



CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES *BORRELIA*

RESUME DU RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITÉ Année 2009

CNR

Unité de Génétique Moléculaire
des Bunyavirus
Institut Pasteur, Paris

Responsables : Murielle Cornet
Élisabeth Ferquel

Techniciennes : Martine Garnier
Natacha Sertour

Secrétaire : Solange Coueille

Laboratoire associé au CNR

Laboratoire de Bactériologie
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

Responsables : Benoît Jaulhac
Sylvie de Martino

Assistante-Ingénieur : Chantal Delena

PLAN

1/ Introduction et résumé de l'année 2009

2/ Activités d'expertise

2. 1 Capacités techniques

2.1.1 Capacités techniques du CNR

- Liste des techniques de référence
 - o Techniques disponibles
 - o Techniques développées en 2009
 - o Techniques en développement
- Collection de souches
- Techniques transférées vers d'autres laboratoires

2.1.2 Capacités techniques du laboratoire associé au CNR

- Liste des techniques de référence
 - o Techniques disponibles
 - o Techniques développées en 2009
 - o Techniques en développement
- Collections de souches
- Liste des techniques évaluées

2. 2 Activités d'expertise de l'année 2009

2.2.1 Activités d'expertise du CNR

- Diagnostics bactériologiques et moléculaires de la borréliose de Lyme
- Diagnostic des fièvres récurrentes
- Matériel biologique distribué

2.2.2 Activités d'expertise du laboratoire associé au CNR

- Sérologies sanguines *Borrelia* réalisées en 2009
- Diagnostics bactériologiques et moléculaires
- Matériel biologique distribué

3/ Activités de surveillance

3. 1 Surveillance clinique de la borréliose de Lyme par le CNR

3.1.1 Extension du « Réseau-Lyme »: Recueil de données en ligne

3.1.2 Étude clinique prospective en Auvergne, dans la Meuse et en Basse et Haute-Normandie

3.1.3 Étude clinique prospective en milieu hospitalier :

Centre Hospitalier Universitaire de Rennes
CH de Charleville-Mézières
CHU de Reims
CHU Rouen
CHU Avicenne
CHU Cochin/Charles-Foix

3.1.4 Résultats du laboratoire Cerba

3.1.5 Collaboration avec l'InVS et le « réseau Sentinelles »

3.1.6 Collaboration avec des réseaux ou partenaires nationaux dans les domaines de la santé animale, alimentaire et environnement

3. 2 Surveillance clinique de la borréliose de Lyme et des autres infections bactériennes transmises par *Ixodes ricinus* par le laboratoire associé au CNR

3.2.1 Surveillance clinique de la borréliose de Lyme par le laboratoire associé au CNR

3.2.2 Surveillance clinique des manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France : protocole « biopsies cutanées » par le laboratoire associé au CNR

3.2.3 Etude de la fréquence relative des pathogènes transmis par les tiques du genre *Ixodes* sur une population à risque

3.2.4 Surveillance clinique de l'anaplasmose granulocytaire humaine par le laboratoire associé au CNR

3. 3 Surveillance du vecteur *Ixodes ricinus* par le CNR en Île de France

3.3.1 Choix des sites et méthodes

3.3.2 Étude dans la forêt de Rambouillet

3.3.3 Étude dans la forêt de Notre- Dame

3.3.4 Étude dans la forêt de Sénart

3.3.5 Étude en Île de France : comparaison des sites et conclusion

3.4. Diversité génétique des souches de *Borrelia burgdorferi* sl.

3.5 Contribution du CNR aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

3.6.1 Contribution du CNR aux réseaux de surveillance nationaux, internationaux, en particulier européens

3.6.2 Contribution du laboratoire associé au CNR aux réseaux de surveillance nationaux, internationaux, en particulier européens

4/ Activités d'information, de formation et de conseil

4.1 Activités d'information, de formation et de conseil du CNR

4.2 Activités d'information, de formation et de conseil du laboratoire associé au CNR

1/ Introduction et résumé de l'année 2009 :

Les ***Borrelia*** sont responsables de deux grands syndromes infectieux : la borréliose de Lyme et les fièvres récurrentes qui, bien que très différentes dans leur répartition géographique et leur symptomatologie clinique, sont deux infections transmises par des tiques. La borréliose de Lyme est la maladie vectorielle la plus fréquente dans les pays tempérés de l'hémisphère Nord alors que les fièvres récurrentes sont endémiques dans les pays tropicaux et subtropicaux, avec une prévalence largement sous-estimée car occultée par le paludisme ou les arboviroses. Le Centre National de Référence (CNR) des *Borrelia* contribue à la **surveillance épidémiologique** de ces deux **zoonoses**, considérées actuellement comme potentiellement **émergentes**.

Le CNR des ***Borrelia*** et son laboratoire associé, sont mandatés depuis 2002, pour collaborer à la **surveillance épidémiologique** de la **borréliose de Lyme** en France. Cette surveillance implique non seulement une estimation du nombre de cas humains ainsi que l'analyse des formes cliniques de la **maladie** mais aussi la surveillance du **vecteur** (la tique *Ixodes ricinus*) et celle des **réservoirs** (faune sauvage). Cette approche globale permet d'analyser et, éventuellement de prédire, l'évolution du cycle des *Borrelia* afin d'évaluer le niveau de risque de contamination de l'homme.

En 2009, le CNR des *Borrelia* et son laboratoire associé a estimé l'incidence de la **maladie** et analysé la fréquence des formes cliniques dans 6 régions : Lorraine, Alsace, Auvergne, Basse-Normandie, Haute-Normandie et Île-de-France. Dans le département de la Meuse (suivi depuis 8 ans) l'incidence estimée, déjà élevée les années précédentes, a augmenté en 2009 (224/100 000 hab.). L'incidence dans la Meuse confirme le niveau élevé de risque de la borréliose de Lyme dans l'Est de la France. En Auvergne, l'incidence moyenne s'est sensiblement accrue (92/100 000 vs 78/100 000 hab.) par rapport à 2008 avec une augmentation surtout marquée dans le Cantal. En Basse-Normandie, l'incidence est restée stable et est modérée (40/100 000) alors qu'elle a nettement diminuée en Haute-Normandie (38/100 000 vs 93/100 000 hab.). Le CNR a également collaboré avec l'équipe qui coordonne le «réseau Sentinelles» (Inserm-UPMC) et l'InVS pour que la borréliose de Lyme soit intégrée en 2009 à la liste des sept maladies transmissibles surveillées par ce réseau national. Le laboratoire associé au CNR coordonne un réseau de dermatologues et une étude nationale sur les biopsies cutanées pour la surveillance des manifestations cutanées de la borréliose de Lyme. En Île-de-France, le CNR a également surveillé les populations d'*I. ricinus* et a collaboré à une étude pluridisciplinaire sur les conséquences de l'introduction d'une espèce **réservoir** allochtone dans une forêt périurbaine très fréquentée. Ainsi, la densité des nymphes infectées (indicateur qui reflète le mieux le risque pour l'homme) a été estimée à 4,7, 4,4 et 11 respectivement dans les forêts de Rambouillet (78), Notre-Dame (77-94) et Sénart (77-91). Le risque apparaît donc plus élevé à Sénart et la surveillance des réservoirs permettra d'évaluer la contribution des principales espèces présentes sur ce site.

Au total, pour ces activités de **surveillance**, le CNR a sollicité en 2009 plus de 600 correspondants (médecins et biologistes). Il a collecté 625 fiches de déclaration de cas (+ 24 %) provenant de 200 médecins. D'après ces fiches, 383 cas de borréliose de Lyme ont été confirmés. L'augmentation du nombre de cas recensés par le CNR par rapport à 2008 est de 27%. Le CNR a collecté environ 16 000 tiques pour l'estimation de la densité (activité en hausse de 33 %), analysé 6 000 tiques pour l'estimation du taux d'infection, fait 9 000 PCR, identifié 800 isolats de *Borrelia* (activité en hausse de 60 %), analysé les séquences de 248 souches et analysé 370 prélèvements provenant des réservoirs sauvages (activité en hausse de 356 %).

Le CNR des *Borrelia* réalise le diagnostic des cas importés de **fièvres récurrentes**. En 2009, il a coordonné ou a participé à des études épidémiologiques dans les pays d'endémie afin d'y évaluer l'incidence des fièvres récurrentes et le taux d'infection des tiques vectrices du genre *Ornithodoros*. Ainsi, il contribue à une meilleure connaissance de la répartition mondiale de ces infections, largement méconnues.

Le CNR et son laboratoire associé ont également la mission de contribuer au **développement** et à l'**évaluation** des méthodes diagnostiques des **borrélioses** ainsi que des méthodes d'identification et d'analyse de la diversité des *Borrelia*. Le laboratoire associé au

CNR expertise les principaux tests sérologiques commerciaux. Il expertise également les sérologies réalisées par les laboratoires d'analyse médicale. Il assure la détection et l'identification des *Borrelia* en culture ou par biologie moléculaire à partir de prélèvements humains.

En 2009, le CNR a collaboré au typage moléculaire par des méthodes d'analyse multilocus de plus de 100 souches de *B. burgdorferi* sl. Le laboratoire associé au CNR a évalué un nouveau test pour la détermination de la synthèse intrathécale des anticorps anti-*Borrelia*. Il a également **expertisé** 2 300 sérologies, effectué 120 recherches de synthèse intrathécale (activité en hausse de 10 %) et réalisé 145 analyses bactériologiques et moléculaires de prélèvements cliniques pour la confirmation du diagnostic (activité en hausse de 18 %).

Sur le plan **recherche** le CNR a poursuivi ses travaux sur le polymorphisme génétique des souches de *Borrelia* avec des analyses multilocus permettant, en collaboration avec une équipe anglaise, de décrire la cinquième espèce pathogène responsable de borréliose de Lyme chez l'homme, *B. bavariensis*. Ainsi, avec le développement en 2007 d'une première méthode d'analyse multilocus ayant permis l'identification de *B. spielmannii*, le CNR a contribué à la description des deux dernières espèces pathogènes pour l'homme *B. spielmannii* et *B. bavariensis*. Le complexe *B. burgdorferi* sl. comprend donc maintenant 5 espèces pathogènes pour l'homme, responsables de la borréliose de Lyme en Europe. L'importance clinique de *B. spielmannii* et *B. bavariensis*, par rapport aux 3 espèces considérées comme principales : *B. burgdorferi* ss., *B. garinii* et *B. afzelii*, reste à déterminer.

Par ailleurs, le CNR et son laboratoire associé ont initié, dans le cadre d'un programme transversal de recherche de l'Institut Pasteur, des travaux sur le thème des interactions des protéines de la salive de tiques avec *Borrelia* et le rôle de l'interface cutanée lors de l'infection initiale par *Borrelia*.

2/ Activités d'expertise :

2-1 Capacités techniques

2.1.1 Capacités techniques du CNR (Unité de Génétique Moléculaire des Bunyavirus, Institut Pasteur, Paris)

- Liste des techniques de référence pour le diagnostic/identification, typage
 - Techniques disponibles pour le diagnostic/identification, typage de la borréliose de Lyme
 - Culture de prélèvements de peau, de LCR, de liquide ou tissu synovial et de tiques sur milieu spécifique BSK (milieu de Kelly modifié par Stoenner et Barbour).
 - Amplification génique à partir des mêmes prélèvements : PCR classique ou PCR nichée avec amplification des gènes *rrs*, *fla* et espace intergénique *rrf-rrl*.
 - Identification et typage des *Borrelia burgdorferi* sl.
 - par amplification de l'espace intergénique *rrf-rrl* puis analyse du profil de restriction *Msel* et/ou séquençage du produit d'amplification,
 - méthodes Multi Locus Sequence Analysis (MLSA),
 - par électrophorèse en champ pulsé ou hybridation ADN/ADN qui est la méthode de référence,

Ces méthodes sont utilisées à la fois sur les matériels biologiques humains dans le cadre du diagnostic de la maladie humaine et sur les prélèvements effectués sur les réservoirs et les tiques dans le cadre de la surveillance épidémiologique.

- Techniques disponibles pour le diagnostic/identification, typage des fièvres récurrentes
 - Culture à partir du sang et du LCR et de tiques sur milieu spécifique BSK
 - Amplification génique à partir des mêmes échantillons : PCR classique ou PCR nichée des gènes *rrs*, *fla* et espace intergénique *rrs-rrl* (IGS).
 - Identification par séquençage du produit d'amplification.
- Méthodes pour l'étude acarologique
 - Méthodes morphologiques d'identification des principales tiques d'intérêt médical
 - Méthodes statistiques pour l'évaluation de la densité des tiques
 - Méthode de collecte des tiques (*Ixodes ricinus*) sur le terrain par la technique dite « du drapeau »
 - Techniques d'extraction d'ADN de tiques
 - Amplification génique, détection des *Borrelia* et typage (cf. plus haut méthodes pour le diagnostic)
- Techniques disponibles pour le diagnostic/identification, typage des autres bactéries pathogènes transmises par *Ixodes ricinus*
 - Amplification génique de l'ensemble des bactéries : *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp, *Wolbachia* sp. et des *Rickettsies* ou amplification spécifique d'*Anaplasma phagocytophilum*.
 - Identification par séquençage
- Techniques développées en 2009

Détection de *B. burgdorferi* sl. par PCR quantitative en temps réel (gène *hbb*) sur les organes d'un modèle animal souris (CH3/HeN) utilisé dans le cadre du PTR 309. Cette méthode sera ensuite évaluée en parallèle des méthodes utilisées pour le diagnostic (cf. plus haut) à partir des prélèvements humains.

- Collection de souches

Le CNR des *Borrelia* possède une collection de 1100 souches comprenant à la fois des souches cliniques humaines et des souches isolées de tiques, de réservoirs, des souches de référence et des souches atypiques rares. Environ 900 souches sont européennes, 70 proviennent d'Amérique du Nord, 40 d'Asie et 30 d'Afrique du Nord.

Ces souches sont stockées en plusieurs aliquots à – 80°C. Elles sont mises à disposition après demande écrite précisant l'origine (souche humaine ou issue de tique), les espèces souhaitées et l'utilisation envisagée. Si les souches ont été transmises au CNR par un autre laboratoire, l'autorisation de celui-ci est requise. Ces souches (ou leur ADN) sont envoyées gracieusement dans le cadre d'une collaboration scientifique.

- Liste des techniques transférées vers d'autres laboratoires

- À l'unité d'entomologie de l'Institut Pasteur de Madagascar
 - Méthodes de collecte des tiques du genre *Ornithodoros* en milieu naturel
 - Identification des ces tiques
 - Extraction de l'ADN et détection des *Borrelia*
- À l'unité UR346 Épidémiologie Animale, INRA Clermont-Ferrand Theix
 - Culture de *Borrelia burgdorferi* sl. sur milieu spécifique BSK
 - Extraction de l'ADN de *Borrelia* à partir des cultures
- À l'UMR 7204 Muséum National Histoire Naturelle, Paris.
 - Principes d'identification d'*Ixodes ricinus* et méthode de collecte des tiques sur le terrain par la technique dite « du drapeau »
- À l'Unité Pathologie des Animaux Sauvages, AFSSA, Nancy
 - Principes d'identification d'*Ixodes ricinus* et méthode de collecte des tiques (*Ixodes ricinus*) sur le terrain par la technique dite « du drapeau »
- À l'Unité AFFSA – LERPAZ UMR BIPAR Maisons – Alfort
 - Principes d'identification d'*Ixodes ricinus* et méthode de collecte des tiques (*Ixodes ricinus*) sur le terrain par la technique dite « du drapeau »

2.1.2 Capacités techniques du laboratoire associé au CNR (Institut de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

- Liste des techniques de référence :
 - Techniques disponibles
 - Culture de *B. burgdorferi* sl. en milieu liquide BSK à partir de prélèvements biologiques.
 - Culture de souches de *Borrelia* sur milieu solide mis au point par le laboratoire (production de souches clonales)
 - Inoculation à l'animal (souris C3H sensibles à l'infection par *Borrelia*)
 - Recherche de *B. burgdorferi* sl. par PCR en temps réel et sonde TaqMan sur prélèvements biologiques (cible = gène *fla*)
 - Typage direct ou sur culture par sondes fluorescentes spécifiques des espèces de *B. burgdorferi* sl. (cible = gène *fla*)
 - Immuno-empreinte pour étude des anticorps anti-*B. burgdorferi* sl. Calibration à l'aide d'anticorps monoclonaux.
 - Techniques développées en 2009

Nous avons développé et validé une technique de PCR en temps réel pour la détection d'*Anaplasma phagocytophilum* (gène *msp2* codant la protéine p44). La méthode est basée sur la technologie Taqman[®]. La spécificité de notre détection a été validée en 2008. En 2009, nous avons déterminé la sensibilité de la méthode ainsi que les conditions de préparation d'ADN à partir de sang total et de plasma infectés avec une culture d'*A. phagocytophilum*. Nous avons également testé la sensibilité et la spécificité à partir de prélèvements de bovins, ovins, caprins et canidés infectés par *A. phagocytophilum* (2 cas) ou par d'autres Anaplasmataceae (2 cas) (collaboration avec l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, M. Vayssier, UMR BIPAR). La méthode développée permet d'obtenir de façon répétée un signal pour une quantité de 0,4 cellule infectée dans la prise d'essai.
- Collections de souches, d'antigènes ou immun-sérums de référence

Le laboratoire associé au CNR *Borrelia* possède

- Une collection d'environ 200 sérums et LCR de patients atteints des différentes formes cutanées, articulaires et neurologiques de la borréliose de Lyme selon les critères diagnostiques définis par la conférence de consensus de 2006. Ces sérums et LCR ont été confirmés par western-blot. Ils sont stockés en aliquots de 0,5 ml à - 30°C et sont disponibles dans le cadre d'études collaboratives.
- Une collection de 32 souches cliniques de *B. burgdorferi* sl. isolées au laboratoire associé à partir de prélèvements humains (peau ou LCR). Pour certaines d'entre elles, la virulence a été testée sur modèle murin. Ces souches sont stockées en aliquots de 0,5 ml à - 80°C et sont disponibles dans le cadre d'études collaboratives.
- Une collection de 63 souches de *B. burgdorferi* sl. isolées à partir de prélèvements humains et de 33 souches isolées de tiques. Ces souches proviennent d'autres laboratoires européens ou américains. Elles sont stockées en aliquots de 0,5 à 1 ml à - 80°C. Après accord du détenteur initial, ces souches peuvent être fournies par notre intermédiaire.

- Liste des techniques évaluées

Le laboratoire associé au CNR *Borrelia* a validé initialement un protocole de détermination de la synthèse intra-thécale des anticorps anti *B. burgdorferi* avec un coffret utilisant un antigène natif (Enzygnost Borreliosis, Siemens). Plus récemment, il a évalué sur sérum une version modifiée de ce coffret (Enzygnost LymeVlsE, Siemens) incluant un recombinant de l'antigène VlsE provenant des principales espèces européennes de *B. burgdorferi* s.l. Les résultats ont montré que ce coffret avait une sensibilité légèrement supérieure au coffret natif et une spécificité équivalente. Un protocole adapté à l'analyse des LCR a permis d'évaluer ce coffret pour le diagnostic des neuroborrélioses.

Nous avons d'abord comparé la spécificité de ce coffret LymeVlsE au coffret classique pour l'analyse sur LCR en testant :


- un panel de 25 LCR témoins de patients ayant une maladie neurologique inflammatoire diagnostiquée selon des critères internationaux (SEP débûtante)

- un panel de 10 LCR témoins de patients ayant une maladie neurologique non inflammatoire (méningite infectieuse, hydrocéphalie).

Tous les LCR analysés ont été séronégatifs pour *Borrelia* avec les deux coffrets testés.

Nous avons ensuite comparé ce coffret LymeVlsE au coffret classique pour l'étude de la synthèse intra-thécale. Nous avons analysé prospectivement 41 couples sérum/LCR positifs prélevés chez 37 patients.

| | | Coffret classique | | | |
|-------------------|---------|-------------------|---------|-----|----|
| | | Neg | Douteux | Pos | |
| Coffret avec VlsE | Neg | 19 | 3 | 1 | 23 |
| | Douteux | 1 | 1 | 0 | 2 |
| | Pos | 2 | 3 | 11 | 16 |
| | | 22 | 7 | 12 | |

 meilleure sensibilité du réactif vlse

 meilleure sensibilité du réactif classique

Les 17 patients pour lesquels nous avons reçu des demandes d'analyses pour le diagnostic de borréliose de Lyme présentaient une arthrite de Lyme certaine (2 patients), une ACA (2 patients), un lymphocytome cutané bénin (un cas), une neuroborréliose probable (pas de détermination de la synthèse intrathécale, 2 patients). Pour un patient, nous n'avons pas pu obtenir de renseignement clinique. Pour neuf autres patients suspects de neuroborréliose, la sérologie dans le LCR n'avait pas été pratiquée. La sensibilité du diagnostic moléculaire dans le LCR reste très décevante (25 %) en comparaison de la sensibilité de la sérologie dans le LCR (80-100 %) (Texte des experts de la conférence de consensus 2006). Dans le LCR, la sérologie doit donc toujours être privilégiée par rapport à la PCR.

Le diagnostic de fièvre récurrente à *B. crocidurae* a été fait chez deux patients au retour du Mali et de Mauritanie. *B. crocidurae* est l'espèce de *Borrelia* responsable des fièvres récurrentes la plus neurotrophe et un prélèvement de LCR s'est révélé positif. Par opposition à la borréliose de Lyme, le diagnostic moléculaire des fièvres récurrentes dans le sang total et le LCR est très sensible.

- **Décrire le nombre de souches ou d'échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribué**

Souches de *Borrelia*

2 souches de *Borrelia spielmanii* au Dr Lise GERN, Université de Neuchâtel, Suisse.

ADN de *Borrelia*

4 souches de *Borrelia tanukii*, *B. turdi* et *B. japonica* au Dr S. Vollmer, Department of Biology and Biochemistry University of Bath U.K.

5 souches de *B. burgdorferi* sl. au Dr Karen McCOY, IRD, Montpellier.

1 souche de *B. persica* au Dr. Marc V. ASSOUS, Israël.

ADN de tiques : 1500 ADN de tiques collectées à Sénart ont été donnés à l'unité UR346 Épidémiologie Animale, INRA Clermont-Ferrand Theix (G. Vourc'h)

2.2.2 Activité d'expertise du laboratoire associé au CNR des *Borrelia* (Institut de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

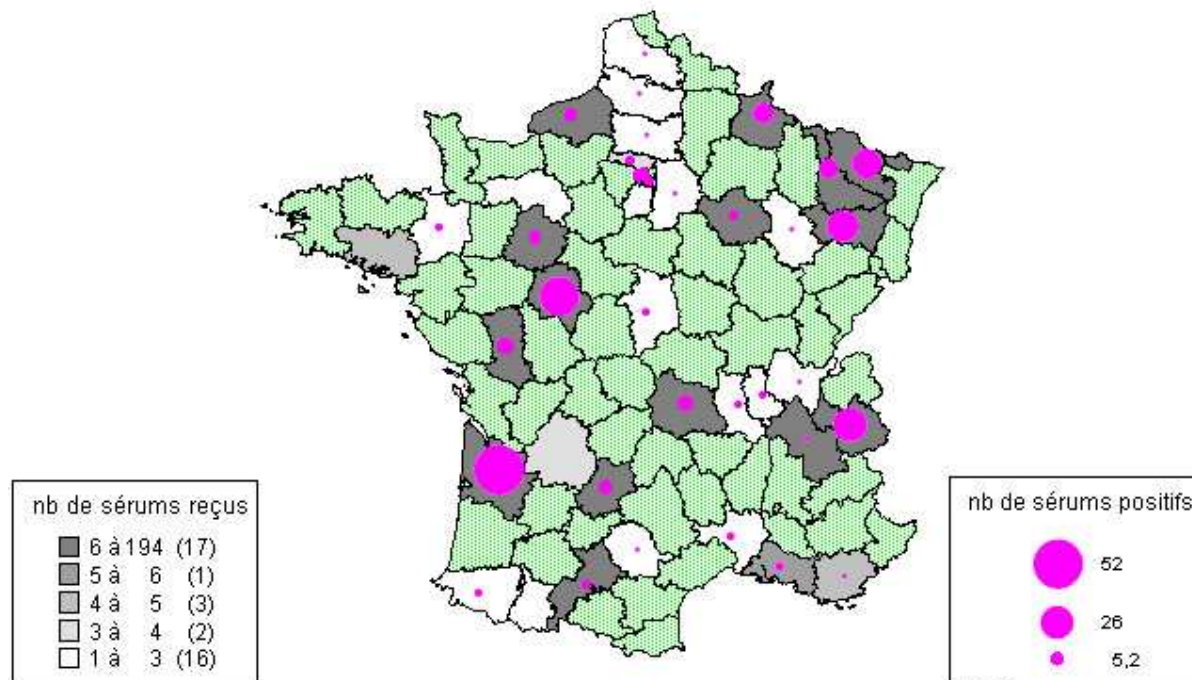
ELISA :

En 2009, le laboratoire associé au CNR *Borrelia* a réalisé 2 316 sérologies *B. burgdorferi* par ELISA (activité identique à 2008) pour différents laboratoires : privés, CH et CHU (hors CHU de Strasbourg). Leur origine géographique, en distinguant la région Alsace (1 552 sérologies) du reste de l'Hexagone (764 sérologies), figure sur les deux cartes ci-dessous.

En tout, 822 sérums (35,5 %) ont été détectés positifs (32 % en 2008). En 2009, la proportion de résultats positifs hors Alsace a augmentée par rapport à 2008 (33 % vs 25 %) et est restée stable en Alsace. En 2009, la proportion de résultats positifs hors Alsace est devenue équivalente à celle observée en Alsace (33 % vs 37 %, $p = 0,07$).

Carte 2.2.2.1 Origine géographique (hors Alsace) des 764 demandes et des 252 résultats positifs pour les sérologies de dépistage adressées au laboratoire associé au CNR des *Borrelia* en 2009

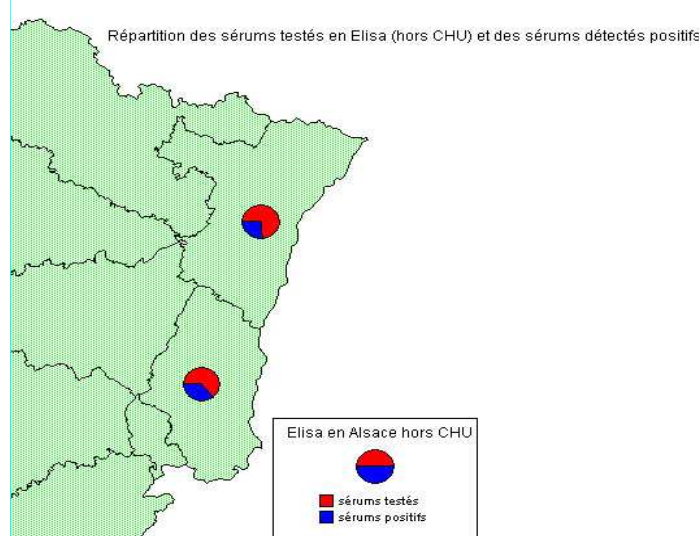
Répartition des sérums testés en ELISA et des sérums détectés positifs en 2009 (hors Alsace)



La répartition géographique des demandes et des sérologies positives ne reflète pas la prévalence de la borréliose de Lyme.

La comparaison avec la carte de 2008 montre une nette diversification du recrutement du laboratoire associé au CNR. Des laboratoires de dix départements supplémentaires se sont adressés à nous pour l'expertise de certains de leurs sérums : Aube, Cher, Dordogne, Gard, Isère, Haute-Marne, Morbihan, Pyrénées-Atlantiques, Hautes-Pyrénées, Guadeloupe. Ils représentent maintenant 33 départements répartis sur tout le territoire national.

Carte 2.2.2.2 Origine géographique en Alsace des 1 552 demandes et des 570 résultats positifs pour les sérologies de dépistage adressées au laboratoire associé au CNR des *Borrelia* en 2009

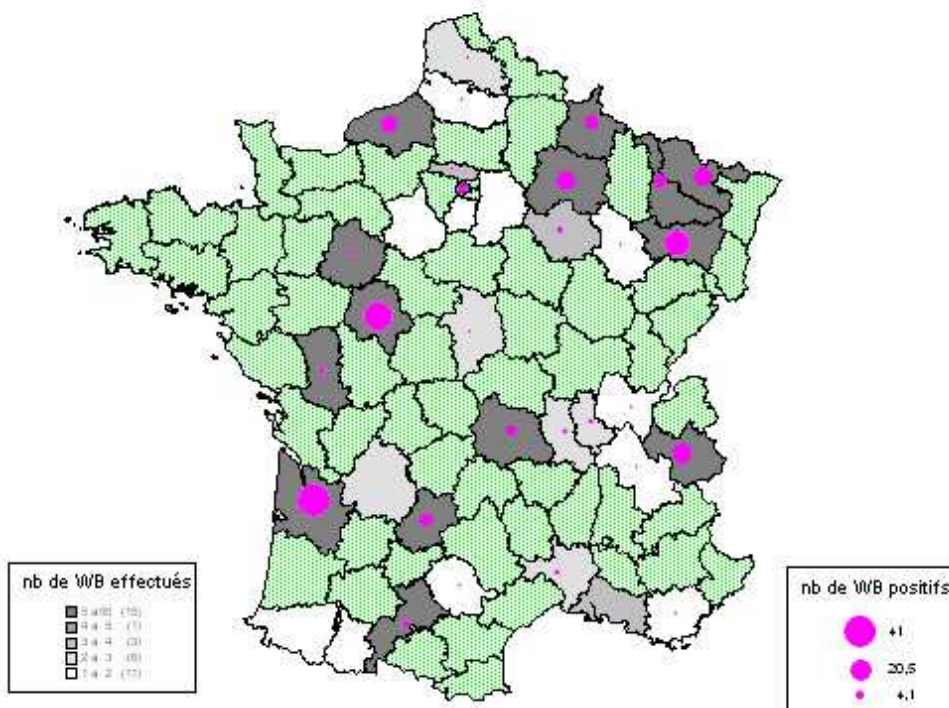


Sérologies de confirmation par western-blot

Au total, seuls 487 (39 %) des 1 255 sérums qui nous ont été adressés ont été confirmés positifs par western-blot, les autres sérums analysés étant des faux positifs. Ce taux élevé de réactions croisées montre que l'analyse de confirmation par immuno-empreinte des sérums positifs ou douteux en dépistage est indispensable.

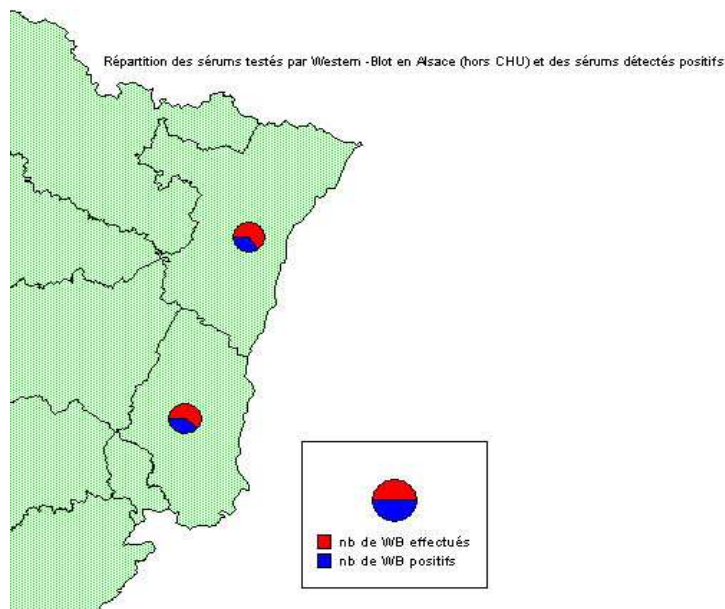
Carte 2.2.2.3 Origine géographique (hors Alsace) des demandes et des résultats positifs pour les western-blot adressés au laboratoire associé au CNR des *Borrelia* en 2009

Répartition des sérums testés par western-blot et des sérums détectés positifs en 2009 (hors Alsace)



De même que pour l'activité ELISA, la comparaison avec 2008 montre une diversification du recrutement du laboratoire associé au CNR. Ainsi, en 2009, des laboratoires de 7 départements supplémentaires se sont adressés à nous pour l'expertise de certains de leurs sérums par western-blot.

Carte 2.2.2.4 Origine géographique en Alsace des demandes et des résultats positifs pour les western-blot adressés au laboratoire associé au CNR des *Borrelia* en 2009



La répartition géographique des WB positifs est superposable à celle des ELISA positifs.

- Étude de la synthèse intrathécale en 2009 (hors CHU de Strasbourg)

Les neuroborrélioses représentent la forme disséminée la plus fréquente de la borreliose de Lyme. La mise en évidence d'une synthèse intrathécale d'anticorps spécifiques de *B. burgdorferi* permet de différencier une infection asymptomatique (cicatrice sérologique avec passage passif d'anticorps dans le LCR) d'une neuroborréliose. Suite notamment aux travaux du CNR, ce paramètre fait maintenant partie des critères retenus par la conférence de consensus pour poser le diagnostic d'une neuroborréliose.

Nous avons réalisé en 2009, 118 études de ce paramètre (+ 10 % par rapport à 2008) pour différents laboratoires (principalement CH et CHU, hors CHU de Strasbourg) répartis dans 22 départements.

La proportion de LCR positifs a augmenté de 10 % par rapport à 2007 et 2008. Cela a permis de poser un diagnostic de neuroborréliose pour 43 patients. Ainsi dans plus de la moitié des cas où la sérologie était positive dans le LCR, ce test a permis d'éliminer ce diagnostic et d'éviter un traitement probabiliste d'épreuve coûteux qui se serait révélé inefficace.

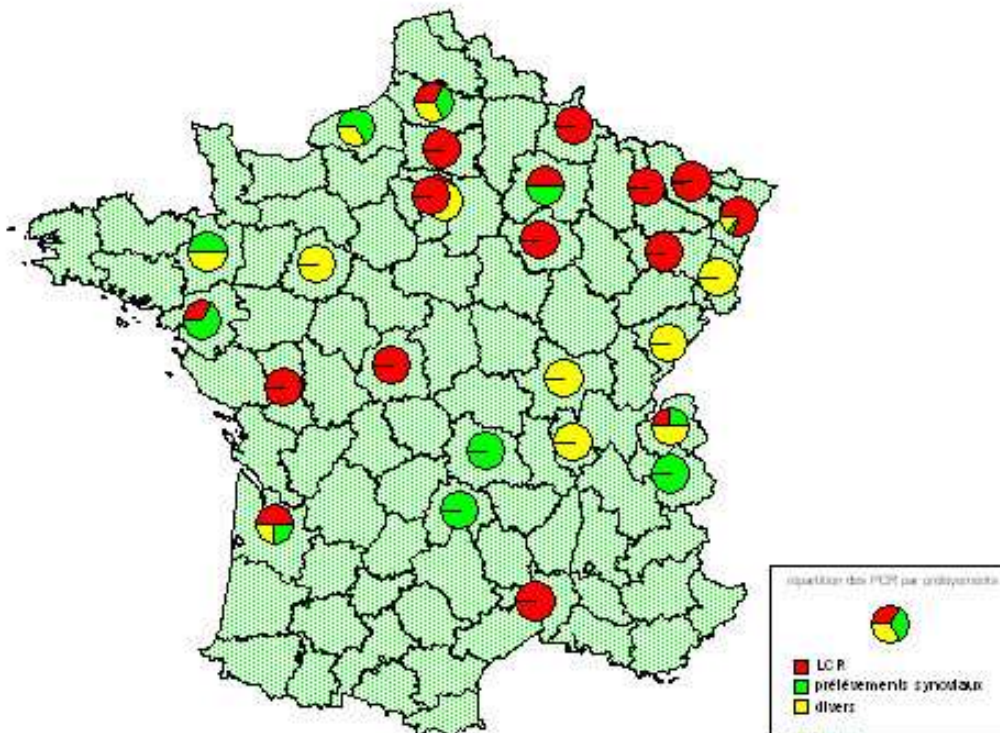
- Diagnostics moléculaires

(Les résultats de l'étude mise en place sur biopsies cutanées sont présentés plus loin)

En 2009, 145 prélèvements (+ 18 %) ont été adressés au laboratoire associé au CNR pour recherche de *Borrelia* par PCR. Il s'agissait de 106 LCR, 19 prélèvements synoviaux et 20 prélèvements d'origine diverse. Leur répartition géographique figure sur la carte ci-dessous :

Carte 2.2.2.5 Origine géographique des 145 demandes de PCR pour le diagnostic de borréliose de Lyme adressées au laboratoire associé au CNR des *Borrelia* en 2009

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



Deux prélèvements ont été détectés positifs. Il s'agissait d'un liquide articulaire et d'une biopsie cutanée d'une lésion atypique (bulleuse) d'érythème migrant. Le typage par PCR a montré qu'il s'agissait de *B. afzelii* dans le liquide articulaire et n'a pas permis d'identifier l'espèce dans le prélèvement cutané. L'atteinte articulaire était atypique car elle était fébrile (> 38,5°C) et est survenue sous antibiothérapie probabiliste (orbénine+gentalline). Devant la positivité de la sérologie *Borrelia*, une nouvelle ponction articulaire avec recherche de *Borrelia* par PCR a été demandée, et a permis de poser le diagnostic étiologique.

Toutes ces analyses moléculaires et bactériologiques, pratiquées à la fois par le CNR et son laboratoire associé, confirment que la PCR et la culture peuvent avoir un intérêt dans le diagnostic de la borréliose de Lyme dans les formes cutanées et articulaires. Nos résultats confirment que ces analyses sont très décevantes dans les formes neurologiques (aucun LCR positif sur les 117 échantillons).

3/ Activités de surveillance:

3.1. Surveillance clinique de la borréliose de Lyme par le CNR (Unité de Génétique Moléculaire des Bunyavirus, Institut Pasteur, Paris)

L'estimation de l'incidence est basée sur le recensement du nombre de cas certains. L'extrapolation à l'ensemble de la population de la région est faite à partir du taux de médecins participant.

Définition des cas certains : selon les recommandations de la conférence de consensus de décembre 2006 <http://www.infectiologie.com/site/medias/documents/consensus/2006-lyme-long.pdf>.

Pour plus de cohérence avec ces recommandations, les critères diagnostiques sont présentés en fonction des phases évolutives de la maladie et non plus en fonction des organes atteints comme c'était le cas jusqu'en 2007.

Distinction de 3 phases évolutives :

- Phase primaire :
 - manifestation cutanée localisée ou Érythème migrant : Lésion cutanée érythémateuse, avec centre clair et s'étendant de façon concentrique avec une bordure intensément colorée.
Pas de sérologie exigée pour la confirmation.
 - Diffusion systémique de la bactérie ou phase primo-secondaire : Érythème migrant multiple, arthro-myalgies fugaces et migratrices, céphalées.

- Phase secondaire :
 - Neuroborréliose précoce : Méningoradiculite douloureuse, atteinte des nerfs crâniens, en particulier le VII. Parfois, méningite isolée, myélite aiguë ou encéphalite.
Sérologie sang et LCR, pléiocytose lymphocytaire dans le LCR et production intrathécale d'anticorps spécifiques, exigées pour la confirmation.
 - Arthrite de Lyme : monoarthrite le plus souvent, et siégeant préférentiellement au niveau des grosses articulations.
 - Manifestations cutanées : Lymphocytome borrélien (lymphocytome cutané bénin).
 - Manifestations cardiaques, ophtalmologiques : plus rares.

- Phase tertiaire :
 - Neuroborréliose tardive : encéphalomyélites chroniques et polyneuropathies sensitives axonales.
 - Manifestations cutanées : acrodermatite chronique atrophiante (ACA).
 - Manifestations rhumatologiques : arthrites chroniques

En dehors du diagnostic de neuroborréliose précoce qui nécessite une confirmation par la mise en évidence d'une synthèse intrathécale d'anticorps spécifiques, le diagnostic de borréliose de Lyme certaine, à la phase secondaire ou tertiaire, requiert une sérologie dans le sérum positive (IgM et/ou IgG) en ELISA avec confirmation par un Western Blot.

Dans les descriptions des caractéristiques cliniques des patients, certains cas sont considérés comme neuroborréliose probable. Il s'agit de patients présentant des signes neurologiques évocateurs mais dont le diagnostic n'a pas pu être confirmé car la synthèse intrathécale n'a pas été réalisée. Cet examen nécessite des prélèvements de sérum et de LCR contemporains. L'existence d'une pléiocytose lymphocytaire du LCR ou d'une sérologie positive dans le LCR sont considérées comme critères de neuroborréliose probable. Ces cas ne sont pas inclus dans l'estimation de l'incidence.

3.1.1 Extension de « Réseau-Lyme » (CNR, Unité de Génétique Moléculaire des Bunyavirus, Institut Pasteur, Paris)

Depuis 2008, le CNR a informatisé son mode de recueil de données et mis en ligne la fiche de déclaration des cas afin de faciliter le suivi et l'analyse des données. Le logiciel Vozanoo® (Société Epiconcept) sert de support pour ce réseau avec les médecins volontaires. En 2009, nous avons collecté 625 fiches de déclaration (502 en 2008 ; + 24 %) provenant de 200 médecins ayant diagnostiqué des cas de borréliose de Lyme. A noter que l'augmentation du nombre de fiches recueillies est de 100 par an depuis 3 ans. Toutes ces fiches ont été saisies dans Voozanoo®. Après analyse de chaque déclaration, 383 cas de borréliose de Lyme ont été confirmés. L'augmentation du nombre de cas recensés par le CNR par rapport à 2008 est de 27%. Pour les cas avec manifestations neurologiques évocatrices, 28 cas supplémentaires ont été classés comme neuroborréliose probable en l'absence de confirmation par la mise en évidence de la synthèse intra-thécale et 33 patients n'ont pas eu de prélèvement de LCR. Ces 61 cas de neuroborréliose probable ne sont pas compris dans les 383 cas certains.

3.1.2 Étude clinique prospective en Auvergne, dans la Meuse, en Basse-Normandie et Haute-Normandie (données recueillies par le CNR, Unité de Génétique Moléculaire des Bunyavirus, Institut Pasteur, Paris)

Sur les 386 fiches reçues (+18%) nous avons retenu 268 cas de borréliose de Lyme dans ces régions. L'estimation de l'incidence ainsi que les caractéristiques cliniques des cas dans ces régions sont présentées dans le tableau ci-après.

Tableau 3.1.2 Incidence et caractéristiques cliniques de la borréliose de Lyme, en Auvergne, dans la Meuse, en Basse-Normandie et en Haute-Normandie

| | Auvergne | | | | Basse -Normandie | | | Haute-Normandie | |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|---------------|----------------|-----------------|----------------|
| | Puy-de-Dôme | Cantal | Allier | Meuse | Calvados | Manche | Orne | Eure | Seine-Maritime |
| Médecins sollicités /Médecins participants (%) | 763/99 (13) | 310/82 (26) | 410/56 (14) | 361/57 (16) | 1117/32 (3) | 697/30 (4) | 394/22 (6) | 635/36 (6) | 1193/32 (3) |
| Nombre de cas certains | 76 | 51 | 24 | 68 | 3 | 4 | 14 | 8 | 17 |
| Incidence de la maladie / 100 000 hab. | 98 | 128 | 51 | 224 | 15 | 19 | 85 | 26 | 51 |
| [Intervalle de confiance] | 55-141 | 85-171 | 29-73 | 154-294 | 0-31 | 0-40 | 38-133 | 8-44 | 35-68 |
| Âge, Moyenne [extrêmes] | 49[2-83] | 52[2-79] | 44[2-72] | 49[5-81] | 53[16-75] | 46[3-63] | 57[1-73] | 55[32-75] | 39[4-70] |
| Sexe Homme (%) | 32 (42) | 28 (55) | 11 (46) | 34 (50) | 1 (33) | 0 (0) | 10 (71) | 5 (63) | 10 (59) |
| Phase primaire (%) | 72 (95) | 48 (94) | 20 (83) | 67 (99) | 3 (100) | 3 (75) | 11 (79) | 7 (88) | 8 (47) |
| Érythème Migrant (EM) | 59 | 43 | 13 | 55 | 3 | 1 | 11 | 4 | 5 |
| EM avec signes généraux | 13 | 5 | 6 | 11 | | 2 | | 3 | 3 |
| EM multiple | | | 1 | 1 | | | | | |
| Phase secondaire (%) | 4 (5) | 3 (6) | 4 (17) | 1 (1) | 0 | 1 (25) | 3 (21) | 1 (13) | 10 (59) |
| Neuroborréliose précoce | 1 | | 3 | 1 | | | 1 | | 8 |
| Paralysie faciale | | | | | | | | | 1 |
| Paralysie faciale+Signes méningés | | | | | | | | | 3 |
| Méningoradiculite | 1 | | 2 | | | | 1 | | 4 |
| Radiculite | | | | 1 | | | | | |
| Syndrome méningé | | | 1 | | | | | | |
| Arthrite de Lyme | 2 | 2 | 1 | | | 1 | 2 | | 2 |
| Monoarthrite ou Oligoarthrite | 1 | 2 | | | | 1 | 1 | | 2 |
| Polyarthrite | 1 | | 1 | | | | 1 | | |
| Lymphocytome borrélien | 1 | | | | | | | 1 | |
| Atteinte cardiaque /Atteinte ophtalmologique | | 1/0 | | | | | | | |
| Phase tertiaire (%) | 2 (3) | | | | | | | | |
| ACA | 2 | | | | | | | | |
| Piqûre de tique précédant le diagnostic (%) | 45 (59) | 29 (57) | 13 (54) | 51 (75) | 1 (33) | 2 (50) | 7 (50) | 4 (50) | 8 (47) |
| Siège de la piqûre | | | | | | | | | |
| Membre inférieur | 25 | 6 | 5 | 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Membre supérieur | 1 | 4 | 2 | 8 | | | | | 1 |
| Autres | 11 | 3 | 5 | 3 | | 1 | | | 2 |
| Non précisé | 8 | 16 | 1 | 30 | 0 | 0 | 6 | 3 | 4 |
| Durée d'attachement | | | | | | | | | |
| <12 h | 1 | 1 | | 2 | | | | | |
| 12 h-24 h | 2 | 1 | 1 | 2 | | | | | |
| 24-72 h | 3 | | 1 | 9 | | | | 1 | |
| >72h | 1 | | 1 | 2 | | | | | 1 |
| Non précisée | 38 | 27 | 10 | 36 | 1 | 2 | 7 | 3 | 7 |
| Localisation des EM | | | | | | | | | |
| Membre inférieur | 48 | 19 | 8 | 36 | 1 | 1 | 5 | 3 | 4 |
| Membre supérieur | 2 | 11 | 2 | 13 | | | 1 | | 1 |
| Autres | 16 | 11 | 6 | 6 | | 1 | 2 | | 3 |
| Non précisé | 6 | 7 | 4 | 12 | 2 | 1 | 3 | 4 | 0 |

Le taux de médecins participants est stable dans l'ensemble des régions. Compte tenu de la population de chacun des départements, du nombre de cas certains et du nombre de médecins participants, l'incidence moyenne estimée en Auvergne s'est sensiblement accrue (92/100 000 vs 78/100 000 hab.) par rapport à 2008, avec une augmentation surtout marquée dans le Cantal, alors que dans le Puy de Dôme et dans l'Allier l'incidence est globalement stable. Dans le département de la Haute-Loire, qui ne figure pas dans le tableau, 3 cas d'EM nous ont été signalés. L'incidence dans la Meuse est importante, confirmant les résultats de 2008 et 2007. L'incidence dans la Meuse confirme le niveau élevé de risque de la borréliose de Lyme dans l'Est de la France. Ce département a été le premier surveillé par le CNR et le réseau y est maintenu depuis 2002. La collaboration des médecins est maintenant optimale et l'on peut supposer que le recueil des cas par les médecins qui participent est quasi exhaustif. En Basse-Normandie, l'incidence plus élevée dans l'Orne par rapport aux autres départements se confirme pour cette troisième année de surveillance. Dans cette région, l'incidence est restée stable et est modérée (40/100 000) alors qu'elle a nettement diminuée en Haute-Normandie (38/ 100 000 vs 93/100 000 hab.) par rapport à 2008. Cette diminution est surtout marquée dans l'Eure.

L'analyse de la description des formes cliniques montre que, dans cette surveillance, qui repose essentiellement sur des médecins libéraux, la très grande majorité des patients présentent un érythème migrant (>90 % des patients) isolé ou associé à d'autres signes. À noter que des manifestations générales (asthénie, myalgies, arthralgies ou fièvre) étaient associées à l'érythème migrant dans 18 % des cas. Les autres manifestations cutanées ont été rares puisque seuls 2 cas de lymphocytome borrélien et 2 ACA ont été signalés. Sur l'ensemble des 265 cas, seulement 14 cas (5 %) de neuroborréliose certaine ont été signalés. Par ailleurs, 7 cas de neuroborréliose probable sans recherche de la synthèse intrathécale (voir définitions § 3.1) ont été déclarés. Ces cas probables ne figurent pas dans le tableau car ne sont pas inclus dans l'incidence.

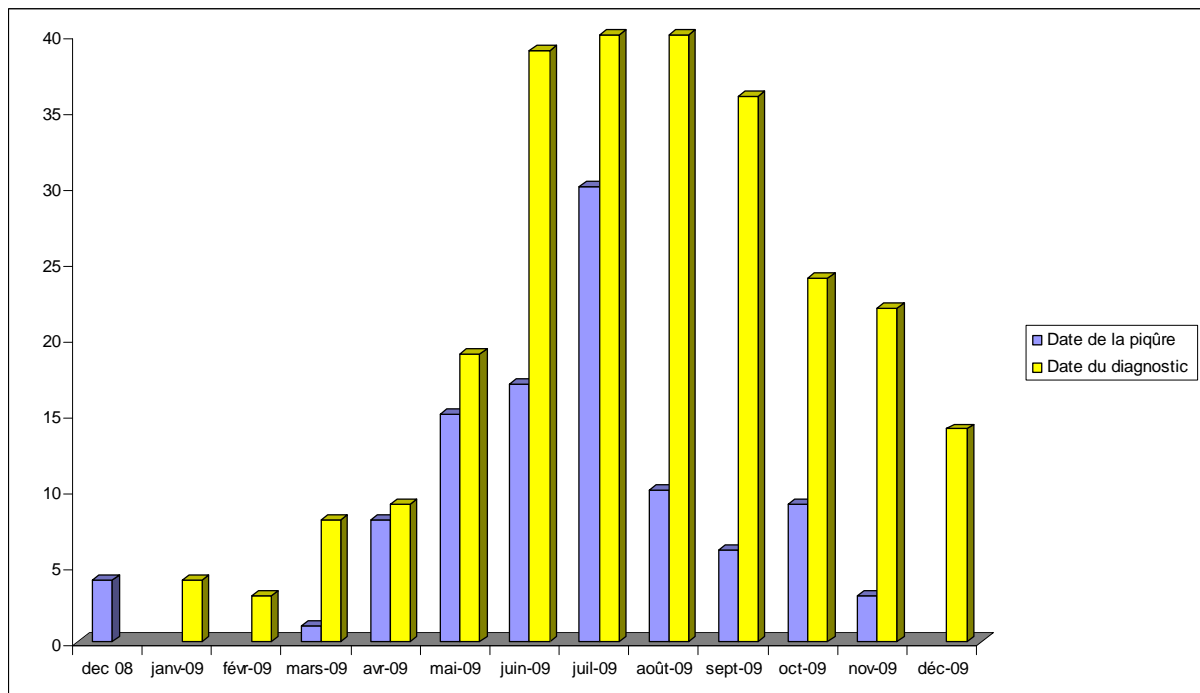
Le nombre élevé de formes secondaires recensées dans la Seine-Maritime s'explique par la participation de deux biologistes hospitaliers (Dr Pestel-Caron et Dr Grise) qui nous ont communiqué l'ensemble des cas diagnostiqués par les médecins du CHU de Rouen et du Centre hospitalier d'Elbeuf. Le nombre de médecins hospitaliers participant est donc plus important dans la Seine-Maritime.

Globalement, plus de la moitié des patients rapporte une piqûre de tique avec le plus souvent une durée d'attachement entre 12h et 72h, mais parfois cette durée est inférieure à 12h.

Les recommandations qui établissent que le diagnostic à la phase primaire est clinique et ne nécessite aucune confirmation biologique, ont possiblement eu un impact sur les prescriptions, puisque en 2009 la sérologie a été pratiquée dans 44 % des cas contre 58% en 2008. Cette sérologie s'est révélée positive ou douteuse en ELISA dans 88 cas d'EM (83 %), et malheureusement, et contrairement aux recommandations, le plus souvent (53%) sans confirmation par un Western Blot.

La très grande majorité des diagnostics ont été faits entre juin et novembre (Fig. 3.1.2.). Le pic de fréquence des piqûres de tiques est en juin et juillet et le pic des cas de borréliose de Lyme se situe au mois de juillet et août.

Figure 3.1.2 Répartition des cas de borréliose de Lyme au cours de l'année en Auvergne, dans la Meuse, en Basse-Normandie et Haute-Normandie



3.1.3 Étude clinique prospective en milieu hospitalier :

CHU de Rennes et région Bretagne

Les résultats de sérologie ainsi que les fiches de renseignements épidémiocliniques nous ont été fournis par le Dr. B. Degeilh, biologiste du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Rennes. 977 analyses ont été réalisées (+12%) : 733 sérums et 244 LCR ont fait l'objet d'une demande de sérologie de Lyme : ils proviennent du CHU de Rennes et du CH de Saint-Malo.

Centre Hospitalier de Charleville-Mézières et de Reims et région Champagne-Ardenne

En 2009, les Drs. C. Penalba, Lanoux et J.M.Galempoix, médecins du CH de Charleville-Mézières. Le CHU de Reims, grâce à la collaboration des Drs V. Brodard, V. Duval, Z. Reguiat et C. Strady a été inclus dans cette surveillance depuis 2008.

Centre Hospitalier de Rouen

A noter que ces 17 cas figurent également dans le tableau 3.1.2 car ont été inclus dans le calcul de l'incidence pour la Seine-Maritime.

Région parisienne (CHU Avicenne et Cochin/ Charles-Foix)

Les demandes de sérologie de l'ensemble des hôpitaux de l'AP-HP (sauf Henri-Mondor et Saint-Antoine) ont été transférées du laboratoire de Microbiologie de l'hôpital Cochin vers celui de l'hôpital Charles-Foix en juillet 2009. Les résultats de sérologie ainsi que les fiches de renseignements épidémiocliniques nous ont été fournis par le Dr. N. Benhadou pour l'hôpital Cochin et les Drs S. Gallah et F. Lesle pour l'hôpital Charles-Foix. Les 4601 demandes de sérologie de Lyme (3 962 sérums et 639 LCR) ont permis de retenir 44 cas détaillés dans le tableau ci-dessous. Pour l'AP-HP le nombre de demandes de sérologie est stable.

Le Pr. R. Dhôte au CHU Avicenne est un des cliniciens correspondants du CNR de la région parisienne. Il nous adresse systématiquement les informations cliniques des patients qu'il prend en charge.

En 2009, le Dr Bigaillon biologiste de l'Hôpital des Armées Begin nous a communiqué 3 cas qui ne figurent pas dans le tableau.

Tableau 3.1.3 : Caractéristiques cliniques de la borréliose de Lyme en milieu hospitalier, Bretagne, Champagne-Ardenne et Ile de France

| | CHU Rennes | CH Charleville- Mézières | CHU Reims | CHU Rouen | CHU Avicenne | CHU Cochin/ Charles-Foix |
|--|----------------|-----------------------------|---------------|----------------|-----------------|-----------------------------|
| Nombre de cas (cas certains) | 30 (25) | 17 (16) | 5 (4) | 17 (17) | 6 (6) | 80 (61) |
| Âge, Moyenne [extrêmes] | 44 [4-85] | 45 [19-63] | 38 [3-63] | 39 [4-70] | 63 [53-86] | 45 [6-86] |
| Sexe Homme (%) | 12 [40] | 7 [41] | 3 [60] | 10 [59] | 1 [17] | 43 [54] |
| Phase primaire (%) | 13 (43) | 12 (71) | 3 (60) | 8 (47) | 5 (83) | 44 (55) |
| Érythème Migrant (EM) | 10 | 11 | 3 | 7 | 2 | 24 |
| EM avec signes généraux ^a | 3 | 1 | | 1 | 2 | 19 |
| EM multiple | | | | | 1 | 1 |
| Phase secondaire (%) | 16 (53) | 5 (29) | (3 60) | 11 (65) | 2 (33) | 39 (49) |
| Neuroborréliose précoce | | | | | | |
| Paralysie faciale | | | 2 | 1 | | |
| Paralysie faciale + signes méningés | 6 | 3 | | 4 | | 12 |
| Syndrome méningé | 1 | | | | | 3 |
| Radiculite | 1 | | | 1 | 1 | 2 |
| Méningoradiculite | 7 | | | 3 | | 2 |
| Névrite optique | | | | | | 1 |
| Arthrite de Lyme | | | | | | |
| Monoarthrite oligoarthrite | 1 | 1 | 1 | 2 | | 10 |
| Oligoarthrite +Uveite | | | | | | 1 |
| Lymphocytome borrélien | | | | | | 4 |
| Atteinte cardiaque /Atteinte ophtalmologique | | 1/0 | | | 1/0 | 1/3 |
| Phase tertiaire (%) | 1 (3) | | | | | 2 (3) |
| Acrodermatite Chronique Atrophiante (ACA) | 1 | | | | | 2 |
| Piqûre de tique précédant le diagnostic (%) | 8 (30) | 13 (76) | 1 (20) | 8 (47) | 3 (50) | 59 (74) |
| Siège de la piqûre | | | | | | |
| Membre inférieur | 2 | 6 | | 1 | 2 | 35 |
| Membre supérieur | 2 | 1 | 1 | 1 | | 8 |
| Autres | | 3 | | 2 | | 16 |
| Non précisé | 4 | 3 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| Durée d'attachement | | | | | | |
| <12 h | | | | | | 2 |
| 12 h-24 h | | | 1 | | | |
| 24-96h | | 3 | | 1 | | 1 |
| Non précisée | 8 | 10 | 0 | 7 | 2 | 52 |
| Localisation des EM | | | | | | |
| Membre inférieur | 7 | 6 | 1 | 4 | 4 | 26 |
| Membre supérieur | 3 | 2 | | 1 | | 4 |
| Autres | 1 | 3 | 1 | 3 | | 8 |
| Non précisé | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 6 |

Dans ce tableau, contrairement à celui fait précédemment dans les régions (Tableau 3.1.2), les cas de neuroborréliose probable sont inclus. Comme les années précédentes, si on peut suspecter que les formes disséminées ont été plus nombreuses en milieu hospitalier, on peut regretter que la recherche de synthèse intrathécale ne soit pas réalisée systématiquement, alors que le prélèvement de LCR a été effectué. Un certain nombre de formes neurologiques échappe au diagnostic certain et sont considérées ici comme probables (cf. définitions des cas § 3.1). Ainsi ce tableau comprend 155 cas dont 129 certains et 21 neuroborrélioses probables et 5 autres cas probables (formes cutanées atypiques).

Dans notre étude en milieu hospitalier, les caractéristiques cliniques de la borréliose de Lyme sont différentes de celles observées dans les enquêtes incluant en majorité des médecins libéraux (Auvergne, Meuse, Basse-Normandie et Haute-Normandie). Les formes secondaires (notamment neurologiques) et tertiaires sont plus fréquentes. Ceci s'explique par le mode d'inclusion des patients qui, en milieu hospitalier, se fait presque exclusivement sur la demande de sérologie qui n'est pas indiquée dans la phase primaire.

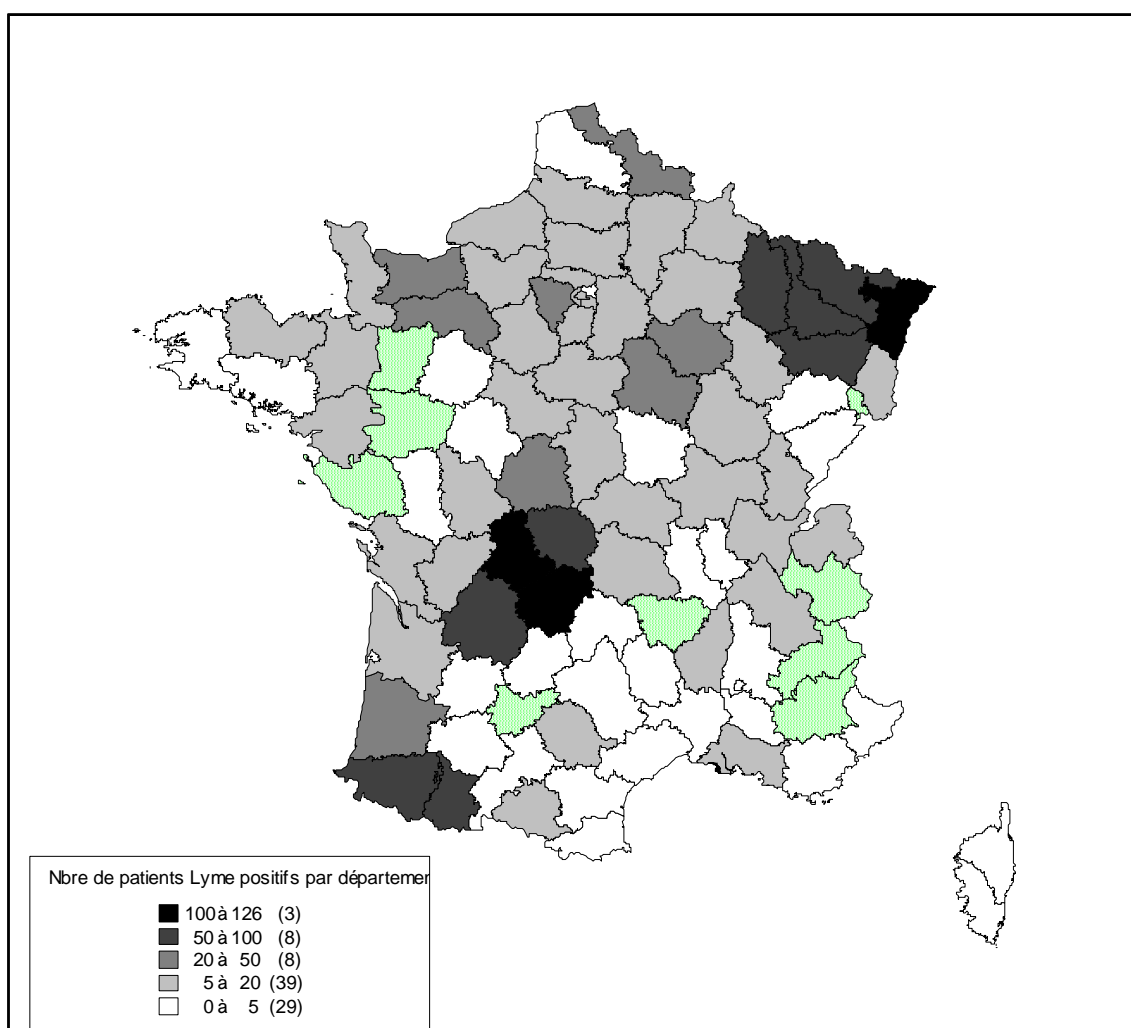
3. 1. 4 Résultats du laboratoire Cerba

En 2009, le laboratoire Cerba (Dr. S. Trombert) nous a transmis les résultats des sérologies (ELISA et confirmation par Western Blot). Un total de 24 373 sérologies de dépistage (ELISA) dans le sérum a été effectué : 3 959 (16,2 %) se sont révélées positives ou douteuses.

1 603 patients avaient une sérologie positive dans le sérum confirmée par WB, correspondant à 6,6 % des demandes, et 48 avait une sérologie positive dans le LCR. On note une augmentation de 16 % du nombre de patients ayant une sérologie positive dans le sérum par rapport à 2008, pour un nombre de demande resté stable.

La répartition géographique des 1 651 patients positifs en ELISA et WB (sérum ou LCR) est indiquée dans la figure suivante.

Carte 3.1.4. Répartition géographique des 1 651 patients ayant une sérologie positive, résultats du laboratoire Cerba, 2009



Les départements en vert correspondent aux départements pour lesquels le laboratoire Cerba n'a reçu aucune demande.

Il s'agit de sérologies effectuées chez des patients présentant une symptomatologie compatible et non pas d'une enquête de séroprévalence faite en population générale.

Certaines régions, comme les régions méridionales, sont considérées comme peu concernées par la borréliose de Lyme. Un nombre non négligeable de sérologies positives provient de ces régions. Ces résultats sont à interpréter avec prudence, le lieu du prélèvement de la sérologie ne correspondant pas systématiquement au lieu de la contamination. De plus, les résultats d'un seul laboratoire sont représentés et ils ne concernent pas l'ensemble du territoire.

3.1.5 Collaboration avec l'InVS et le « réseau Sentinelles »

En 2009, le CNR a collaboré avec le « réseau Sentinelles » (UMR S 707, Inserm, Université Pierre et Marie Curie) et l'InVS pour intégrer la borréliose de Lyme à la liste des sept maladies transmissibles surveillées par ce réseau national. Cette collaboration a permis une harmonisation des critères diagnostiques qui garantit une comparabilité des résultats. Les surveillances effectuées par le « réseau Sentinelles » et le CNR sont complémentaires, l'une étant nationale et l'autre régionale. La représentativité est également différente : le « réseau sentinelles » inclut exclusivement des généralistes alors que le réseau du CNR comprend également les médecins spécialistes concernés par cette pathologie. Les régions dans lesquelles les deux systèmes coexistent vont permettre de tester la cohérence des évaluations d'incidence. Les résultats du « réseau Sentinelles » seront disponibles en mai 2010.

Le CNR a également collaboré avec l'InVs dans cadre du projet « ZooRisque-Lyme » cf. § 7.1.1

3.1.6 Collaboration avec des réseaux ou partenaires nationaux dans les domaines de la santé animale, alimentaire et environnement

Le CNR a également collaboré avec l'InVs et l'INRA dans cadre du projet « ZooRisque-Lyme » cf. §7.1.1

3. 2. Surveillance clinique de la borréliose de Lyme et des autres infections bactériennes transmises par Ixodes ricinus par le laboratoire associé au CNR (Institut de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

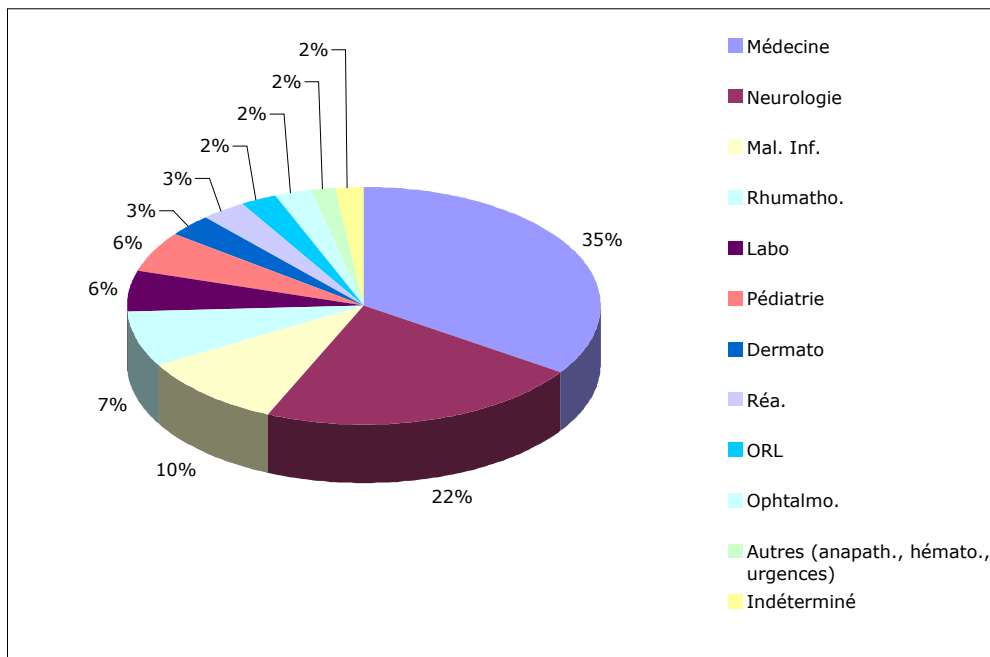
3.2.1 Surveillance clinique de la borréliose de Lyme par le laboratoire associé au CNR

La surveillance clinique exercée par le laboratoire associé est à rapprocher de celle faite en milieu hospitalier par le CNR dans laquelle le recrutement des patients s'effectue sur la demande de sérologie. La sérologie n'étant pas indiquée à la phase primaire, cela peut entraîner une sélection des patients se présentant à la phase secondaire ou tertiaire. Ceux-ci sont effectivement surreprésentés dans cette analyse avec un nombre particulièrement élevé de formes neurologiques.

Cette surveillance a porté en 2009 sur l'analyse des 190 fiches de renseignements cliniques et épidémiologiques qui nous sont parvenues. Cette activité est stable par rapport à l'année 2008. Sur ces 190 fiches, 10 étaient inexploitable par manque de renseignements. Les 180 fiches restantes correspondaient à 165 patients.

Ces 165 cas provenaient de 31 départements français métropolitains et DOM-TOM (Guadeloupe). La très grande majorité des fiches, soit 94,6 %, provenaient de centres hospitaliers et de disciplines cliniques variées (figure 1). Seulement 5,4 % venaient de praticiens libéraux (1 médecin généraliste, 1 rhumatologue).

Au sein des centres hospitaliers, la majorité des fiches de renseignements nous ont été adressées de services de médecine et de neurologie.



Pour 91 patients, sur les 165 pour lesquels les fiches étaient exploitables, le diagnostic n'a pas été confirmé. Seuls 22 % rapportaient des antécédents de piqûre de tiques et 72 % des cas (66/91) correspondaient à des suspicions de neuroborréliose. Les symptômes décrits étaient surtout des polyradiculites. Les signes généraux accompagnant étaient, dans des proportions identiques, l'asthénie, les algies et la fièvre. Dans seulement 50 % des suspicions de neuroborréliose (31/66) une étude du LCR a été pratiquée, et une lymphorrhachie significative n'était présente que dans 22 % (7/31). Il est important de noter qu'aucun de ces cas ne présentait une SIT positive. Dans l'ensemble, 10 % de ces cas « non neuroborréliose » ont été néanmoins traités comme une neuroborréliose par ceftriaxone pendant 3 semaines.

46 patients ont été considérés comme des cas possibles car les renseignements clinico-biologiques ne nous permettaient pas d'exclure le diagnostic, mais étaient insuffisants pour l'affirmer.

28 cas ont été considérés comme certains ou probables selon les définitions du § 3.1 correspondant aux critères de la conférence de consensus de 2006 et sont détaillés dans le tableau ci-dessous.

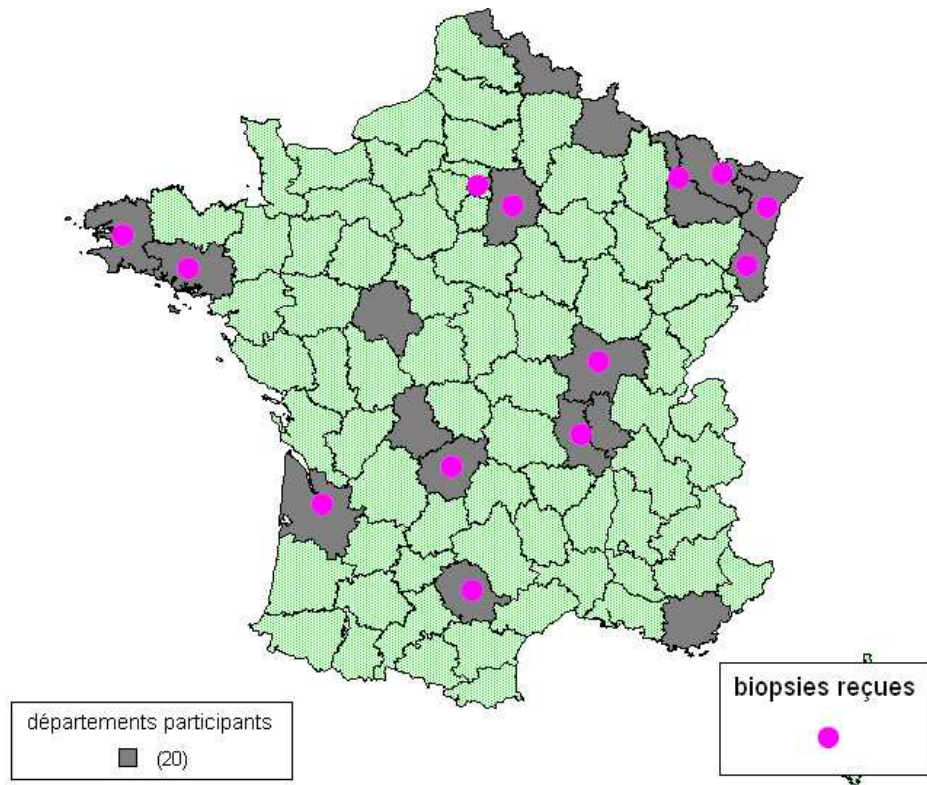
Tableau 3.2.1 : Caractéristiques cliniques de la borréliose de Lyme : diagnostics établis par le laboratoire associé au CNR

| | Laboratoire associé |
|-----------------------------|---------------------|
| Nombre de cas | 28 |
| Phase primaire (%) | 5 (18) |
| Érythème Migrant (EM) | 4 |
| EM avec signes généraux | 1 |
| Phase secondaire (%) | 23 (82) |
| Neuroborréliose précoce | 21* |
| Arthrite | 2 |
| Phase tertiaire (%) | 0 |

* de même que pour les cas hospitaliers du CNR la synthèse intrathécale manquait pour 12 cas de neuroborréliose inclus dans le tableau et qui ont été considérés comme probables (cf. définitions des cas § 3.1).

3.2.2 Surveillance clinique des manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France : protocole « biopsies cutanées » par le laboratoire associé au CNR (Institut de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

En 2007, nous avons débuté l'analyse prospective de biopsies cutanées de patients adultes suspects d'infection à *Borrelia burgdorferi* s.l. En 2009, nous avons reçu 98 prélèvements. Cela porte à 191 le nombre total de prélèvements analysés depuis le début de l'étude. Ces biopsies nous ont été adressées par 48 cliniciens (essentiellement des dermatologues, mais aussi des infectiologues et internistes) de 21 départements français. La répartition géographique est la suivante :



La comparaison de l'origine des prélèvements (points roses) par rapport à la localisation des praticiens volontaires pour participer à l'étude (départements grisés) montre une bonne participation. La couverture du territoire est correcte avec des prélèvements provenant de 13 des 20 régions françaises.

Parmi les 98 prélèvements reçus, 67 l'ont été pour suspicion d'EM, 16 pour suspicion d'ACA et 9 pour suspicion de lymphocytome cutané bénin. Dans 6 cas, les lésions étaient très atypiques (morphée, granulome annulaire, plaque violacée nodulaire, macule érythémateuse, paniculite).

3.2.2.1 Analyse des 67 cas d'érythème migrant

Une exposition aux piqûres de tiques est mentionnée dans 57 cas (85 %), cette piqûre était récente dans 43 % des cas. Dans deux cas d'EM confirmés par culture (et par PCR), la durée d'attachement était précisée et était de 24 et de 72 heures.

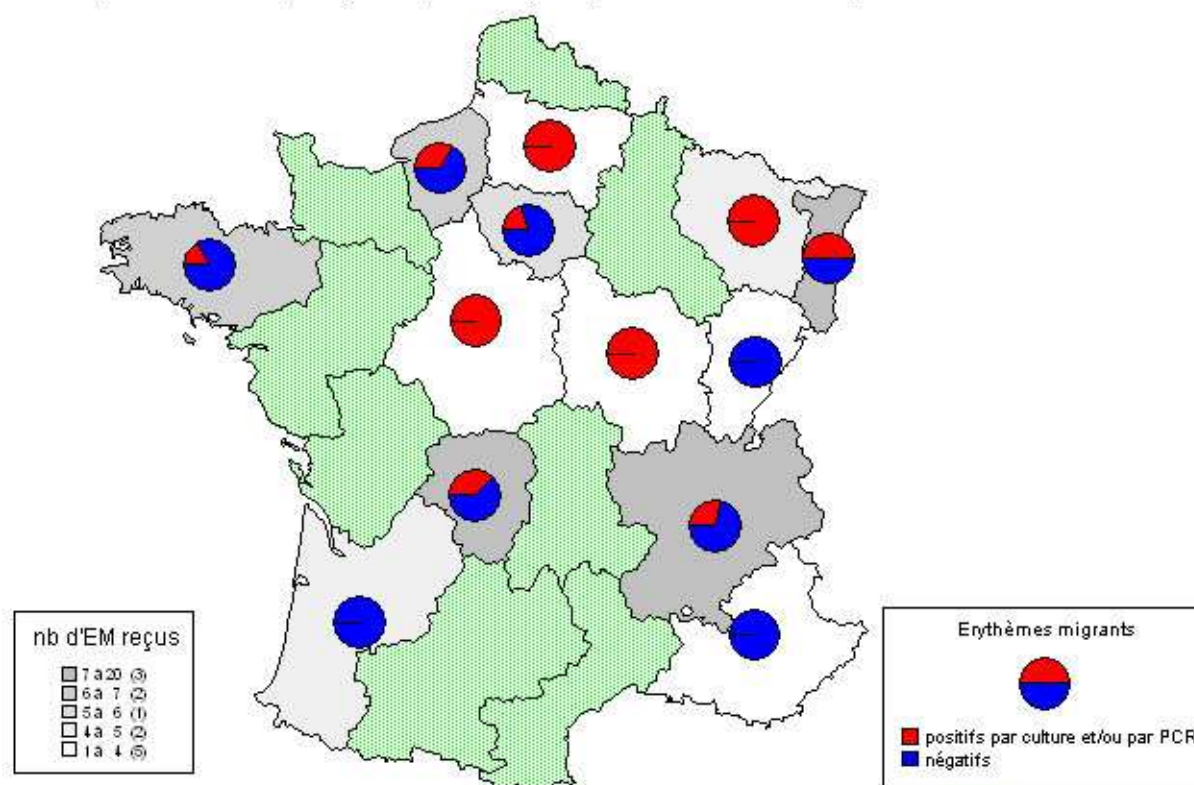
La présentation de ces EM est détaillée dans le tableau ci-dessous et est comparable à celle de 2008. A noter que dans 30 % des cas on ne retrouve pas le centre clair typique et la coloration est homogène.

| | | PCR positive (cible <i>fla</i>) | Culture positive | Espèce |
|-----------------------------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------|---|
| Érythème Migrant (EM) (%) | 67 (100) | 25 (37) | 4 (6) | 22 <i>B. afzelii</i> |
| EM unique* | 62 (94) | | | 4 <i>B. garinii</i> |
| EM multiple | 4 (6) | | | 2 <i>B. burgdorferi</i> ss. 1 <i>Borrelia</i> sp |
| Localisation** | | | | |
| membre inf. | 43 (68) | | | |
| thorax/abdomen | 12 (19) | | | |
| membre sup | 5 (8) | | | |
| tête/cou | 3 (5) | | | |
| Aspect typique à centre clair | 46 (69) | | | |
| Coloration homogène | 20 (30) | | | |
| Diamètre 5-10 cm | 11 (16) | | | |
| 10-20 | 22 (33) | | | |
| 20-30 | 17 (25) | | | |
| 30-40 | 11 (16) | | | |
| 40-50 | 5 (7) | | | |
| ≥ 50 cm | 2 (3) | | | |
| Signes locaux | | | | |
| Prurit | 12 (18) | | | |
| Brûlure | 8 (12) | | | |
| Dissémination précoce | | | | |
| Association douleurs/paresthésies | 8 (12) | | | |
| Signes généraux | 7 (10) | | | |
| arthralgies | 9 (13) | | | |

* précisé pour 66 cas ; ** précisée pour 63 cas

Une antibiothérapie avait été mise en route avant la biopsie dans 8 cas (12 %). Cependant, dans un cas traité de façon inappropriée par Oxacilline pendant 8 jours, la culture s'est révélée positive à *B. burgdorferi* ss ; dans 3 cas, seule la PCR était encore positive (2 *B. afzelii*, 1 *B. garinii*).

Répartition des EM par région et pourcentage de positivité en culture et/ou par PCR



Comparaison de la PCR et de la culture sur biopsies cutanées

Sur un plan thérapeutique, en 2009, 59 patients sur 67 (88 %) ont bénéficié d'une antibiothérapie après le prélèvement. Cette antibiothérapie était adaptée dans 57 cas tant pour les molécules que pour les durées. Il s'agissait :

- d'amoxicilline dans 54 % des cas, à raison de 3g/j en moyenne pendant 14 à 21 jours
- de doxycycline dans 30 % des cas, pendant 10 à 21 jours
- de ceftriaxone dans 3 cas, prescrite par suite des signes neurologiques associés. Dans 2 cas, la posologie était insuffisante.

Le tableau suivant regroupe les résultats obtenus en 2008 et 2009 sur les EM :

| | <i>B.afzelii</i> | <i>B.garinii</i> | <i>B.b ss</i> | Total |
|-------|------------------|------------------|---------------|-------|
| NE | 25 | 1 | 2 | 28 |
| NO | 5 | 1 | 3 | 9 |
| SE | 1 | 1 | 1 | 3 |
| SO | 7 | 3 | 2 | 12 |
| Total | 38 | 6 | 8 | 52 |

Sur les deux années, 52 prélèvements positifs d'EM ont été typés. *B. afzelii* était retrouvée en majorité (73 %), notamment dans le Nord-est. Dans les autres régions, les faibles effectifs ne permettent pas de conclure. Nous avons analysé les corrélations pouvant exister entre espèce de *Borrelia* infectante et présentation clinique de l'EM. Sur 20 EM à *B. afzelii*, 15 sont à centre clair et 5 sont des lésions homogènes. Tous les EM multiples (n = 4) étaient négatifs en culture et en PCR.

3.2.2.2 Analyse des 16 cas d'acrodermatite chronique atrophiante

| | | PCR positive (cible <i>fla</i>) | Culture positive | Espèce |
|--------------------------|-----------------|-------------------------------------|------------------|----------------------|
| ACA (%) | 16 (100) | 5 (31) | 2 (12) | 4 <i>B. afzelii</i> |
| Localisation membre inf. | 12 (75) | | | 1 <i>Borrelia</i> sp |
| Signes neuro associés | 3 | | | |
| EM associé | 1 | | | |
| Oligoarthritis associée | 1 | | | |

L'antibiothérapie instaurée après le prélèvement était conforme aux recommandations de la conférence de consensus dans tous les cas.

3.2.2.3. Analyse des 9 cas de lymphocytome cutané bénin

Neuf patients ont été prélevés. Dans un cas, la lésion siégeait au mamelon, localisation typique chez l'adulte. Les autres lésions siégeaient aux membres inférieurs, supérieurs et sur le tronc. Deux cas étaient positifs, dont un en culture à *B. afzelii*.

Seuls 4 cas ont été traités pendant 21 à 28 jours, 2 par doxycycline selon les recommandations, 2 cas par amoxicilline dont 1 à posologie insuffisante (500 mg/j).

3.2.3 Etude de la fréquence relative des pathogènes transmis par les tiques du genre *Ixodes* sur une population à risque

Une étude de séroprévalence de la borréliose de Lyme et de l'encéphalite à tiques a été réalisée il y a quelques années par la Mutualité Sociale Agricole (MSA) chez les forestiers des régions Alsace, Lorraine, Franche-Comté, Champagne-Ardenne et Bourgogne. Cette étude a été effectuée chez 3 000 sujets et une sérothèque a été constituée. Les bûcherons et les sylviculteurs représentaient plus de 60 % des effectifs. Une séroprévalence globale > à 14 % avait été mise en évidence vis-à-vis de *Borrelia burgdorferi*.

En collaboration avec la CCMSA, nous avons réalisé en 2008 une étude de séroprévalence vis-à-vis de deux autres pathogènes transmissibles par les tiques en Europe, *Francisella tularensis* et *Anaplasma phagocytophilum*.

Nous avons montré pour *F. tularensis* une séroprévalence élevée de 6,7 %. Nous avons réalisé, sur les 201 sérums positifs, une sérologie de *Brucella* par agglutination en tube et de *Yersinia* par ELISA IgA, car ces deux pathogènes sont connus pour donner des réactions croisées avec la sérologie *F. tularensis*. Trente-quatre réactions croisées avec *Yersinia* ont été détectées, ce qui abaisse à 5,6 %, la séroprévalence pour *F. tularensis*, qui reste donc élevée parmi les travailleurs forestiers du Nord-est.

Une sérologie *A. phagocytophilum* avait été réalisée sur les mêmes sérums par ELISA avec un antigène recombinant de la protéine P 44. Nous avons observé 44 sérums positifs (1,5 %) et 49 autres (1,6 %) douteux vis-à-vis d'*A. phagocytophilum*. Pour confirmer ces résultats, nous avons contrôlé tous les sérums douteux par une méthode d'immunofluorescence indirecte commercialisée et utilisée par le CNR des *Rickettsia* (seuil de positivité = 1/64^e). Parmi ces 49 sérums testés, nous avons observé par IFI 6 positifs et 44 négatifs. Nous avons donc un total de 50 positifs soit une séroprévalence de 1,7 % pour *A. phagocytophilum* parmi les forestiers. Cela corrobore les 3 cas cliniques d'anaplasmose que nous avons observés durant l'été 2009 chez des personnes exposées lors de leurs loisirs (cf. paragraphe suivant).

3.2.4 Surveillance clinique de l'anaplasmose granulocytaire humaine par le laboratoire associé au CNR

Description de cas d'infections humaines à *Anaplasma phagocytophilum* dans l'Est de la France :

Nous avons analysé en 2009 des prélèvements de patients hospitalisés en Alsace et présentant une fièvre élevée en période estivale après exposition aux piqûres de tiques. Trois de ces patients avaient des sérologies *B. burgdorferi* et *A. phagocytophilum* négatives (collaboration avec le CNR des *Rickettsia*, Marseille) sur les prélèvements effectués dans la semaine suivant l'apparition de la fièvre. La PCR *A. phagocytophilum* était positive chez les 3 patients.

| Clinique / Biologie | Cas 1 | Cas 2 | Cas 3 |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|
| Fièvre > 38,5°C | + | + | + |
| Piqûre de tiques/ Exposition récente | + | + | + |
| Céphalées | + | | + |
| Fatigue/malaise | + | + | + |
| Myalgies/Arthralgies | + | + | |
| Nausées/Vomissements | + | + | + |
| Toux | | | + |
| Adénopathies ou Hépatosplénomégalie | | | + |
| Thrombopénie | + | + | + |
| Leucopénie | + | + | + |
| Transaminases élevées | + | + | + |
| LDH élevée | + | | + |
| Séroconversion <i>A. phago</i> | + | + | + |
| PCR <i>A. phago</i> | + | + | + |
| Traitement adapté | + | + | + |
| Evolution favorable | + | + | + |

Dans le suivi à un mois, ces trois patients restaient négatifs en sérologie *B. burgdorferi* et ont présenté une séroconversion pour *A. phagocytophilum*. La PCR sur sang total est donc un outil efficace pour la mise en évidence précoce d'une infection par *A. phagocytophilum*.

3.3. Surveillance du vecteur *Ixodes ricinus* par le CNR en Île de France (Unité de Génétique Moléculaire des Bunyavirus, Institut Pasteur, Paris)

La surveillance de la borréliose de Lyme est rendue difficile par le caractère non systématique de la déclaration des cas, les signes cliniques très polymorphes et l'absence de critères biologiques formels. La surveillance du vecteur, la tique *Ixodes ricinus*, représente donc un moyen d'approcher l'épidémiologie de la maladie humaine et d'évaluer les risques. Le CNR des *Borrelia* effectue une estimation de la densité des tiques et de leur taux d'infection par *B. burgdorferi* sl. dans différentes régions de France.

3.3.1 Choix des sites et méthodes

En 2009, cette évaluation a été menée dans 3 forêts d'Île-de-France. Ces sites ont été choisis dans le cadre de l'étude « EpiLyme », débutée en 2008 dans la forêt de Sénart, sur les conséquences de l'introduction et de la prolifération d'une espèce réservoir allochtone, le *Tamias sibiricus*. En 2008, seule la forêt de Sénart, très colonisée par les tamias sur la majorité de sa superficie, avait été analysée. Nous avons choisi en 2009 d'investiguer également la forêt de Rambouillet. Celle-ci n'est pas (encore) colonisée par les tamias et peut constituer une forêt témoin pour l'analyse de l'impact du tamia sur le cycle des tiques et des *Borrelia*. De plus, elle a déjà fait l'objet d'une surveillance il y a une vingtaine d'années ce qui permet de suivre l'évolution des populations de tiques sur une longue période. Comme la forêt de Sénart, elle est très fréquentée par la population francilienne. La forêt de Notre-Dame a été choisie pour sa proximité par rapport à la forêt de Sénart et l'absence de tamia.

Pour les collectes de tiques (nymphe et adultes), nous avons utilisé la même méthodologie que celle habituellement adoptée par le CNR et déjà validée sur plusieurs régions (Ferquel et al., 2006). Cette méthode repose sur l'allotissement systématique de la forêt par un découpage en parcelles de 1 ha à partir de cartes au 1/200.000 éditées par l'IFN (Inventaire Forestier National) et représentant les types de formations végétales, et de cartes au 1/25.000 éditées par l'IGN (Institut Géographique National). Ce quadrillage est réalisé à l'aide du logiciel Photoshop® et un nombre représentatif de parcelles est tiré au sort avec le logiciel Epi Info. La collecte des tiques est effectuée selon la méthode du drapeau de 1 m² avec relève tous les 10 m.

Calcul de la densité des tiques et du taux d'infection

Notre méthode d'échantillonnage est donc une méthode à deux niveaux, avec la parcelle de 1 ha comme premier niveau et la parcelle de 10 m² (tirage du drapeau) comme deuxième niveau, ces deux paramètres étant sélectionnés au hasard sur le terrain. La densité des tiques (d) de l'ensemble de la forêt est estimée à partir du nombre total de tiques collectées selon la formule (Ferquel et al., 2006) :

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

où S est la surface totale de la forêt étudiée, \hat{t}_y le nombre total de tiques à estimer, m le nombre de parcelles de 1 ha sélectionnées, M le nombre total de parcelles de 1 ha de la forêt, n_i le nombre de parcelles de 10 m² sélectionnées dans la parcelle de 1 ha i , N_i le nombre total de parcelles de 10 m² dans la parcelle de 1 ha i et y_{ij} le nombre de tiques collectées dans la parcelle de 10 m² j de la parcelle de 1 ha i .

Pour comparer la distribution des tiques collectées entre les différents sites et saisons, nous établirons un intervalle de confiance à 95 % pour chaque collecte :

$$CI_{95\%}(\hat{t}_y) = \left[\hat{t}_y - 1,96 \cdot \sqrt{\hat{V}(\hat{t}_y)}; \hat{t}_y + 1,96 \cdot \sqrt{\hat{V}(\hat{t}_y)} \right]$$

L'intervalle de confiance à 95 % pour la densité des tiques d est obtenu en divisant les limites du précédent intervalle par la surface S .

Une analyse de variance à deux facteurs, incluant le collecteur et le site d'échantillonnage comme principaux paramètres et l'interaction des deux variables, est effectuée pour chaque collecte afin de vérifier qu'il n'y a pas d'influence du collecteur.

Détection des agents pathogènes

La détection et l'identification des *Borrelia* est faite à la fois par des cultures de 16 tiques adultes et par l'extraction de l'ADN total de 30 nymphes et de 10 adultes par parcelle, suivie d'une amplification par PCR de l'espace intergénique *rrf-rrl* et d'une restriction par *MseI*. Le séquençage du produit de PCR obtenu est effectué pour certaines souches présentant des atypies.

Les autres bactéries transmises par *I. ricinus* (notamment les *Anaplasmataceae*) sont recherchées par l'amplification du gène *rrs* et séquençage. La famille des *Anaplasmataceae* regroupe *Anaplasma phagocytophilum* (agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine), *Ehrlichia* sp. (agent de l'ehrlichiose monocytique) et *Wolbachia* (endosymbiote d'*Ixodes ricinus*).

3.3.2 Étude dans la forêt de Rambouillet

Les collectes de tiques dans cette forêt ont débuté en 2009.

Tableau 3.3.2.1 Densité et taux d'infection des tiques *I. ricinus* dans la forêt de Rambouillet (2009)

| Forêt de Rambouillet | Avril | Mai | Juin | Juillet | Septembre | Octobre | Novembre | Total |
|--|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| Nymphes(N) | 467 | 1014 | 1309 | 957 | 529 | 311 | 89 | 4676 |
| Dens/100 m ² | 41,7 | 79,2 | 102,3 | 74,8 | 41,3 | 24,3 | 7 | 52,9 |
| IC | 31-53 | 33-126 | 41-164 | 30-120 | 13-64 | 12-37 | 3-11 | |
| Adultes (N) | 34 | 75 | 56 | 46 | 26 | 24 | 8 | 269 |
| Dens/100 m ² | 3 | 5,9 | 4,4 | 3,6 | 2 | 1,9 | 0,6 | 3,1 |
| IC | 2-5 | 2-9 | 2-7 | 1-6 | 1-4 | 1-3 | 0,2-1 | |
| Nymphes | 19/210 | 14/240 | 22/201 | 25/213 | 20/202 | 9/168 | 7/85 | 116/1319 |
| Taux d'infection (%) | 9,1 | 5,8 | 10,9 | 11,7 | 9,9 | 5,4 | 8,2 | 8,8 |
| Adultes | 3/32 | 13/70 | 10/48 | 9/42 | 6/24 | 1/23 | 1/8 | 43/247 |
| Taux d'infection (%) | 9,4 | 18,6 | 20,8 | 21,4 | 25 | 4,3 | 12,5 | 17,4 |
| Densité des nymphes infectées/100 m² | 3,8 | 4,6 | 11,2 | 8,8 | 4,1 | 1,3 | 0,6 | 4,7 |
| Densité des adultes infectés/100 m ² | 0,3 | 1,1 | 0,9 | 0,8 | 0,5 | 0,1 | 0,1 | 0,5 |

Globalement, notre estimation pour la forêt de Rambouillet montre en moyenne une densité de nymphes de 53 /100 m², un taux d'infection des nymphes de 9 % et une densité de nymphes infectées de 4,7/100 m².

3.3.2.2. Espèces de *B. burgdorferi* sensu lato infectant les tiques dans la forêt de Rambouillet en 2009

Il existe une différence dans la répartition des espèces du complexe *B. burgdorferi* sl. entre les nymphes et les adultes et nous les avons donc analysées séparément.

La répartition par espèce, après analyse du polymorphisme de restriction par *MseI* des 116 nymphes et 43 adultes infectés par *Borrelia* est représentée dans les figures ci-dessous.

Figure 3.3.2.2a : Espèces de *B. burgdorferi* sl. isolées de nymphes d'*Ixodes ricinus* dans la forêt de Rambouillet en 2009

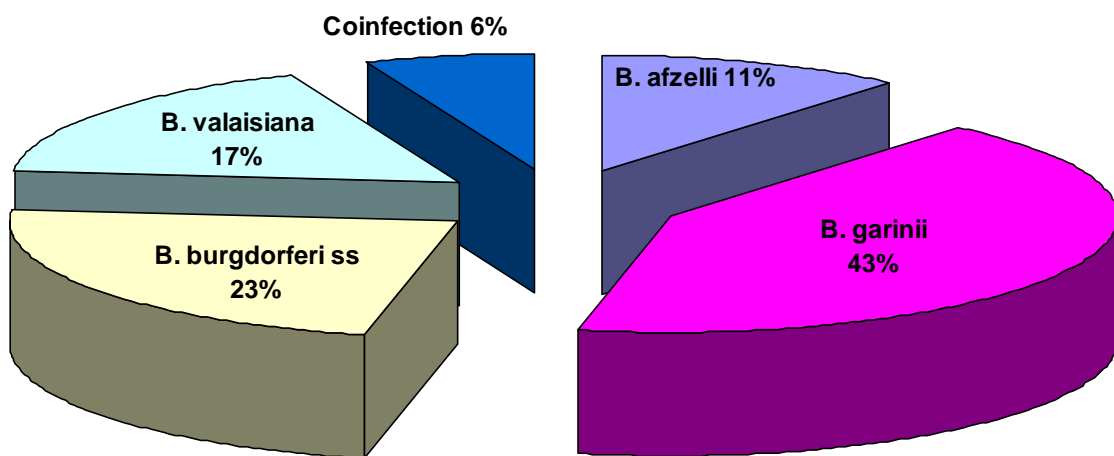
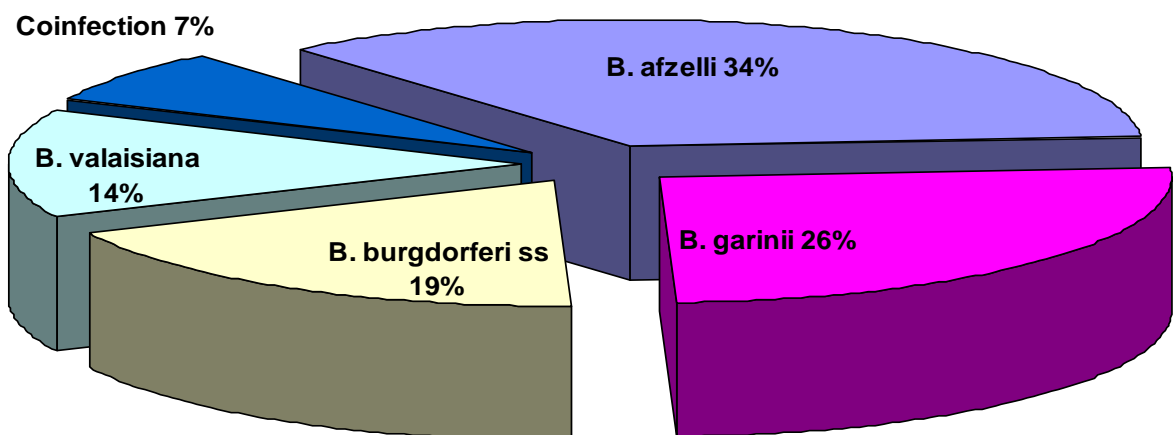


Figure 3.3.2.2b : Espèces de *B. burgdorferi* sl. isolées d'adultes d'*Ixodes ricinus* dans la forêt de Rambouillet en 2009



La prévalence de *B. garinii* est plus élevée chez les nymphes (43 % vs 26 % ; $p = 0,05$), alors que celle de *B. afzelli*, est plus élevée chez les adultes (34 % vs 11% ; $p < 0,01$).

3.3.2.3 Surveillance de l'infection d'*Ixodes ricinus* par les autres bactéries dans la forêt de Rambouillet

En 2009, nous avons également analysé les tiques collectées dans la forêt de Rambouillet pour l'infection par les bactéries de la famille des Anaplasmataceae : *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* sp. et *Wolbachia* sp

Tableau 3.3.2.4 Densité et taux d'infection par les Anaplasmataceae des tiques *I. ricinus* dans la forêt de Rambouillet (2009)

| | Avril | Mai | Juin | Total |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Nymphes (infectées/analysées) | 8/210 | 10/240 | 3/201 | 21/651 |
| Taux d'infection par les Anaplasmataceae (%) | 1,4 | 4,2 | 1,4 | 3,2 |
| Adultes (infectés/analysés) | 4/32 | 4/70 | 1/48 | 9/150 |
| Taux d'infection par les Anaplasmataceae (%) | 12,5 % | 5,7 % | 2,1 % | 6 |
| Nymphes (infectées/analysées) | 1/210 | 5/240 | 1/201 | 7/651 |
| Taux d'infection par <i>A. phagocytophilum</i> | 0,5 | 2 | 0,5 | 1,1 |
| Adultes (infectés/analysés) | 1/32 | 3/70 | 1/48 | 5/150 |
| Taux d'infection par <i>A. phagocytophilum</i> | 3 | 4,3 | 2,1 | 3,3 |
| Densité des nymphes infectées par <i>A. phagocytophilum</i> | 0,2 | 1,6 | 0,5 | 0,8 |
| Dens/100 m² | | | | |
| Densité des adultes infectés par <i>A. phagocytophilum</i> /100 m ² | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,1 |

Au total, l'étude dans la forêt de Rambouillet montre une densité et un taux d'infection des nymphes par *B. burgdorferi* sl. de 53/100 m² et 9 %, respectivement. La densité des nymphes infectées (estimation la plus importante pour le risque de transmission à l'homme) est de 4,7/100 m², correspondant à un niveau de risque moyen en comparaison des autres régions déjà étudiées par le CNR. Par rapport aux études précédentes, menées par des équipes de l'Institut Pasteur avant la création du CNR (C. Perez-Eid, F. Rodhain) entre 1994 et 1998, on observe une stabilité du taux d'infection des nymphes. La prévalence d'*Anaplasma phagocytophilum* chez les nymphes d'*I. ricinus* n'excède pas 2 %.

3.3.3 Étude dans la forêt de Notre-Dame

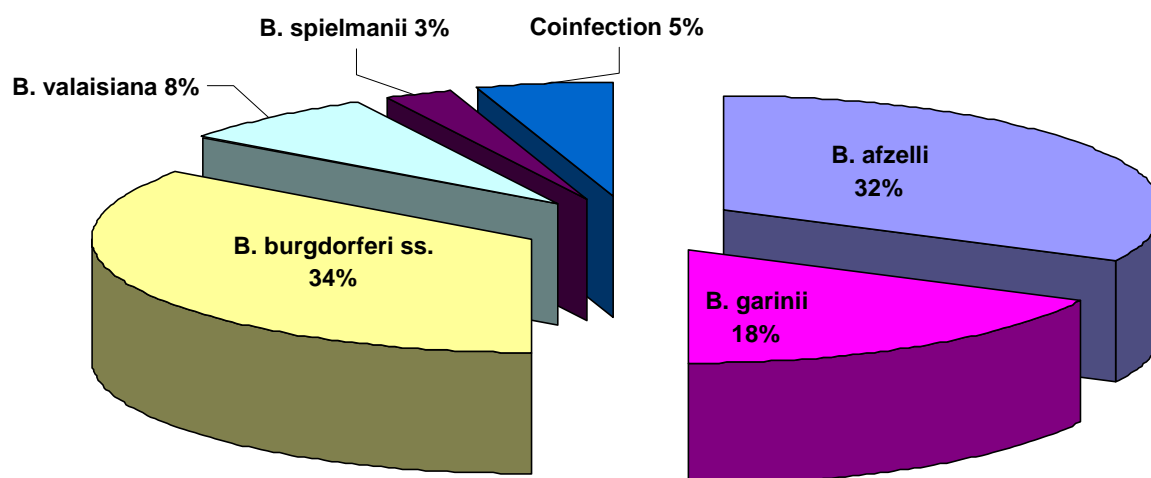
Tableau 3.3.3.1 Densité et taux d'infection des tiques *I. ricinus* dans la Forêt de Notre-Dame en 2009

| Forêt de Notre Dame | Mars | Avril | Mai | Juin | Juillet | Août | Sept. | Oct. | Total |
|---|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| Nymphes(N) | 42 | 138 | 45 | 272 | 286 | 222 | 159 | 41 | 1205 |
| Dens/100 m ² | 13,1 | 43,1 | 14,1 | 85 | 89,4 | 69,4 | 49,9 | 12,8 | 47,1 |
| IC | [7-19] | [31-55] | [10-18] | [80-90] | [58-124] | [46-93] | [26-74] | [12-13] | |
| Adultes (N) | 3 | 8 | 2 | 9 | 17 | 14 | 11 | 2 | 66 |
| Dens/100 m ² | 0,9 | 2,5 | 0,6 | 2,8 | 5,3 | 4,4 | 3,4 | 0,6 | 2,6 |
| IC | [0-2] | [1-4] | [0-2] | [1-5] | [5-6] | [1-8] | [2-5] | [0-2] | |
| Nymphes | 2/39 | 6/60 | 2/45 | 8/60 | 5/60 | 6/60 | 5/60 | 6/41 | 40/425 |
| Taux d'infection (%) | 5 | 10 | 4 | 13.3 | 8.3 | 10 | 8.3 | 14.6 | 9,4 |
| Adultes | 0/3 | 0/8 | 0/2 | 1/9 | 1/14 | 1/14 | 2/11 | 0/2 | 5/63 |
| Taux d'infection (%) | 0 | 0 | 0 | 11.1 | 7 | 7 | 18.2 | 0 | 8 |
| Densité des nymphes Infectées /100 m² | 0,7 | 4,3 | 0,6 | 11,3 | 7,4 | 6,9 | 4,1 | 1,9 | 4,4 |
| Densité des adultes Infectés /100 m² | 0 | 0 | 0 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,6 | 0 | 0,2 |

3.3.3.2. Espèces de *B. burgdorferi* sensu lato infectant les tiques dans la forêt de Notre-Dame en 2009

Du fait du faible nombre de tiques adultes porteuses de *Borrelia* nous présentons uniquement les résultats pour les nymphes. La répartition par espèce, pour les 40 nymphes infectées par *Borrelia* est représentée dans la figure ci-dessous.

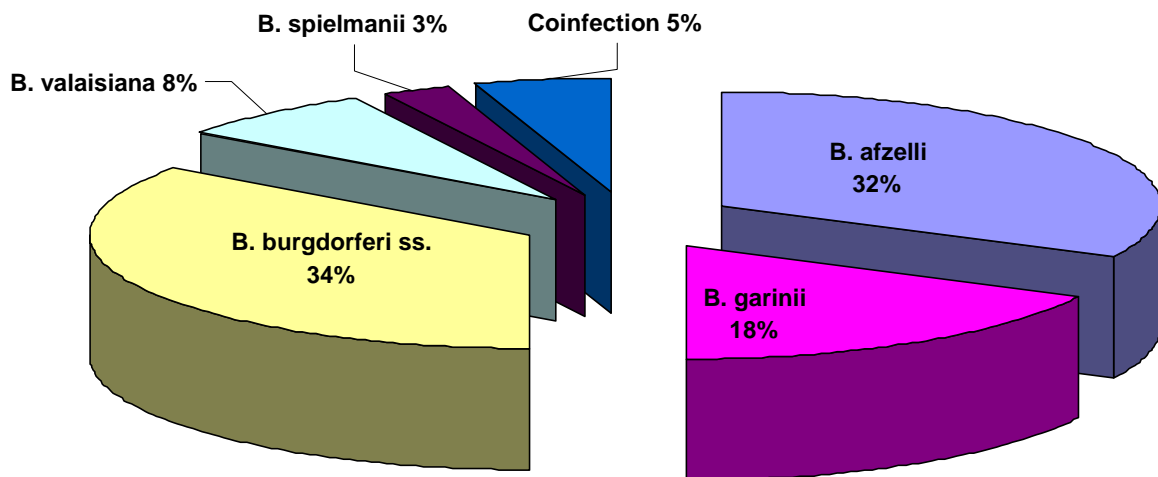
Figure 3.3.3.2a : Espèces de *B. burgdorferi* sl. isolées de nymphes d'*Ixodes ricinus* dans la forêt de Notre-Dame en 2009



3.3.3.3.2b Espèces de *B. burgdorferi* sensu lato infectant les tiques dans la forêt de Notre-Dame en 2009

Du fait du faible nombre de tiques adultes porteuses de *Borrelia* nous présentons uniquement les résultats pour les nymphes. La répartition par espèce, pour les 40 nymphes infectées par *Borrelia* est représentée dans la figure ci-dessous.

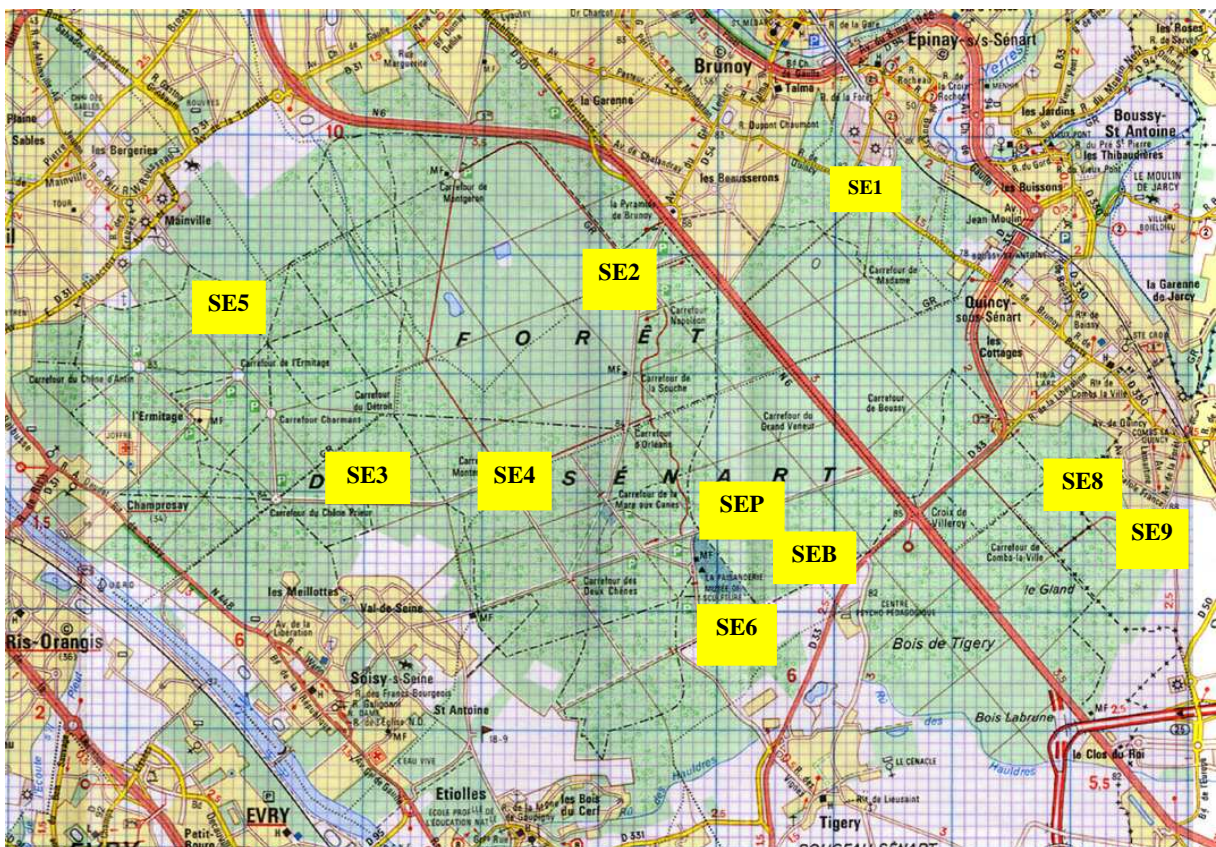
Figure 3.3.3.3 : Espèces de *B. burgdorferi* *sl.* isolées de nymphes d'*Ixodes ricinus* dans la forêt de Notre-Dame en 2009



3.3.4 Étude dans la forêt de Sénart

Cette étude a pour but d'évaluer les conséquences de la prolifération d'une espèce allochtone, le Tamia de Sibérie (*Tamias sibiricus*), encore appelé Écureuil de Corée, sur le risque de transmission de la borréliose de Lyme dans les forêts françaises. Le tamia est un « nouvel animal de compagnie (NAC) » originaire d'Eurasie, notamment de Sibérie, de Chine et de Corée. Les propriétaires déçus de son comportement - en effet, cet animal reste sauvage et est difficilement domesticable - s'en débarrassent en le « libérant » dans la forêt. Cette espèce est envahissante. Les premiers individus ont été repérés à l'extrémité ouest du site dans les années 1970 (voir figure ci-dessous parcelle SE5) et, actuellement, la population de tamias dans cette forêt est estimée à 15 000 individus (données J.-L. Chapuis, UMR 7204, Muséum National d'Histoire Naturelle). La partie sud-est de la forêt (parcelles SE8 SE9) a été colonisée très récemment (premiers individus observés en 2008, JL Chapuis).

Figure 3.3.4.1 : Carte de la forêt de Sénart avec parcelles collectées en 2008 et 2009



Des travaux sont en cours (UMR 7204 MNHN, Paris et unité UR346 Épidémiologie Animale, INRA Clermont-Ferrand Theix), dans le cadre du projet « EpiLyme », pour confirmer l'hypothèse que le tamia est un réservoir de *Borrelia* et pourrait donc favoriser le maintien voir amplifier le cycle de la bactérie. Le CNR *Borrelia* participe à cette étude depuis sa conception, notamment pour l'évaluation de la contribution du tamia au risque acarologique. En 2009, le CNR a identifié les espèces de *Borrelia* infectant les rongeurs autochtones et les tamias capturés entre 2006 et 2008. Il a évalué la densité des tiques et leur taux d'infection sur 10 parcelles de la forêt de Sénart. Ces dix parcelles avaient déjà été collectées en 2008.

Les parcelles collectées par le CNR sont réparties sur l'ensemble de la forêt :

- 8 parcelles ont été tirées au sort comprenant 6 parcelles dans la zone colonisée par les tamias (SE1 à SE6) et 2 dans la zone Sud-est dite « sans tamia » ou à faible densité (SE8 et SE9).
- 2 parcelles choisies en zone de forte densité de tamias (environ 5 à 10 individus par ha. selon les années en juin, données J.-L. Chapuis) dans le parc de la Faisanderie qui constitue un site de suivi temporel approfondi des tamias de la part du MNHN. La configuration de ces deux parcelles est différente de celle du reste du site car c'est un milieu clos, constitué d'une chênaie-charmaie entretenue, présentant une couverture herbacée importante (zone de prairie (SEP) et une chênaie-charmaie fermée (SEB). Cet espace n'est pas ouvert au public sauf aux scolaires et centres de loisirs.

Tableau 3.3.4.2: Densité et taux d'infection des tiques *I. ricinus* dans la forêt de Sénart en 2009. Ensemble des 10 parcelles collectées

| Forêt de Sénart | Mars | Avril | Mai | Juin | Juillet | Août | Septembre | Octobre | Total 2009 | Total 2008 | Comparaison 2008/2009 |
|--------------------------------------|----------|----------|----------|----------|------------|---------|-----------|---------|-------------|-------------|-----------------------|
| Nymphes (N) | 1077 | 1497 | 1441 | 2109 | 1742 | 769 | 332 | 175 | 9142 | 7657 | |
| Dens/100 m ² | 67,3 | 93,6 | 90,1 | 131,8 | 108,9 | 48,1 | 20,8 | 12,2 | 71,6 | 53,2 | NS |
| IC | [24-110] | [53-134] | [49-132] | [68-195] | [422-1756] | [15-81] | [7-34] | [6-18] | | | |
| Adultes (N) | 56 | 96 | 89 | 99 | 72 | 43 | 42 | 24 | 521 | 452 | NS |
| Dens/100 m ² | 3,5 | 6,0 | 5,6 | 6,2 | 4,5 | 2,7 | 2,6 | 1,7 | 4,1 | 3,1 | |
| IC | [0-7] | [3-9] | [3-8] | [3-10] | [1-8] | [0,5-3] | [1-4] | [0,4-3] | | | |
| Nymphes | 27/264 | 35/296 | 43/293 | 38/293 | 37/275 | 24/233 | 23/172 | 13/158 | 240/1984 | 208/2036 | |
| Taux d'infection | 10,2 % | 11,8 % | 14,7 % | 13 % | 13,6 % | 10,3 % | 13,4 % | 8,2 % | 12,1 | 10,2 | p = 0,06 |
| Adultes | 1/54 | 8/90 | 11/87 | 10/90 | 9/70 | 9/43 | 3/40 | 1/24 | 52/498 | 41/434 | NS |
| Taux d'infection | 1,9 % | 8,9 % | 12,6 % | 11,1 % | 12,9 % | 20,9 % | 7,5 % | 4,2 % | 10,4 | 9,5 | |
| Densité des nymphes infectées | | | | | | | | | | | |
| Dens/100 m ² | 6,9 | 11 | 13,2 | 17,1 | 14,7 | 5 | 2,8 | 1,3 | 9 | 5,4 | NS |
| Densité des adultes infectés | | | | | | | | | | | |
| Dens/100 m ² | 0,1 | 0,5 | 0,7 | 0,7 | 0,6 | 0,6 | 0,2 | 0,1 | 0,4 | 0,2 | NS |

On note une tendance à l'augmentation de la densité des nymphes et de leur taux d'infection par rapport à 2008.

Comme en 2008, les densités des nymphes et des adultes sont significativement inférieures dans les deux parcelles du parc de la Faisanderie, les taux d'infection étant comparables. Ces deux parcelles n'ayant pas été tirées au sort et étant très différentes des autres parcelles, nous les excluons de l'analyse ultérieure.

Après abstraction des parcelles de la Faisanderie, l'augmentation du taux d'infection des nymphes en 2009 devient significative ($p = 0,01$) et la densité des nymphes infectées dans la forêt de Sénart atteint $11/100\text{m}^2$ ce qui représente un niveau de risque élevé.

Tableau 3.3.4.3 Comparaison de la densité et du taux d'infection des tiques *I. ricinus* dans les 6 parcelles de la forêt avec tamias et les 2 parcelles sans tamia, forêt de Sénart, 2009

| | Six parcelles avec tamias | | | | | | | | | Deux parcelles sans tamia | | | | | | | | | Compa- raison tamias / sans tamia |
|---|---------------------------|--------|---------|--------|---------|--------|-------|-------|----------------|---------------------------|---------|--------|---------|---------|-------|-------|-------|---------------|---|
| | mars | avril | mai | juin | juillet | août | sept. | oct. | Total 2009 | mars | avril | mai | juin | juillet | août | sept. | oct. | Total 2009 | |
| Nymphes(N) | 456 | 851 | 815 | 1180 | 872 | 364 | 165 | 99 | 4802 | 580 | 564 | 535 | 844 | 804 | 363 | 146 | 63 | 3899 | P =0,03 |
| Dens/100 m2 | 47,5 | 88,6 | 84,9 | 122,9 | 90,8 | 37,9 | 17,2 | 12,4 | 62,8 | 181,3 | 176,3 | 167,2 | 263,8 | 251,3 | 113,4 | 45,6 | 19,7 | 152,3 | |
| IC | 22-74 | 46-131 | 136-133 | 63-183 | 28-154 | 8-68 | 1-34 | 4-21 | | 109-253 | 135-217 | 99-235 | 131-336 | 82-420 | 0-232 | 16-75 | 18-22 | | |
| Adultes (N) | 17 | 48 | 49 | 44 | 32 | 21 | 17 | 16 | 244 | 39 | 42 | 35 | 47 | 37 | 21 | 23 | 7 | 251 | P= 0,002 |
| Dens/100 m² | 1,8 | 5 | 5,1 | 4,6 | 3,3 | 2,2 | 1,8 | 2 | 3,2 | 12,2 | 13,1 | 10,9 | 14,7 | 11,6 | 6,6 | 7,2 | 2,2 | 9,8 | |
| IC | 0-4 | 1-9 | 2-9 | 2-7 | 0-6 | 0-5 | 1-3 | 0-4 | | 7-18 | 8-18 | 10-12 | 7-23 | 5-18 | 0-13 | 7-8 | 2-3 | | |
| Nymphes | 22/165 | 26/180 | 28/180 | 27/180 | 28/179 | 18/141 | 15/92 | 10/85 | 174/1202 | 4/60 | 6/60 | 9/60 | 5/60 | 4/60 | 4/60 | 6/60 | 3/60 | 41/480 | P= 0,001 |
| Taux d'infection (%) | 13,3 | 14,4 | 15,6 | 15 | 15,6 | 12,8 | 16,3 | 11,8 | 14,5 | 6,7 | 10 | 15 | 8,3 | 6,7 | 6,7 | 10 | 5 | 8,5 | |
| Adultes | 0/15 | 5/44 | 8/48 | 6/39 | 7/32 | 5/21 | 2/15 | 1/16 | | 1/39 | 3/40 | 3/35 | 4/43 | 2/35 | 4/21 | 1/23 | 0/7 | 18/243 | |
| Taux d'infection (%) | 0 | 11,4 | 16,7 | 15,4 | 21,9 | 23,8 | 13,3 | 6,3 | 34/230 14,8 | 2,6 | 7,5 | 8,6 | 9,3 | 5,7 | 19 | 4,3 | 0 | 7,4 | P =0,01 |
| Densité des nymphes infectées Dens/100 m² | 6 | 13 | 13 | 18 | 14 | 5 | 3 | 1 | 9 | 12 | 18 | 25 | 22 | 17 | 8 | 5 | 1 | 13 | NS |
| Densité des adultes infectés Dens/100 m² | 0 | 0,6 | 0,9 | 0,7 | 0,5 | 0,2 | 0,1 | 0 | 0,5 | 0,3 | 1 | 0,9 | 1,4 | 0,7 | 1,3 | 0,3 | 0 | 0,7 | NS |

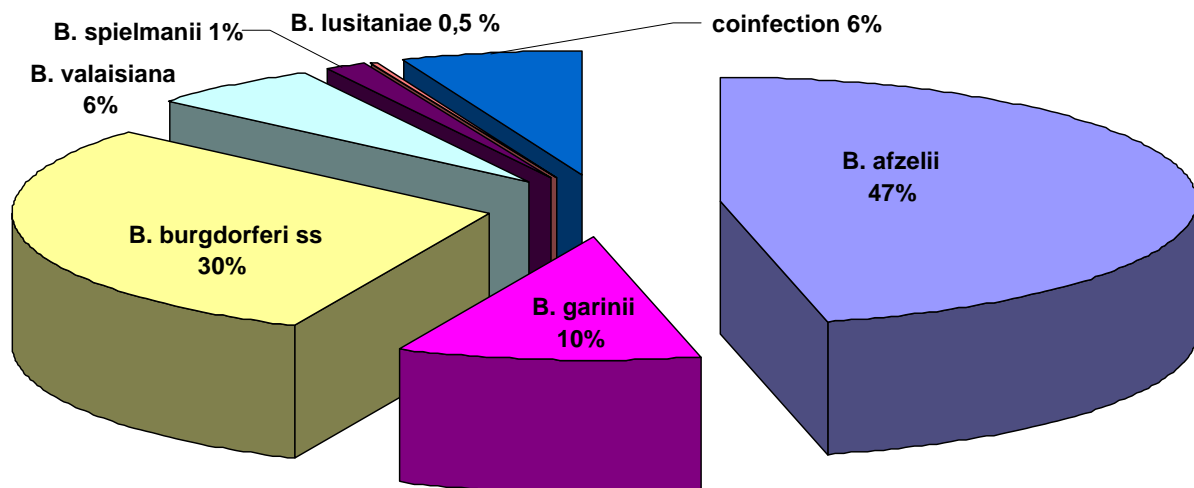
Comme en 2008, les densités en nymphes et en adultes sont significativement supérieures dans les parcelles sans tamia ($p = 0,02$ et $p = 0,002$) par rapport aux parcelles avec tamias. Cette différence peut s'expliquer par une plus forte densité de chevreuils dans cette zone de la forêt qui est moins chassée (données ONF). Le taux d'infection des nymphes est inversé, plus élevé dans les parcelles avec tamias. Cette évolution inverse de la densité et du taux d'infection aboutit au final à une densité des nymphes infectées équivalente dans les parcelles avec et sans tamia. À noter que le taux d'infection des nymphes (14,5 %) dans les parcelles avec tamias se situe parmi les taux les plus élevés déjà trouvés en France (18,5 % en Alsace en 2003-2004).

Le taux d'infection des tiques, plus élevé dans les parcelles avec tamias, est à rapprocher des résultats obtenus sur les réservoirs (cf. §3.4).

3.3.4.4. Espèces de *B. burgdorferi* sensu lato infectant les tiques dans la forêt de Sénart

La répartition par espèce, après analyse du polymorphisme de restriction par *MseI* des 215 nymphes infectées par *Borrelia* est représentée dans la figure ci-dessous.

Figure 3.3.4.4 : Espèces de *Borrelia* retrouvées dans les nymphes de la forêt de Sénart en 2009



À l'inverse de ce que l'on a observé dans la forêt de Rambouillet, la prévalence de *B. garinii* (29 %) est supérieure chez les tiques adultes, alors que celle de *B. afzelii* (30 %) est plus faible. Les prévalences des autres espèces sont comparables chez les adultes et les nymphes. À noter, comme en 2008, la forte proportion de *B. burgdorferi* ss. et le nombre non négligeable de *B. spielmanii* et *B. lusitaniae* retrouvées exceptionnellement dans les autres régions françaises.

Par rapport à 2008, on observe chez les nymphes une augmentation significative de la prévalence de *B. afzelii* (47 % vs 33 %), espèce dont les réservoirs sont les petits mammifères (rongeurs) au détriment des *B. garinii* (10 % vs 21 %), espèce habituellement inféodée aux oiseaux.

En 2009, la répartition des espèces de *Borrelia* infectant les nymphes d'*Ixodes ricinus* est comparable dans les parcelles avec et sans tamias. En 2008, la proportion de *B. afzelii*, était significativement plus élevée dans les parcelles fortement colonisées par les tamias

Au total, dans la forêt de Sénart, la densité et le taux d'infection des tiques a sensiblement augmenté en 2009 par rapport à 2008, aboutissant à une densité de nymphes infectées telle qu'elle représente un risque élevé dans cette forêt périurbaine très fréquentée. L'introduction et la prolifération des tamias pourraient entraîner une augmentation du taux d'infection des tiques. Cette hypothèse est à confirmer par les travaux en cours sur les réservoirs.

3.3.5 Étude en Île-de-France : comparaison des sites et conclusion

| | Rambouillet | Notre-Dame | Sénart | Comparaison ND+Rambouillet/ Sénart |
|--|-------------|-------------|-------------|--|
| Nymphes(N) | 4.676 | 1.205 | 8.701 | NS |
| Dens/100 m ² | 52,9 | 47,1 | 85,2 | |
| Adultes (N) | 269 | 66 | 495 | P = 0,02 |
| Dens/100 m ² | 3,1 | 2,6 | 4,9 | |
| Nymphes | 116/1319 | 40/425 | 215/1682 | P < 0,01 |
| Taux d'infection (%) | 8,8 | 9,4 | 12,8 | |
| Adultes | 43/247 | 5/63 | 52/473 | NS |
| Taux d'infection (%) | 17,4 | 8 | 11 | |
| Densité des nymphes Infectées/100 m² | 4,7 | 4,4 | 11 | P = 0,048 |
| Densité des adultes infectés/100 m ² | 0,5 | 0,2 | 1 | NS |

La densité des nymphes et leur taux d'infection sont plus élevés dans la forêt de Sénart aboutissant à une densité de nymphes infectées et donc à un risque pour l'homme plus élevé.

L'étude clinique menée en parallèle à proximité du site de Sénart en 2010 et 2011 (Programme PICRI, Collaboration avec le Dr. O. Patey, CH de Villeneuve St Georges) permettra d'évaluer l'incidence de la borréliose de Lyme dans ce secteur.

3.4. Diversité génétique des souches de *Borrelia burgdorferi* s.l.

La détection et l'identification de *B. burgdorferi* s.l. est effectuée par amplification puis digestion enzymatique de la région intergénique *rrf-rrl*. L'analyse des profils de restriction donne un premier niveau de polymorphisme, complété, dans un second temps, par l'analyse des séquences du produit d'amplification. Afin d'apprécier le polymorphisme, nous avons séquencé certains des produits d'amplification donnant lieu à un profil atypique.

Tableau 3.4.1: Polymorphisme de restriction *MseI* de l'espace intergénique *rrf-rrl* des 504 *Borrelia* détectées dans les tiques *I. ricinus* en France en 2009 (Forêt de Rambouillet, de Notre dame et de Sénart)

| | | Profils de restriction <i>MseI</i> | Nombre | séquences |
|--|-------------------------------|------------------------------------|--------|-----------|
| <i>B. garinii</i> (n= 112) | Profil 20047 ^T | 107, 95, 51 | 112 | 2 |
| | Profil atypique 1 | 107, 80, 51 | 0 | |
| | Profil atypique 2 | 107, 98, 51 | 0 | |
| <i>B. afzelii</i> (n=165) | Profil VS461 ^T | 107, 68, 51, 20 | 132 | 3 |
| | Profil atypique 1 | 107, 68, 51, 13, 7 | 13 | 13 |
| | Profil atypique 2 | 107, 51, 38, 30, 20 | 20 | 6 |
| <i>B. valaisiana</i> (n=53) | Profil VS116 ^T | 174, 51, 23, 7 | 49 | 2 |
| | Profil atypique 1 | 204, 51 | 2 | 0 |
| | Profil atypique 2 | 174, 51, 14, 7 | 2 | 2 |
| <i>B. burgdorferi</i> ss (n=139) | Profil B31 ^T | 107, 52, 38, 29, 28 | 78 | 1 |
| | Profil atypique 1 | 107, 52, 40, 29, 28 | 56 | 5 |
| | <i>Bb</i> ss var 1 | 107, 53, 38, 29, 26 | 5 | 5 |
| | <i>Bb</i> ss var 2 | 107, 52, 38, 29, 29 | 0 | - |
| <i>B. spielmanii</i> (n=6) | Profil PC-EQ17NS ^T | 107, 99 | 0 | - |
| | Profil 1 | 107, 67, 48 | 3 | 3 |
| | Profil 2 | 107, 65, 51 | 3 | 3 |
| <i>B. lusitaniae</i> potiB2 (n=2) | | | 2 | 2 |
| <i>B. afzelii</i> + <i>B. burgdorferi</i> ss | | | 14 | 0 |
| <i>B. afzelii</i> atypique 1+ <i>B. burgdorferi</i> ss | | | 2 | 0 |
| <i>B. afzelii</i> + <i>B. garinii</i> | | | 1 | 0 |
| <i>B. garinii</i> + <i>B. burgdorferi</i> ss Ca19 | | | 1 | 0 |
| <i>B. garinii</i> + <i>B. valaisiana</i> | | | 8 | 0 |
| <i>B. garinii</i> + <i>B. burgdorferi</i> ss | | | 1 | 0 |
| Total | | | 504 | 47 |

Tableau 3.4.2 : Polymorphisme de restriction *MseI* de l'espace intergénique *rrf-rrl* des 274 *Borrelia* détectées dans les biopsies d'oreilles de rongeurs dans le site de la Faï-sanderie dans la forêt de Sénart sur 2006 2007 2008

| | Profils de restriction <i>MseI</i> | Tamias | Apodemus | Myodes | Nombre | séquences |
|---|------------------------------------|------------|----------|------------|------------|-----------|
| <i>B. garinii</i> (n = 8) | Profil 20047 ^T | 8 | 0 | 0 | 8 | 3 |
| | Profil atypique 1 | | | | 0 | |
| | Profil atypique 2 | | | | 0 | |
| <i>B. afzelii</i> (n = 181) | Profil VS461 ^T | 35 | 4 | 1 | 40 | 15 |
| | Profil atypique 1 | 22 | 2 | 23 | 47 | 11 |
| | Profil atypique 2 | 13 | 3 | 78 | 94 | 33 |
| <i>B. burgdorferi</i> ss (n = 75) | Profil B31 ^T | 42 | 0 | 0 | 42 | 2 |
| | Profil atypique 1 | 33 | 0 | 0 | 33 | 0 |
| | <i>Bb</i> ss var 1 | | | | | |
| | <i>Bb</i> ss var 2 | | | | | |
| <i>B. afzelii</i> + <i>B. burgdorferi</i> ss (n = 4) | | 4 | | | 4 | 0 |
| <i>B. afzelii</i> atypique 1+ <i>B. burgdorferi</i> ss | | 1 | | | 1 | 0 |
| <i>B. afzelii</i> atypique 1+ <i>B. garinii</i> | | 1 | | | 1 | 0 |
| <i>B. afzelii</i> + <i>B. burgdorferi</i> ss Ca19 (n = 3) | | 3 | | | 3 | 0 |
| <i>B. afzelii</i> aty1+ <i>B. burgdorferi</i> ss Ca19 | | 1 | | | 1 | 0 |
| Total | | 163 | 9 | 102 | 274 | 64 |

3.5. Contribution du CNR aux réseaux de surveillance nationaux, internationaux, en particulier européens

3.5.1 Contribution du CNR aux réseaux de surveillance nationaux, internationaux, en particulier européens

- Collaboration avec le « réseau Sentinelles » pour l'ajout de la borréliose de Lyme à la liste des maladies surveillées par ce réseau national.

3.5.2 Contribution du laboratoire associé au CNR aux réseaux de surveillance nationaux, internationaux, en particulier européens

En 2008, la révision des critères de définition de cas établis en 1996 a été entreprise et le laboratoire associé au CNR *Borrelia* participe toujours à ce groupe de travail. Il est apparu nécessaire de réviser ces critères par suite de l'existence de nouvelles données cliniques, de l'augmentation de l'incidence de cette pathologie dans certains pays européens, du coût que représentent certaines distorsions liées à des diagnostics et des traitements inappropriés ou non validés actuellement.

Après plusieurs réunions du groupe EUCALB en 2008, deux réunions des représentants de dix pays européens ont été organisées à Vienne en 2009. Des critères de définition des principales manifestations de la borréliose de Lyme actuellement reconnues ont été établis et la place des outils biologiques incluant les méthodes moléculaires a été définie. Ces propositions sont basées sur les données de la littérature, classées en niveau de preuve. Ces nouvelles recommandations ont été soumises et acceptées par Clinical Microbiology and Infection. Elles seront publiées au début 2010.

Le groupe envisage de poursuivre ce travail en proposant des protocoles thérapeutiques communs.

Parallèlement le site web de l'EUCALB a été rénové

(<file://localhost/http://meduni09.edis.at/eucalb/cms:index.php%3Flang=en>) et son contenu est en cours de réactualisation collective. Nous participons aussi à la hotline mail de ce site depuis fin 2008.

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

4. 1 Activités d'information, de formation et de conseil du CNR (Unité de Génétique Moléculaire des Bunyavirus, Institut Pasteur, Paris)

Missions

- De mars à novembre 2009 : nombreuses missions (une par mois dans chaque site) de collectes de tiques en Île-de-France
- 19 avril au 2 mai 2009 : Collectes de tiques (identifications, extractions d'ADN ...) à Madagascar par Muriel Cornet, Élisabeth Ferquel et Natacha Sertour dans le cadre du projet ACIP A02 07 2007. Conférence sur les borrélioses par M. Cornet et É. Ferquel à l'Institut Pasteur de Madagascar.

Enseignements, formations aux professionnels de santé,

- Atelier pratique aux 51ème Journées de Biologie Clinique Necker-Institut Pasteur le 21 janvier 2009 : « Cas cliniques en Microbiologie » par M. Cornet.
- Présentation sur les maladies à tiques CiRE Centre-Est Franche Comté dans le cadre de l'étude « Maladies transmises par les tiques 2010-2012 ». Par É. Ferquel le 5 février 2009 à Dijon
- Enseignement dans les services de Microbiologie et Parasitologie-Mycologie du GH Cochin-Saint Vincent de Paul, sur les borrélioses par M. Cornet. Mars 2009
- Séminaire d'enseignement pratique et théorique sur les « Tiques et Maladies transmises par les Tiques » du 2 au 13 nov. 2009, Sainte Chlothilde, La Réunion. Enseignement organisé par le Centre de recherche et de veille sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien CRVOI. Participation d'É. Ferquel et M. Garnier
 - o Cours sur la systématique des tiques
 - o Identification et morphologie des tiques
 - o Pratique : Collecte des tiques en milieu naturel
 - o Les borrélioses : Maladie de Lyme et Fièvres récurrentes
 - o Pratique : Extraction d'acides nucléiques des tiques et détection et identification des *Borrelia*
- Enseignement au Diplôme Universitaire de Dermatologie Infectieuse et Tropicale de l'Université Paris VI : Enseignement sur les borrélioses par M. Cornet en novembre 2009

Information « grand public » :

- Participation à l'émission de vulgarisation scientifique « Xenius » de Arte sur le thème des « dangers de la forêt ». Interview de M. Cornet et reportage au laboratoire du CNR à l'Institut Pasteur. Diffusion de l'émission le 22 juillet 2009.

Reportage « type » élaboré à la demande du service presse de l'Institut Pasteur sur les activités du CNR avec tournage sur le terrain en forêt de Sénart et au laboratoire. Ce reportage est délivré sur demande des médias désireux de faire un reportage sur la maladie de Lyme et sur les tiques.

Lister les guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

- Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :

- o Rétro-information aux partenaires

Envoi du rapport d'activité à tous les médecins et biologistes participants. Envoi de la plaquette sur la prévention élaborée fin 2008 en collaboration avec la MSA aux professionnels demandeurs.

- o Diffusion aux professionnels : Rapport d'activité disponible sur le site web de l'Institut Pasteur.

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

La borréliose de Lyme est une infection complexe, encore mal comprise, qui suscite de nombreuses questions des médecins, biologistes et particuliers. L'équipe médicale qui dirige le CNR (M. Cornet et É. Ferquel) répond à de nombreux messages électroniques ou téléphoniques (en moyenne 6 par jour). Le secrétariat (S. Coueille) assure une permanence téléphonique du lundi au vendredi et en dehors des heures ouvrées un répondeur enregistre les messages téléphoniques.

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

Participation du CNR (É. Ferquel et M. Cornet) au groupe de travail « Maladie de Lyme » du Haut Conseil de la Santé Publique. Ce groupe de travail, coordonné par le Pr C. Perronne avait pour mission d'établir des recommandations sur la prévention de la borréliose de Lyme à usage des professionnels de santé. Le texte a été finalisé et présenté au Haut Conseil en janvier 2010. Il sera diffusé par le ministère de la santé en 2010.

4.2 Activité d'information, de formation et de conseil du laboratoire associé au CNR (Institut de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg)

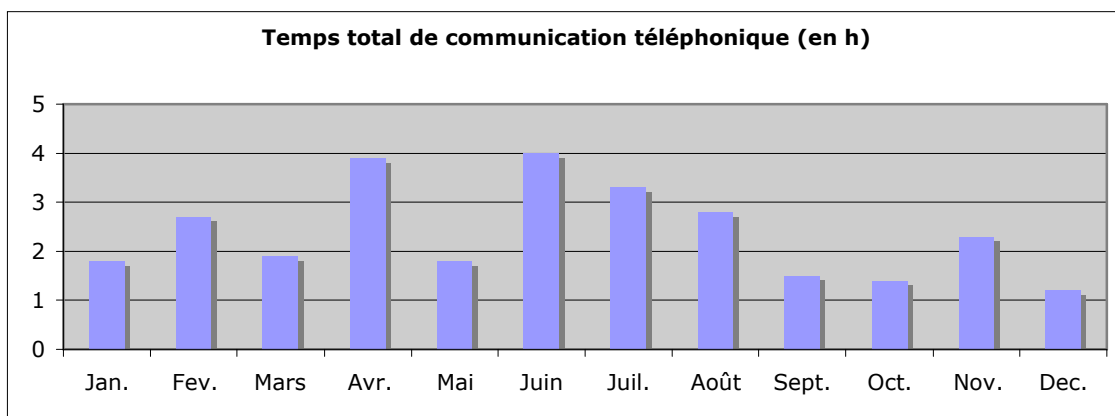
• Enseignement - Formation – accueil de stagiaires

- « Infections émergentes transmises par les arthropodes ». Cours au Master M 1 de Microbiologie Médicale, Faculté de Médecine de Strasbourg, février 2009. S.J. De Martino

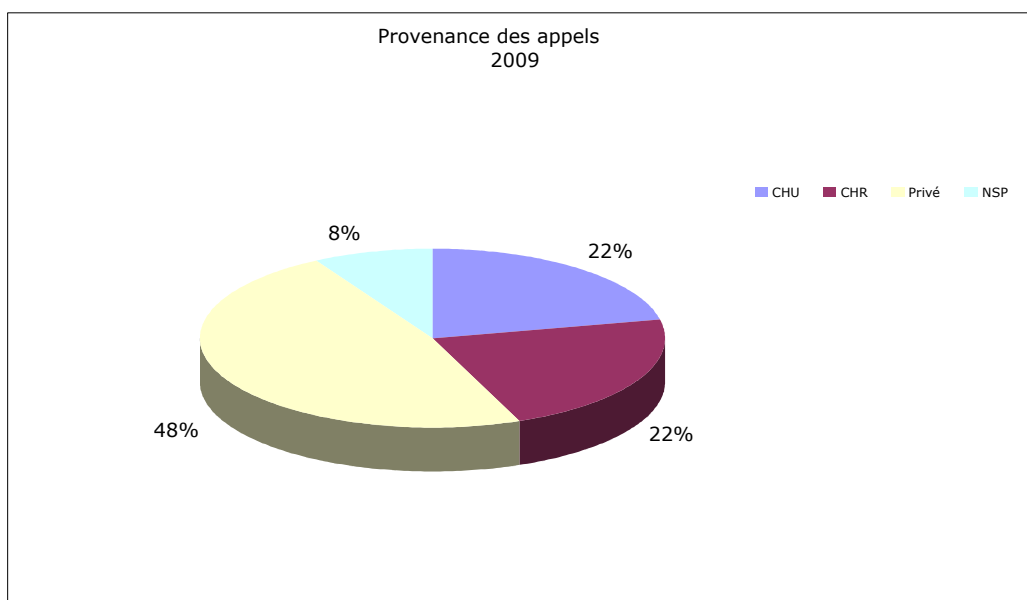
- « Mécanismes bactériens d'échappement aux défenses de l'hôte ». Cours au Master M 1 de Microbiologie Médicale, Faculté de Médecine de Strasbourg, mars 2009. B. Jaulhac

• Conseil aux professionnels (hors CHU de Strasbourg)

Notre activité d'assistance téléphonique s'élève en 2009 à 130 appels (+ 8,5 %), soit au total 28,6 heures passées au téléphone.



Cette activité se renforce naturellement en période d'exposition aux tiques (avril et en été) représentant alors 3 à 4 heures par mois. La durée moyenne des communications est stable (environ 13 min par appel) et varie peu en fonction des périodes de l'année. La provenance des appels est différente par rapport à 2008, pour moitié provenant du secteur public (22 % CHU et 22 % CHR), que alors qu'en 2008 deux fois plus d'appels provenaient du secteur privé.

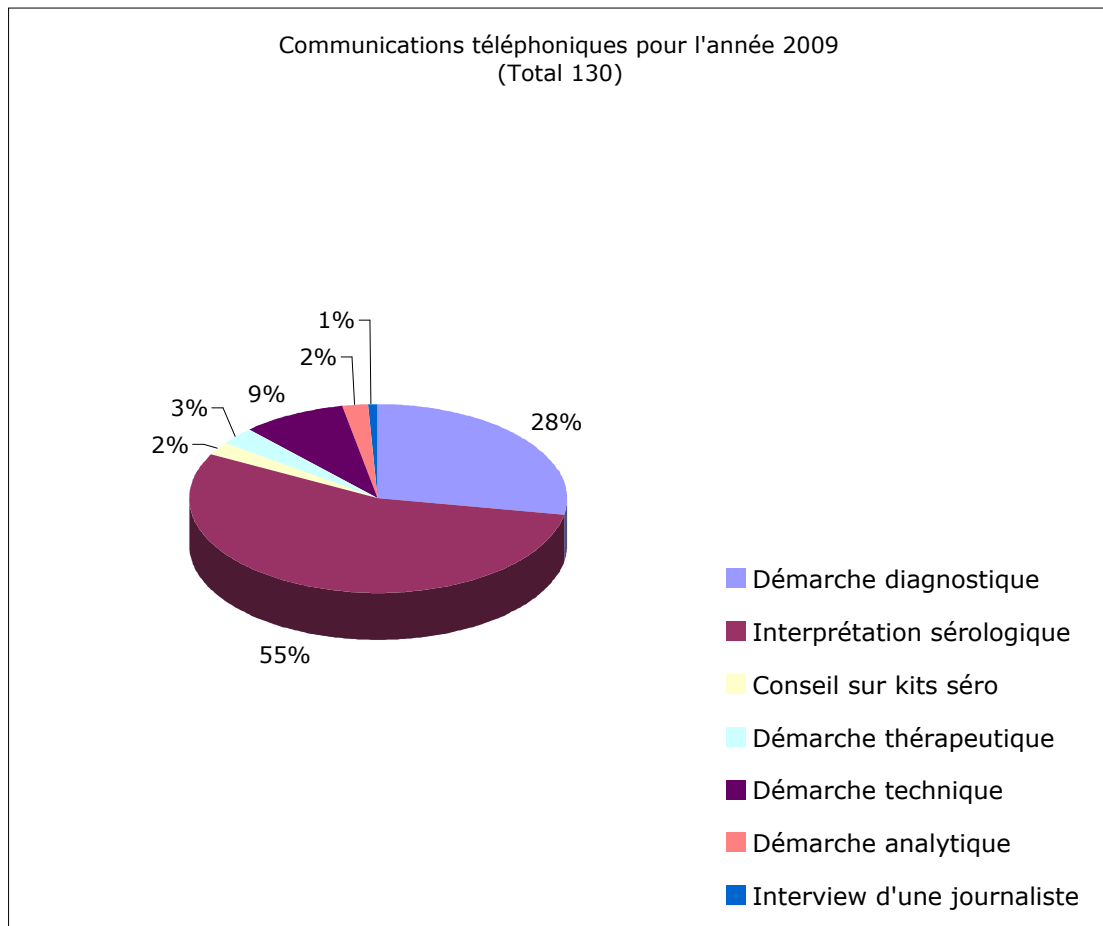


Cette année, nos interlocuteurs étaient :

- pour la majorité, des médecins généralistes ou des praticiens hospitaliers et internistes
Dans la moitié des cas, l'interprétation des résultats sérologiques de leur patient (suite à des sérologies réalisées dans un même laboratoire privé) les préoccupait. Ils étaient alors demandeurs d'expertise sérologique réalisée par le CNR.
- dans 20 % des cas, des médecins spécialistes (6 % de neurologues, 6 % de pédiatres, 5 % de dermatologues, 1 % d'infectiologues, 1 % de cancérologues et 1 % d'anatomopathologistes) demandeurs de conseils essentiellement sur les démarches diagnostiques,
- dans 20 % des cas, des biologistes demandeurs de conseils en matière de démarche diagnostique et technique (réalisation de la synthèse intrathécale) ou de renseignements sur les performances des diverses trousse diagnostiques commercialisées,
- dans 1 % des cas des vétérinaires (demande d'immunoempreinte pour les bovins)
- dans 2 % des cas des paramédicaux (1 % de techniciens de laboratoire, 1 % de coursiers en charge de prélèvements) demandeurs de renseignements pour le bon

management des échantillons,

- 7 % des cas des patients soucieux de l'interprétation sérologique de leur résultats ou demandeurs de conseils de prévention.

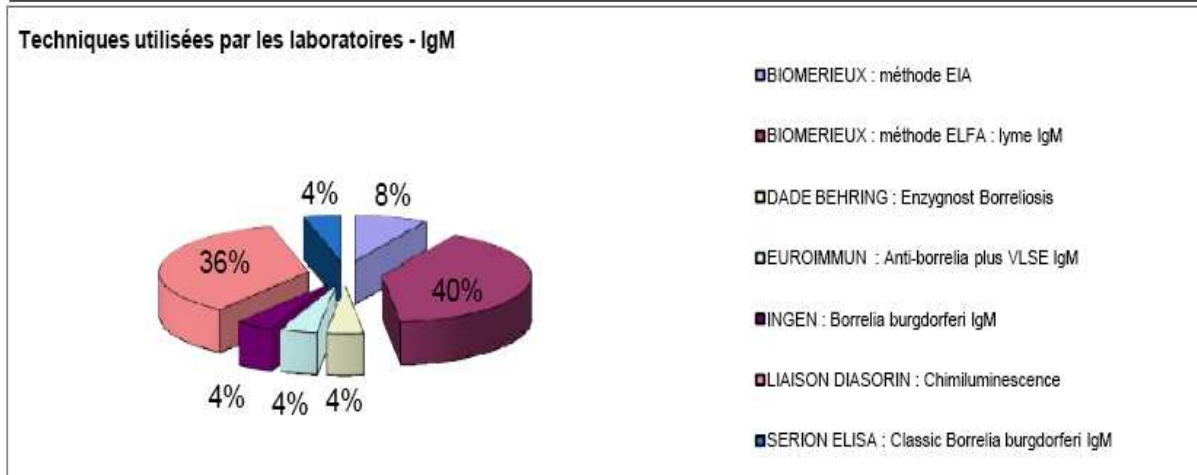
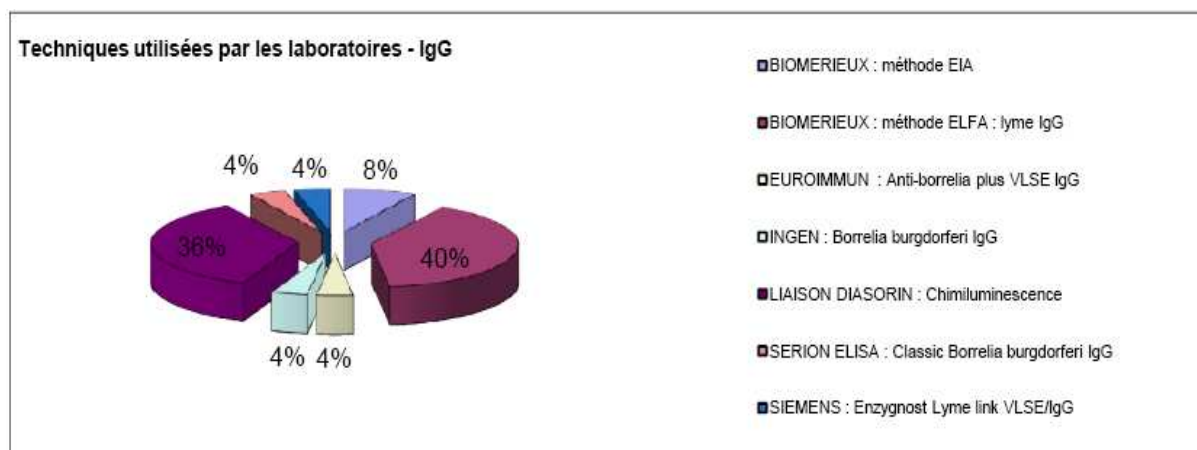


Les appels provenaient du quart Nord-Est dans 57 % des cas, de la région parisienne dans 15 % provenant, dans 6 % du Nord, dans 17 % du Centre ou de l'Ouest. Les appels du Sud-Est représentaient 3 %.

- Contrôle de qualité externe pour les laboratoires

En 2009, nous avons proposé comme l'année précédente aux laboratoires d'analyse médicale volontaires du Nord-est, un contrôle de qualité externe pour la sérologie de *Borrelia*. Avec l'aide logistique d'une association extérieure (Biologie Prospective, Nancy) nous avons diffusé 4 sérums à 25 laboratoires qui avaient fait part de leur intention de participer.

Parmi ces sérums, un était positif en IgG seulement anti *B. burgdorferi*, un autre négatif pour les deux classes d'Ig. Les vingt-cinq laboratoires ont répondu pour ces 2 premiers sérums, dix-huit seulement 2 autres sérums. Les résultats présentés ne concernent que les deux premiers sérums pour lesquels les 25 laboratoires ont participé.



Au sein des 25 laboratoires participants, 6 techniques différentes ont été utilisées pour la détection des IgG et 6 pour la détection des IgM anti *B. burgdorferi*. Deux laboratoires ont utilisé des coffrets utilisant de l'Ag recombinant VLSE.

La technique Ig totales de BioMérieux est toujours largement majoritaire et représente près de la moitié des parts de marché. Il est probable que le format unitaire du test, très pratique d'utilisation, participe à ce choix.

Parmi les autres coffrets, le choix du coffret a légèrement varié chez les utilisateurs, 4 % des utilisateurs ont choisi comme l'année précédente, Euro-Immun, Sérion, Ingen ou Siemens tandis que Diasorin représente comme l'an dernier le 2^{ème} choix, en terme de fréquence d'utilisation, après BioMérieux.

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

Tous les laboratoires participants sauf un ont fourni la bonne réponse. Pour ceux utilisant des coffrets IgG et IgM séparés, ils ont détecté les IgG anti *B. burgdorferi* dans l'échantillon et ont fourni la bonne réponse négative en IgM, un seul faux positif a été rapporté.

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

| Laboratoires | IgM | | | IgG | | | IgM + IgG | | |
|-----------------|-----|---|---|-----|---|---|-----------|---|---|
| | - | ± | + | - | ± | + | - | ± | + |
| Référent | | | X | | | X | | | |
| 0029 | | | X | | | X | | | / |
| 0066 | | | | | | | | | X |
| 0106 | | | | | | | | | X |
| 0143 | | | | | | | | | X |
| 0152 | | X | | | | X | | | |
| 0176 | X | | | | | X | | | |
| 0192 | | | | | | | | | X |
| 0198 | X | | | | | X | | | |
| 0216 | | | | | | | | | X |
| 0239 | X | | | | | X | | | |
| 0247 | | | | | | | | | X |
| 0295 | | | | | | | | | X |
| 0319 | X | | | | | X | | | |
| 0420 | X | | | | | X | | | |
| 0438 | | | | | | | | | X |
| 0445 | X | | | | | X | | | |
| 0469 | | | X | | | X | | | |
| 0506 | X | | | | | X | | | |
| 0511 | | | | | | | | | X |
| 0545 | | | | | | | | | X |
| 0548 | | | | | | | | | X |
| 0589 | | | | | | | | | X |
| 0639 | X | | | | | X | | | |
| 0640 | X | | | | | X | | | |
| 0674 | X | | | | X | | | | |

Les LABM utilisant le coffret BioMéreux IgG+IgM couplé ont tous détecté ce sérum comme positif (100% de réponse correcte).

Parmi les LABM utilisant un coffret analysant séparément les IgG et les IgM, tous les laboratoires participants sauf un ont détecté les IgG anti *B. burgdorferi* tandis que 77 % (10/13) d'entre eux n'ont pas détecté les IgM dans l'échantillon fourni, par suite d'un manque de sensibilité du coffret IgM utilisé, problème déjà souligné l'an dernier. Dans 90 % des cas, il s'agissait du même coffret, le test Liaison Diasorin IgM dont nous avons déjà souligné le manque de sensibilité en IgM. Ce coffret est utilisé par environ un tiers des laboratoires participants.

Au total, les résultats de ce contrôle de qualité sont très satisfaisants en IgG en termes de sensibilité et manquent pour certains coffrets de sensibilité en IgM.

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

| Laboratoires | IgM | | | IgG | | | IgM + IgG | | |
|-----------------|-----|---|---|-----|---|---|-----------|---|---|
| | - | ± | + | - | ± | + | - | ± | + |
| Référent | X | | | | | X | | | |
| 0029 | X | | | | | X | | | |
| 0066 | | | | | | | | | X |
| 0106 | | | | | | | | | X |
| 0143 | | | | | | | | | X |
| 0152 | X | | | | | X | | | |
| 0176 | | | | | | | | | X |
| 0192 | | | | | | | | | X |
| 0216 | | | | | | | | | X |
| 0239 | X | | | | | X | | | |
| 0247 | | | | | | | | | X |
| 0319 | X | | | | | X | | | |
| 0420 | X | | | | | X | | | |
| 0445 | X | | | | | X | | | |
| 0469 | X | | | | | X | | | |
| 0471 | | | | | | | | | X |
| 0545 | | | | | | | | | X |
| 0547 | X | | | | | X | | | |
| 0548 | | | | | | | | | X |
| 0589 | | | | | | | | | X |
| 0590 | X | | | | | X | | | X |
| 0639 | X | | | | | X | | | |
| 0640 | X | | | | | X | | | |

Tous les laboratoires participants ont fourni la bonne réponse. Pour ceux utilisant des coffrets IgG et IgM séparés, ils ont détecté les IgG anti *B. burgdorferi* dans l'échantillon et ont fourni la bonne réponse négative en IgM, aucun positif n'a été rapporté.

Au total, les résultats de ce contrôle de qualité sont très satisfaisants en IgG en termes de sensibilité et manquent pour certains coffrets de sensibilité en IgM.