borrelia*. Cette partie technique se déroulera en 2019-2020 et nous utiliserons :

- un panel de sensibilité confectionné par le CNR des *Borrelia* Allemand (ADN

quantifiés de 15 souches de *Borrelia* et 5 souches d'autres spirochètes)

- un panel de spécificité composé de 28 ADN d'autres micro-organismes et de 2 ADN humain (caucasien et asiatique).

A ce jour, il est prévu que 10 fournisseurs proposant 11 coffrets soient inclus dans cette évaluation technique.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Néant en 2018.

2.4 Collections de matériel biologique

Evolution de nos collections en 2018 :

En 2018, nous avons isolé à partir de prélèvements humains 10 nouvelles souches de *B. afzelii* et 1 souche de *B. garinii*.

La collection de souches de *Borrelia* du CNR s'élève fin 2018 à 227 souches (tableau en annexe 1.4)

En 2018, à partir de l'étude des fiches de renseignements cliniques adressées au CNR, nous avons conservé 169 nouveaux échantillons (118 sérums et 51 LCR).

La sérothèque humaine du CNR comprend fin 2018 : 2 678 échantillons humains (cf. tableau en annexe 1.4).

Date d'envoi	Matériel biologique	Souche	Projet	Destinataire
19/01/2018	Cultures bactériennes	IBS 67, IBS 72, IBS 74 et IBS 77		
03/05/2018	Biopsies cutanées	27 biopsies du PHRC « Diabolyc »	Projet protéomique <i>Borrelia</i>	Paola Cantero Liz (PhD student) IPHC-ECPM Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique (Strasbourg)
19/09/2018	Biopsies cutanées + ADN	39 biopsies du PHRC Diabolyc ADN des souches IBS 72, 78 et 91		
01/03/2018	Culture bactérienne	<i>Borrelia afzelii</i> IBS 39	"Impact of chronic bacterial infection on NKT cell lymphomagenesis in mice and humans"	Laurent Genestier Laboratoire INSERM U1111/CIRI (Lyon)
02/07/2018	Culture bactérienne	IBS 31		Cyril Guyart et Corentin Chaboul BIOASTER (Lyon)
30/08/2018	Panel d'ADN	<i>Borrelia burgdorferi</i> ss <i>Borrelia garinii</i> <i>Borrelia afzelii</i> <i>Borrelia valaisiana</i> <i>Borrelia spielmanii</i>	Validation d'une mise au point de PCR	Cyril Maingourd QUALYSE (Champdeniers)

2.5 Activités d'expertise

	Nombre	Provenance	Origine	Détails
Prélèvements humains	9 221	CHs, CHUs, LABMs	France	Voir chapitre 3.2.1 et 3.5
Analyses humains	11 776	CHs, CHUs, LABMs	France	Voir chapitre 3.2.1 et 3.5
Fiches de renseignements	1 352	CHs, CHUs, LABMs	France	Voir chapitre 3.2.1.5
Prélèvements vecteurs (tiques)	6 497 (6 214 nymphes et 283 adultes)	Collecte par le CNR et collaborateurs	France	Voir chapitre 3.2.2
Analyses vecteurs	7 114 (recherche d'ADN de 3 paramètres)	Collecte par le CNR et collaborateurs	France	Voir chapitre 3.2.2

Délai moyen de rendu des résultats d'analyses réalisées au CNR :

- Sérologie (ELISA, western-blot, Synthèse Intrathécale) : 2 à 10 jours
- Biologie moléculaire : 2 jours à 3 semaines
- Culture : 13 semaines

2.6 Activités de séquençage

- Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ? **OUI**
 - Type d'accès (interne ou externe au CNR) : externe
 - si externe, préciser quelle(s) plateforme(s) : Eurofinsgenomics (anciennement GATC)
 - Technologie/matériel de la (des) plateforme(s) de séquençage auquel le CNR a accès : Sanger (ABI 3730 XL), WGS (Illumina)
- Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique : **OUI**
 - Type d'accès : interne au CNR ;
 - Outils utilisés pour l'analyse des séquences : ClustalW (Mega 7.0), DnaSP 5.10, START 2.0, W-IQ-Tree, PHYLOViZ, ARLEQUIN 3. Tous outils open source
- Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ? **OUI**
 - Investigations d'épidémies ? NON
 - Surveillance ? OUI

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrire les analyses bio-informatiques conduites :

- En 2017, nous avons mis au point la technique de MLST.
- En 2018, elle a été appliquée sur certaines souches en collection du CNR et si le MLST direct sur échantillons positifs est validé en 2019, il sera appliqué

- chaque année aux échantillons humains positifs (culture et PCR) du CNR
- EN 2019, le cgMLST sera testé sur certaines souches et comparé au MLST. Son utilisation sera ensuite envisagé en fonction des données internationales (pas de publications actuellement sur cgMLST et *Borrelia*)

Si le séquençage est utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences brutes (fastq files) :

- Les séquences sont déposées dans un banque internationale publique : online MLST *Borrelia* database (gestionnaire : G. Margos, CNR *Borrelia* Munich)

3 Activités de surveillance

Résumé des activités de surveillance en 2018 :

○ **Surveillance humaine :** Elle est basée sur les feuilles de renseignements accompagnant les échantillons adressés au CNR. Elle couvre 70 départements. L'étude des fiches de renseignements montre que 42 % des demandes adressées au CNR concernent des troubles neurologiques, 5 % des troubles articulaires. L'étude des fiches de renseignements montre 19,5 % de cas certains, probables ou possibles selon les critères de définition de cas européens et 54 % de cas improbables.

- Le western-blot confirme l'ELISA dans 34,6 % des cas et est resté donc recommandé devant un ELISA positif ou douteux.
- La synthèse intrathécale est positif dans < 50% des cas où elle est réalisée et a écarté le diagnostic de neuroborréliose dans 65,7 % des cas où le LCR était positif en ELISA.
- L'analyse rétrospective des données du CNR a montré qu'aucune arthrite de Lyme diagnostiquée par PCR et séronégative n'a été observée en 11 ans d'activité du CNR. Ces données ont été soumises pour publication en 2018.

Les demandes de recherche de *Borrelia* par PCR sur liquide synovial ont augmenté de 71 % en 2018.

- Nous avons observé deux cas de fièvres récurrentes en 2018, toutes les 2 venant du Sénégal et dues à *B. crocidurae*.
- Aucune suspicion clinique d'infection à *A. phagocytophilum* n'a été confirmée par PCR en 2018.
- Participation annuelle du CNR au réseau Sentinelles depuis 2009.

○ **Surveillance vectorielle :**

- Différence de densité entre l'Alsace et la Bretagne, respectivement de 41 et 27 nymphes/100 m².
- Différence du taux d'infection des tiques par *Borrelia* entre l'Alsace et la Bretagne, respectivement de 17 et 7,6 %.
- Différence du taux d'infection des tiques par *B. miyamotoi* dans les 2 régions : 3,8 en Alsace et 1,7 % en Bretagne.
- Espèces de *Borrelia* majoritaires dans les tiques : *B. afzelii* + *B. garinii* : 67,8 % (*B. afzelii* majoritaire en Alsace, *B. afzelii* et *B. garinii* équivalentes en Bretagne). Plus rares : *B. burgdorferi* (12 %) et *B. valaisiana* (12 %). Exceptionnellement, en Alsace,

présence de *B. lusitaniae* : 0,7 %.

- Taux d'infection par *A. phagocytophilum* similaire entre l'Alsace et la Bretagne (0,7 et 0,3 %).

3.1 Description du réseau de partenaires

- Etude de la diversité des espèces de *Borrelia* dans les manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France (PRI 3977)

Voir détails dans la partie 3.5.1

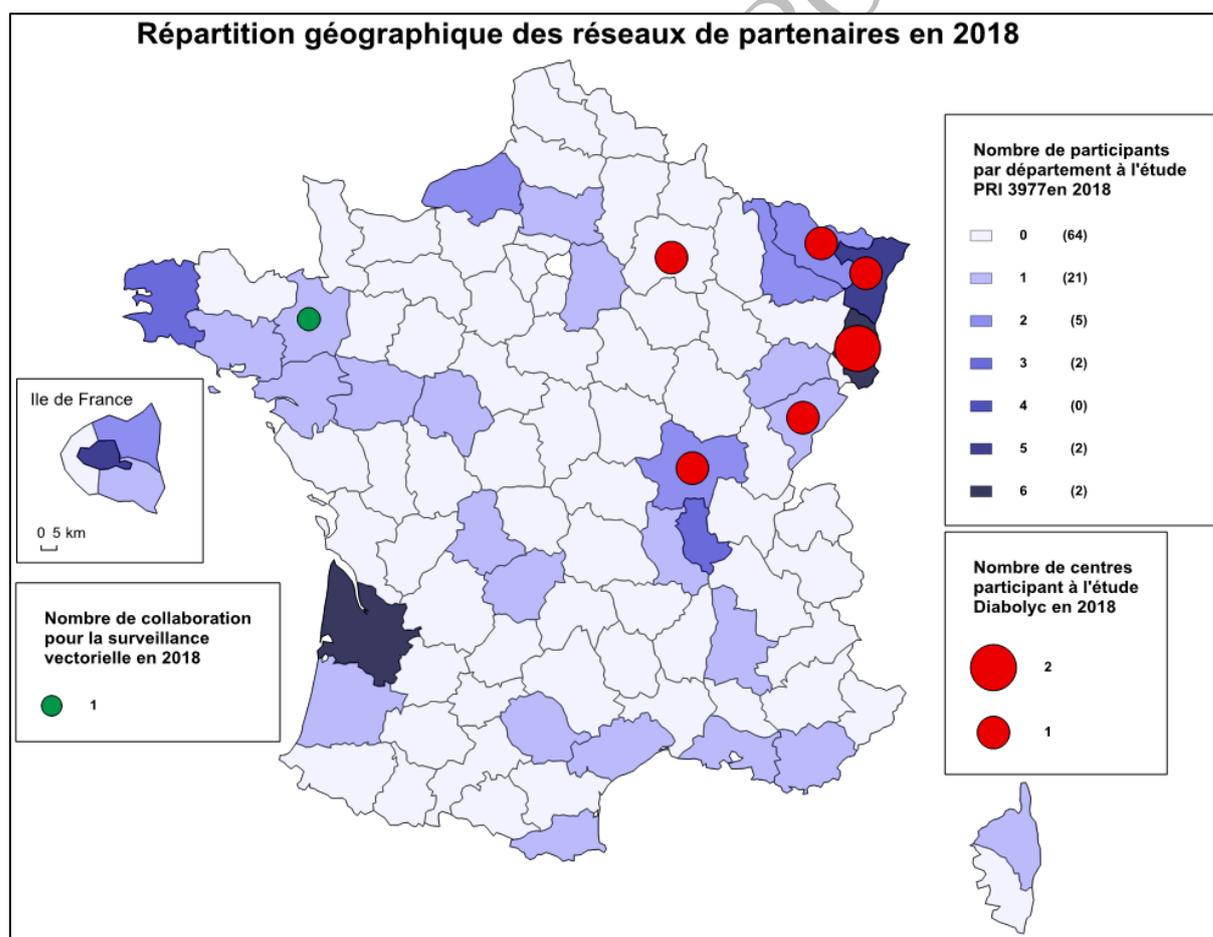
- Etude « DIABOLYC : Diagnostic Borréliose de Lyme Cutané »

Voir détails dans la partie 3.5.2

- Collaboration pour la surveillance vectorielle

Durant le précédent mandat (2015), nous avons mis en place une collaboration avec la Dre Brigitte Degeilh (CHU Rennes). Avec le mandat actuel du CNR, cette collaboration pour la surveillance vectorielle s'est perpétuée.

Ces trois réseaux de partenaires sont stables en 2018.



Estimation de la couverture du réseau ou représentativité :

Dans le cadre du PRI 3977 « biopsies cutanées », nous recevons des prélèvements cutanés (érythème migrant, acrodermatite chronique atrophiante ou lymphocytome borreléen)

effectués par des dermatologues et infectiologues de 32 départements français, répartis dans les différentes grandes régions françaises.

L'érythème migrant étant lié à la multiplication des *Borrelia* au point d'inoculation de la tique, cela nous permet d'avoir une représentation et un suivi dans le temps de la diversité des espèces de *Borrelia* inoculés par les tiques et capables d'infecter l'Homme sur le territoire métropolitain, Corse comprise, et de voir émerger éventuellement de nouvelles espèces qui seraient pathogènes pour l'Homme sur notre territoire.

Le protocole diagnostique Diabolyc, plus contraignant sur les prélèvements à effectuer, est centré essentiellement sur le quart Nord-Est de la France.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1 Surveillance humaine

L'activité d'expertise humaine du CNR *Borrelia* repose sur des analyses de sérologie (ELISA, western-blot, index de synthèse intrathécale SIT) et des analyses de biologie moléculaire (PCR).

Ces analyses peuvent être réalisées à titre gratuit si elles sont accompagnées d'une fiche de renseignements cliniques et épidémiologique (cf. annexe 2.3.2). Le recueil de ces fiches de renseignements entre dans le cadre de nos activités de surveillance des cas humains de borréliose de Lyme et l'ensemble de ces données sont analysées au chapitre 3.2.1.5. En l'absence de cette fiche de renseignements ou de compte rendu équivalent du cas clinique, l'analyse est réalisée et facturée à l'établissement demandeur par le CHU de Strasbourg.

En 2018, 9 221 échantillons biologiques ont été réceptionnés par le CNR *Borrelia* ; 8 602 (93,3 %) étaient accompagnés de demandes de sérologie, 572 (6,2 %) étaient accompagnés de demande d'analyses en biologie moléculaire et 69 (1,1 %) accompagnés de demande d'analyse par culture. Parmi ces différents échantillons biologiques, 143 (1,6 %) ont été adressés avec une double demande : soit sérologie et PCR, soit PCR et culture, ceci expliquant le total des demandes supérieur au total des échantillons biologiques réceptionnés.

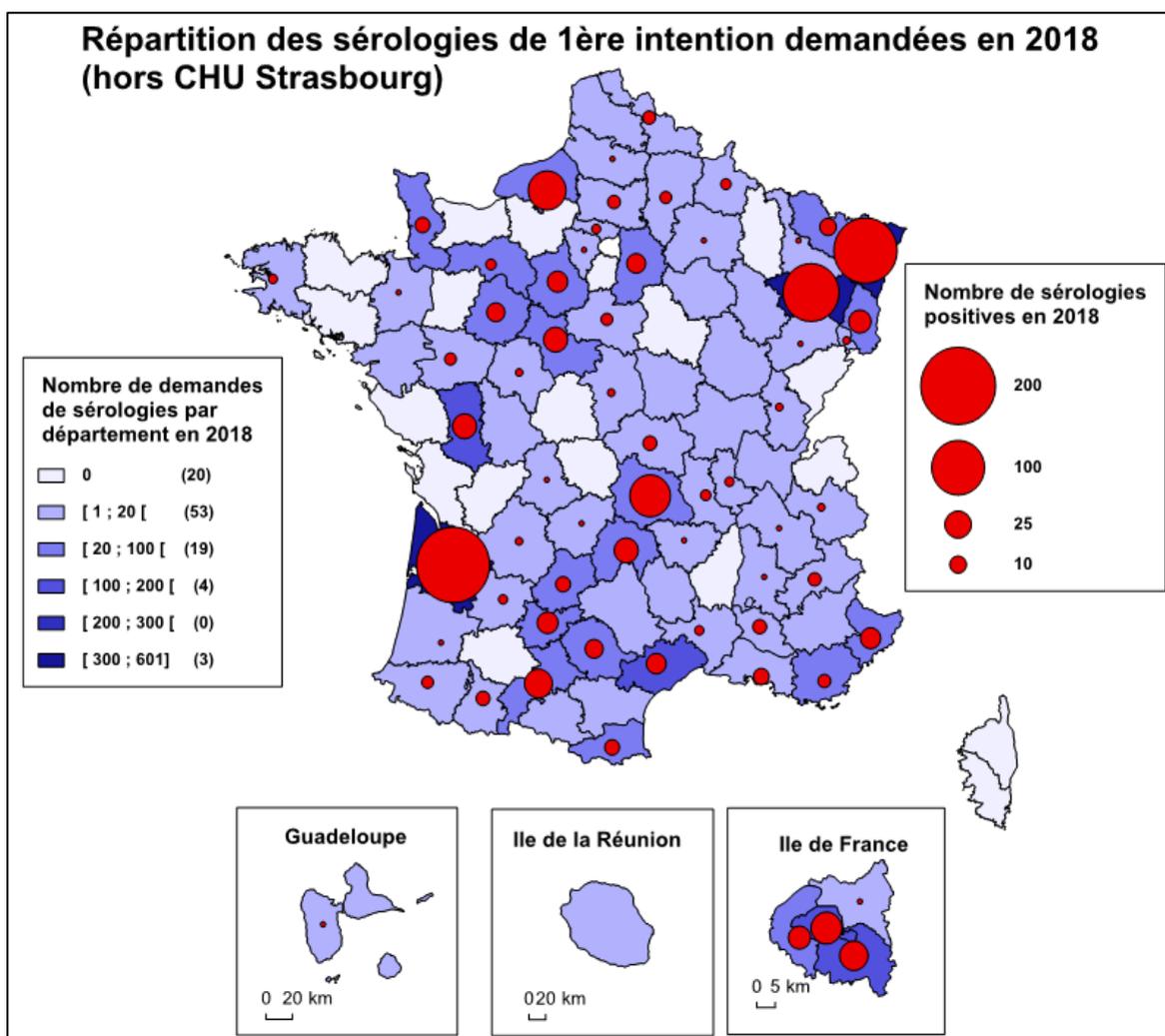
Sur l'ensemble de ces échantillons, le nombre total d'analyses réalisées s'élève à 11 776 : 11 085 analyses en sérologie, 626 analyses en biologie moléculaire : 538 en PCR *Borrelia*, 12 PCR *Borrelia*, 76 PCR *Anaplasma* et 65 culture pour recherche de *Borrelia*.

Par rapport à 2017, les tendances évolutives sont une stabilité du nombre global d'analyses réalisées avec une **augmentation de 14 % des demandes de *Borrelia* par biologie moléculaire**.

3.2.1.1 Expertise des sérologies *Borrelia* (anciennement *B. burgdorferi sensu lato*)

3.2.1.1.1 Sérologie de 1ère intention par ELISA en 2018

En 2018, le CNR a réalisé 7 426 sérologies par ELISA : 5 233 sérums et 2 193 LCR. Cette tendance est globalement stable par rapport à 2017.



Origine géographique (hors CHU de Strasbourg) des demandes et des résultats positifs pour les sérologies de 1^{ère} intention par ELISA adressées au CNR en 2018.

En 2018, les demandes, hors CHU de Strasbourg, représentaient 3 139 analyses. La carte en page suivante, objective le nombre d'analyses adressées au CNR par département demandeur et le nombre d'analyses positives en sérologie de 1^{ère} intention. Ces échantillons biologiques provenaient de 80 départements répartis sur l'ensemble du territoire national dont 2 départements d'outre-mer (Guadeloupe, et Réunion). Sur cette carte, les départements en blanc ne nous ayant adressé aucune demande. Concernant l'Alsace, les nombreuses demandes du CHU de Strasbourg ont été volontairement exclues, elles seront analysées par la suite dans un paragraphe dédié.

Ces 3 139 demandes nationales (hors CHU de Strasbourg) concernent :

- 1 998 sérums dont 746 (37,3 %) étaient positifs et 179 (9 %) douteux en ELISA
- 1 141 LCR dont 259 (22,7 %) étaient positifs et 36 (3,2 %) douteux.

Au total, 1 220 échantillons étaient positifs (32 %) ou douteux (6,8 %) en ELISA. La spécificité de ces résultats a ensuite été confirmée par immuno-empreinte, conformément aux recommandations nationales et européennes.

On constate qu'un cas de sérologie positive en ELISA est rapporté en Guadeloupe. La sérologie de confirmation par immuno-empreinte était négative et infirmait *in fine* le résultat de l'ELISA.

Demandes de sérologie de 1^{ère} intention par ELISA provenant du CHU de Strasbourg en 2018 :

Les demandes du CHU de Strasbourg (Alsace), zone d'endémie de la borréliose de Lyme, représentent 4 287 analyses, soit environ 1,3 fois plus que l'ensemble des demandes nationales.

Les 4 287 demandes du CHU de Strasbourg sont réparties de la manière suivante :

- 3 235 sérums dont 845 (26,1 %) sont positifs ou douteux en ELISA
- 1 052 LCR dont 108 (10,3 %) sont positifs ou douteux en ELISA

Parmi ces 4 287 demandes du CHU de Strasbourg, 953 (22,2 %) sont positives ou douteuses en sérologie de 1^{ère} intention par ELISA.

Ce taux de positivité et douteux est plus faible que parmi les demandes reçues de l'ensemble du territoire français, alors que le taux d'infection des tiques en Alsace est élevée ainsi que l'incidence de cette pathologie. Cela est probablement dû à une demande très fréquente de sérologie *Borrelia*, cette étiologie étant très fréquemment évoquée en Alsace lors du diagnostic étiologique d'une pathologie.

3.2.1.1.2 Sérologie de confirmation par immuno-empreinte (ou western-blot) en 2018

En 2018, 2 594 sérologies de confirmation ont été réalisées par western-blot (WB).

Préambule : l'analyse des neuroborrélioses reposent sur la sérologie positive confirmée par western blot dans le sérum et sur la présence de synthèse intrathécale spécifique d'anticorps anti-*Borrelia* objectivée en ELISA. Le profil qualitatif des anticorps dans le LCR étant similaire à celui du sérum, la technique d'immuno-empreinte dans le LCR n'apporte pas de valeur ajoutée au diagnostic de neuroborréliose. De plus, sur le plan technique, le volume de nécessaire à la réalisation de l'immuno-empreinte du LCR est très important, rendant difficile cette confirmation sur LCR pour chaque cas de neuroborréliose. Elle ne fait donc partie de l'activité usuelle du CNR. Cette demande d'analyse reste exceptionnellement possible sur demande expresse du clinicien en accord avec les biologistes experts du CNR.

Répartition géographique des demandes et des résultats positifs de sérologies de confirmation par WB en 2018 :

En 2018, les demandes hors CHU de Strasbourg, représentaient 1 676 analyses et concernaient :

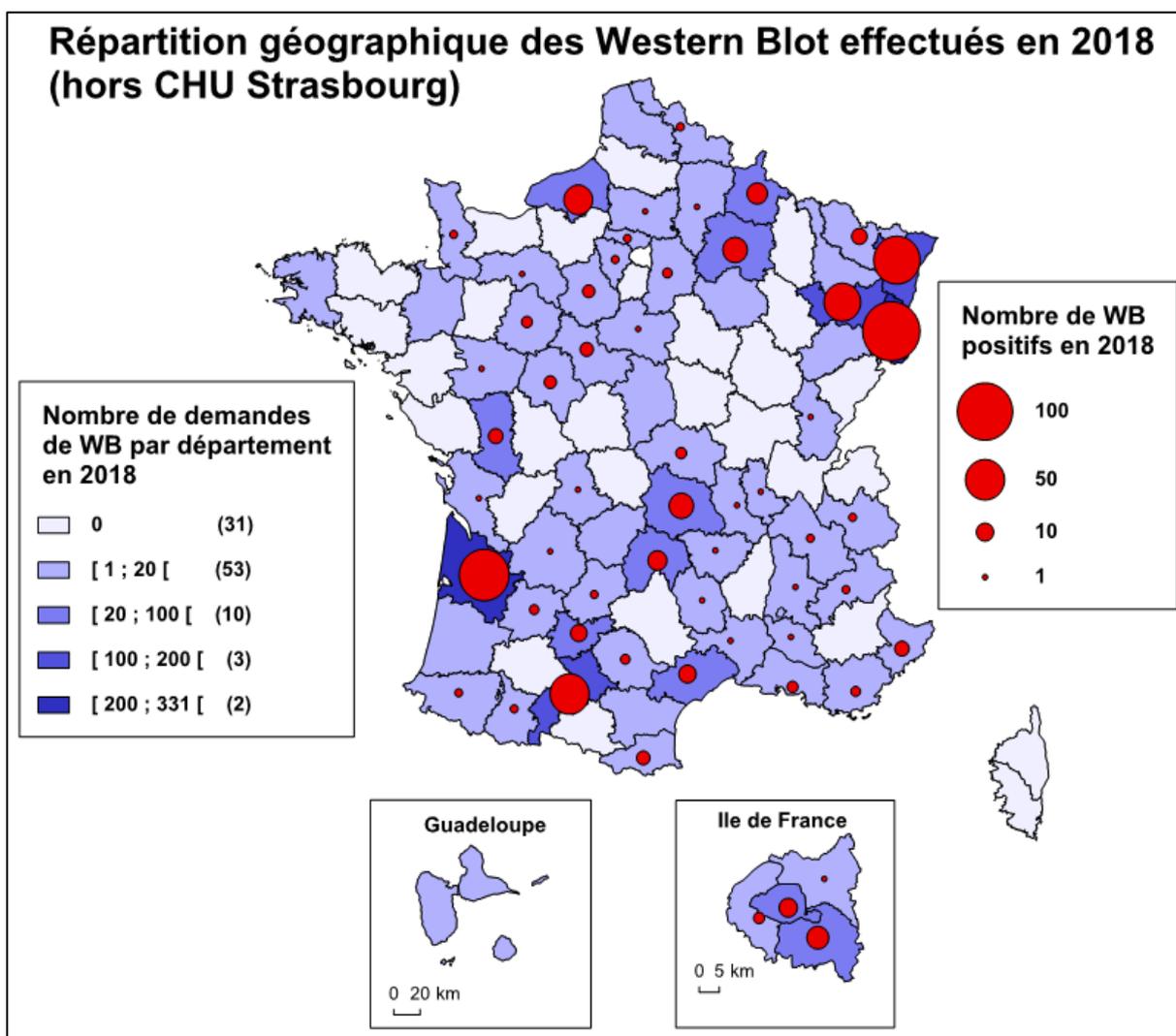
- 1 628 sérums dont 558 positifs (34,3 %)
- 49 LCR dont 42 positifs (85,7 %).

Les demandes de confirmation sérologique par immuno-empreinte adressées au CNR provenaient de 69 départements répartis sur le territoire national dont 1 département d'outre-mer (Guadeloupe). Les départements en blanc ne nous ont adressé aucune demande.

La carte en page ci-dessous représente le nombre de demandes de sérologie de confirmation en WB adressées au CNR par département demandeur ainsi que le nombre de résultats positifs obtenus.

En Alsace, les nombreuses demandes du CHU de Strasbourg ont été volontairement exclues, elles sont analysées par la suite dans un paragraphe dédié.

Répartition géographique des Western Blot effectués en 2018 (hors CHU Strasbourg)



En comptant le CHU de Strasbourg, en 2018, les sérologies de confirmation ont été réalisées sur 2 533 sérums et 62 LCR.

Parmi ces 2 595 analyses, 897 étaient positives en WB soit 34,6 % ; 793 ont eu un résultat de WB douteux soit 30,6 %. Dans le cas des WB douteux, une sérologie de contrôle à distance est recommandée.

Au total, le résultat du WB a donc infirmé plus d'un tiers des échantillons initialement détectés positifs ou douteux en 1^{ère} intention. **Ce taux élevé de réactions croisées en ELISA objective l'importance de l'analyse de confirmation par WB avant de conclure à la positivité de la sérologie pour la borréliose de Lyme.**

Dans 27,4 % des cas, seul le WB a été réalisé sur des sérums ou LCR préalablement dépistés positifs en sérologie de 1^{ère} intention par ELISA par les laboratoires demandeurs. Le but du WB étant de confirmer la spécificité des anticorps dépistés en 1^{ère} intention, il n'est pas systématiquement réalisé par certains laboratoires qui préfèrent externaliser cette prestation, notamment ceux localisés en zone de plus faible endémie. Ces 711 demandes (694 sérums et 17 LCR) provenaient de 28 départements français.

Certains départements ont très fréquemment recouru au CNR (1 à 5 fois/semaine), d'autres épisodiquement :

Nombre de départements	Nombre de demandes en 2018
19	1-10
4	10 - 50
5	50 - 310

Demandes de confirmation de sérologie par western-blot provenant du CHU de Strasbourg en 2018 :

Les demandes du CHU de Strasbourg, zone d'endémie de la borréliose de Lyme, représentaient 918 analyses, soit environ la moitié de l'ensemble des demandes nationales.

Les 918 demandes du CHU de Strasbourg étaient réparties de la manière suivante :

- 905 sérums dont 286 (31,6 %) étaient positifs et 263 étaient douteux (29,1 %)
- 13 LCR dont 11 (84,6 %) étaient positifs.

3.2.1.1.3 Etude de la synthèse intrathécale spécifique anti *Borrelia* en 2018

Les neuroborrélioses représentent en France et dans les différents pays d'Europe, la forme disséminée la plus fréquente de la borréliose de Lyme. De plus, la mise en évidence d'une synthèse intrathécale (SIT) spécifique d'anticorps dirigés contre *Borrelia* fait partie en Europe, des critères pour poser le diagnostic de certitude d'une neuroborréliose.

Dans le cadre de nos conseils à professionnels de santé, nous avons continué en 2018, à diffuser auprès des cliniciens et des biologistes, l'intérêt de cet outil pour le diagnostic des neuroborrélioses, notamment par rapport à la PCR qui ne doit être réalisée que dans des cas très précis (tout début des neuroborrélioses aiguës et toujours en complément de la synthèse intrathécale) et à expliquer aux biologistes libéraux ou hospitaliers le protocole pratique pour réaliser cette analyse.

En 2018, 1 919 demandes de recherche de synthèse intrathécale nous ont été adressées. Ce nombre est en augmentation importante (29 %) par rapport à 2017.

In fine, 1 470 (76,6 %) n'ont pas été réalisées en raison de sérologie négative dans le sérum et/ou le LCR ; dans ce cas de figure, la recherche de SIT n'est pas indiquée.

Répartition géographique des demandes et des résultats positifs de recherche de synthèse intrathécale anti Borrelia :

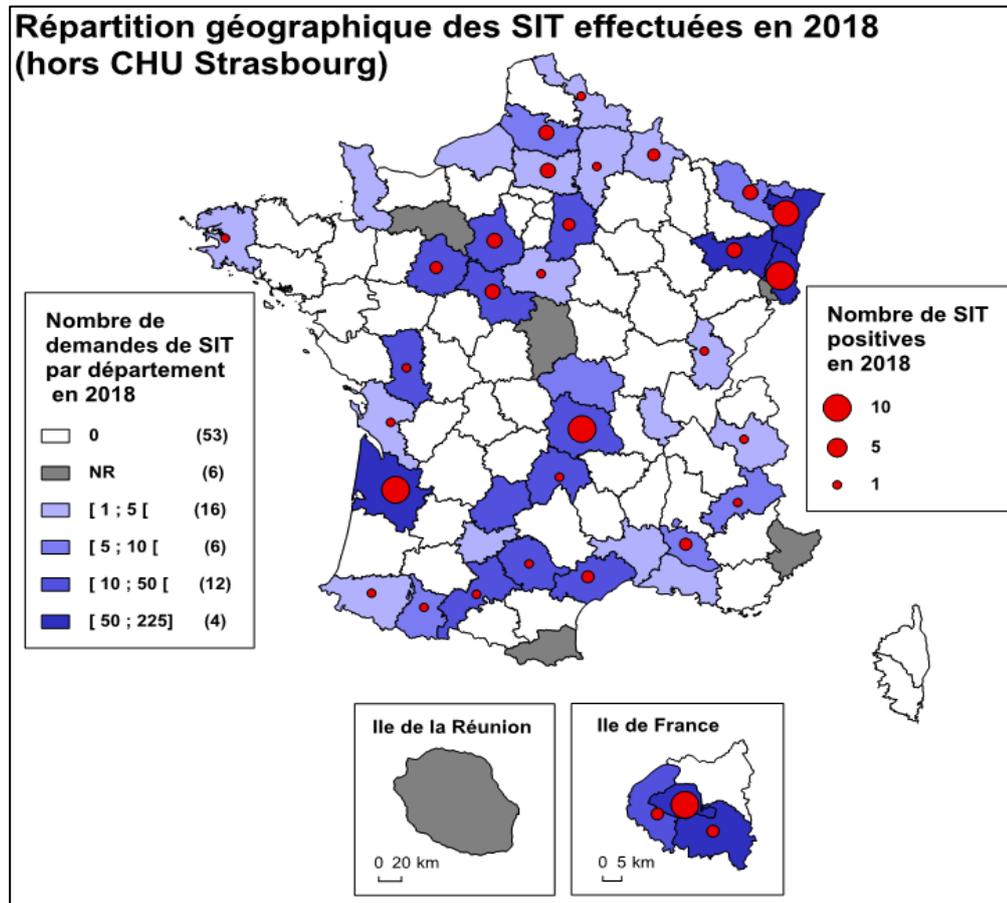
Les 1 919 demandes adressées en 2018 provenaient de 46 départements répartis sur le territoire national dont un département d'outre-mer (La Réunion). Les 449 demandes dont l'analyse a été réalisée, provenaient de 40 départements.

En 2018, les recherches de synthèse intrathécale, hors CHU de Strasbourg, représentaient 347 couples sérum/LCR dont 96 avaient une SIT positive (27,7 %), permettant d'affirmer dans ce cas le diagnostic de neuroborréliose.

Inversement, dans 219 (63,1 %) des cas où la sérologie était positive dans le LCR sans détection de SIT spécifique, ce test a permis d'écarter le diagnostic de neuroborréliose. Dans 9,2 % des cas, le résultat était douteux, ne permettant ni d'affirmer ni d'infirmer le diagnostic.

La carte ci-dessous représente le nombre de demandes adressées au CNR par département demandeur et dont l'analyse a pu être réalisée ainsi que le nombre de résultats positifs obtenus pour la recherche de SIT.

On note que les neuroborrélioses sont observés sur l'ensemble des départements du territoire national qui nous ont adressé des échantillons.



Les départements en blanc ne nous ont adressé aucune demande.

Les départements en gris nous ont adressé des demandes pour lesquelles la recherche de SIT n'était pas indiquée en raison de l'absence d'anticorps spécifiques dans le sérum et/ou le LCR.

En Alsace, les nombreuses demandes du CHU de Strasbourg ont été volontairement exclues, elles seront analysées ci-dessous dans un paragraphe dédié.

Demandes de SIT provenant du CHU de Strasbourg en 2018 :

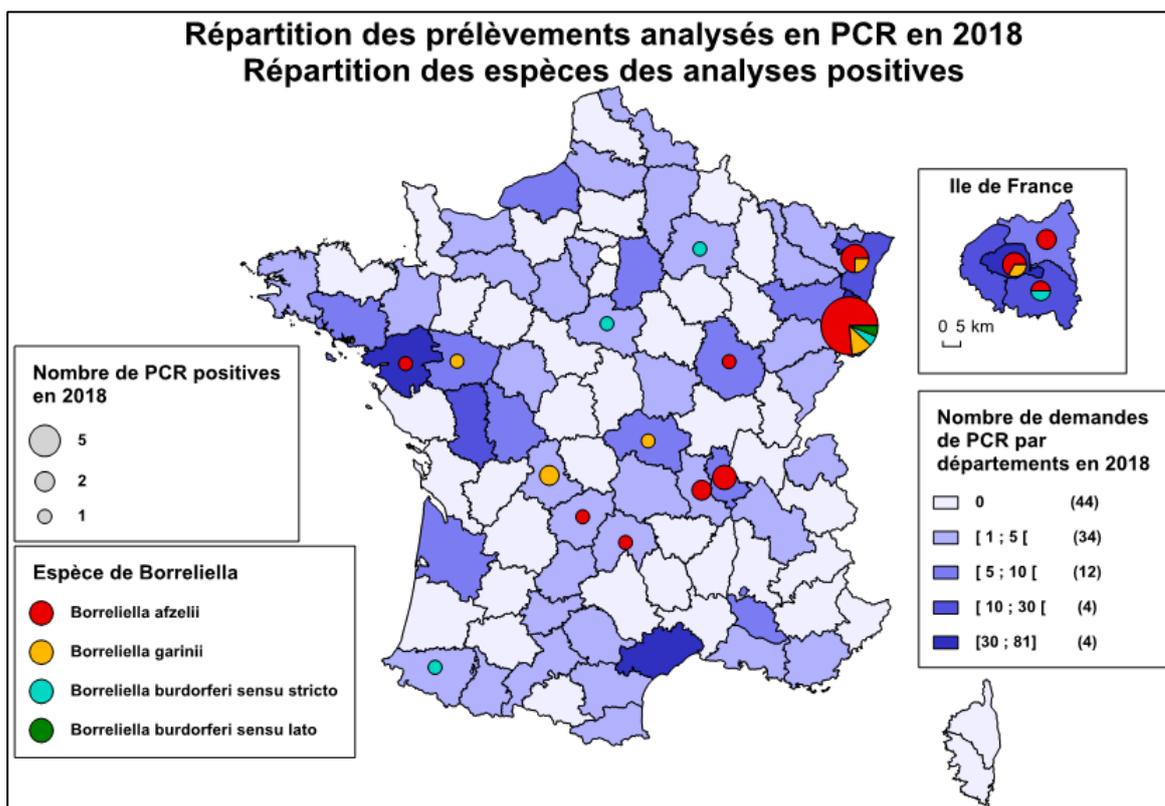
Les demandes du CHU de Strasbourg, situé en Alsace, zone d'endémie de la borréliose de Lyme, représentent 947 analyses, dont 102 ont été réalisées (10,7 %) soit environ la moitié des demandes pour environ un quart de l'ensemble des demandes réalisées.

Les 102 demandes du CHU de Strasbourg dont l'analyse a pu être réalisée sont réparties de la manière suivante, 15 couples LCR/sérum (14,7 %) ont une SIT positive, permettant d'affirmer dans ce cas le diagnostic de neuroborréliose. Inversement, dans 67 (65,7 %) des cas où la sérologie était positive dans le LCR sans détection de SIT spécifique, ce test a permis d'éliminer le diagnostic de neuroborréliose. Dans 19,6 % des cas, le résultat était douteux ou ininterprétable et ne permettait ni d'affirmer ni d'infirmier le diagnostic.

3.2.1.2 Activité d'expertise en Biologie Moléculaire du CNR en 2018

En 2018, 538 prélèvements provenant de 54 départements répartis sur le territoire national. Ce nombre de demandes a augmenté de 9,8 % par rapport à l'année 2017.

Parmi ces demandes, 3,5 % n'ont pas pu être réalisées car la nature de l'échantillon biologique n'était pas indiquée pour l'analyse (sérum, sang sur tube EDTA, liquide pleural). Dans ces cas, un contact téléphonique avec le prescripteur a permis d'obtenir un prélèvement plus adéquat ou d'orienter le prélèvement vers une autre analyse (sérologie).



Parmi les 538 prélèvements analysés, on comptait 204 prélèvements articulaires (liquides et biopsies synoviales), 196 LCR et 138 prélèvements de diverses origines (biopsies cutanées ou de tissu profond ; extraits d'ADN ; humeurs aqueuse ou vitré ; biopsie musculaire ; fragment de tissu nerveux ; biopsie rénale ; biopsies ganglionnaires ; sang sur tube EDTA).

- Ainsi, près de 36,4 % des prélèvements adressés étaient des LCR ; un seul était positif. Il provenait du CHU d'Angers.
- 24 sangs sur EDTA ont été analysés. Ces recherches de *Borreliella* ont été effectuées dans le cadre de la polémique médiatisée sur la maladie de Lyme dite chronique, chez des patients présentant des troubles variés mal systématisés depuis de nombreux mois ou années. Tous étaient négatifs en PCR au CNR.
- **Parmi les 204 prélèvements articulaires reçus, 14 étaient positifs (6,9 %) : 5 à *B. burgdorferi* (espèce minoritaire dans les tiques), 4 à *B. afzelii*, 4 à *B. garinii* et un échantillon positif n'a pas pu être typé (signal trop faible). L'origine géographique des 14 cas d'arthrite de Lyme était diverse sur la métropole : Aurillac, Colmar, Limoges, Orthez, Orléans, Paris, Reims, S^t Mande et Strasbourg). Il s'agissait tous de mono-ou oligo-arthrites des grosses articulations (genou) et tous les patients étaient séropositifs en ELISA.**

- Parmi les 138 prélèvements de nature diverse : 36 biopsies cutanées étaient positives, soit 26 % des biopsies cutanées analysées. La très grande majorité (92%) étaient infectées par *B. afzelii* (33 positifs), et 4 à *B. garinii*. Parmi ces biopsies positives, 30 provenaient du « protocole biopsies cutanées » - Etude de la diversité des espèces de *Borrelia* dans les manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France et de l'étude « DIABOLYC : Diagnostic Borréliose de Lyme Cutané », les 6 autres ont été adressées par différents hôpitaux : Colmar, Dijon, Limoges, Nantes, Paris, et Villejuif).

Une biopsie musculaire (provenant de l'hôpital de Nice) était positive à *B. garinii*. Il s'agissait d'un patient présentant par ailleurs une neuroborréliose certaine (SIT positive) avec atteinte musculaire dans le territoire de la radiculite (membre supérieur gauche).

Espèces de Borrelia détectées en PCR en 2018 selon la nature des prélèvements

Espèces de <i>Borrelia</i>	Prélèvements articulaires	LCR	Biopsies cutanées	Autres éch.	Total (%)
<i>B. afzelii</i>	4	0	33	0	37 (71,2)
<i>B. burgdorferi</i>	5	0	0	0	5 (9,6%)
<i>B. garinii</i>	4	1	3	1 (biopsie musculaire)	9 (17,3%)
Non typable	1	0	0	0	1 (1,9 %)

3.2.1.3 Typage de souches cliniques de *Borrelia* par séquençage multi-locus (MLST)

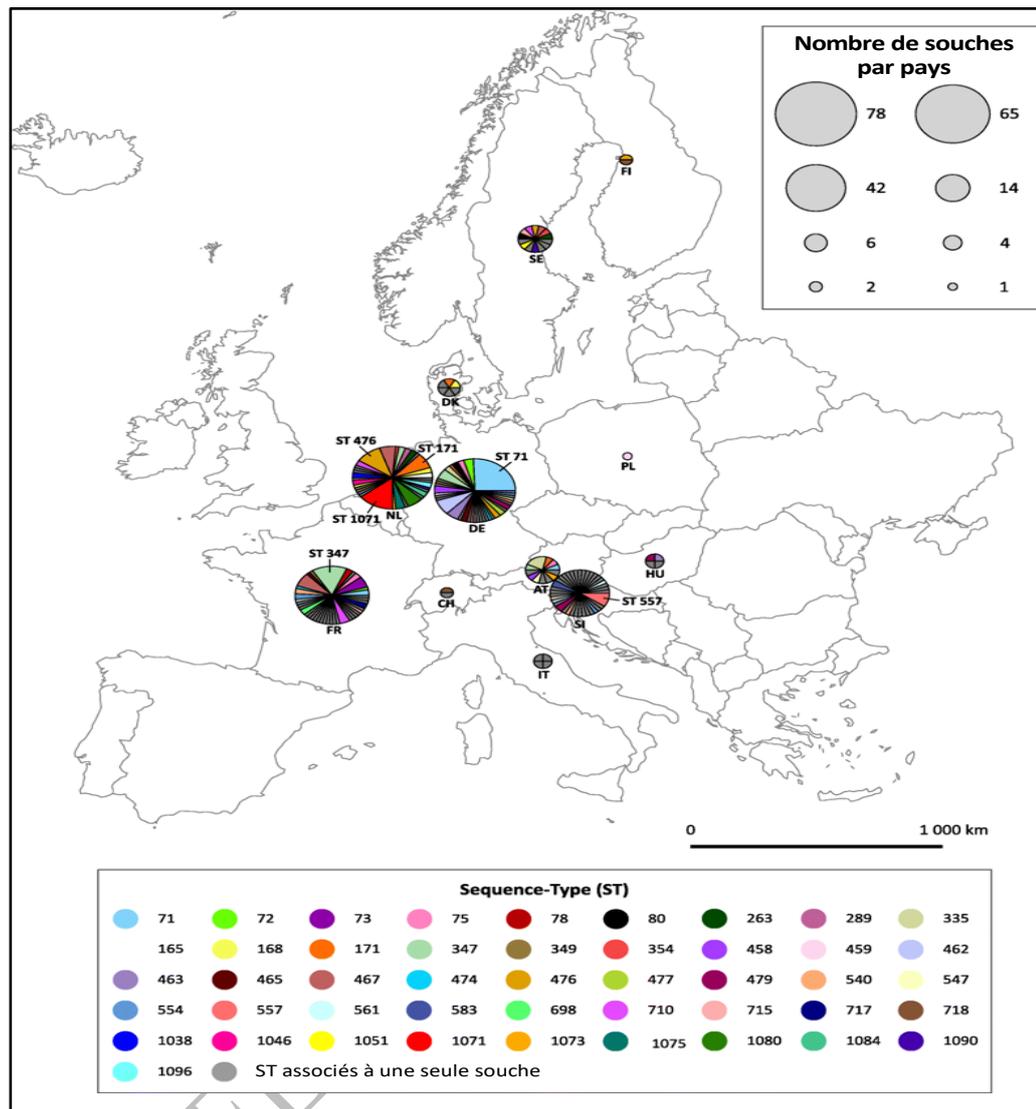
Nous avons employé le schéma MLST publié pour les espèces de *Borrelia* (Margos et al. 2008 ; Wang et al. 2014). La méthode a été mise au point dans le laboratoire l'an passé et repose sur l'étude des séquences partielles de 8 gènes de ménage de *Borrelia* : *nifS* (719 pb), *clpA* (849 pb), *rplB* (720 pb), *pyrG* (706 pb), *recG* (741 pb), *clpX* (721 pb), *pepX* (721 pb) et *uvrA* (677 pb).

Cette approche revêt des applications pour : i) étudier la distribution clonale des souches de *Borrelia*, et ii) étudier les relations phylogénétiques entre les souches par analyse phylogénétique multi-locus.

Nous avons typé par MLST 63 souches cliniques de *B. afzelii*, espèce génomique majoritaire dans les cas européens de borréliose de Lyme. La majorité de ces souches correspondent à des cas d'érythème migrant (n = 43), tandis que les autres sont associées à des cas de borréliose de Lyme disséminée (érythème migrant multiple : n = 7 ; acrodermatite chronique atrophiante : n = 7 ; lymphocytome borreléen : n = 3 ; fasciite : n = 1). Nous avons également procédé au typage de deux souches cliniques de *B. afzelii* en notre possession et originaires d'Allemagne, associées à un cas d'acrodermatite chronique atrophiante et un cas d'arthrite de Lyme.

Nous avons étudié la distribution des profils alléliques ou « *sequence types* ST » obtenus ainsi que les relations phylogénétiques des isolats avec 245 souches cliniques supplémentaires isolées dans 15 pays d'Europe. **Le typage MLST des 63 souches isolées**

au CNR de Strasbourg a détecté 10 nouveaux allèles et 27 nouveaux profils alléliques de *B. afzelii*.

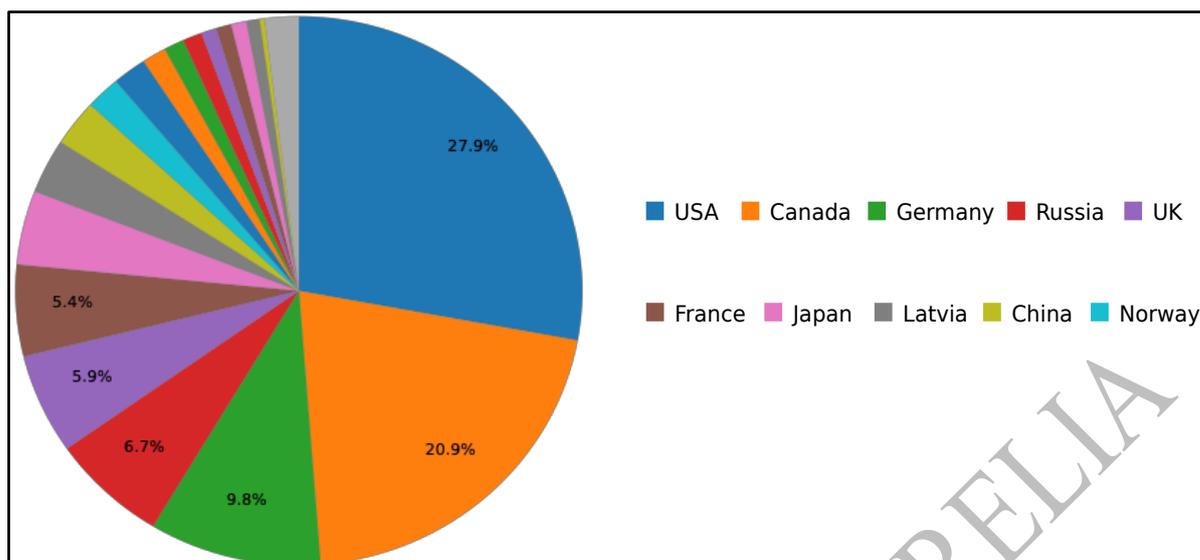


Répartition spatiale des profils alléliques (STs) de 308 souches de *B. afzelii* d'origine clinique.

L'analyse phylogénétique comparée a été faite avec les 308 souches européennes existantes dans la base de données européenne MLST *Borrelia*. Plus de 39 pays ont ainsi mis en commun leurs données de profils MLST de souches de *Borrelia* d'origines diverses (tiques, animales, humaines), afin d'améliorer la surveillance épidémiologique mondiale de la borreliose de Lyme.

Notre analyse a mis en évidence une structuration de la population étudiée de *B. afzelii* sans clades différenciés. Nous avons montré que deux profils alléliques (ST 467 et 1071) agrégeant 23 souches étaient spécifiquement associées à des infections localisées précoces (érythème migrant). En revanche, le profil ST 1073 ne regroupait que des souches isolées lors de manifestations disséminées (n=2). Ces résultats ont été publiés dans *Parasites & Vectors*.

Nous avons contribué à la base de données MLST *Borrelia* avec 63 souches de *B. afzelii* typées au CNR *Borrelia* en 2018, ce qui place la France dans les 3 pays ayant fourni le plus de données de profils MLST en Europe.



Distribution relative des 2524 souches (791 STs) de la base PubMLST *Borrelia* dans les 39 pays où les enregistrements ont été réalisés (<https://pubmlst.org/borrelia/> consulté le 09/04/19).

Nous prévoyons d'employer dans le futur une approche de génétique de population systématisée lors de l'isolement au CNR de nouvelles souches cliniques de *Borrelia* (*B. afzelii* et autres espèces génomiques) en utilisant le schéma MLST 8 gènes ou en sélectionnant un ou plusieurs loci.

3.2.1.4 Détection de *Borrelia* (agents de fièvres récurrentes)

En 2018, nous avons reçu 12 demandes d'analyses pour suspicion de fièvres récurrentes. Les prélèvements provenaient de : CHU Bordeaux, CH Compiègne, CHU Dijon, CH Epinal, CH de Haguenau, Laboratoire de Pouilly en Auxois, CHU Pitié Salpêtrière, CHU de Nantes, CHU Necker, CH St Lo, CHU de Strasbourg, CH Villeneuve-Saint-Georges.

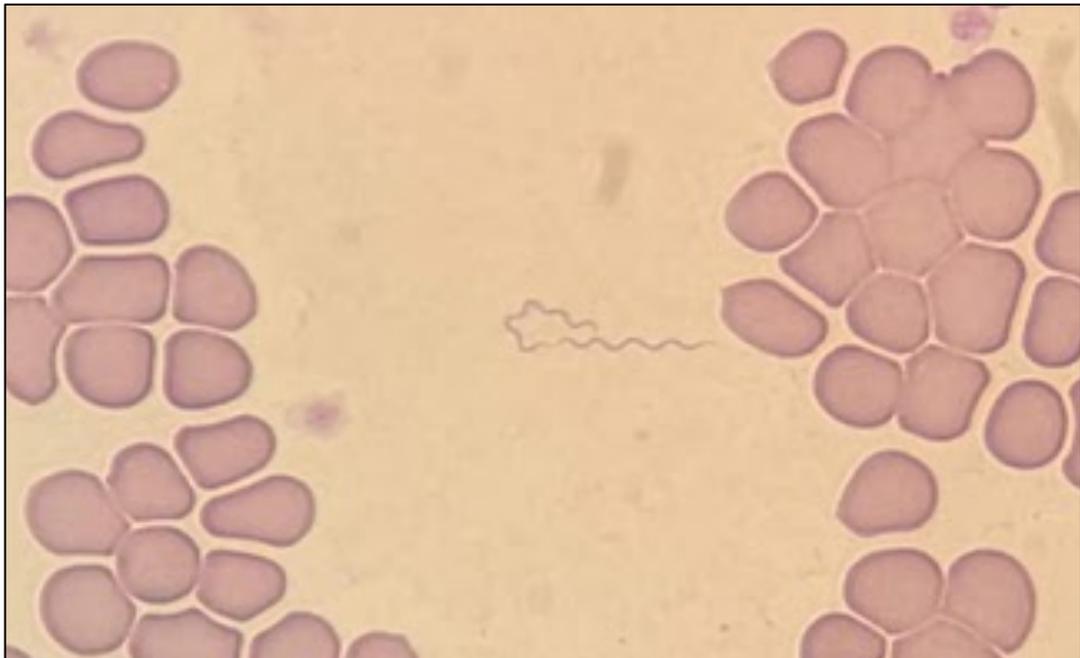
Les patients étaient 7 femmes et 5 hommes, âgés de 4 à 80 ans.

La majorité de ces patients présentaient une fièvre récurrente accompagnée ou non d'autres signes, parfois peu spécifiques suivant les cas : asthénie, syndrome grippal, myalgies, arthralgies, prurit, cytolysé hépatique.

Parmi ces 12 demandes, 7 (58 %) faisaient suite à un retour de voyage (Maroc, Sénégal (n = 5) et Turquie). Les 5 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. Parmi ces 5 demandes sans facteur de risque apparent, deux avaient été spécifiquement prescrites pour recherche de *Borrelia miyamotoi* ; dans les deux cas, le résultat était négatif.

Sur ces 10 échantillons analysés, 2 échantillons étaient positifs et le séquençage précisait l'espèce : *Borrelia crocidurae* dans les 2 cas.

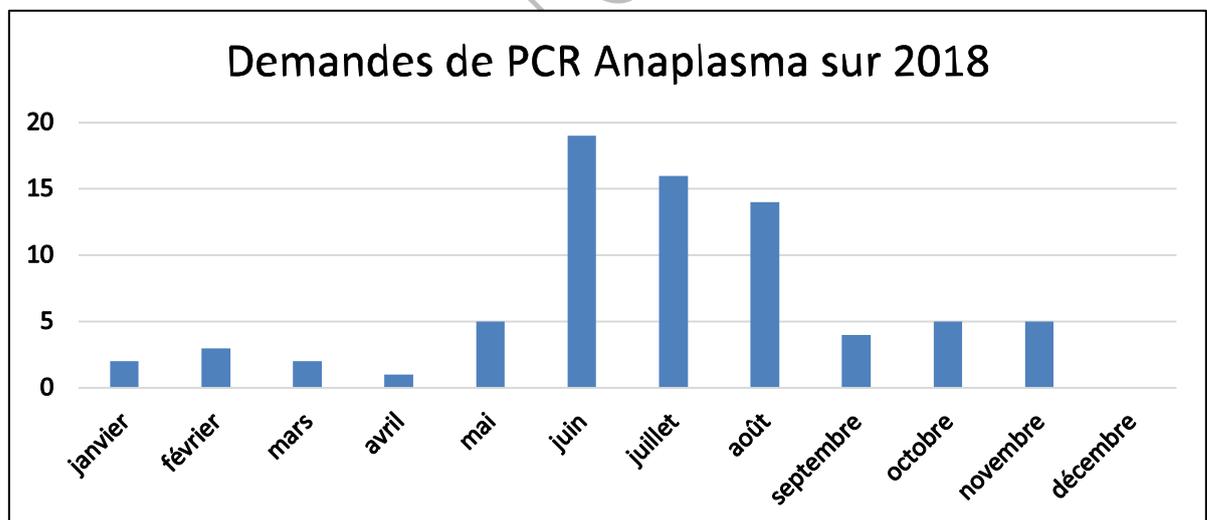
Ces 2 patientes (une enfant de 4 ans et jeune fille de 19 ans) revenaient toutes les deux d'un séjour au Sénégal et présentaient des épisodes fébriles récurrents. Dans les deux cas, leur évolution a été favorable sous antibiothérapie par bêta-lactamines.



(Image : *Borrelia crociduræ* dans le sang d'une patiente de 4 ans ;
Crédit photo : CNR Borrelia 2018)

3.2.1.1 Surveillance des cas d'anaplasmose granulocytaire humaine

En 2018, nous avons reçus 76 demandes de recherche d'*Anaplasma phagocytophilum* par biologie moléculaire ; on note une saisonnalité estivo-automnale des demandes, comme attendu pour une pathologie aigüe après piqûre de tiques.



Les demandes provenaient dans 62 % des cas de centres hospitaliers généraux ou de CHU de l'ensemble de la France, dans 22 % des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg et dans 16 % des laboratoires privés de la région Alsace.

Nous n'avons confirmé cette année aucune suspicion clinique d'anaplasmose granulocytaire humaine en 2018.

Ces données PCR ont été complétées par l'analyse des données de sérologie *A. phagocytophilum*. En effet, cette sérologie permet d'élucider certains cas lorsque l'épisode bactériémique est résolu, la PCR ne permettant alors plus toujours de mettre en évidence la bactérie. Il est communément admis qu'une séroconversion ou une augmentation du titre en IgG de 4 fois signe une anaplasmose granulocytaire humaine.

Le laboratoire a reçu en 2018 616 demandes de sérologie *A. phagocytophilum*. Les prélèvements étaient majoritairement uniques, rendant difficile l'interprétation ; une 2^{ème} sérologie de contrôle n'a été pratiquée que dans 13 % des cas environ.

Aucun cas d'anaplasmose granulocytaire humaine n'a pu être confirmé par sérologie non plus cette année.

Ces résultats de PCR et de sérologie *A. phagocytophilum* sont à mettre en regard d'une baisse cette année de la prévalence du portage par les tiques vectrices d'*Anaplasma phagocytophilum*. La surveillance sur les années qui viennent est nécessaire afin de confirmer ou d'infirmer cette tendance.

3.2.1.2 Analyse des fiches de renseignements accompagnant les échantillons biologiques

Le recueil de renseignements cliniques et épidémiologiques entre dans le cadre de nos activités de surveillance des cas humains de borreliose de Lyme.

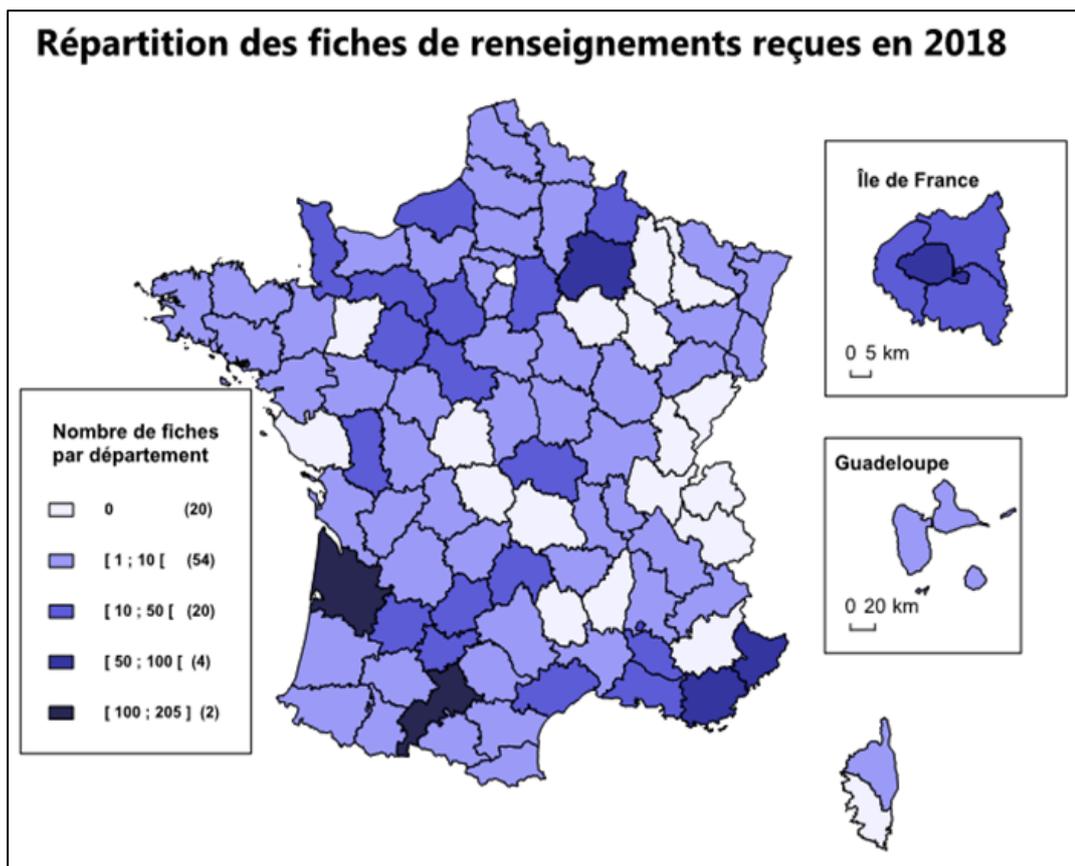
L'analyse des fiches de renseignements permet d'extraire des informations pour l'analyse épidémiologique comme l'âge des patients, le sexe, les facteurs de risque, les signes cliniques, etc. Les données recueillies sont saisies dans un fichier Excel® contenant la retranscription manuelle des fiches de renseignements réceptionnées dans l'année par le CNR ainsi que les résultats biologiques relatifs à chaque analyse. Chaque fiche est ensuite classée en différentes catégories en fonction des critères diagnostiques de l'ESGBOR (European Study Group on Lyme Borreliosis).

Durant l'année 2018, 1 352 fiches de renseignements ont été reçues.

Parmi ces fiches, 3 % ont été inexploitable car insuffisamment remplies, voire complètement vides d'informations épidémiologiques.

Depuis 2016, afin de pallier cette insuffisance, les prescripteurs ont été prévenus que les dossiers inexploitable sur le plan épidémiologique et/ou clinique ne peuvent pas être utilisés pour les activités de surveillance du CNR et ne bénéficiaient plus de la prise en charge financière des analyses par le CNR. Suite à cette démarche, nous avons noté une diminution significative du nombre de fiches inexploitable depuis 2016.

Les fiches reçues couvrent quasiment tout le territoire Français, elles proviennent de 70 départements (voir graphique page suivante) :

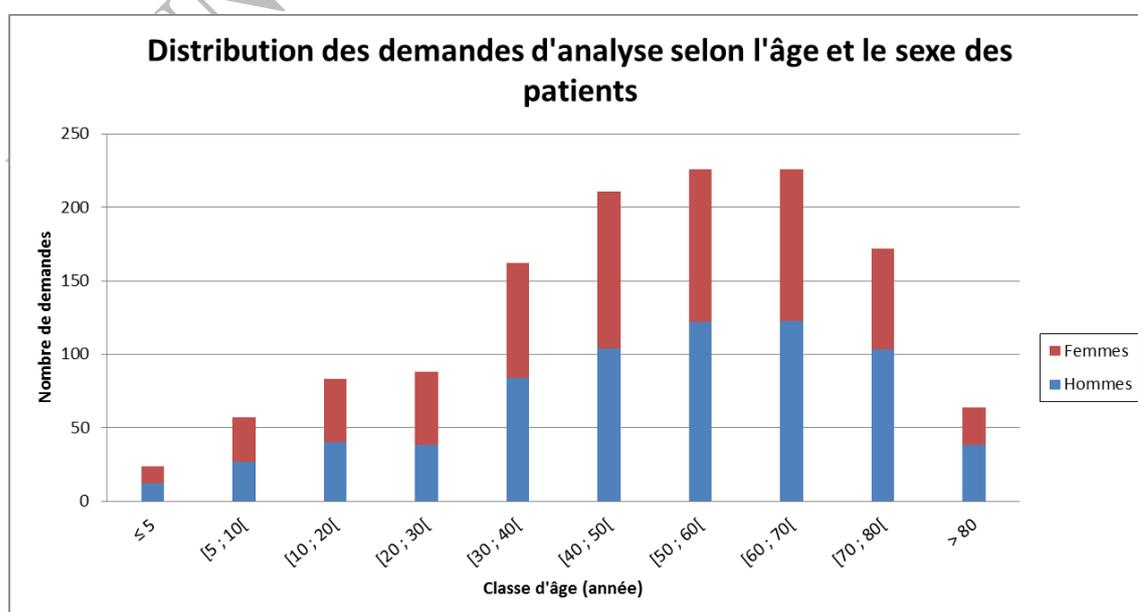


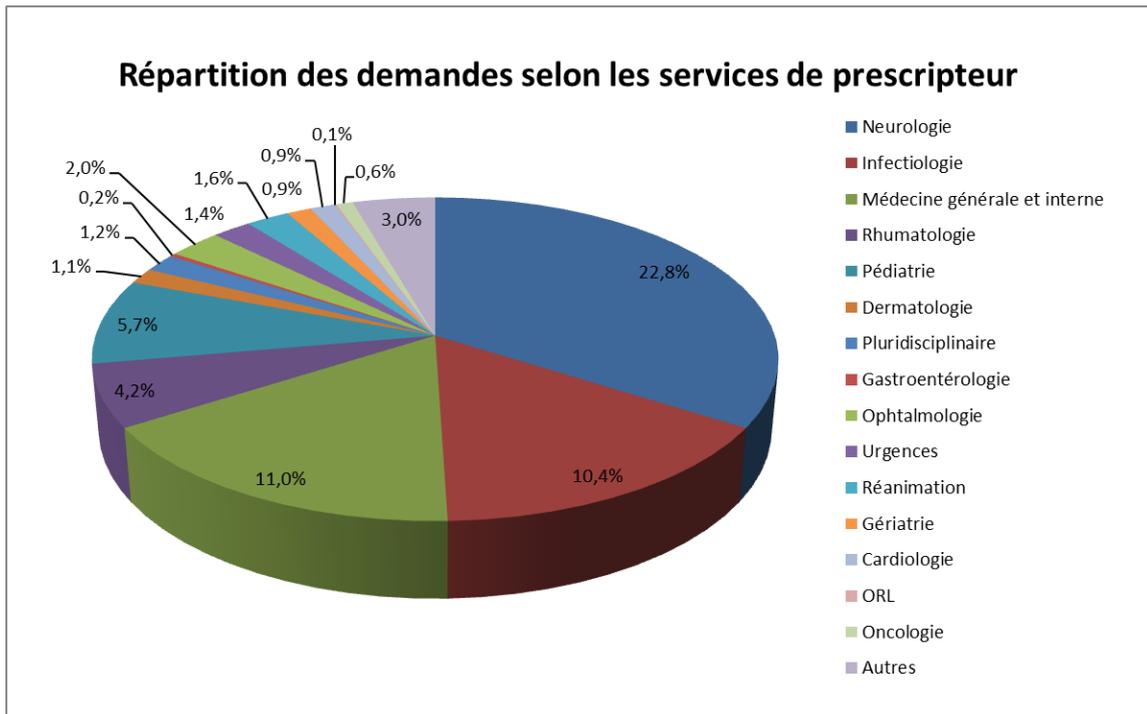
La majorité des fiches réceptionnées (87,4 %) proviennent de CHU ou de CH.

En 2018, l'âge des patients analysés varie de 11 mois à 96 ans. Le sexe ratio est de 1,11 homme/femme.

On note un pic des demandes d'analyses pour les patients de 50 à 70 ans, cette classe d'âge est habituellement plus exposée au risque de contamination par piqûre de tiques (augmentation du temps de loisirs en pleine nature lié à la retraite par exemple).

Les fiches de renseignements ont également été analysées en fonction de la nature du service hospitalier prescripteur :



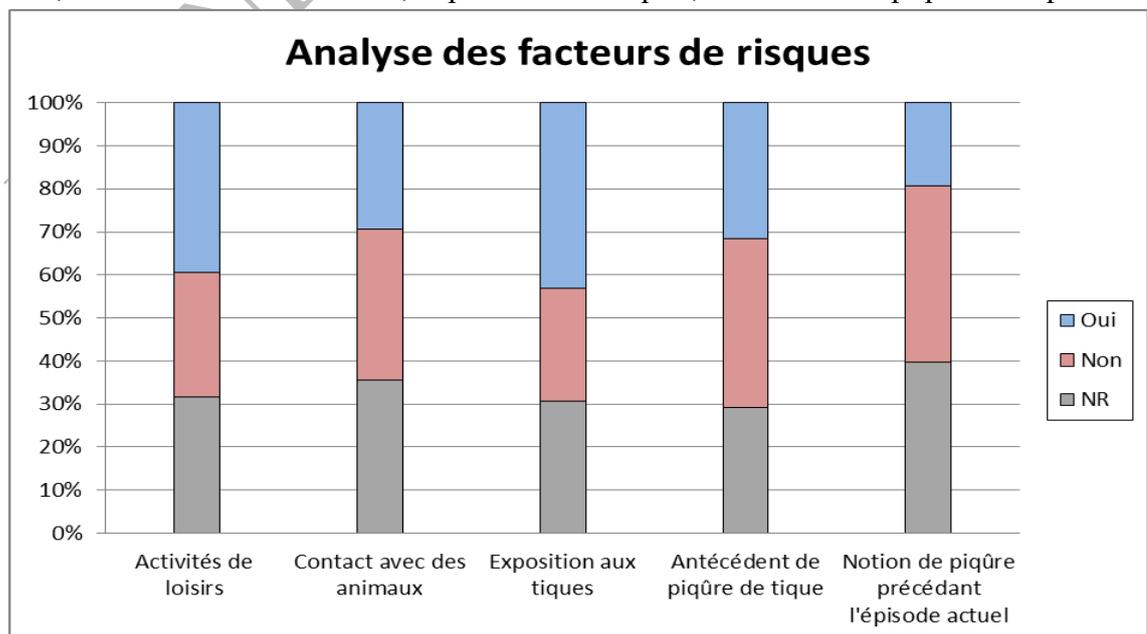


Ne sont représentées, dans le graphique ci-dessus, que les fiches dont le service hospitalier prescripteur est renseigné, soit 65 % du total des fiches de l'année 2018 (hors laboratoires, médecins généralistes et fiches provenant de CH non complétées pour cet item).

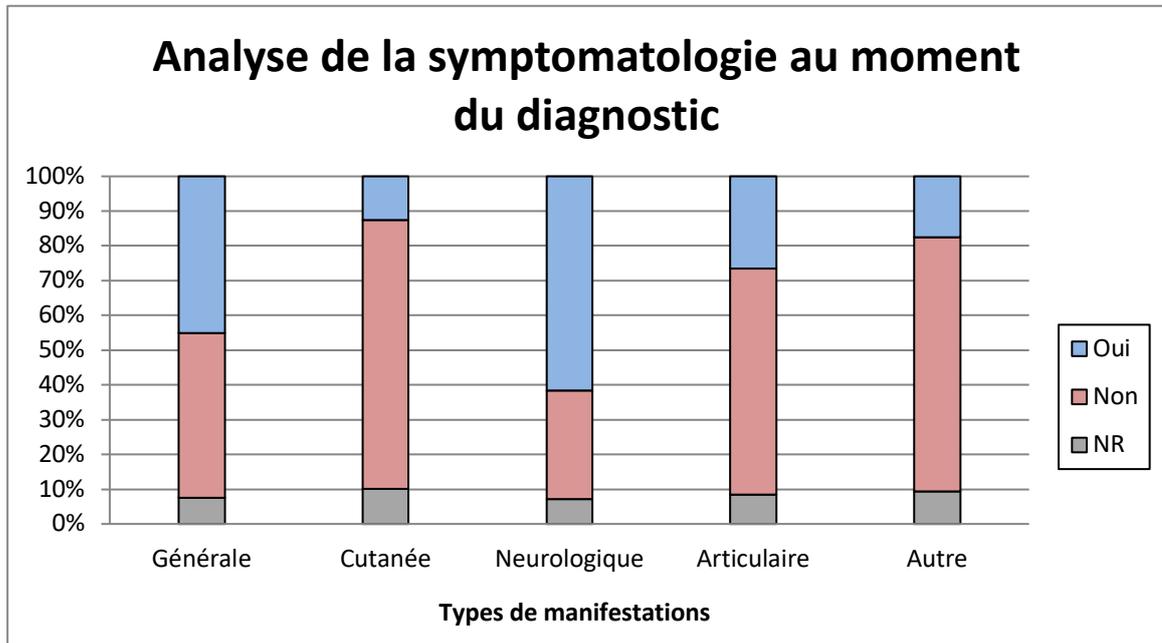
Depuis 2012, la neurologie est la spécialité la plus demandeuse de sérologie *Borrelia*. Ceci est dû au fait que la neuroborréliose peut être un diagnostic différentiel de plusieurs pathologies neurologiques et que les neuroborrélioses sont la forme disséminée de Lyme la plus fréquente en Europe.

La catégorie « autres » (3 %) regroupe des spécialités peu représentées comme la pneumologie, diabétologie, allergologie, médecine légale, etc.

La fiche de renseignements permet le recueil des facteurs de risques suivants : activité de loisirs, contact avec des animaux, exposition aux tiques, antécédent de piqûre de tique :



Les fiches de renseignements permettent également le recueil des grandes catégories de symptômes présentés par le patient au moment de la suspicion diagnostique :



La catégorie « autres » regroupe des manifestations diverses, comme par exemple des symptômes oculaires (8,2 %), cardiaques (4,2 %), auriculaire, dépression, etc.

Chaque fiche est analysée et triée en fonction des critères diagnostiques de l'ESGBOR (cf. annexe).

En 2018, 2,8 % des fiches n'ont pas pu être analysées en raison du manque de renseignements concernant la symptomatologie au moment du prélèvement.

De plus, **42,4 % des dossiers adressés au CNR ont été classés comme « hors ESGBOR » car aucun critère diagnostique de borréliose de Lyme selon l'ESGBOR n'était présent.**

Cette dénomination remplace les « non-cas » définis en 2012 pour lesquels l'analyse demandée n'était pas indiquée. Chez la plupart de ces cas « hors ESGBOR », une borréliose avait été suspectée face à des symptômes peu ou non spécifiques (algies, asthénie, fièvre, vertiges, troubles mnésiques, lésions cutanées atypiques, etc.) voire inappropriés (anémie, cancer, douleurs dentaires, vomissements, etc.).

Au total, **parmi les données analysées en 2018, 127 patients soit 9,8 % présentaient un diagnostic certain d'infection à *Borrelia*, toutes manifestations cliniques confondues, selon les critères de définition de cas de l'ESGBOR.**

Pour les cas non certains : probables, possibles, peu probables, improbables ou indéfinissables, les critères de classification de ces cas sont détaillés en annexe.

	NB	ART	EM	OC.	ACA	CARD	LB	Total (%)
Certain	43	18	51	7		4	4	127 (16%)
Probable	9						1	10 (1,3%)
Possible	7	6	2	2				17 (2,2%)
Peu probable	16							16 (2%)
Improbable	325	21	2	52	1	24	1	426 (54,2%)
Indéfinissable	160	17	1	6	1	3	2	190 (24,3%)
Total	560 (42,7 %)	62 (4,8 %)	56 (4,3 %)	67 (5,1 %)	2 (0,6 %)	31 (2,4 %)	8 (0,6 %)	786

Ainsi, nous pouvons conclure que les patients atteints d'une borréliose de Lyme certaine correspondent à des présentations cliniques variées et ne représentent qu'un faible pourcentage des demandes accompagnées de fiches de renseignements. Le diagnostic de maladie de Lyme reste délicat et l'interprétation des différentes données n'est pas toujours aisée pour les prescripteurs.

3.2.2 Surveillance vectorielle

3.2.2.1 Objectifs de la campagne de collecte de 2018

Dans le cadre des missions du CNR, la surveillance acarologique investigue :

- la répartition du vecteur *Ixodes ricinus* dans deux régions du Nord de la France, une à l'Est, une à l'Ouest : Alsace et Bretagne
- le risque acarologique de borréliose de Lyme (BL), également en Alsace et en Bretagne
- les variations de ce risque au sein des sites d'une même région endémique, l'Alsace
- le taux de nymphes infectées par *Borrelia*, *A. phagocytophilum* et les *Borrelia* agents de fièvre récurrente (dont *B. miyamotoi*) dans ces deux régions.
- Les variations de ces paramètres au fil des mois et des années

3.2.2.2 Choix des sites de collecte et méthodes

L'objectif est de pouvoir comparer le risque acarologique dans deux grandes régions de France, au Nord-Ouest (climat océanique) et au Nord-Est (climat continental).

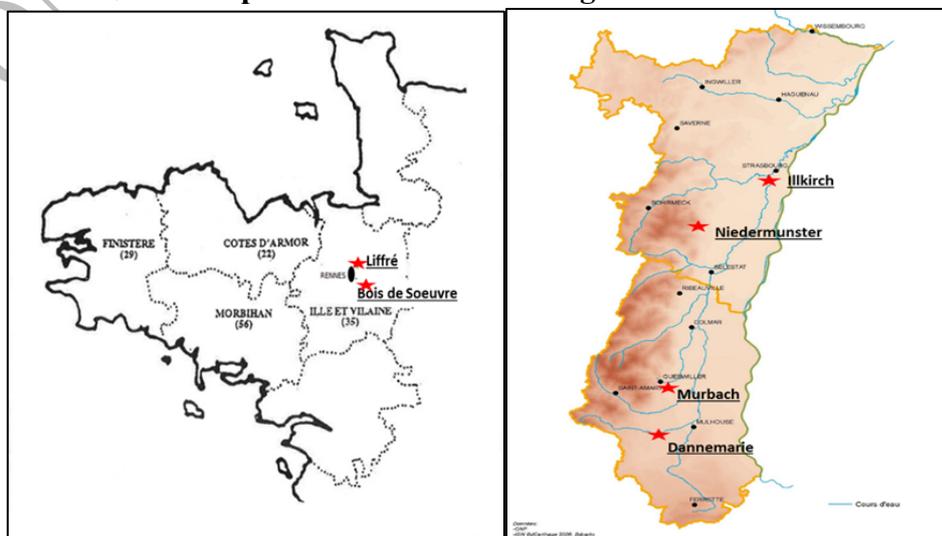
En 2018, afin d'étudier la répartition du vecteur *I. ricinus*, nous avons effectué 36 collectes sur quatre sites répartis dans le Bas-Rhin et le Haut-Rhin (voir carte ci-dessous) et 28 collectes sur deux sites en Bretagne (voir carte ci-dessous).

Ces sites ont été choisis en fonction de leur localisation géographique, de l'activité humaine qui s'y déroule et des données bibliographiques pré-existantes (Ferquel et al., 2006).

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 faible incidence.

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

Répartition des sites investigués en 2018



Les sites collectés mensuellement sont :

- Niedermunster et d'Illkirch pour le Bas-Rhin
- Murbach et Dannemarie pour le Haut-Rhin
- Liffré (Forêt de Rennes) et Bois de Soevre pour la Bretagne.

Dans tous les sites, la méthode de collecte est similaire et utilise la même technique du drapeau. Cette technique privilégie la capture des tiques à l'affût sur la végétation. Une étoffe de tissu d'1 m² est trainée au sol sur une distance de 10 m, ce qui correspond à « un tir ». Sur chaque transect, trente tirs sont effectués. Après chaque tir, les tiques présentes sur le tissu sont prélevées vivantes, mises en tube et ramenées au laboratoire où elles sont congelées à -80°C dans les 24h, jusqu'à analyse. L'étoffe de tissu faisant 1 m², cela permet de définir la densité en tiques par 100 m².

Nombre de tiques collectées par site de collecte

Alsace :

Mois de collecte	Dannemarie (68)		Murbach (68)		Illkirch (67)		Niedermunster (67)	
	Nymphes	Adultes	Nymphes	Adultes	Nymphes	Adultes	Nymphes	Adultes
Mars	30	1	43	7	43	2	16	2
Avril	124	3	253	1	173	5	97	4
Mai	235	5	630	8	391	11	89	22
Juin	258	6	483	7	363	2	100	4
Juillet	146	3	202	1	214	3	92	3
Août	22	0	26	0	38	2	21	1
Septembre	14	1	40	1	5	2	41	2
Octobre	9	1	19	3	6	0	17	1
Novembre	0	0	1	0	6	0	0	0
TOTAL	838	20	1697	28	1239	27	473	39

Bretagne :

Mois de collecte	Liffré – Forêt de Rennes (35)		Bois de Soevre (35)	
	Nymphes	Adultes	Nymphes	Adultes
Janvier	8	3	66	3
Fevrier	9	0	96	6
Mars	41	1	26	4
Avril	185	8	369	31
Mai	92	2	270	31
Juin	192	10	224	8
Juillet	95	3	56	4
Août	81	11	28	8
Septembre	23	3	10	10
Octobre	16	1	57	12
Novembre	2	2	13	0
Décembre	1	0	7	8
TOTAL	745	44	1222	125

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 entre les régions Alsace et Bretagne durant l'année 2018 montre que la Bretagne avec son climat océanique, présente une activité continue des tiques 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 à deux mois et s'arrête un mois plus tôt. Ces tendances nécessitent d'être confirmées par une étude sur plusieurs années.

Au total sur l'ensemble des sites, nous avons collectées 6 214 nymphes et 283 adultes.

3.2.2.3 Analyse des données de densité de nymphes en 2018

La densité en nymphes notée D a été calculée sur les différents sites de la façon suivante :

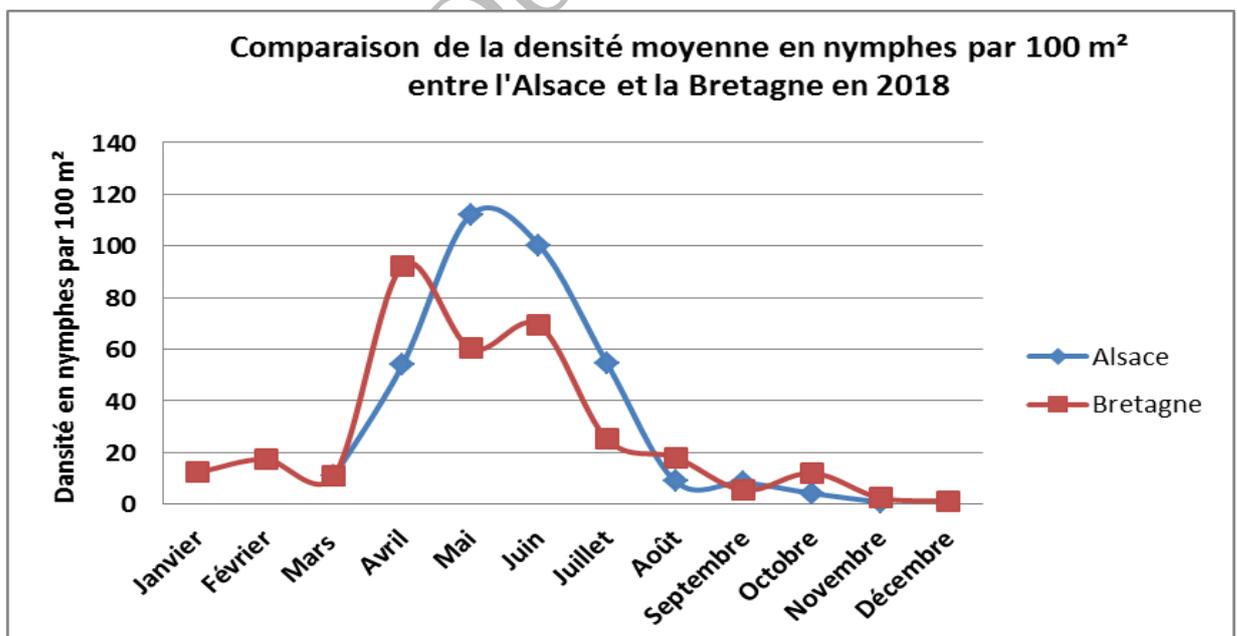
$D = \sum ni/t$ n correspond au nombre de nymphes totales prélevées sur le lieu de collecte i, et t : le nombre de tirs effectués.

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 Illkirch, et les densités les plus élevées en adultes à Niedermunster.

Les sites de Murbach et de Niedermunster correspondent à des sites de moyenne montagne (altitude d'environ 500 m) par opposition à Illkirch (périurbain) et Dannemarie (site de plaine agricole).

Densités des nymphes par 100 m² en Alsace et en Bretagne :



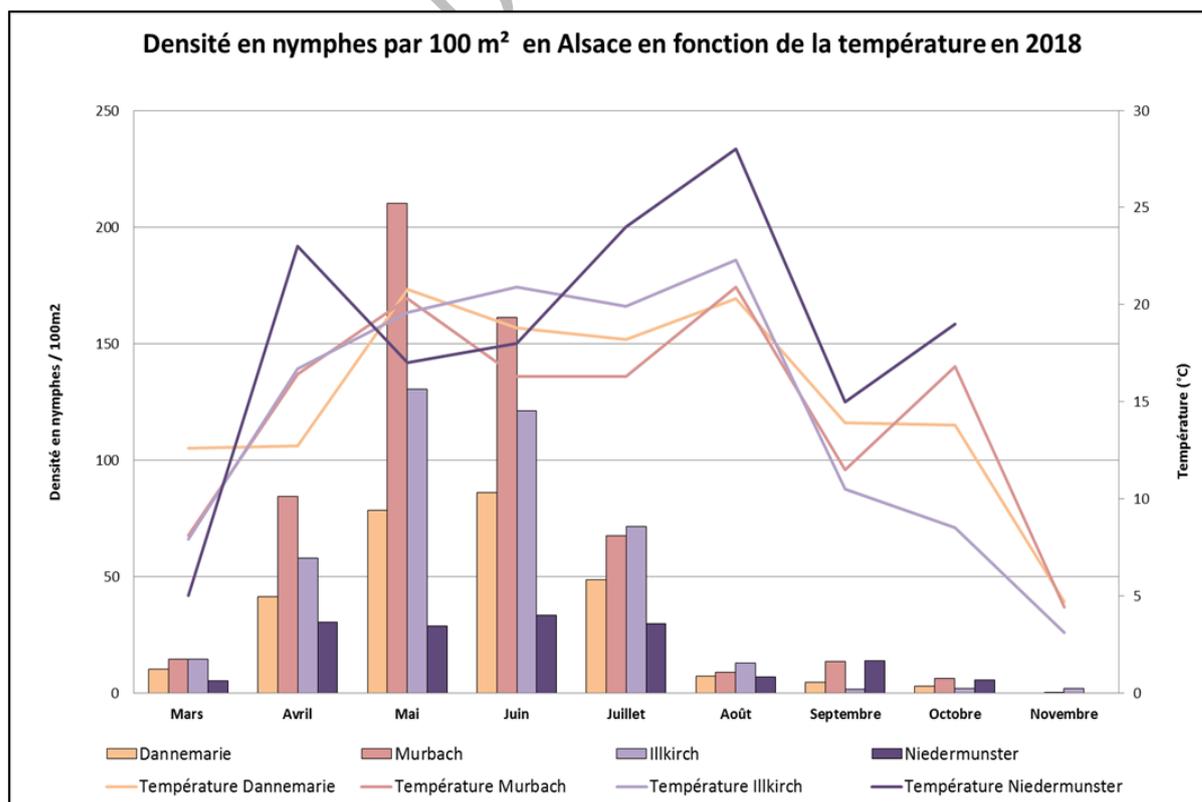
Sites	Nymphes	Adultes	Densité en nymphes par 100 m ²	Densité en adultes par 100 m ²
Alsace (Mars-Novembre)				
Total Haut-Rhin	2534	48	50,68	0,96
Total Bas-Rhin	1712	66	31,77	1,23
TOTAL Alsace	4246	114	41,22	1,09
Bretagne (Janvier-Décembre)				
TOTAL Bretagne	1967	169	27,32	2,35

Nous constatons qu'en 2018, les densités moyennes en nymphes sont nettement plus importantes en Alsace qu'en Bretagne tandis que pour les adultes il y a un peu plus d'adultes en Bretagne qu'en Alsace. En 2017, les densités en nymphes étaient à peu près identiques entre les deux régions.

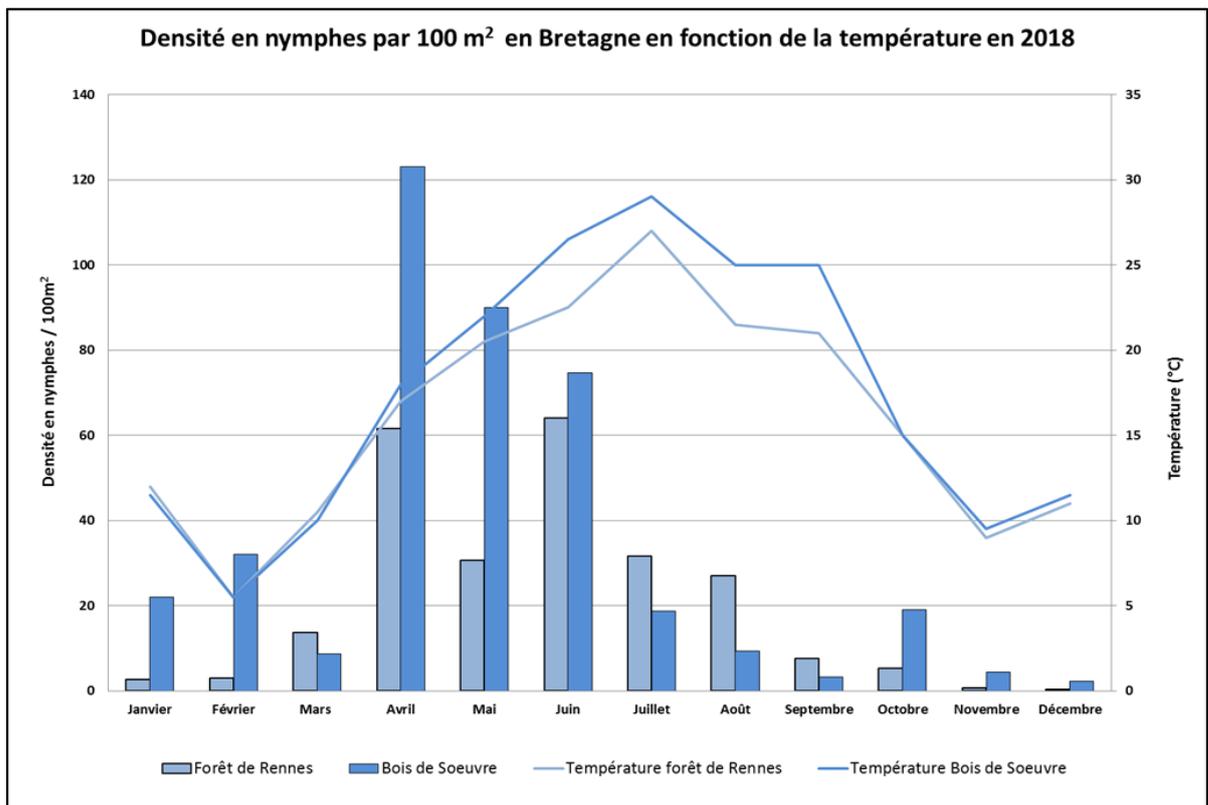
En 2018, nous avons continué à enregistrer certains facteurs comme la température et l'hygrométrie. Elles constituent des facteurs abiotiques importants qui peuvent avoir un impact notable sur la densité en tiques du genre *Ixodes*, très sensibles à la dessiccation.

Evolution au cours de l'année 2018 de la densité de nymphes d'*Ixodes* en Alsace et en Bretagne et étude de la corrélation avec la température :

Alsace :



Bretagne :



En comparant les sites de l'Est (Alsace) et de l'Ouest de la France (Bretagne), les densités en tiques à la stase nymphale montrent que le pic d'activité des nymphes est situé un mois avant en Bretagne (Avril) qu'en Alsace (Mai). Ceci est probablement lié à la température plus douce en Bretagne en début d'année.

Pour un même mois de l'année, on note aussi des variations entre les sites dans une même région, sans variation concomitante importante de la température (cf. avril et mai en Bretagne, mai et juin en Alsace). D'autres facteurs que la température interviennent probablement pour expliquer cela, notamment des variations de la densité en micromammifères, hôtes privilégiés des stases immatures.

3.2.2.4 Analyse des données d'infection des nymphes en 2018

Les nymphes analysées sont issues des collectes effectuées sur les mêmes quatre sites échantillonnés mensuellement en Alsace et les deux sites en Bretagne.

Un échantillonnage de 60 nymphes est ensuite réalisé parmi les tiques récoltées sur chaque site et chaque mois de collecte. Chaque tique est alors testée individuellement pour la détection des agents infectieux sélectionnés.

3.2.2.4.1 Infection des nymphes par *Borrelia*

En 2018, 2 250 nymphes ont été testées par PCR *Borrelia*. Parmi ces nymphes analysées, 298 étaient positives à *Borrelia* soit un taux moyen d'infection d'environ 12,3 % [7,6 – 29,8]. Ce taux moyen d'infection est statistiquement comparable à celui de l'année précédente (16,1 % en 2017).

Le détail des données par site est indiqué dans le tableau ci-dessous :

Sites	Nombre de nymphes testées	Nombre de nymphes positives	Taux d'infection (%)	Densité en nymphes par 100 m ²	Densité en nymphes infectées/100 m ²
Sites du Haut-Rhin (68)					
Dannemarie	315	24	7,6	33,5	2,6
Murbach	370	66	17,8	67,8	12,1
Sites du Bas-Rhin (67)					
Illkirch (peri-urbain)	336	100	29,8	45,9	13,7
Niedermunster	330	40	12,1	17,6	2,1
Total Alsace	1351	230	17,0	22,8	3,9
Sites de l'Ille-et-Vilaine (35)					
Liffré (Rennes)	400	21	5,3	20,7	1,1
Bois de Soevres	499	47	9,4	33,9	3,2
Total Bretagne	899	68	7,6	27,3	2,1

Le taux d'infection des nymphes et la densité moyenne en nymphes collectées sont plus élevés cette année en Alsace qu'en Bretagne.

On constate que le site périurbain (et donc très fréquenté) d'Illkirch présente une densité de nymphes par 100 m² très élevée cette année (45,9 nymphes/100 m²) ainsi que le taux de nymphes infectées le plus élevé (29,8%) et Murbach demeure un site de forte densité en nymphes (67,8 nymphes/100 m²). Cette surveillance sera poursuivie sur les mêmes sites en 2019 afin de confirmer ou infirmer cette tendance.

Répartition des différentes espèces de *Borrelia* par site de collecte en 2018 :

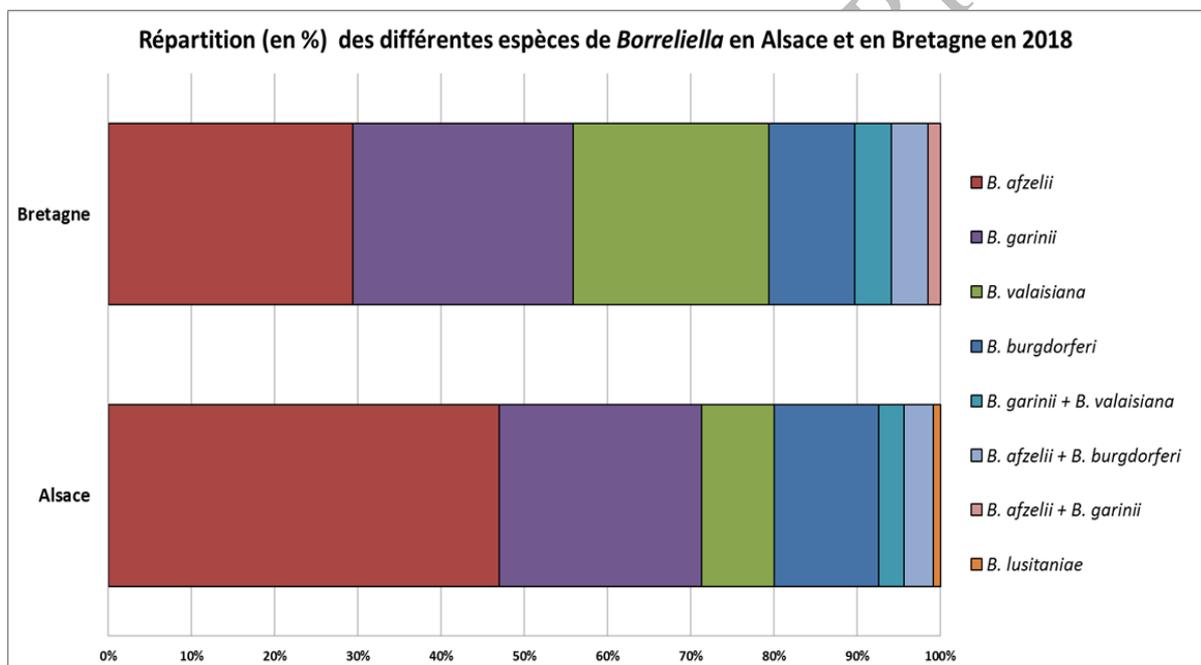
Espèces Sites de collectes	Nombre nymphes positives	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>	<i>B. burgdorferi</i>	<i>B. valaisiana</i>	<i>B. lusitaniae</i>	co-infection de <i>Borrelia</i>
Sous-total Alsace	228 (17 %)	108 (47 %)	56 (24 %)	29 (13 %)	20 (9 %)	2 (1 %)	15 (6 %)
Sous-total Bretagne	68 (8 %)	20 (29%)	18 (27 %)	7 (10 %)	16 (24 %)	0	7 (10 %)
TOTAL	298 (12 %)	128 (38 %)	74 (25 %)	36 (12 %)	36 (16 %)	2 (0,5 %)	22 (8 %)

En Alsace, sur les différents sites de collecte, nous avons identifié par fréquence décroissante les espèces suivantes dans les nymphes : *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi*, *B. valaisiana* et *B. lusitaniae*.

En Bretagne, sur les 2 sites de collecte, nous avons identifié par fréquence décroissante les espèces suivantes dans les nymphes : *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* et *B. valaisiana*.

Comme les années précédentes, nous n'avons, de même que les autres pays d'Europe, détecté aucune *B. mayonii*. Cette espèce semble actuellement limitée à 2 états américains de la région des grands lacs.

Au total, les deux espèces les plus fréquentes, tant en Alsace qu'en Bretagne, sont *B. afzelii* (réservoir rongeurs) et *B. garinii* (réservoir oiseaux tout comme *B. valaisiana*), les autres espèces, notamment *B. burgdorferi*, sont en proportions moins importantes :



Il est intéressant de noter cette année la présence d'ADN de *B. lusitaniae* dans des tiques *I. ricinus*, sur le site d'Illkirch uniquement. Dans la littérature, cette espèce de *Borrelia* est décrite comme occasionnellement pathogène pour l'homme. On la détecte principalement dans le bassin méditerranéen où son hôte habituel est le lézard (*Lacerta* spp., *Podarcis* spp., *Psammodromus* spp.) (Ogden et coll., chapitre 10-vol2, livre SonnnenshineDE et Roe ME ; Mendoza-Roldan et coll ;, Parsites and vectors, 2019).

3.2.2.4.2 Infection des nymphes par *Anaplasma phagocytophilum*

La famille des *Anaplasmataceae* regroupe les bactéries des genres *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* et *Wolbachia*, qui sont des intracellulaires stricts des cellules eucaryotes. *A. phagocytophilum* se multiplie sous forme de morula dans les globules blancs et est responsable de l'anaplasmose granulocytaire humaine. Cette maladie est cosmopolite

puisqu'elle est décrite au niveau animal et humain aussi bien en Europe, qu'en Asie et aux Etats-Unis.

Les prévalences de cette bactérie varient de façon importante d'un pays à l'autre, d'une espèce de tique à l'autre, avec 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 le gène *msp2/p44* d'*A. phagocytophilum*.

Parmi les 2 250 nymphes analysées, 9 étaient positives en Alsace à *A. phagocytophilum* et 3 en Bretagne, soit **un taux d'infection moyen de 0,7 % en Alsace et 0,3 % en Bretagne**.

Sites	Nombre de nymphes testées	Nombre de nymphes (+) à <i>A. phagocytophilum</i>	Taux d'infection (%)	Densité en nymphe par 100 m ²	Densité en nymphes infectées par 100 m ²
ALSACE					
Total Alsace	1351	9	0,7	22,8	0,2
BRETAGNE					
Total Bretagne	899	3	0,3	27,3	0,1

Ce taux était nul en Bretagne en 2017 et de 1,4% en 2016 ; en Alsace les taux étaient respectivement de 0,3 % en 2017 et 1,4 % en 2016.

Ce taux est donc plus faible pour la 2^{ème} année consécutive en Alsace et en Bretagne, par rapport à 2016 où nous avons entre 1 et 2% de tiques infectées.

Les cas cliniques humains d'anaplasmose granulocytaire humaine en France sont principalement répertoriés en Alsace. En 2018, aucun cas humain n'a été positif en biologie moléculaire.

Il conviendrait néanmoins de rechercher ce pathogène chez des patients présentant un syndrome pseudo-grippal estival en Bretagne, compte tenu de la présence, certes rare, d'*A. phagocytophilum* dans les tiques.

3.2.2.4.3 Infection des nymphes par des *Borrelia* agents de fièvres récurrentes

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 en Russie en 2011. En 2013, le premier cas européen a été rapporté chez un patient profondément immunodéprimé en Hollande, un second cas humain a été décrit en Allemagne en 2016.

En 2018, les Hollandais ont publié un cas de fièvre récurrente à *B. miyamotoi* chez un patient immunocompétent (Hoornstra et coll., Emerg Infect Dis. 2018).

A ce jour, aucun cas humain n'a été identifié en France.

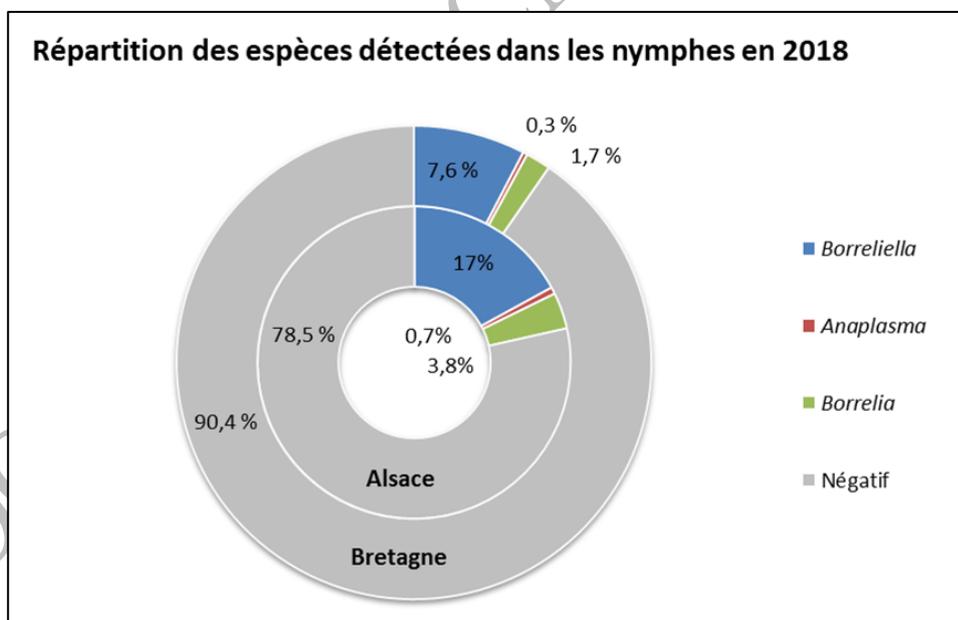
Nous continuons à chercher régulièrement cette espèce de *Borrelia*, ou d'autres espèces responsables de fièvre récurrente, dans les tiques en Alsace et en Bretagne. La surveillance de ces pathogènes dans *Ixodes* est réalisée par le CNR depuis 2013 en Alsace et a été étendue en 2016 à la Bretagne.

La méthode utilisée est une PCR en temps réel ciblant une région conservée de l'ADNr 16S du genre *Borrelia* (Hovius et coll., Lancet 2013). Un séquençage du produit amplifié est ensuite réalisé pour identification précise de l'espèce. Cette PCR détecte ainsi de façon spécifique toutes les *Borrelia* agents de fièvre récurrente.

Sites	Nombre de nymphes testées	Nombre de nymphes positives	Taux d'infection (%)	Densité en nymphe par 100 m ²	Densité en nymphes infectées par 100 m ²
ALSACE					
Total Alsace	1351	51	3,77	22,8	0,9
BRETAGNE					
Total Bretagne	899	15	1,7	27,3	0,4

Les résultats de séquençage des produits de PCR positifs montrent que la seule espèce de *Borrelia* (agent de fièvres récurrentes) détectée **parmi les nymphes collectées sur les sites du Nord-Est et du Nord-Ouest de la France est, comme les années précédentes, *B. miyamotoi* dans les échantillons.**

Au total, concernant les trois pathogènes étudiés, nous observons les répartitions suivantes :



En 2018, 37 nymphes présentaient un co-portage des bactéries pathogènes suivantes :

- 22 nymphes présentaient un co-portage de deux espèces différentes de *Borrelia*
- 14 nymphes présentaient un co-portage de *B. miyamotoi* et *Borrelia*
- 1 nymphe présentait un co-portage de *Borrelia* et d'*A. phagocytophilum*
- Aucune nymphe ne présentait un triple portage.

3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Sans objet pour le CNR *Borrelia*

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

3.4.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France et le réseau Sentinelles

Ce travail prospectif repose sur le réseau des médecins généralistes sentinelles. La surveillance est coordonnée par l'UMR-S 1136. Ses objectifs sont de décrire les caractéristiques cliniques des cas recensés afin d'améliorer leur prévention et leur traitement, d'estimer l'incidence de ces pathologies dans les différentes régions de France et de comparer cette incidence à celles observées depuis 2009.

Le CNR participe ainsi à des réunions téléphoniques ou présentes, 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>.

La validation des cas 2018 n'est pas terminée au jour de ce rapport.

En 2017, le réseau a validé 204 cas de borréliose de Lyme répondant aux critères de définition de cas retenus par le réseau, donnant une estimation de **l'incidence annuelle de la borréliose de Lyme estimée au niveau national à 44 679 cas et un taux d'incidence annuel de 69 cas/100 000 habitants** (IC 95% : 58 – 80) avec de fortes disparités régionales (>150 cas/100 000 habitants en Alsace, Auvergne, Limousin, Lorraine et en Rhône-Alpes). Ceci représente un recul par rapport à 2016 mais montre néanmoins une tendance à l'augmentation par rapport aux années 2009-2015 (taux d'incidence annuel en 2015 de 51 cas/100 000 habitants, IC 95% : 38 – 64).

Le suivi sur les prochaines années avec la même méthodologie est donc important pour voir si la tendance à l'augmentation de l'incidence se confirme.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

3.5.1 Etude de la diversité des espèces de *Borrelia* dans les manifestations cutanées de la borréliose de Lyme (PRI 3977)

Nous réalisons une surveillance des manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France par deux protocoles sur biopsies cutanées (celui-ci et celui présenté en 3.5.3).

Depuis dix ans, nous analysons de façon prospective les biopsies cutanées de patients présentant des lésions typiques ou atypiques dans le cadre d'une suspicion d'infection cutanée à *Borrelia*. Ces prélèvements nous sont adressés de toute la France, essentiellement par des dermatologues volontaires pour participer à ce réseau, mais également par certains infectiologues et internistes.

Tous les échantillons biopsiques proviennent d'adultes et sont conformes au protocole « Etude de la diversité des espèces de *Borrelia* dans les manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France », accepté par le CPP (Comité de Protection des Personnes). 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

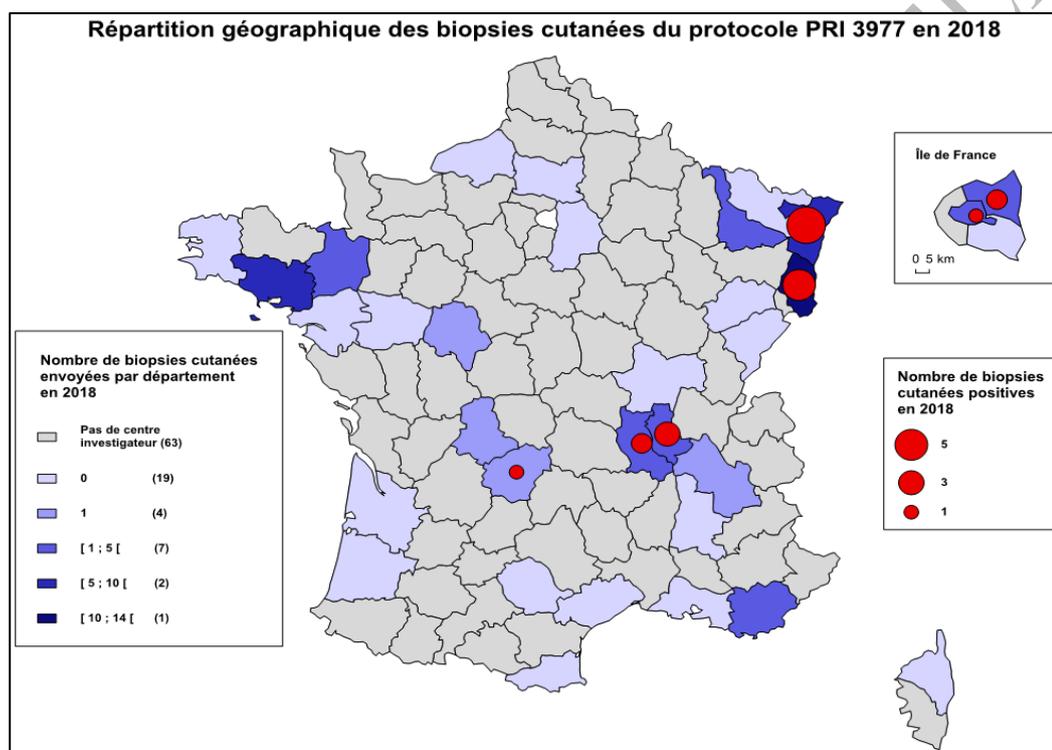
Borrelia.

En 2018, 49 prélèvements nous ont été adressés. Ces biopsies nous ont été adressées de 14 départements répartis sur le territoire.

Parmi ces 49 prélèvements, 23 (46,9 %) ont été adressés pour suspicion d'EM, 10 (20,4 %) pour suspicion d'acrodermatite chronique atrophiante, 4 (8,2 %) pour suspicion de lymphocytome borrélien et 12 (24,5 %) avec des manifestations atypiques (état scléreux, morphee, lésion eczématiforme) ou non renseignées.

La carte ci-dessous représente les départements participants et le nombre de demandes adressées au CNR *Borrelia* par département investigateur (en nuances de bleu) ainsi que le nombre de résultats positifs obtenus par culture et/ou biologie moléculaire (spots rouges).

Les départements en gris ne possèdent pas de centre investigateur pour ce protocole.



Sur les 49 biopsies, 21 biopsies (42,9 %) étaient positives en PCR, dont 10 (20,4 %) également positives en culture. Ceci nous a permis d'isoler 10 nouvelles souches humaines en 2018. La répartition des espèces, dans les biopsies cutanées positives en culture et/ou PCR, est représentée au chapitre 3.2.1.2.

Parmi les 21 biopsies positives, 13 sont des biopsies de suspicion d'EM (61,9 %), 5 de suspicion d'ACA (23,8 %), 2 de suspicion de lymphocytome borrélien (9,5 %), 1 autre manifestation cutanée non renseignée (4,8 %).

Il est à noter que les 21 biopsies positives étaient toutes positives à *B. afzelii*. L'ACA est classiquement dû de façon quasi-exclusive à *B. afzelii*, à la différence des autres manifestations cutanées pour lesquelles il n'a pas été mis en évidence de tropisme particulier d'espèce. **Nos résultats confirment donc une prédominance nette de l'espèce *B. afzelii* dans les autres manifestations cutanées (EM, LB) en France.**

3.5.2 Etude des manifestations articulaires de la borréliose de Lyme

En 2017, nous avons colligé les données de toutes les arthrites diagnostiquées par PCR au CNR *Borrelia* depuis 10 ans et pour lesquelles une sérologie avait été réalisée indépendamment du résultat de la PCR. Au total, 37 cas ont été étudiés. Ces 37 patients atteints d'arthrite de Lyme PCR (+) étaient tous positifs en ELISA IgG anti *Borrelia*. La possibilité d'arthrite de Lyme négative en ELISA apparaît donc très faible. Nous avons aussi montré un tropisme de *B. burgdorferi* pour les articulations : *B. burgdorferi* était l'espèce détectée dans 54 % des cas alors que c'est l'espèce la moins fréquente dans les tiques et dans les lésions d'EM.

En 2018, nous avons complété ce travail et étudié rétrospectivement le devenir de ces patients après antibiothérapie de leur arthrite. Le traitement consistait en de la doxycycline (64%), de la ceftriaxone (27%), de l'amoxicilline (16%) pendant 4 semaines en moyenne. 66% des patients ont guéris à la fin du traitement, les autres ont présentés une synovite persistante pendant au moins 2 mois. Trois patients (PCR de contrôle négative) ont présenté une atteinte systémique nécessitant une prise en charge immunomodulatrice qui a été efficace. Ces données ont été publiées en 2018.

3.5.3 PHRC « DIABOLYC : Diagnostic Borréliose de Lyme Cutané »

Ce PHRC interrégional réunit un réseau de dermatologues et d'internistes de 7 centres hospitaliers de la région Grand-Est.

En 2018, 19 prélèvements nous ont été adressés. Des biopsies nous ont été adressées de 3 centres hospitaliers répartis sur la région Grand-Est. Parmi ces 19 prélèvements, 57,9 % (n = 11) étaient positifs. Ce pourcentage de positivité est supérieur à celui du PRI détaillé plus haut et est équivalent à celui présenté dans les meilleures séries européennes. Cela peut être dû à une meilleure connaissance des manifestations cutanées par les participants à ce protocole.

Centre investigateur (département)	Nombre biopsies cutanées analysées	Nombre biopsies positives en culture et/ou PCR	Espèces
Colmar (68)	1	1	<i>B. garinii</i>
Metz (57)	0	0	
Mulhouse (68)	15	8	<i>B. afzelii</i> (88 %) <i>B. garinii</i> (12 %)
Strasbourg (67)	3	2	<i>B. afzelii</i> (100 %)

4 Alerte

La procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal est décrite en annexe 1.

5 Activités de rétro-information, de formation et de conseil

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

5.1.1 Participation au Plan National de Diagnostic des Soins (PNDS) Lyme et autres Maladies Vectorielles à Tiques (MVT)

Le CNR *Borrelia* a continué en 2018 à participer aux réunions du Plan National de Diagnostic des Soins Lyme, organisées par la HAS et débutées en mars 2017. Si sur certains aspects, les différents participants sont parvenus à un consensus, cela n'a pas été possible sur deux aspects : les performances des tests biologiques et la création d'une nouvelle entité intitulée « symptomatologie/syndrome persistant(e) polymorphe après possible piqûre de tique ou SSPPT ». Cette entité, aux contours flous, n'est présente dans aucune recommandation européenne ou américaine et n'existe pas dans la littérature scientifique internationale. Le CNR et la SPILF ont proposé à la HAS de valider les autres chapitres du PNDS, y compris celui sur les tests biologiques et de continuer à travailler le chapitre SSPPT. Cette proposition n'a pas retenu et le texte a été validé par la HAS.

L'ensemble des sociétés savantes et collèges professionnels (25 participants) ayant participé à ce PNDS ont donc refusé de signer ce document et il a été proposé d'écrire des recommandations inter-sociétés savantes et collèges professionnels. Un mandat de la DGS a été adressé en ce sens à la SPILF mi-septembre 2018. Depuis, les sociétés savantes et collèges professionnels se sont réunis et le travail collégial s'organise autour de différentes questions :

- Quelle est l'épidémiologie des maladies vectorielles à tiques en France ?
- Quelles sont les mesures de prévention efficaces ?
- Dans quelles circonstances faut-il évoquer une borréliose de Lyme ou une autre maladie transmise par les tiques ?
- Quels tests diagnostiques ?
- Quel traitement pour la borréliose de Lyme ?
- Symptômes persistants au décours d'une borréliose de Lyme documentée ou suspectée

5.1.2 Liste des enseignements

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

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

« *Borrelia* », **B. Jaulhac**, cours de Microbiologie Médicale - dispensé aux étudiants de 3^{ème} année - Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg.

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

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

« La borréliose de Lyme », **N. Boulanger**, cours dispensé aux étudiants de 6^{ème} année - Faculté de pharmacie de Strasbourg.

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

« Borréliose de Lyme : les bactéries, l'hôte et la tique : qui manipule qui ? » : **N. Boulanger**, Master 1 et 2 de Microbiologie, Université de Strasbourg.

5.1.3 Formation médicale continue aux professionnels de santé

Les membres du CNR *Borrelia* ont participé à des actions de formations aux :

Formation aux médecins et biologistes - FC des biologistes des hôpitaux, DPC pour les médecins

Jaulhac B.

« *La maladie de Lyme* » *Débat et controverses.*

7^{ème} édition des Rencontres et Immunologie et Immunothérapie Pratiques
Paris, 16 mars 2018.

De Martino S.

DPC - Les Journées Alain Feuillu à Rennes : « *Maladies à tiques et maladie de Lyme* »
Rennes, le 23 mars 2018.

Jaulhac B.

Séminaire Microbiologistes – Hôpital de la Croix Rousse. « *Maladie de Lyme dans ses aspects du diagnostic biologique* »
Lyon, 10 avril 2018.

Jaulhac B.

FMC –Dermatologues – ALPUD. « *La maladie de Lyme* »
Nancy, 13 avril 2018.

Jaulhac B.

Forum Franc-Comtois Microbiologie-Infectiologie Actualité sur la borréliose de Lyme – le point de vue du biologiste »
Besançon, 17 mai 2018.

De Martino S.

DPC – L'organisme de référence de la rhumatologie. « *Prise en charge des pathologies rhumatologiques liées à la maladie de Lyme* »
Marseille, 05 avril 2018
Clermont-Ferrand, 26 mai 2018.

Jaulhac B.

19^e Journées Nationales d'Infectiologie –

Modérateur Session Zoonoses/Lyme « Tests diagnostiques non validés de la borréliose de Lyme et manifestations infectieuses systémiques post piqûres de tiques /étiologie et place des co-infections

Nantes, 14 juin 2018.

Jaulhac B.

13^{ème} Edition - Interface Rhumatologie et Dermatologie. « Les tests diagnostiques aujourd'hui : mythes et réalité »

Paris, 04 octobre 2018.

Formation aux professionnels de santé – ARS Grand-Est

« *Diagnostic et prise en charge de la borréliose de Lyme* »

De Martino S.

- session Reims, 08 novembre 2018.

- session Troyes, 15 novembre 2018.

Jaulhac B.

- session St Dizier, 22 novembre 2018.

Jaulhac B.

52^e Journées de Biologie Praticienne. DPC – Diagnostic biologique de la maladie de Lyme en 2018 »

Paris, 08 décembre 2018.

Jaulhac B.

Journées Dermatologiques de Paris. FMC – « Maladie de Lyme : ce que le dermatologue doit savoir en 2018 »

Paris, 14 décembre 2018.

Jaulhac B.

Séminaire « Lyme » - IHU Méditerranée Infection. « Le point de vue du CNR *Borrelia* »

Marseille, 20 décembre 2018.

Formation aux personnels enseignants :**Jaulhac B.**

Académie de Strasbourg

Actualisations des connaissances « Maladie de Lyme »

Strasbourg, Lycée Jean-Baptiste Kléber, 17 janvier 2018.

Formation aux vétérinaires :**B. Jaulhac :**

Journée des spirochètes – Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Les pathogènes, la pathogénicité et l'épidémiologie : « *La borréliose de Lyme : épidémiologie, pathogènes impliqués et diagnostic biologique* »

Maisons-Alfort, 18 janvier 2018

5.1.4 Information pour les médias grand public et site internet

➤ **Médias**

En 2018, le CNR a continué à faire l'objet de nombreuses sollicitations de la part des media grand public, que ce soit de la presse écrite ou télévisée, régionaux et nationaux :

Jaulhac B.

- Participation à la conférence de presse sur la Borréliose de Lyme organisée par l'ARS Grand-Est : présentation des résultats de l'étude ALSA(CE)TIQUE et les actions de prévention menées par l'ARS sur le territoire régional. Nancy, 29 mars 2018.
- Interview pour le magazine « Ca m'intéresse ». Avril 2018
- Interview pour le Figaro. Juin 2018
- Reportage au CNR pour FR 3 Grand-Est. Juin 2018.
- Communiqué de presse commun (SPILF et CNR) pour les média sur la non-validation des recommandations HAS. Juin 2019
- Interview pour le Monde. Article le 4 Juillet 2018
- Communiqué de presse commun (21 société savantes, collèges professionnels et CNR) pour les media sur les raisons de la non-validation des recommandations HAS. Juillet 2019
- Interview pour le SJBm sur les autotests Lyme. Septembre 2018

N. Boulanger :

Reportage « ARTE » : « Les envahisseurs microscopiques », et préparation exposition à Lyon « Musée des confluences » sur les tiques. Journaliste Thierry Berrod, Mai 2018. MONA LISA Production, Lyon.
Diffusion prévue en juin 2019.

➤ **Le site internet**

- Adresse site : <http://www.chru-strasbourg.fr/Les-centres-de-reference/Borrelia>
- Date de création : 2013
- Rythme des actualisations : annuelles
- Date de la dernière mise à jour : 24 avril 2018

5.1.5 Accueil de stagiaires

Stage de master M1 :

- Néant

Stage de master M2 :

- Alexandre Muller : Novembre 2017-Mai 2018 (Master Physiopathologie)
- Nouha Filali : Novembre 2018-Mai 2019 (Master Microbiologie).

Stage de Pharmacie 5^o année :

- Aline Tritschberger : janvier à avril 2018 – option Industrie-Recherche
- Lorraine Pinot : janvier à avril 2018 – option Industrie-Recherche
- Franck Lach : janvier à avril 2018 – option Officine
- Lucille Bousinière : mai à août 2018 – option Industrie-Recherche
- Mathilde Michon : septembre à décembre 2018 – option Officine.

5.1.6 Thèse de doctorat, participation à des jurys

Thèses d'Université soutenues au laboratoire :

Néant en 2018

Thèses d'exercice soutenues dans l'Université

- **Floriane GALLAIS** : thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie de l'Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie intitulée « Typage de souches cliniques de *Borrelia afzelii* par multilocus sequence typing (MLST)» le 26 juin 2018
- **Sarah RIETSCH** : thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie de l'Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie intitulée « Neuroborréliose : épidémiologie et diagnostic biologique – expérience du CNR *Borrelia* 2012-2017 au CHU de Strasbourg » le 19 novembre 2018.
- **Flora SCHILLING** : thèse pour le doctorat de Docteur en Pharmacie de l'Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie intitulée « Maladie de Lyme : revue des connaissances actuelles des pharmaciens d'officine » le 19 décembre 2018 avec enquête auprès des pharmaciens d'officine et création d'un support multimédia à diffuser dans les pharmacies d'officine avec la collaboration de l'ordre des pharmaciens et le CES PHARM.

Participation à des jurys soutenus hors de l'Université :

- **Novembre 2018** : Thèse d'Université de B. El Hamzaoui. Identification des arthropodes et pathogènes associés par Maldi-Tof MS et étude des relations entre arthropodes et bactéries. Université de Marseille. Rapporteur. **N. Boulanger**.
- **Juillet 2018** : Présidence jury concours recrutement des MCU en Bactériologie – à l'ENVA –MAISONS-ALFORT. **Sylvie De Martino**

Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

Néant en 2018

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

> Expertises nationales

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

N. Boulanger :

2018 :

- Nomination expert ANSES « Vecteurs » pour les tiques pour une durée de trois ans
- Expert Fondation pour la recherche sur la biodiversité : « Ecosystèmes et maladies infectieuses vectorielles et zoonotiques ».

➤ *Expertises internationales*

• *Expertise pour l'Attribution de financements :*

- **Expertise ELSEVIER** : livre « Arthropod collection and identification ». Février 2018
- **Ministère belge de la recherche : FWO Microbiology and Immunology** - Application N° : G034119N. « Adaptation of tsetse fly inoculated african trypanosomes to the host skin and their interplay with recruited neutrophils. Mars 2018.
- **ABIES-Financement thèse-Paris** : *Anaplasma phagocytophilum*, des bovins, des cerfs et des hommes : polynucléaires, réservoirs et potentiel zoonotique. Février 2018.
- **LABEX – Emerging diseases, Institut Pasteur (LABEX IBEID)**: Expertise dossier neuroborréliose (T. Planchenault). Octobre 2018.

• *Participation à des comités d'experts :*

B. Jaulhac :

- **Commission PNDS. Expert « Maladie de Lyme et autres maladies transmissibles par les tiques »**
08 mars 2018, Paris
- **COPIL Plan de prévention et de lutte contre la maladie de Lyme**
Direction Générale de la Santé
21 septembre 2018, Paris.

N. Boulanger :

2018 :

- **Expertise l'ANSES. Rapport : « Tick-borne disease working group report to Congress » sous l'égide du département américain de la santé**
Analyse comparative entre le système américain et le système français de la lutte antivectorielle et la lutte contre les maladies à tiques.
- **Expert pour l'ECDC, Projet « Tick-borne diseases »**
13-14 Mars 2018, Cluj-Napoca, Roumanie.

• *Activités de referee*

N. Boulanger :

- Eurosurveillance
- Ticks and Tick Borne diseases

B. Jaulhac :

- Ticks and Tick Borne Diseases

5.3 Conseil pour d'autres cibles

B. Jaulhac :

Assemblée Nationale – Palais Bourbon

Groupe d'études sur la maladie de Lyme « la maladie de Lyme »

Audition le 28 novembre 2018, Paris.

Conférences grand public

N. Boulanger :

« Tiques et maladies à tiques : mieux les connaître pour mieux s'en protéger »

- Conférence grand public : Les tiques. 16 février 2018, Ban-Lavelline, Vosges (88)
- Conférence grand public, association SARO : Les tiques. 1^{er} Mars 2018, Mulhouse, Alsace (68)
- Conférence grand public, Fédération des chasseurs du Bas-Rhin : Tiques et maladies à tiques, Geudertheim, 27 mars 2018
- Conférence grand public, Association CARSAT, Maison des Associations, Strasbourg, 13 avril 2018.

B. Jaulhac :

Audition du CNR par la Dre Elisabeth Hilborn, détachée de l'Ambassade des Etats-Unis d'Amérique auprès de la DGS : Comparaison entre le système américain et le système français pour la lutte antivectorielle et la lutte contre les maladies à tiques Paris, 20 novembre 2018.

5.4 Conseil aux professionnels

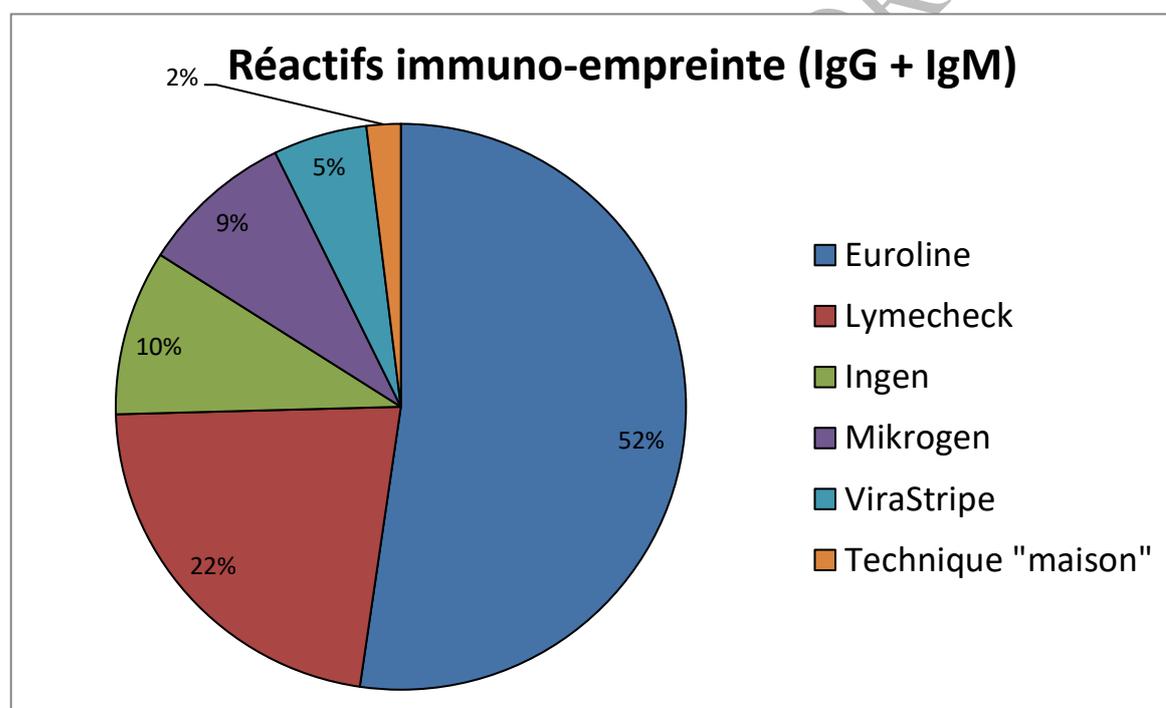
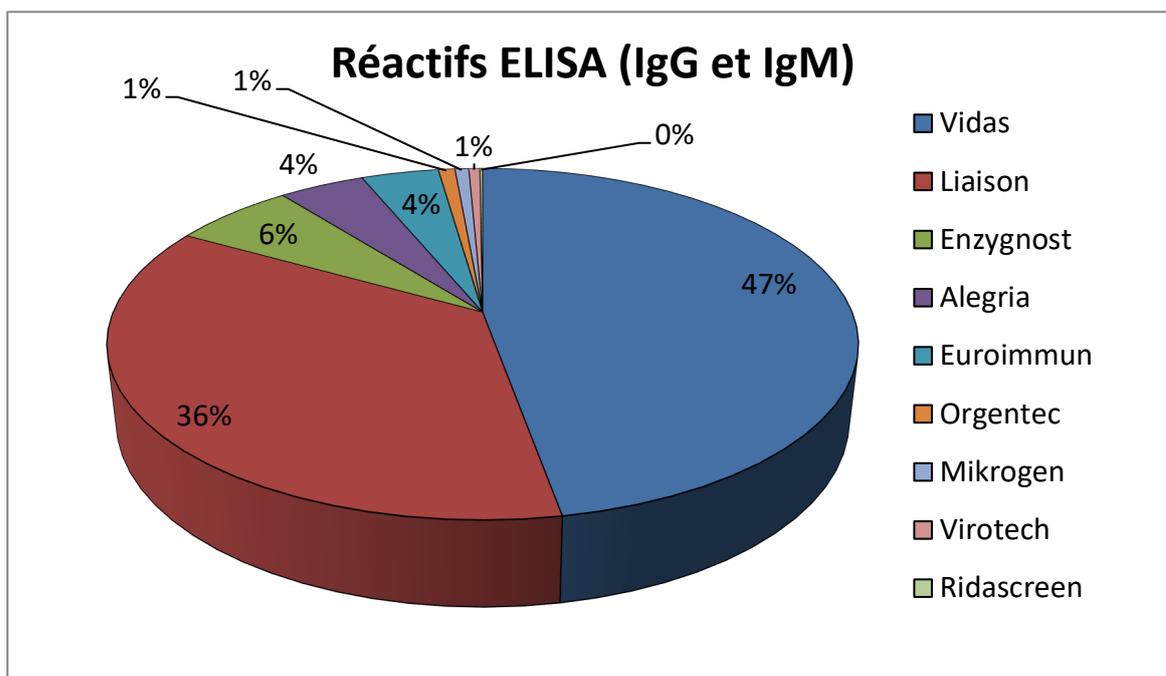
5.4.1 Organisation annuelle d'un Contrôle de Qualité Externe (EEQ) proposé par le CNR

Quatre sérums de contrôle de qualité externe (EEQ) ont été proposés aux laboratoires d'analyses médicales volontaires *via* Biologie Prospective (organisme associatif d'organisation de contrôle de qualité – DPC et formation professionnelle) pour la sérologie de *Borrelia*.

L'objectif de ces contrôles est de permettre à chaque laboratoire de tester sa qualité technique analytique ainsi que sa capacité d'interprétation et de conseil biologique face à un cas clinique.

Environ 230 laboratoires ont participé en 2018 aux EEQ annuels (227 au minimum et 232 au maximum, selon les enquêtes).

Neuf réactifs différents étaient utilisés par ces laboratoires en ELISA et 7 réactifs différents en immuno-empreinte (ou western-blot) :



En moyenne les résultats analytiques fournis par l'ensemble des laboratoires étaient satisfaisants dans plus de 95 % des cas.

Tous les réactifs d'immuno-empreinte commerciaux utilisés par ces laboratoires ont fait par ailleurs l'objet d'une évaluation technique par le CNR (<http://www.chru-strasbourg.fr/Les-centres-de-referance/Borrelia>)

Pour les interprétations sérologiques de ces EEQ et les conseils donnés aux cliniciens, les taux de concordance avec les réponses du référent variaient selon les enquêtes de 83 % à 91 %. Les pistes d'amélioration portent sur la connaissance de possibles réactions croisées en IgM et sur la quasi-absence d'indication de la PCR sur le LCR en cas de suspicion de neuroborréliose. Ces deux points sont des axes de formation lors des séminaires de FMC réalisés par le CNR.

5.4.2 Activités de conseil et organisation des communications écrites et orales

Organisation du CNR pour réceptionner les appels ou e-mails :

- Les mails sont centralisés sur une adresse unique : cnr.borrelia@unistra.fr, et selon leur contenu sont soit transmis aux biologistes du CNR soit répondus directement par les techniciennes et ingénieure du CNR.
- Une permanence téléphonique du CNR est effective du lundi au vendredi de 9h à 12h et de 13h à 16h30 (03.69.55.14.27), une boîte vocale est également mise en place : 03.69.55.16.66. Selon la nature et l'interlocuteur les appels sont traités soit par les biologistes soit par les techniciennes et ingénieure du CNR.

5.4.2.1 Communications écrites : e-mails / fax / lettres

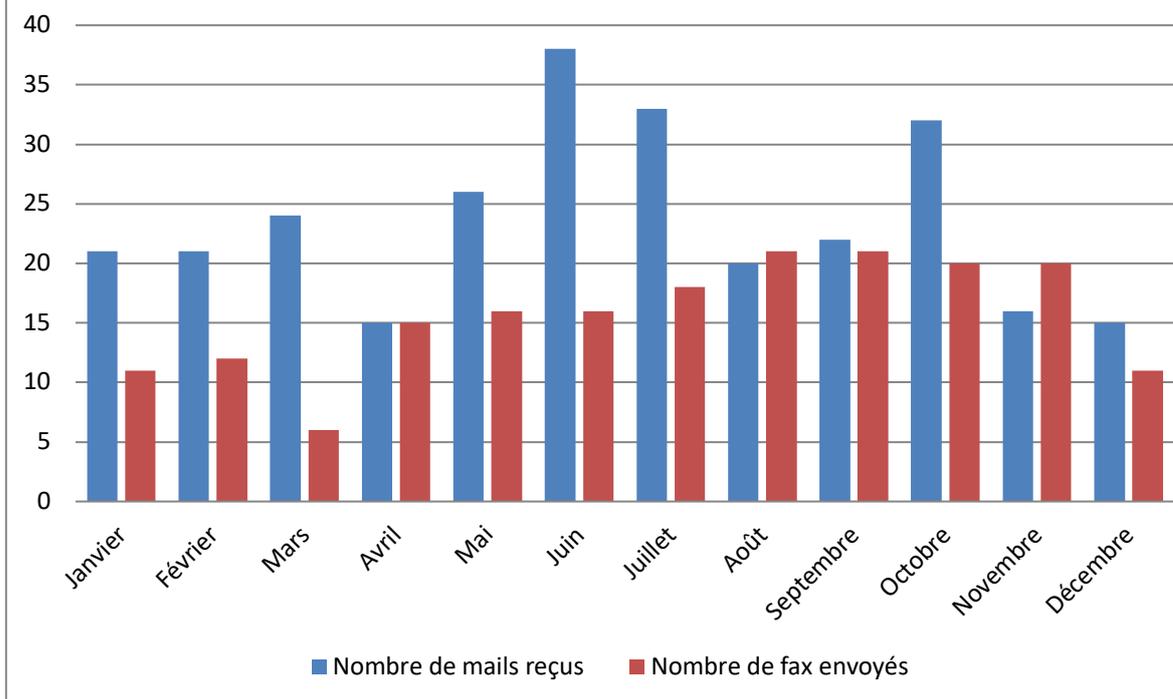
L'analyse de l'activité de conseil du CNR *Borrelia* a été réalisée à partir d'un fichier Excel® contenant la saisie manuelle des e-mails et fax de l'année 2018. La base de données est constituée à partir de l'extraction des données suivantes dans chaque e-mail : la date, l'émetteur, le destinataire, la provenance géographique et le thème de la demande.

En 2018, 473 communications écrites ont été recensées : 283 e-mails, 187 fax et 3 courriers.

Le graphique ci-dessous représente la répartition de ces communications en fonction des différents mois de l'année.

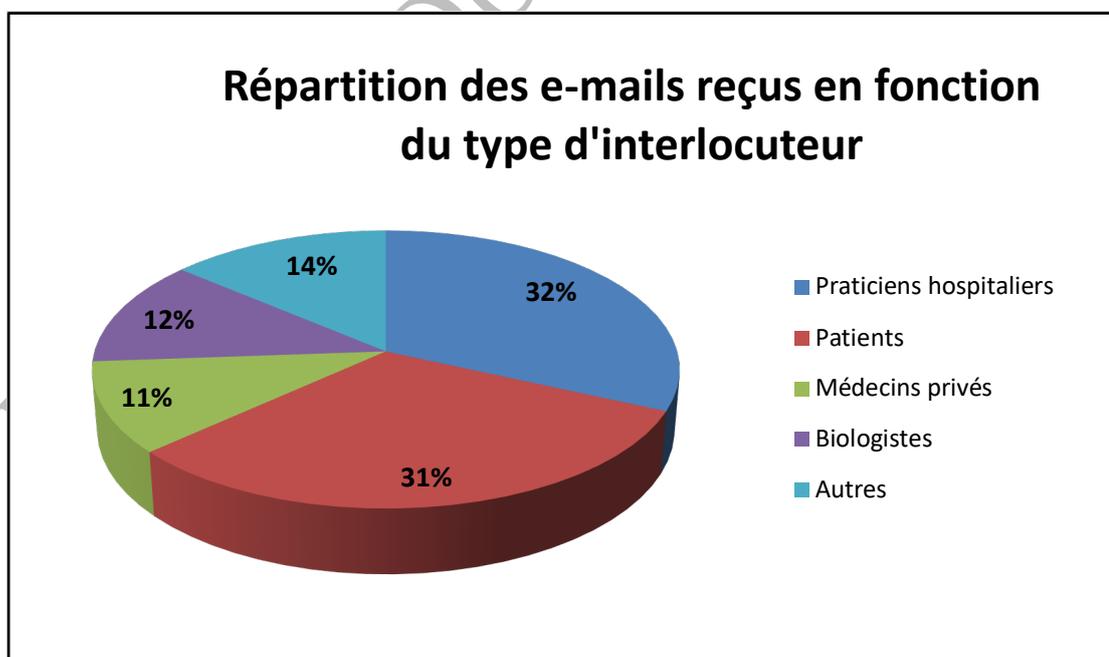
On observe une répartition relativement homogène des demandes durant l'année. Le nombre de demandes variait entre 6 et 38 par mois.

Répartition du nombre de communications écrites en fonction des mois de l'année 2018



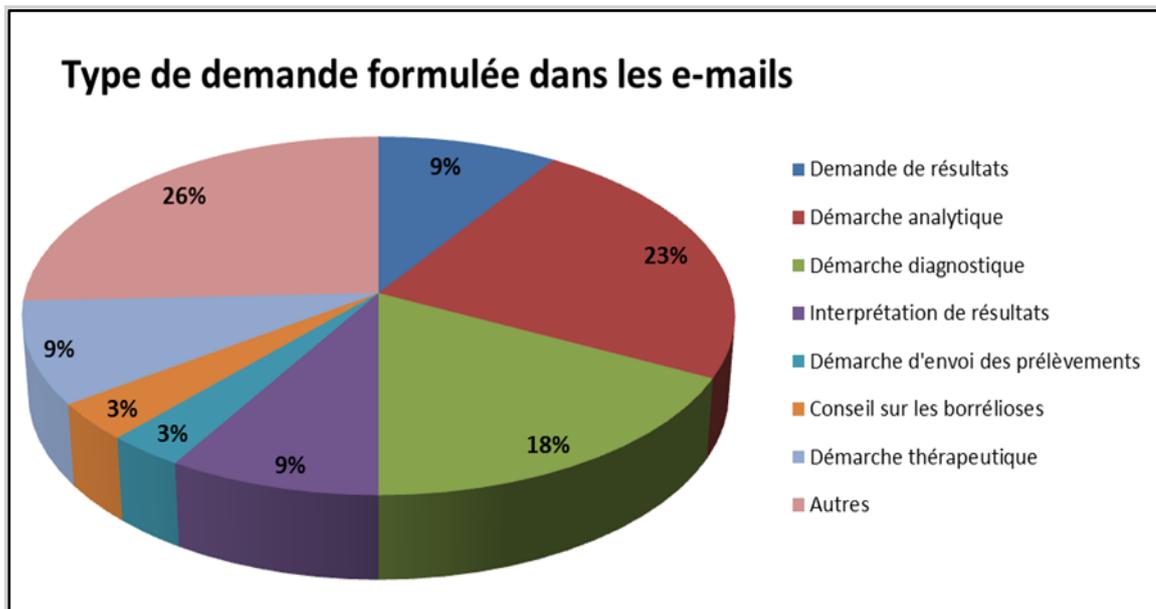
Parmi les 187 fax envoyés, 99 % correspondaient à des résultats d'analyses demandés par les prescripteurs. Les autres demandes correspondaient à des envois de documentation.

Les e-mails ont été analysés en fonction du type d'interlocuteur :



Les demandes provenaient essentiellement de praticiens hospitaliers et de médecins libéraux qui représentaient 43 % des e-mails reçus. Les demandes de patients représentaient 31 % des e-mails reçus ; 14 % des e-mails provenaient d'autres interlocuteurs comme des journalistes, des organismes liés à la santé ou à la recherche (ARS, DRCI), etc.

Les e-mails ont été ensuite analysés en fonction de la demande formulée :



La majorité des e-mails envoyés au CNR concernent l'aide à la démarche analytique (23 %), à la démarche diagnostique (18 %), à la démarche thérapeutique (9 %), ou une aide à l'interprétation des résultats (9 %).

Dans la catégorie « autres » qui représentait 26 % des e-mails reçus, se trouvent principalement des demandes d'informations précises (ex : épidémiologie, modes de transmission, etc.).

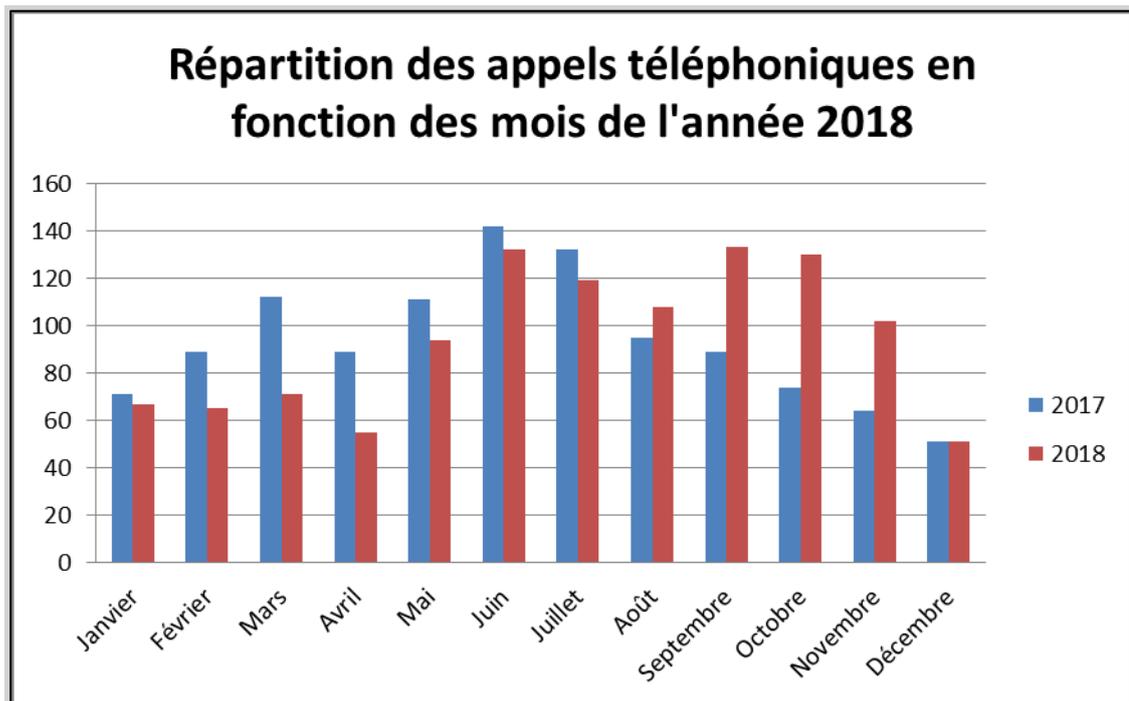
5.4.2.2 Communications téléphoniques

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 2018.

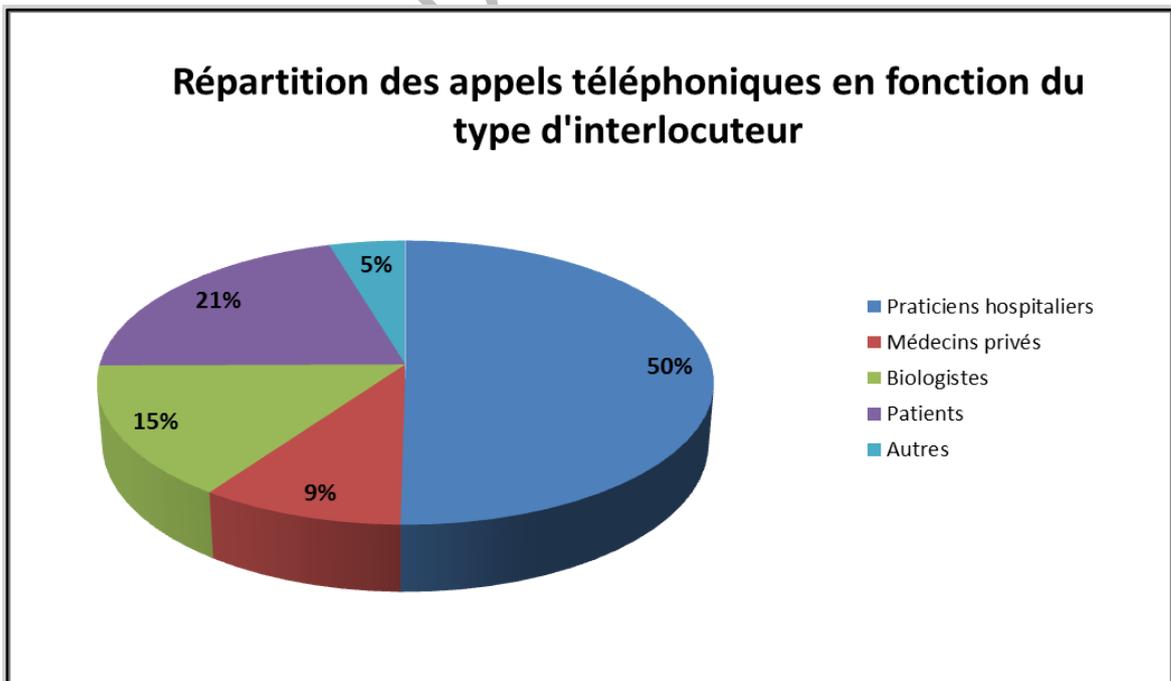
Le CNR a reçu en 2018, 1 127 appels, ce chiffre est stable par rapport à 2017. En 2018, le nombre moyen d'appels par mois est 93,9 appels.

Au total, 84 h ont été passées au téléphone par le personnel du CNR. Parmi ces appels, 185 appels (16 %) ont été réceptionnés par les biologistes du CNR et 942 appels (84 %) ont été réceptionnés par les techniciennes et ingénieure du CNR. La durée d'un appel est en moyenne de 5 minutes. Les biologistes apportent des conseils essentiellement analytiques, diagnostiques ou thérapeutiques alors que les techniciennes répondent aux questions relatives aux démarches pour l'envoi de prélèvements ou de documents ou des demandes de résultats.

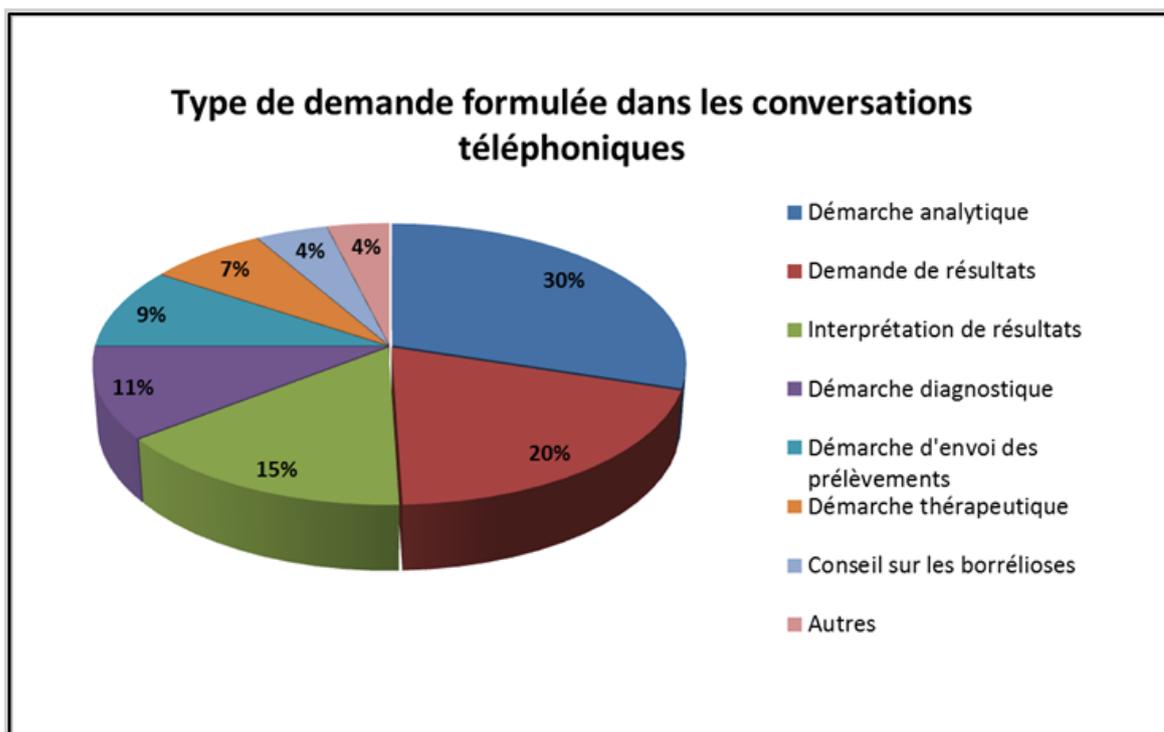
Graphique de répartition des appels selon les mois de l'année :



En 2018, la majorité des communications téléphoniques provenaient de médecins (59 %), toutes spécialités et origines confondues. Dans la plupart des cas, il s'agissait de médecins qui demandaient conseil au CNR pour la prise en charge de leurs patients. Les autres interlocuteurs étaient directement des patients (21 %) et des biologistes (15 %). Les 5 % des appels restants concernaient d'autres interlocuteurs (ARS, DRCI, journalistes, etc.).



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



Les principaux thèmes correspondaient aux :

- demandes relatives aux analyses biologiques (59 %) : demandes de résultats (20 %), démarche analytique (30 %), et modalités de prélèvement et d'envoi des échantillons (9 %)
- demandes relatives au diagnostic (33 %) : interprétations des résultats (15 %), démarche de diagnostic clinique (11 %) et démarche thérapeutique (7 %).

En conclusion, l'analyse des communications téléphoniques révèle que l'activité du CNR des *Borrelia* sur ce domaine est stable par rapport à 2017. Cette activité s'avère être une activité analytique et d'expertise, mais aussi de conseil et d'information. Les demandes présentaient des diversités géographiques, thématiques et provenaient de divers interlocuteurs, la majorité des demandes étant celles des cliniciens à propos de la démarche diagnostique et analytique en cas de suspicion de borréliose de Lyme.

En effet, le diagnostic de maladie de Lyme peut être délicat et l'interprétation des différentes analyses n'est pas toujours aisée pour les prescripteurs.

L'analyse de l'ensemble de ces données montre la répartition des demandes en fonction de l'interlocuteur afin d'orienter le fonctionnement ultérieur du CNR vers une sensibilisation prioritaire de ces personnes, et permet également d'identifier des questions récurrentes auxquelles une réponse standardisée pourrait être apportée *via* une Foire aux Questions sur un développement du site internet du CNR (voir chapitre 8).

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

6.1 Activités de recherche en 2018 en lien direct avec les missions et activités du CNR

Les différents axes fondamentaux et vectoriels de l'équipe de recherche (EA7290 : virulence bactérienne précoce : groupe *Borrelia*) ont été les suivants en 2018 :

1. Analyse du rôle de la peau dans la transmission précoce de *Borrelia* et de son rôle potentiel dans la physiopathologie de la maladie. Mise au point d'une technique de détection de *Borrelia* dans des biopsies cutanées par spectrométrie de masse.
2. Analyse de la persistance de *Borrelia* dans la peau et de l'organotropisme de *Borrelia* pour la peau par une approche protéomique : application à un diagnostic tardif de la borréliose de Lyme.
3. Mise au point d'une technique de détection de *Borrelia* dans les tiques par spectrométrie de masse.
4. Analyse du rôle du microbiome cutané sur la transmission précoce de *Borrelia*: rôle sur l'attraction des tiques et dans la transmission de *Borrelia* au niveau de la peau.
5. Développement d'un vaccin vétérinaire contre la borréliose de Lyme.
6. Aspects épidémiologiques de la borréliose de Lyme en zone d'endémie : identification des tiques *Ixodes* par spectrométrie de masse, MALDI-TOF.
7. Mise au point d'un modèle de fièvres récurrentes à *Borrelia crocidurae*.

6.1.1 Analyse de la persistance et de l'organotropisme de *Borrelia* dans la peau par une approche protéomique de *Borrelia* : application à un diagnostic tardif de la borréliose de Lyme.

6.1.1.1 Objectifs

Confirmer le rôle de la peau dans la persistance de *Borrelia* et mettre en évidence des protéines bactériennes qui pourraient servir de marqueurs de *Borrelia* active dans la phase disséminée de la borréliose.

6.1.1.2 Partenariats

- Professeur L. Sabatier et une étudiante en doctorat (Paola Cantero), Département des Sciences Analytiques Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg, France.
- Plateforme i-Cube de l'hôpital (C. Po et Dr. S. Gioux) : analyse de la persistance cutanée de *Borrelia burgdorferi* ss N40 bioluminescente chez des souris.

6.1.1.3 Etat d'avancement

B. burgdorferi a été inoculée par voie intradermique chez la souris. Des biopsies de peau de souris, réactivées au préalable avec un dermocorticoïde, ont été prélevées à 40 et 90 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 vont constituer des marqueurs d'infection active de *Borrelia*.

Afin de préparer le protocole chez les patients, nous avons travaillé sur le modèle murin afin d'étudier l'effet de :

- (1) la lidocaine sur *Borrelia*. En effet, cet anesthésique est utilisé chez les patients et pourrait potentiellement affecter la survie des *Borrelia* dans les prélèvements.
- (2) différents dermocorticoïdes et
- (3) réactivation à distance du point d'inoculation par le clobétasol.

Nous travaillons au protocole chez les patients afin de présenter le projet au conseil scientifique de l'hôpital puis au CPP. Ce travail va donc se poursuivre afin d'identifier des marqueurs d'infection active à *Borrelia* lors de la phase tardive chez les patients. Cette technique de protéomique sur biopsies cutanées pourrait aussi constituer une alternative moins invasive qu'une ponction lombaire ou articulaire.

Un financement ANR a été obtenu pour ce projet.

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

6.1.2.1 Objectifs

Mettre au point une nouvelle technique de diagnostic précoce. Comparaison 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 Partenariats

Professeur L. Sabatier et une étudiante en doctorat (Paola Cantero), Département des Sciences Analytiques Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg, France.

- Cette étude se fait en collaboration avec :
 - le service d'Infectiologie (Prof Hansmann) et de Dermatologie (Prof D. Lipsker et Dr. C. Lenormand) du CHU de Strasbourg,
 - le CH de Mulhouse (Dr Kieffer),
 - le CH de Colmar (Dr Martinot),
 - le CH de Metz (Dr Truchetet).

6.1.2.3 Etat d'avancement

Nous avons mis au point sur modèle murin une technique de diagnostic ciblée, la SRM-MS/MS (Selected Reaction Monitoring / Mass spectrometry). Nous nous sommes placés au 7^{ème} jour (pic de multiplication de *Borrelia*) après infection intradermique à la seringue de *B. burgdorferi* ss

Sur biopsies cutanées, nous avons préalablement recherché l'ensemble des protéines bactériennes de *Borrelia* présentes par LC-MS/MS : 25 ont été identifiées.. Afin de valider la méthode pour une application éventuelle chez l'Homme, nous l'avons testée sur

3 biopsies d'érythème migrant de patients infectés par *B. afzelii*. De façon intéressante, OspC et la flagelline ont été détectées chez les trois patients.

Les résultats sont très prometteurs et les protéines de *Borrelia* seront étudiées chez les patients avec modification de protocole suite aux effets de la lidocaine sur *Borrelia*.

Financements : IDEX puis PHRC interrégional pour ce projet.

6.1.3 Mise au point d'une technique d'identification de tiques par spectrométrie de masse, notamment d'Ixodes

6.1.3.1 Objectifs

Mettre au point une technique rapide d'identification des tiques par spectrométrie de masse pour remplacer l'identification à la loupe binoculaire (longue) ou par biologie moléculaire (coûteuse).

6.1.3.2 Partenariats

Ce travail se fait en étroite collaboration avec l'équipe de recherche IRBA (Institut de Recherche des Armées) de Marseille (Dr L. Almeras).

Université de Tizi Ouzou (Algérie): Un étudiant en thèse est venu se former avec des tiques collectées dans le Maghreb sur bovins.

6.1.3.3 Etat d'avancement

Le travail fait partie de la thèse de doctorat d'Université de P. Boyer.

Nous constituons une base de données de tiques en utilisant les pattes des tiques, le reste du corps (idiosome) est utilisé pour rechercher des agents infectieux par PCR ou identifier l'espèce de tique par biologie moléculaire pour la constitution de banque de données.

Nous continuons à alimenter la banque de données par des tiques venant de différentes régions du Monde : Algérie, Guyane, Cambodge, Allemagne.

Publication soumise portant sur l'identification de différentes espèces d'*Ixodes*.

6.1.4 Analyse du rôle du microbiome cutané dans l'attraction des tiques et sur la transmission précoce de *Borrelia*

6.1.4.1 Objectifs

La flore cutanée de l'Homme pourrait avoir un impact majeur sur (1) l'attraction vis-à-vis des tiques, (2) puis sur la transmission d'agents infectieux. Les bactéries commensales moduleraient potentiellement l'inflammation lors de la transmission de la borréliose de Lyme, rendant les personnes plus ou moins sensibles à la maladie.

6.1.4.2 Partenariats

Ce travail a fait l'objet de travaux de M2 en 2018 (Nouha Fillali).

6.1.4.3 Etat d'avancement

(1) **Approche *in vitro* :**

Nous analysons le rôle des bactéries commensales de la peau dans la transmission de *Borrelia* en co-incubant la bactérie infectante *Borrelia* avec une bactérie de la peau *Staphylococcus epidermidis*

(2) **Approche *in vivo* :**

Nous avons mis en place une étude avec des personnes particulièrement exposées aux tiques (Agent de l'ONF –Office National des Forêts, suivi sur une année). Les personnes plus sensibles et moins attractives vis-à-vis des tiques, ont été divisées en deux groupes. Des frottis de peaux seront réalisés afin d'isoler et d'identifier les bactéries de la peau de ces personnes. Ces bactéries seront ensuite co-incubées *in vitro* avec *Borrelia* afin de voir si ces bactéries diminuent ou augmentent l'inflammation des cellules de la peau (kératinocytes et fibroblastes). Des prélèvements de sérum seront faits également pour mesurer la présence d'anticorps de salive ou anti- *Borrelia* (voire d'autres maladies à tiques).

6.1.5 Développement d'un vaccin canin contre la borreliose de Lyme

6.1.5.1 Objectifs

Basée sur l'identification de protéines de *Borrelia* dans la peau par protéomique (spectrométrie de masse), nous recherchons des antigènes-candidats-vaccins susceptibles d'être utilisés pour un vaccin chez le chien.

6.1.5.2 Partenariats

- Pr L. Sabatier, Département des Sciences Analytiques Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg, France - Satt-Conectus, cellule de valorisation de l'université.
- Société vétérinaire VIRBAC.

6.1.5.3 Etat d'avancement

Nous avons identifié par protéomique chez la souris infectée à la seringue avec *B. burgdorferi* (plusieurs souches), 25 protéines au jour 7 (pic de multiplication de *Borrelia*).

Les protéines lipidées ont été produites en 2018 pour un test d'efficacité chez le chien en 2019.

Ce projet est financé en intégralité par la cellule de valorisation de l'Université de Strasbourg.

6.1.6 Mise au point d'un modèle murin de fièvres récurrentes à *Borrelia crocidurae*

6.1.6.1 Objectifs

Analyse du rôle de la tique molle *Ornithodoros* dans la transmission

Analyse du rôle de la peau dans la transmission et dans la persistance de la bactérie : tentative de mise au point d'une technique diagnostique en protéomique sur peau infectée.

6.1.6.2 Partenariats

Partenariat avec le Dr S. Bergstrom (Suède), spécialiste européen des fièvres récurrentes et avec le Dr L. Vial, spécialiste des fièvres récurrentes en Afrique de l'Ouest et experte sur les tiques molles.

6.1.6.3 Etat d'avancement

Mise au point du modèle sur souris Balb/C avec inoculation à la seringue. Mise en place d'un élevage de tiques molles *Ornithodoros*. Analyse de la physiopathologie chez la souris

Le CNR *Borrelia* souhaite développer un peu plus son expertise sur cette espèce de *Borrelia*, et la transmission par la tique *Ornithodoros*.

6.2 Liste des publications et communications en 2018

6.2.1 Publications nationales

Boulangier N., Zilliox L., Goldstein V., Boyer P., Napolitano D., Jaulhac B. (2018). Surveillance du vecteur de la borréliose de Lyme, *Ixodes ricinus*, en Alsace (France), de 2013 à 2016. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, Lyme, 2018, N°19-20, p.400-405.

Bonnet S.I., Blisnick A., **Boulangier N.**, Stachurski F., Vial L. (2018). Impacts du changement climatique sur les populations de tiques en Europe : mythes et réalités. Le point Vétérinaire, Mai 2018, N°85.

6.2.2 Publications internationales

Bernard Q, **Jaulhac B., Boulangier N.** (2018) In Vitro Models of Cutaneous Inflammation. Methods Mol Biol.;1690:319-327.

Talagrand-Reboul E., Boyer P.H., Bergström S., Vial L., Boulangier N. (2018). Relapsing fevers : neglected tick-borne diseases. Frontiers in Infection and Cellular Microbiology, 8:98.

Gallais F., **De Martino S.J., Sauleau E.A., Hansmann Y., Lipsker D., Lenormand C., Talagrand-Reboul E., Boyer P.H., Boulangier N., Jaulhac B., Schramm F.** Multilocus sequence typing of clinical *Borrelia afzelii* strains: population structure and differential ability to disseminate in humans. *Parasit Vectors*. 2018, 11:374-378.

Grillon A., Scherlinger M., **Boyer P.H.**, **De Martino S.**, Perdriger A., Blasquez A., Wipff J., Korganow A.S., Bonnard C., Cantagrel A., Eyer D., Guérin F., Monteiro I., Woehl J.M., Moreau P., Pennaforte J.L., Lechevallier J., Bastides F., Colombey A., Imbert I., Maugars Y., Gicquel P., Cuchet F., Brax M., Sibilia J., **Zilliox L.**, **Barthel C.**, Arnaud L., **Jaulhac B.**

Characteristics and clinical outcomes after treatment of a national cohort of PCR-positive Lyme arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2018 18: 30424-4.

Robinot R., Bachy E., Chaubard S., Urb M., Carras S., Bardel E., Chartoire D., Traverse-Glehen A., Marche P.N., Salles G., **Jaulhac B.**, Genestier L. Chronic *Borrelia burgdorferi* infection triggers NKT lymphomagenesis. *Blood.* 2018;132: 2691-2695.

Boyer P.H., Kieffer P., **De Martino S.J.**, **Zilliox L.**, Vogel J.Y., **Jaulhac B.**, Hansmann Y. *Borrelia burgdorferi* sl and tick-borne encephalitis virus coinfection in Eastern France. *Med Mal Infect.* 2018, 48: 218-220.

Velay A., Solis M., Kack-Kack W., Gantner P., Maquart M., Martinot M., Augereau O., De Briel D., Kieffer P., Lohmann C., Poveda J.D., Cart-Tanneur E., Argemi X., Leparç-Goffart I., **De Martino S.**, **Jaulhac B.**, Raguët S., Wendling M.J., Hansmann Y., Fafi-Kremer S. A new hot spot for tick-borne encephalitis (TBE) : A marked increase of TBE cases in France in 2016. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018; 9:120-125.

Dessau R.B., van Dam A.P., Fingerle V., Gray J., Hovius J.W., Hunfeld K.P., **Jaulhac B.**, Kahl O., Kristoferitsch W., Lindgren P.E., Markowicz M., Mavin S., Ornstein K., Rupperecht T., Stanek G., Strle F. To test or not to test ? Laboratory support for the diagnosis of Lyme borreliosis - Author's reply. *Clin Microbiol Infect.* 2018, 24: 211-212.

6.2.3 Communications nationales

Boyer P., **Boulangier N.** *Borrelia miyamotoi* parmi des patients fébriles après piqûres de tiques et dans les tiques en Alsace. Journées du REID : groupe Tiques et Maladies à tiques, 13-15 mars 2018.

Talagrand-Reboul E., **Diop K.**, Bergström S., Vial L., **B. Jaulhac**, **Boulangier N.** Rôle d'*Ornithodoros erraticus* dans la transmission-dissemination de la borréliose récurrente africaine et réponse de l'hôte en modèle murin. Journées du REID : groupe Tiques et Maladies à tiques, 13-15 mars 2018.

Boyer P., Almeras L., Plantard O., McCoy K., **Jaulhac B.**, **Boulangier N.** Application du MALDI-TOF à l'identification des tiques du genre Ixodes. Journées de la Société de Microbiologie de Strasbourg, 29 mars 2018.

Grillon A., **Boulangier N.** Journées Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, 26 avril 2018.

Boyer P.H., Koetsveld J., **Zilliox L.**, Sprong H., **De Martino S.J.**, Hansmann Y., **Boulangier N.**, Hovius J.W., **Jaulhac B.** Fréquence de l'infection à *Borrelia miyamotoi* chez des patients fébriles et dans les tiques dans une zone endémique de borréliose de Lyme en France. RICAI, 17-18 dec 2018, Paris.

Raffetin A., Salomon J., **Grillon A.**, **Jaulhac B.** Tests diagnostiques non validés de la borréliose de Lyme. 19^{èmes} Journées Nationales d'Infectiologie 14 juin 2018 à Nantes.

6.2.4 Communications internationales

Cantero P., **Grillon A.**, Westermann B., Esteves-Gloria L., **Jaulhac B.**, **Boulangier N.**, Ehret-Sabatier L. Discovery and targeted proteomics on skin biopsies for the diagnosis of tick-borne diseases, 66th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 3-7, 2018, San Diego, CA, USA.

Grillon A., Cantero P., **Lenormand C.**, Hansmann Y., Esteves-Gloria L., Westermann B., Sabatier L., **Jaulhac B.**, Kieffer P., **Boulanger N.** Proteomics on skin biopsies: a new approach for the diagnosis of active infection in Lyme Borreliosis? ICLB, Atlanta, USA, 11-14 septembre 2018.

Cantero P., **Boulanger N.**, **Jaulhac B.**, Hansmann Y., **Lenormand C.**, **Zilliox L.**, Kieffer P., Ehret-Sabatier L. Development of quantitative targeted proteomics for the diagnosis of Lyme borreliosis. Annual Congress of the *European Proteomics Association: Potsdam, Allemagne*. 24-28 Mars 2019.

Scherlinger M., Grillon A., Sibia J., Arnaud L., **Jaulhac B.** Clinical characteristics and outcome after treatment of a national cohort of PCR-positive Lyme arthritis. Congrès Européen de Rhumatologie – EULAR - Clinical topics by diseases. Amsterdam, 16 juin 2018.

Scherlinger M., Grillon A., Sibia J., Arnaud L., **Jaulhac B.** Clinical Characteristics and Outcome after Treatment of a National Cohort of PCR-Positive Lyme Arthritis 2018 ACR/ARHP Annual Meeting, Chicago, IL October 19-24 2018.

6.2.5 Conférences sur invitation, congrès, séminaires

Boulanger N. et Sabatier L : Borréliose de Lyme et diagnostic cutané. Commission Recherche de l'université de Strasbourg, 27 septembre 2018.

Boulanger N. : Pouvoir immunomodulateur de la salive de tique dans la transmission des pathogènes. Journée de la société de Biologie, 18 décembre 2018, Paris.

Jaulhac B. : Journées Spirochètes – Académie Vétérinaire
« La borréliose de Lyme : épidémiologie, pathogènes impliqués et diagnostic biologique » Maisons-Alfort, 18 janvier 2018.

Jaulhac B. : Rencontres en Immunologie Pratiques – **RIIP**, Débat et controverses avec le Pr Jean SIBILIA : « La maladie de Lyme », UIC-P Espaces Congrès, Paris, 16 mars 2018.

Jaulhac B. : Conférence « Maladie de Lyme dans ses aspects du diagnostic biologique » Institut des Agents Infectieux – CNR des Staphylocoques, Groupement Hospitalier Croix Rouse, Lyon, 10 avril 2018.

Jaulhac B. : FMC - Dermatologues- ALPUD, Maladie de Lyme : ce que le dermatologue doit savoir, Nancy, 13 avril 2018.

B Jaulhac B. : 19^e Journées Nationales d'Infectiologie - Session Zoonoses/Lyme Modérateur « Tests diagnostiques non validés de la borréliose de Lyme et manifestations infectieuses systémiques post piqûres de tiques /étiologie et place des co-infections , Nantes, 14 juin 2018.

Jaulhac B. : 13^e édition de la journée Interface Rhumatologie Dermatologie, Borréliose de Lyme, une actualité toujours brûlante « Les tests diagnostiques aujourd'hui : mythes et réalité », Paris, 04 octobre 2018.

Jaulhac B. : 52^e Journées de Biologie Praticienne – Maison de la Chimie « Diagnostic biologique de la maladie de Lyme en 2018 », Paris, 08 décembre 2018.

Jaulhac B. : Institut de la Transmission Environnementale de Sorbonne Université « **Clima-Tique** », Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Epidémiologie de la borréliose de Lyme et outils biologiques et diagnostic de la borréliose de Lyme : situation en 2018, Paris 07 décembre 2018.

Jaulhac B. , Lenormand C. : Journées Dermatologiques de Paris, FMC -Maladie de Lyme : ce que le dermatologue doit savoir en 2018, Paris, 14 décembre 2018.

Jaulhac B. : Actualités diagnostiques et thérapeutiques, Séminaire Lyme «Des tests inefficaces - le point de vue du CNR *Borrelia* », IHU – Méditerranée Infection, Marseille Université, 20 décembre 2018.

6.2.6 Rédaction de livre ou de chapitres de livre

Chapitres :

- **Jaulhac B.**, Twizeyimana E., Schramm F., **Boulanger N.**, **De Martino S.** (2018) Chapitre N° 94 : *BORRELIA – BORRELIELLA*, - 3e Edition du précis de Bacteriologie clinique, Editions ESKA.
- Bernard Q., **Jaulhac B.**, **Boulanger N.** (2018) Chapter 24: *In vitro* model of cutaneous inflammation. Chapitre de livre: Springer. *Borrelia burgdorferi* : Methods and protocols. U. Pal and O. Buyuktanir editors.

Livre :

- **Skin and Arthropod vectors.** N. **Boulanger** Editeur. Elsevier . 550p. 2018

7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux

L'abondance des tiques dans un écosystème est associée à des facteurs abiotiques (température, humidité, etc.) et à des facteurs biotiques (végétation, écosystème forestier et faune sauvage).

Nous avons commencé dans le cadre du COPIL « maladies à tiques » présidé par l'ARS-Alsace de 2011 à 2014, une réflexion commune avec l'ONF sur le rôle de la faune sauvage, notamment des cervidés.

Nous souhaitons travailler plus en détail sur la faune sauvage et notamment l'impact des rongeurs et des cervidés sur la population de tiques en collaboration avec l'ANSES de Nancy (Dr. Franck Boue, Unité pathologie des animaux sauvages ANSES. Laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy, Malzéville). Ce travail se ferait également en collaboration avec l'ONCSF.

Le site de Murbach sera plus particulièrement ciblé afin d'analyser pourquoi ce site présente un plus fort risque acarologique que les différents sites étudiés depuis des années en Alsace ; cela pourrait être dû à sa faune sauvage.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions 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 diagnostiques 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 Santé publique France de tout événement inhabituel (nombre de cas, cas groupés, modification de la présentation clinique, etc).

1.2 Organisation du CNR *Borrelia*

Le CNR *Borrelia* est intégré depuis janvier 2012 au laboratoire de Bactériologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg sur le Plateau Technique de Microbiologie. Le CNR *Borrelia* a fonctionné en 2018 avec les moyens humains constants suivants :

- Pr Benoît Jaulhac : médecin biologiste, directeur du CNR, PU-PH, 25 % ETP hospitalier payés sur les crédits affectés au CNR
- Dr Sylvie De Martino : médecin biologiste, MCU-PH, 20 % ETP hospitalier payés sur les crédits affectés au CNR
- Dr Nathalie Boulanger : pharmacienne, MCU-PA, 45 % ETP hospitalier payés sur les crédits affectés au CNR
- Dr Pierre Zachary : pharmacien biologiste, PA, 10 % ETP hospitalier payés sur les crédits affectés au CNR
- Madame Laurence ZILLIOX : Ingénieure Biologiste Hospitalier : 80% ETP affectée au CNR et payés sur les crédits affectés au CNR
- Techniciennes : 2,72 ETP affectée au CNR et payés sur les crédits affectés au CNR
- Secrétaire : 40 % ETP affectée au CNR et payés sur les crédits affectés au CNR.

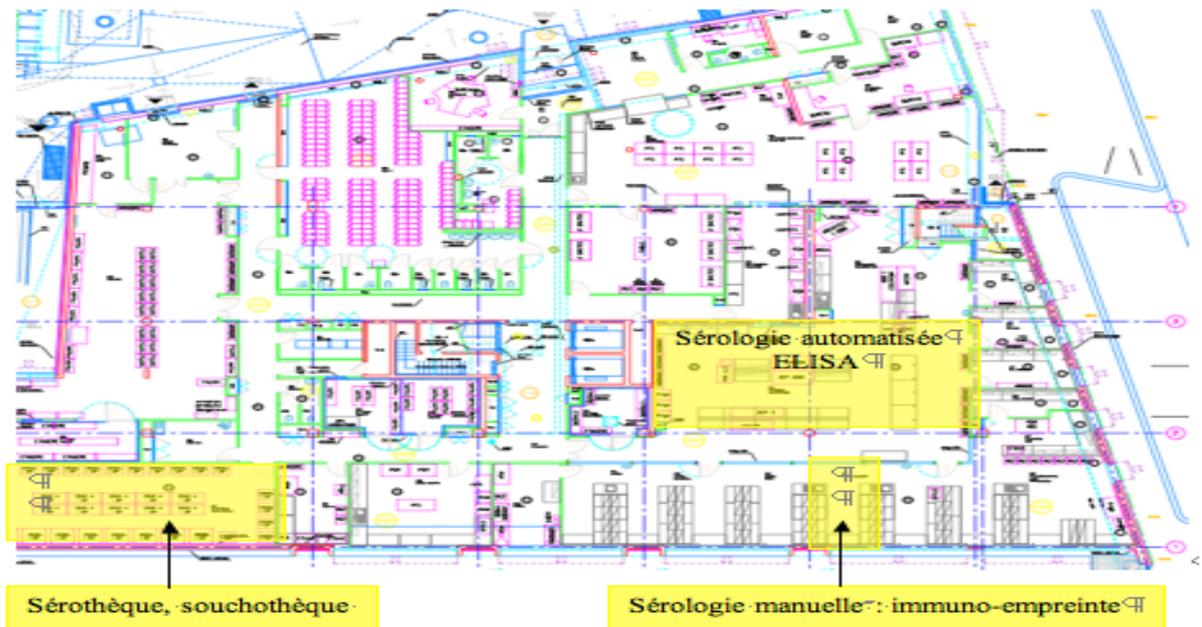
1.3 Locaux et équipements

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

Surface, plan :

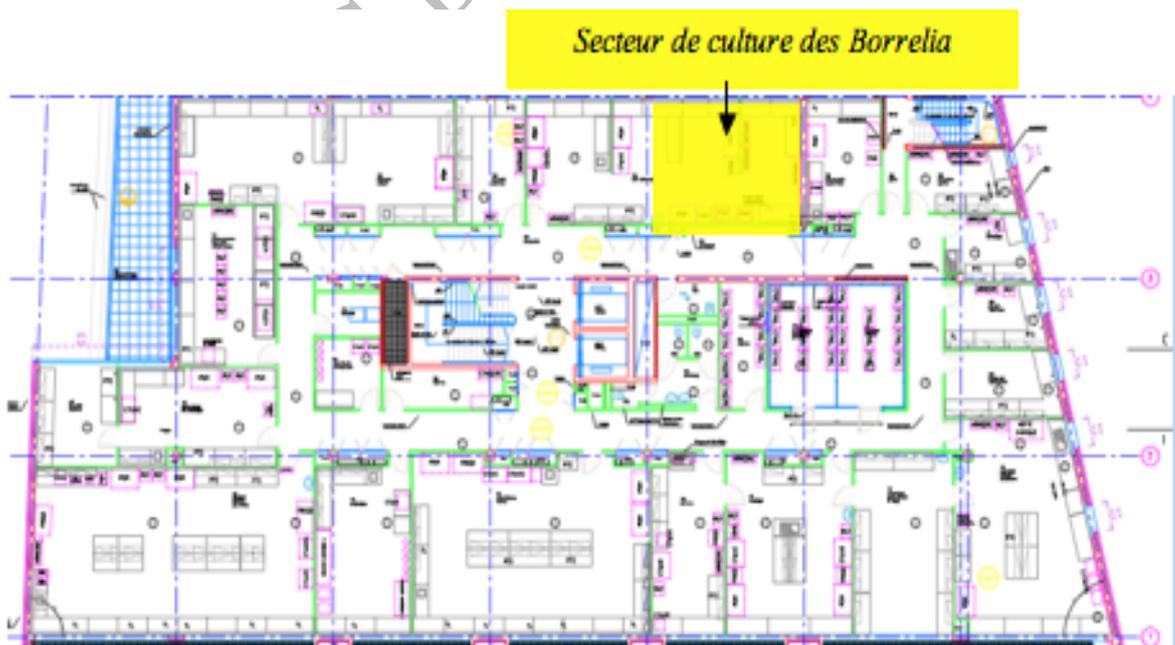
Depuis 2012, le CNR est localisé au sein du Plateau Technique de Microbiologie (bâtiment de 3 500 m² utiles). Son activité s'effectue en fonction des analyses à réaliser dans les différents Secteurs Techniques d'Activité Partagée (STAP) présentés ci-après.

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

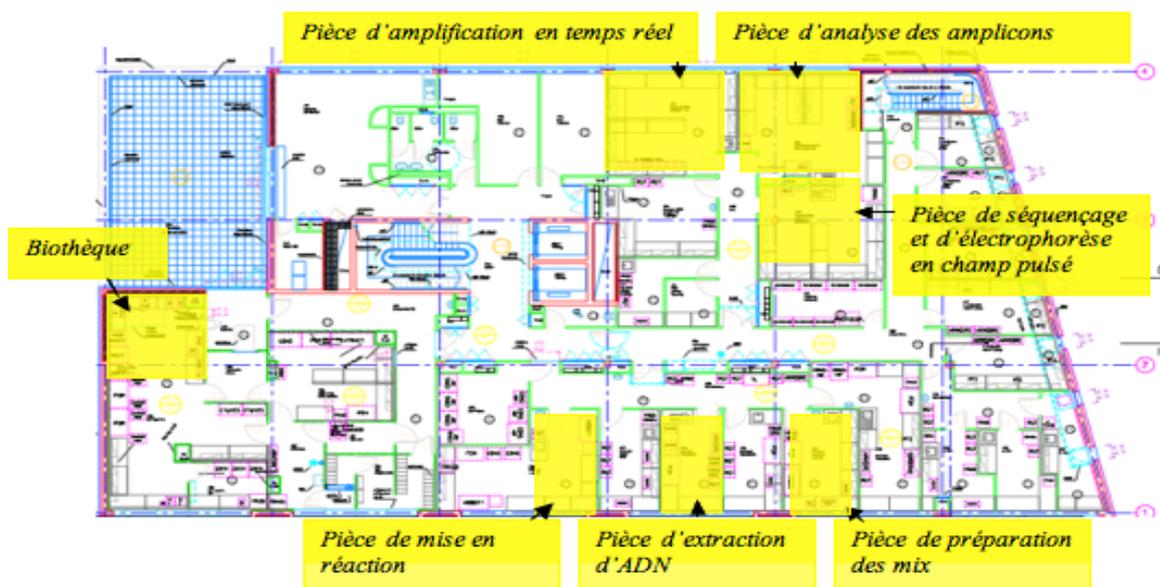


La souchothèque et les tiques sont conservées à -80°C, la sérothèque est conservée à -30°C. Elles sont situées dans une pièce séparée

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.

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), à -80°C (conservation des souches bactériennes, des ADN et des tiques) et à -150°C (conservation des souches bactériennes). Une connexion à un système d'alerte centralisé en temps réel 24H/24 est en place.
- ▷ Deux appareils de PCR en temps réel à microplaques (Roche 480, ABI 7500)
- ▷ Accès à un appareil de PCR en temps réel en capillaires (Roche Light Cycler 2.0)
- ▷ Accès à deux automates pour ELISA (BEP III, BEP 2000)
- ▷ Accès à un appareillage pour western-blot (Autoblot, Ingen)
- ▷ Accès à deux extracteurs d'acides nucléiques (Roche, BioMérieux)
- ▷ Accès à appareillage d'électrophorèse d'ADN
- ▷ Accès à système d'acquisition d'images (Bio-Rad)
- ▷ Accès à une hotte à produit chimique
- ▷ Accès à un autoclave
- ▷ Accès à une animalerie infectieuse agréée n° A 67 482 37.

1.4 Collections de matériel biologique

La collection de souches du CNR s'élève fin 2018 à 227 souches :

	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>	<i>B. burgdorferi</i>	Autres	Non déterminé	Total
Isolement au CNR (souches humaines)	79	15	9		2	105
Provenance externe (souches variées)	21	18	45	33	5	122

La catégorie « autres » regroupe diverses espèces de :

- *Borrelia* : *B. miyamotoi*, *B. recurrentis*, *B. hermsii* etc.
- *Borrelia*, présentant ou non un risque pathogène pour l'Homme : *B. spielmanii*, *B. lusitaniae*, *B. turdi*, *B. mayonii*, *B. japonica*, etc.

La sérothèque humaine du CNR s'élève à 2678 échantillons humains (détaillée en annexe1).

1. Sérothèque « Forestiers » : 441 sérums, cédés par l'ONF (année de collecte : 1996)
2. Sérothèque « DDS » : 344 sérums (donneurs de sang), collection cédée par Biomérieux en 2010
3. Sérothèque « EFS » : 695 sérums (donneurs de sang, année de collecte 2005)
4. Sérothèque issue de l'activité du CNR *Borrelia* avec fiches de renseignements Lyme des années précédentes ou étiquetée pour d'autres pathologies (réactions croisées possibles en sérologie de Lyme) : 1199 sérums et 51 LCR
5. Sérothèque « MSA » : 3150 sérums (collecte dans le ¼ Nord-Est de la France en 2003).

1.5 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.

Au même titre que le chef du pôle de biologie, le Pr Jaulhac s'est engagé, en tant que chef de service, à soutenir la démarche qualité du CNR.

Depuis le 1er novembre 2015, le laboratoire est accrédité par la section Santé Humaine du Comité Français d'Accréditation (COFRAC) selon la version 2012 de la norme NF EN ISO 15189 et les règles d'application du COFRAC sous le numéro 8-3524.

Le Cofrac a prononcé le maintien et l'extension de l'accréditation de notre laboratoire suite à l'évaluation de surveillance S2 et d'extension en date du 20.02.2018.

Les activités couvertes par cette accréditation relèvent de différentes spécialités (cf www.cofrac.fr).

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 :

- Le processus de management
- Le processus support
- Le processus de réalisation
 - Processus pré-analytique
 - Processus analytique
 - Processus post-analytique
 - Prestations de conseils

1. Le processus de management :

Les finalités sont de :

- Définir la politique qualité et les objectifs « qualité »
- Décliner la politique et les objectifs en actions
- Surveiller, mesurer et analyser les processus, les prestations et le niveau de satisfaction des clients et des partenaires.

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 bénéficié des outils mis en place au niveau du pôle de biologie :

1. un logiciel de gestion des événements indésirables (EI) Norméa® par les HUS avec déploiement au pôle de Biologie et au CNR depuis 2014
2. un logiciel de gestion documentaire Norméa® par les HUS avec déploiement au pôle de Biologie fin 2016 puis au CNR en 2017
3. 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.

Mesure, analyse et amélioration en routine au CNR :

- Réception et enregistrement des envois extérieurs d'échantillons biologiques (sérums,
- 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
- Suivi des contrôles internes de qualité (CIQ) en sérologie et en biologie moléculaire.
 - des CIQ sont intégrés à chaque série d'analyse de sérologie :
 - après une qualification 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.
 - des CIQ (témoins positif et négatif d'amplification et d'extraction) sont intégrés à chaque série d'analyse de biologie moléculaire.
- Participation du CNR aux programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ) :
 - de Labquality® (Elisa), Probioqual® (Elisa et technique de confirmation) et Instand® (SIT) pour la sérologie de Lyme

En 2018, nous avons obtenus 100 % de conformité pour l'ensemble des contrôles de qualité réalisés. Nous avons répondu à deux enquêtes de 2 sérums envoyés par Labquality® ; arrêt en milieu d'année 2018 pour passer à Probioqual® (6 sérums/an). Nous avons également répondu à 2 enquêtes Instand pour la synthèse intrathécale (couple sérum/LCR).

- de QCMD® (un EEQ européen de PCR *Borrelia*) et Instand®

En 2018, le CNR *Borrelia* a participé au Contrôle Européen de Qualité pour la détection de différentes espèces de *Borrelia* par amplification génique. Sur l'ensemble des 10 extraits fournis contenant de l'ADN de *Borrelia*, de *Treponema* et deux négatifs, tous les résultats fournis par le CNR ont été conformes.

Pour les 8 échantillons fournis par Instand®, tous les résultats rendus étaient conformes.

2. Processus support :

La finalité est de :

- fournir les ressources nécessaires aux processus de réalisation.

Ressources humaines :

- Les fiches d'habilitation et de maintien d'habilitation ont été mises à jour en 2018.

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
- La Direction des Achats (DAA) pour les consommables médicaux

- La Direction 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 :

Les enceintes thermostatées du CNR ont été cartographiées en 2017 et le seront à nouveau en 2019.

Hygiène et sécurité :

La liste des réactifs dangereux établie en 2012 a été mise à jour en 2018.

Maîtrise des documents et de l'information :

- La mise à jour des modes opératoires se poursuit.
- La validation des systèmes informatiques a été poursuivie en 2018 par le CRIH (Centre Régional Informatique Hospitalière).

3. Processus de réalisation :

La finalité est de :

- contrôler la qualité des différentes activités du laboratoire : accueil du patient, pré-analytique, analytique, post-analytique et prestations de conseils ; ils permettent de satisfaire aux attentes des clients et des partenaires.

➤ Accueil et prise en charge du patient :

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

➤ Processus pré-analytique :

Amélioration des procédures de réception, d'enregistrement et d'envoi des échantillons biologiques: réception et saisie informatique en temps réel d'un échantillon biologique pour analyse par culture et PCR, vérification de la saisie, procédure d'envoi de kits de prélèvement de biopsie cutanée pour analyse par culture, conditionnement pour envoi d'ADN, protocole de prélèvement pour recherche par PCR.

- Poursuite de la rédaction et réactualisation des modes opératoires pré-analytiques (cf : liste des fichiers informatiques « MOPE » du CNR *Borrelia*).
- Mise en place de l'édition d'un accusé de réception automatique quotidien des examens demandés au CNR en 2018 (*via* courrier de confirmation de réception : traçabilité, réponse préliminaire au prescripteur).

➤ 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 par ELISA afin de répondre aux exigences de la version 2012 de la norme NF EN ISO 15189.

Le sérodiagnostic de dépistage de la borréliose de Lyme sera ajouté courant 2019 à la ligne de portée accréditée au niveau du Pôle de Biologie (domaine Biologie médicale – Sous domaine : Microbiologie – Sous-famille : Sérologie infectieuse (ISEROBM) – code IB1 = Recherche, identification (détection) et détermination de la concentration d'anticorps contre des agents infectieux par méthode immunologique de type quantitatif (Immuno-enzymatique = ELISA).

➤ Processus post-analytique :

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 (cf. 5.3.1).

1.6 Procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS

Le contexte épidémiologique de la borréliose de Lyme est moins propice à la notion d'alerte épidémiologique que pour d'autres pathogènes bactériens ou viraux. 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 annuelle dans certaines régions, le CNR est à même de détecter et de faire remonter à Santé publique France toute augmentation anormale du nombre de cas observés ou qui seraient signalés au CNR par les ARS ou les cliniciens par exemple, ou toute survenue d'une pathologie non usuelle qui pourrait apparaître comme liée à une infection par *Borrelia* ou *Borrelia*.

Dans de tels contextes, le CNR transmettra sans délai ces informations à Santé publique France et vérifiera 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 fait état durant son mandat précédent 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 1 % 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
 - * *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 par mail et appel téléphonique au département maladies infectieuses de Santé publique France.

DONNEES DU CNR BORRELIA

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

2.1.1. 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** (souris) de sang infecté au sein d'une animalerie agréée
- **Amplification génique *in vitro*** :
 - PCR en point final 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).
 - PCR en temps réel et sonde Taqman® ciblant une région conservée de l'ADNr 16S du genre *Borrelia* (Hovius, JR, 2013). Un séquençage du produit amplifié est ensuite réalisé pour identification de l'espèce. Cette PCR détecte notamment *B. miyamotoi*
 - Développement en 2017 d'une nouvelle technique PCR par double PCR en point final pour l'identification des espèces de *Borrelia* agents de fièvres récurrentes (cf 2.1.1) plus précise sur les espèces *B. crocidurae* et *B. hispanica*.

* *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 2018 de *Borreliella* (cibles : gène chromosomique de la flagelline).
- PCR en temps réel et sonde TaqMan sur prélèvements biologiques pour recherche d'*Anaplasma phagocytophilum*, autre pathogène transmis par *I. ricinus*, (cible : gène *msp2* codant la protéine de surface p44).
- PCR universelle sur le gène de l'ADNr 16 S pour rechercher d'autres pathogènes transmis par les tiques.

* *Techniques sérologiques Borreliella :*

- Sérologie ELISA IgG et IgM séparés (Enzygnost VlsE Siemens®) pour la réalisation de sérologie sanguine, de sérologie sur LCR et pour la recherche d'une synthèse intrathécale spécifique anti *Borreliella*.

- Sérologies de confirmation par technique 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*.

2.1.2. Liste des techniques disponibles pour le typage

- Typage direct sur prélèvements ou sur culture par sondes fluorescentes spécifiques des principales 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*.
- Identification au rang d'espèce directement sur prélèvements ou sur culture par PCR puis séquençage pour les résultats atypiques obtenus avec la méthode précédente et pour les *Borrelia* des fièvres récurrentes
- Technique de typage des *Borrelia* par MSLT (cf 2.1.2) : technique de PCR nichée basée sur l'étude de 8 loci (méthode adaptée de Margos *et al.*, 2008).

2.1.3. Autres techniques disponibles : techniques d'étude de *Borrelia*, de *Borrelia in vivo* et des tiques :

(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 crociduræ*
- Lignée de tiques *Ornithodoros* pour étude des *Borrelia* agents de fièvre récurrentes.
- En 2018, le CNR a finalisé une banque de données de tiques au niveau du genre et des espèces en spectrométrie de masse, projet initié avec le Dr. L. Almeras (Marseille, Urmite). Nous arrivons à identifier très précisément les tiques *Ixodes* de différentes espèces en routine (publication en cours).

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

- Techniques de culture : utiliser le milieu BSK-H (Sigma)
- Technique PCR *Borrelia* : PCR en temps réel et sonde TaqMan® (gène *fla*) détectant l'ensemble des espèces de *Borrelia* connues (méthode du CNR, transférable sur demande)
- Techniques d'immuno-empreinte : cf évaluation sur le site du CNR des kits disponibles sur le marché français : www.chru-strasbourg.fr/Les-centres-de-reference/Borrelia

2.3 Liste des critères utilisés pour l'analyse des fiches de renseignements

2.3.1 Critères de l'ESGBOR

TABLE I. Summary of clinical case definitions for Lyme borreliosis

Term	Clinical case definition	Laboratory evidence: essential	Laboratory/clinical evidence: supporting
Erythema migrans	Expanding red or bluish-red patch (≥ 5 cm in diameter) ^a , with or without central clearing. Advancing edge typically distinct, often intensely coloured, not markedly elevated.	None	Detection of <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from skin biopsy.
Borrelial lymphocytoma (rare)	Painless bluish-red nodule or plaque, usually on ear lobe, ear helix, nipple or scrotum; more frequent in children (especially on ear) than in adults.	Seroconversion or positive serology ^b Histology in unclear cases	Histology. Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from skin biopsy. Recent or concomitant EM.
Acrodermatitis chronica atrophicans	Long-standing red or bluish-red lesions, usually on the extensor surfaces of extremities. Initial doughy swelling. Lesions eventually become atrophic. Possible skin induration and fibroid nodules over bony prominences.	High level of specific serum IgG antibodies	Histology. Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from skin biopsy.
Lyme neuroborreliosis	In adults mainly meningo-radiculitis, meningitis; rarely encephalitis, myelitis; very rarely cerebral vasculitis. In children mainly meningitis and facial palsy.	Pleocytosis and demonstration of intrathecal specific antibody synthesis ^c	Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from CSF. Intrathecal synthesis of total IgM, and/or IgG and/or IgA. Specific serum antibodies. Recent or concomitant EM.
Lyme arthritis	Recurrent attacks or persisting objective joint swelling in one or a few large joints. Alternative explanations must be excluded.	Specific serum IgG antibodies, usually in high concentrations	Synovial fluid analysis. Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by PCR and/or culture from synovial fluid and/or tissue.
Lyme carditis (rare)	Acute onset of atrio-ventricular (I-III) conduction disturbances, rhythm disturbances, sometimes myocarditis or pancarditis. Alternative explanations must be excluded	Specific serum antibodies	Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from endomyocardial biopsy. Recent or concomitant erythema migrans and/or neurologic disorders.
Ocular manifestations (rare)	Conjunctivitis, uveitis, papillitis, episcleritis, keratitis.	Specific serum antibodies	Recent or concomitant Lyme borreliosis manifestations. Detection of <i>B. burgdorferi</i> s.l. by culture and/or PCR from ocular fluid.

^aIf < 5 cm in diameter a history of tick-bite, a delay in appearance (after the tick bite) of at least 2 days and an expanding rash at the site of the tick-bite is required.
^bas a rule, initial and follow up samples have to be tested in parallel in order to avoid changes by inter-assay variation.
^cIn early cases intrathecally produced specific antibodies may still be absent.

2.3.2 Les différents cas recensés par le CNR ont été classés par type d'atteinte d'après les critères ci-dessous (développés à partir du tableau de définition de cas de l'ESGBOR) :

Erythème migrant (EM) :

- *EM certain* : EM ≥ 5 cm et constaté par un médecin
- *EM possible* : description d'une lésion cutanée atypique par le médecin
- *EM improbable* : EM non constaté par un médecin avec une description clinique incertaine.

Lymphocytome borrelie (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 atrophante (ACA) :

- *ACA certaine* : ACA diagnostiquée par un médecin, accompagnée d'une concentration élevée en IgG spécifiques dans le sérum.
- *ACA possible* :

- ACA diagnostiquée par un médecin mais sérologie non réalisée.
- Renseignements cliniques insuffisants accompagnés d'une concentration élevée en IgG spécifiques dans le sérum et d'une PCR positive sur biopsie cutanée.
- *ACA indéfinissable* : Mention d'ACA mais absence de renseignements cliniques accompagné d'une concentration élevée en IgG spécifiques dans le sérum.
- *ACA improbable* : sérologie négative.

Neuroborréliose (NB) :

- *NB certaine* : clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR + pléiocytose dans le LCR (liquide céphalorachidien) + SIT (Synthèse intrathécale) >2
 - *NB probable* :
 - clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR + pléiocytose dans le LCR + $1,7 \leq \text{SIT} \leq 2$
 - clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR + pléiocytose dans le LCR + SIT non réalisée
 - *NB possible* :
 - clinique en inadéquation avec les critères de l'ESGBOR (démence, doute sur une infection syphilitique) + pléiocytose dans le LCR + $\text{SIT} > 2$
 - clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR +/- pléiocytose dans le LCR + sérologie dans le LCR très positive + SIT non réalisée
 - clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR + pléiocytose dans le LCR négative + $\text{SIT} > 2$.
 - *NB peu probable* : clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR + $\text{SIT} < 1,5$
 - *NB improbable* :
 - clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR mais sérologie dans le LCR négative.
 - clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR mais sérologie négative dans le sérum + LCR non réalisé
 - LCR envoyé dans le cadre d'une suspicion de neuroborréliose (clinique inconnue ou en inadéquation avec les critères de l'ESGBOR) mais sérologie dans le LCR négative.
- NB indéfinissable* : clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR +/- 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 insuffisants ou inadéquats) accompagnée d'une sérologie positive en IgG.
- *ART improbable* :
 - mono-arthrite d'une grosse articulation accompagnée d'une sérologie (IgG) négative ou faiblement positive/douteuse.
 - manifestation(s) articulaire(s) autre(s) que mono-arthrite d'une grosse articulation +/- sérologie positive en IgG (sont classés dans cette catégories des manifestations articulaires autres que mono-arthrite (polyarthrite) avec des sérologies à un taux parfois très élevé).
 - clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR mais sérologie dans le sérum négative.
- *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'ESGBOR accompagnée d'une sérologie positive.
- *CARD possible* : clinique douteuse accompagnée d'une sérologie positive.
- *CARD improbable* :
 - clinique en inéquation avec les critères de l'ESGBOR +/- sérologie positive.
 - clinique correspondante aux critères de l'ESGBOR accompagnée d'une sérologie négative.

Manifestations oculaires (OCC) :

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