

Diagnostic des maladies dues aux tiques

Introduction

1883 Acrodermatitis

1908 Erythème (Afzelius)

1911 Lymphocytome

1922 Paralyse à tique

1948 Erythème à spirochètes

1955 Origine infectieuse

1975 Epidémie de Lyme

1982 *Borrelia burgdorferi*

Immunofluorescence

Isolements cliniques + hôtes

Génotypage - taxonomie

Diagnostic génomique

Associations cliniques

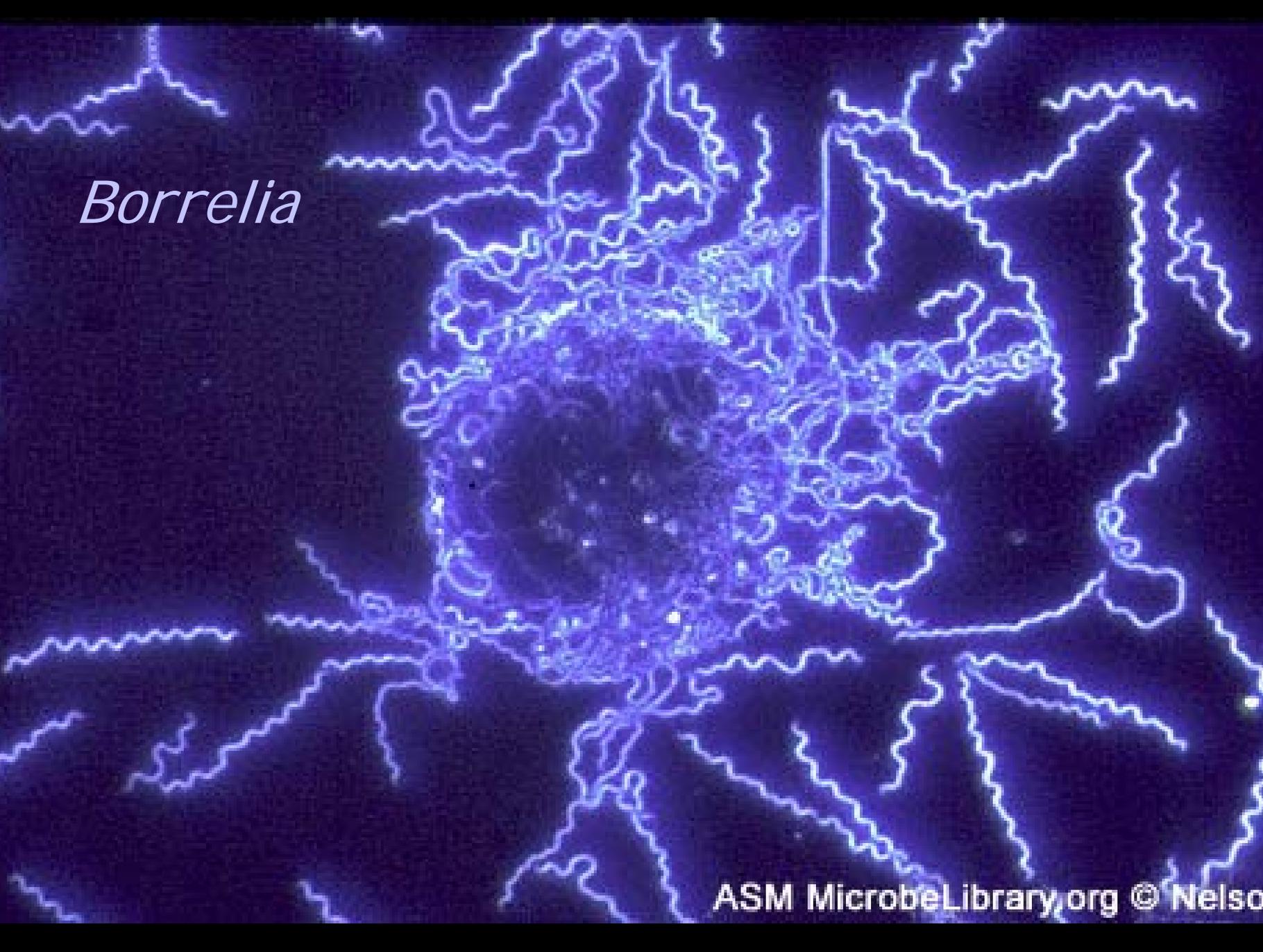
Pathogènes associés

Importance de la tique

Pathogènes

- 🐛 Borrélias de Lyme
- 🐛 Virus de l'encéphalite à tique
- 🐛 *Anaplasma phagocytophilum*
- 🐛 *Ehrlichia ewingii*
- 🐛 *Ehrlichia chaffeensis*
- 🐛 *Babesia microtii*, *B. divergens*, EU1, WA1
- 🐛 Rickettsies

Borrelia



Diagnostic des Borrélioses

- ✓ Observation directe
- ✓ Coloration
- ✓ Détection des antigènes
- ✓ Culture
- ✓ Sérologie
- ✓ Stimulation cellulaire
- ✓ Détection  du génome

Examens directs

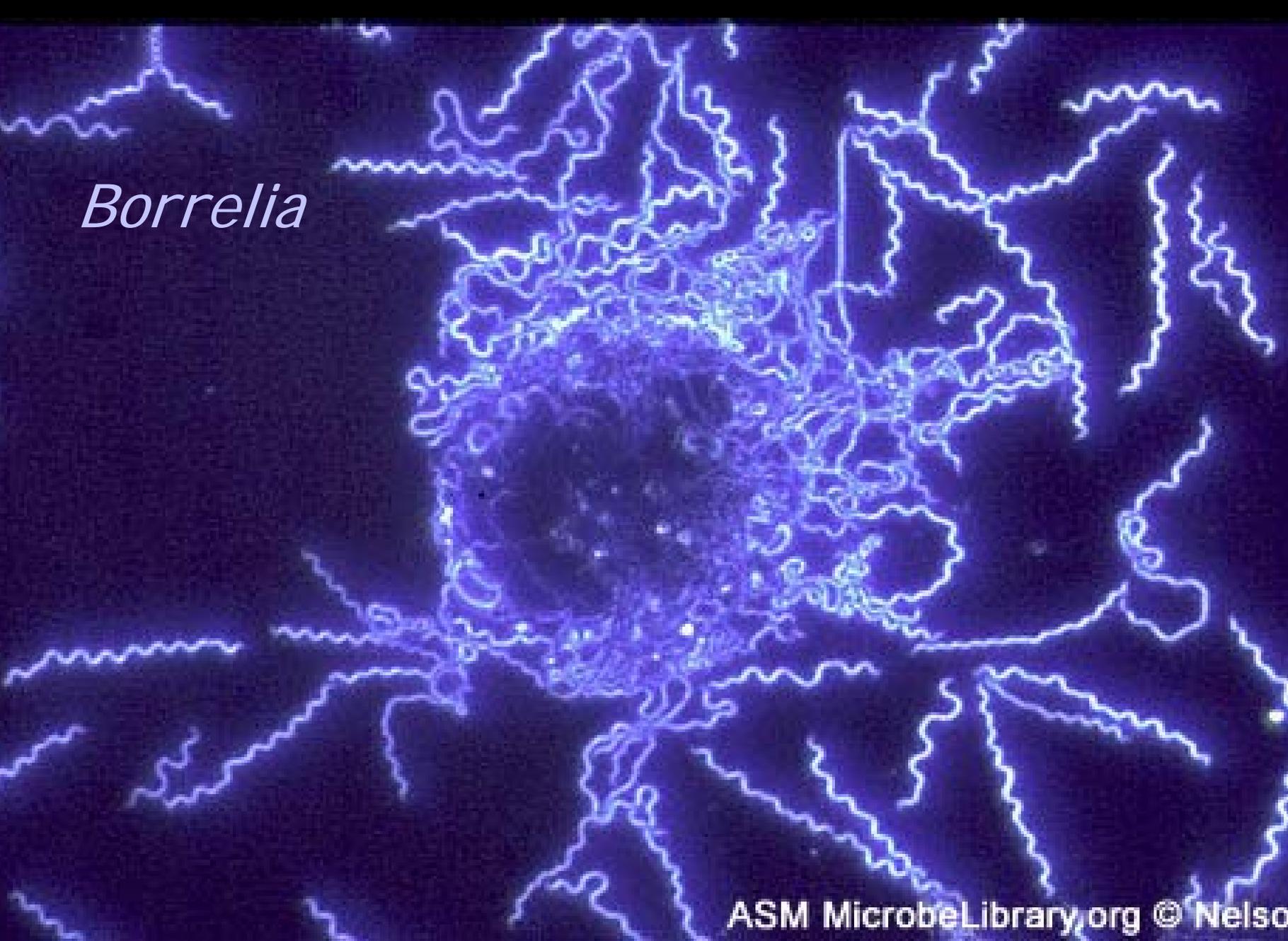
- ✓ Microscopie
- ✓ Coloration Gram
- ✓ Coloration au Giemsa
- ✓ Coloration argentique
- ✓ Marquage par anticorps spécifique
- ✓ Recherche d'antigène (urine)

 Non praticable, peu sensible ou inutile pour le diagnostic



Borrelia species

Borrelia



Culture des borrélioses

- ✓ Bouillon de culture complexe (BSK II)
- ✓ Croissance sur gélose en anaérobiose
- ✓ Incubation de 2 -8 semaines (ou plus)
- ✓ Prélèvements stériles délicat et invasif

Biopsie de peau

Liquide synovial

Sang, sérum ou plasma

LCR

- Sensibilité = 5 à 70%
- Spécificité = 100%

Borrélioses de Lyme - méthodes indirectes

Fixation du complément

Immunofluorescence (IFI)

ELISA

Western blot

Immunoblot

Immuno-chromatographie

Stratégie classique

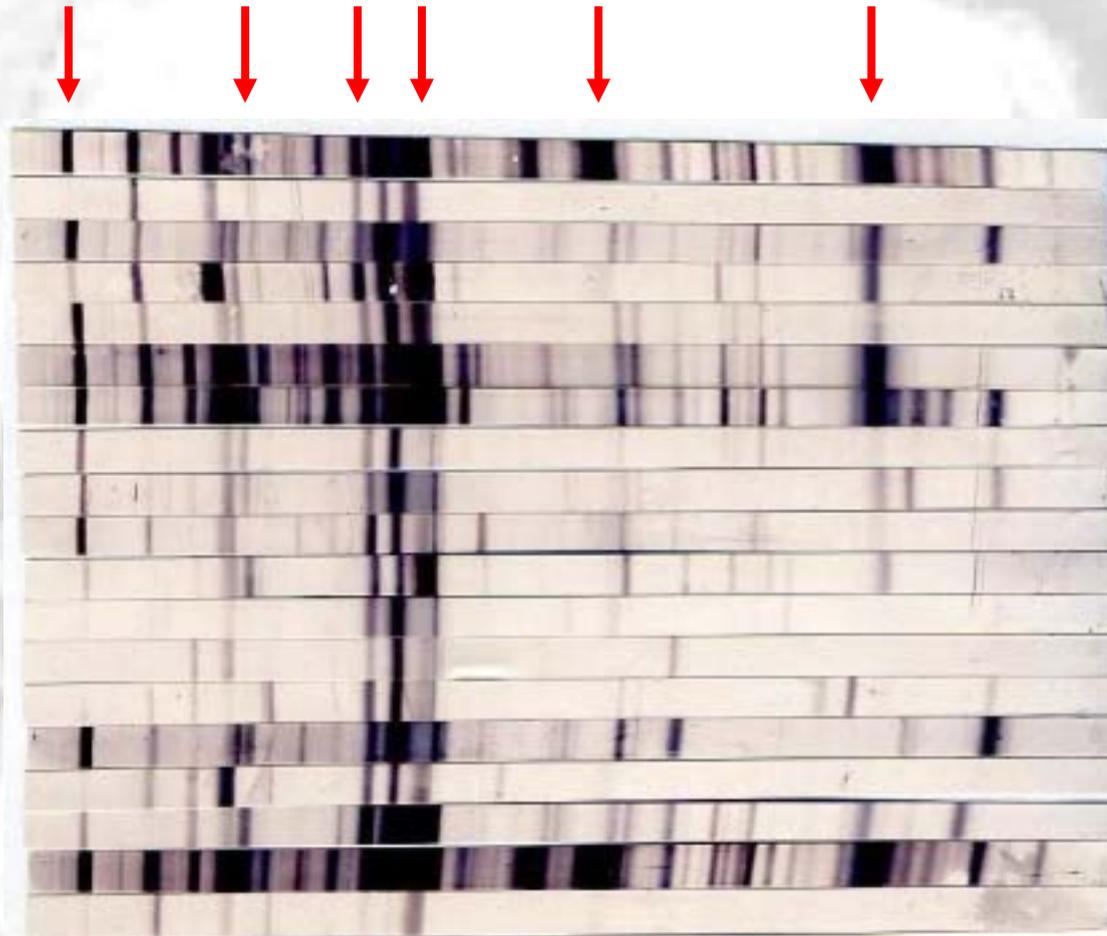
Dépistage

par EIA, tests sensibles pour la détection des IgG et des IgM ou Ig totaux. Utilisation d'antigènes d'extraits semi-purifiés d'une espèce ou mélange de borrelies

Confirmation

par immunoblots, tests spécifiques en IgG et IgM utilisant des antigènes de borrelies marqueurs d'infection

Western-blot



Antigènes de borrelies

- ✓ flagelline, p41 int flagelle
- ✓ OspC (23kD) membrane externe
- ✓ OspA (31kD) membrane externe
- ✓ BmpA, p39
- ✓ p100 (90 ou 83kD) membrane externe
- ✓ 56 - 58 kD
- ✓ 43 - 45 kD VlsE (?)
- ✓ VlsE recombinant
- ✓ DbpA Immunogène
- etc...

Sources des antigènes

- ✓ *Borrelia burdorferi*
- ✓ *Borrelia afzelii*
- ✓ *Borrelia garinii*
- ✓ *Borrelia valaisiana*
- ✓ *Borrelia spielmanii*
- ✓ *Borrelia lusitaniae*
- et ?

Erythèmes

- 🦋 stade précoce localisé
- 🦋 clinique fréquente et typique
- 🦋 forme atypique difficile
- 🦋 réponse humorale évolutive
- 🦋 fenêtre sérologique
- 🦋 dépistage IgM
- 🦋 confirmation rare



Sérologies de Lyme

Tests	EM
Ig totaux	40%
Capture IgM	41%
peptide C6 VlsE	45%
test IgG	52%
test IgG mod	40%
blot IgM	22%
blot IgG	<15%

Parésie faciale

- 🦋 stade précoce disséminé
- 🦋 pas rare et reconnaissable
- 🦋 origines multiples
- 🦋 différenciation enfant - adulte
- 🦋 réponse humorale évolutive
- 🦋 dépistage pas toujours positif
- 🦋 confirmation peu souvent



Production intrathécale

- ✓ Neuroborréliose du SNC
- ✓ Sérologie sur sérum et LCR prélevés en même temps
- ✓ Recherche des IgM et IgG spécifiques
- ✓ Dosage des IgG totaux ou de l'albumine
- ✓ Calcul de l'index de production intrathécale (PI)
- ✓ Mise en évidence par blot de bandes additionnelles dans le LCR

Lymphocytome

- 🦟 stade précoce disséminé
- 🦟 clinique évocatrice rare
- 🦟 réponse humorale développée
- 🦟 dépistage positif
- 🦟 confirmation fréquente



Arthrite Acrodermatite

- 🐛 stade tardif
- 🐛 clinique évocatrice
- 🐛 réponse humorale très forte
- 🐛 dépistage positif
- 🐛 confirmation positive



Sérologies de Lyme

Tests	EM	tardif
Ig totaux	40%	> 99%
Capture IgM	41%	< 5%
peptide C6 VlsE	45%	> 99%
test IgG	52%	> 99%
test IgG mod	40%	> 99%
blot IgM	22%	NA
blot IgG	<15%	> 99%

Relation entre les Antigènes et le stade de la Borréliose

OspC VlsE p39 DbpA p58 p83
Mix PKo



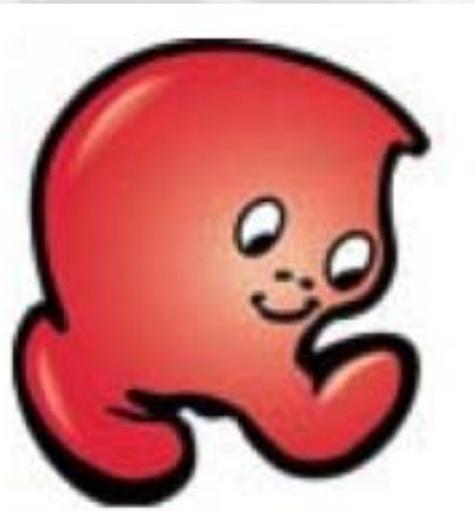
Donneurs de sang

- 🦟 bonne santé
- 🦟 sans clinique
- 🦟 pas sans contact avec
borrélie
- 🦟 réponse humorale de base
- 🦟 séroprévalence
- 🦟 spécificité
- 🦟 relativisation de la sérologie



Prévalence

- 🦋 endémicité, incidence
- 🦋 enfants vs personnes âgées
- 🦋 occupation, loisirs
- 🦋 métiers
- 🦋 contact des milieux à tiques
- 🦋 prévalence des borrélioses
- 🦋 écologie de la tique
- 🦋 écologie des hôtes
- 🦋 virulence des borrélioses



Sérologies de Lyme

Tests	EM	tardif	don
Ig totaux	40%	> 99%	12%
Capture IgM	41%	< 5%	7%
peptide C6 VlsE	45%	> 99%	12%
test IgG	52%	> 99%	37%
test IgG mod	40%	> 99%	14%
blot IgM	22%	NA	3%
blot IgG	<15%	> 99%	6%

Sérologies de Lyme

Tests	EM	tardif	don	spécif.
Ig totaux	40%	> 99%	12%	94%
Capture IgM	41%	< 5%	7%	92%
peptide C6 VlsE	45%	> 99%	12%	94%
test IgG	52%	> 99%	37%	72%
test IgG mod	40%	> 99%	14%	92%
blot IgM	22%	NA	3%	98%
blot IgG	<15%	> 99%	6%	94%

Séroconversions

Mise en évidence d'une réponse humorale spécifique à borrelies de Lyme

- Preuve de contact
- Pas preuve d'une maladie en absence de
clinique
- Souvent absence après antibiothérapie



Problèmes de la sérologie

- Séroprévalence élevée
- Séroconversion sans symptômes
- Sensibilité faible (ou tardive)
- Hétérogénéité des souches
- Antigènes utilisés
- Pléthore de tests pas toujours adéquat
- Réponse humorale maladie active

Nouveautés sérologiques

- 🦋 Suivi de la réponse humorale
 - Antigènes recombinants modifiés
 - issu de protéine VlsE
 - en IgM et IgG
 - Quantification en IgG
 - Lien avec l'évolution des symptômes de la
borréliose

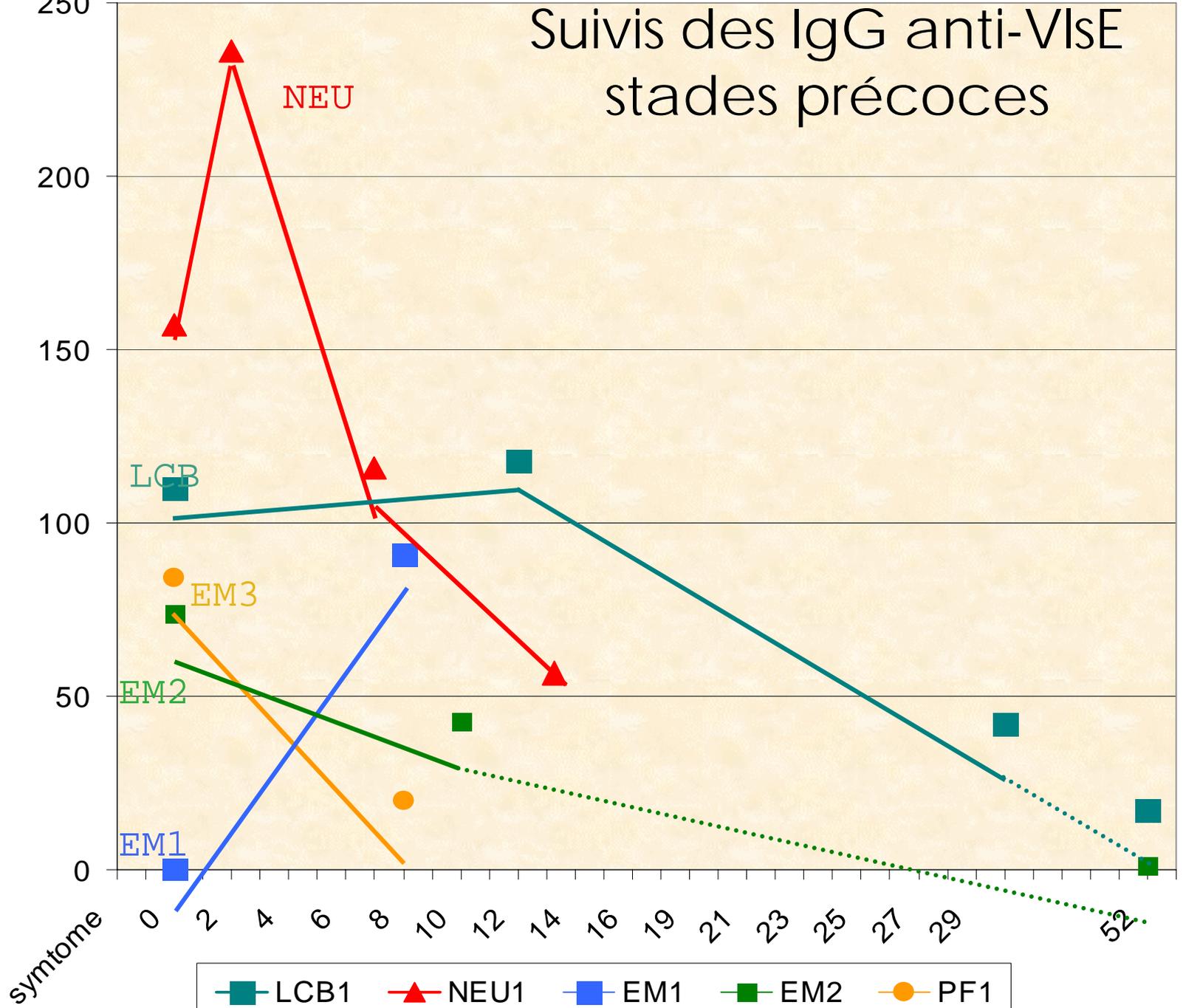
VlsE - Protein

- ✓ Vmp-like sequence Expressed
- ✓ Segment court de la protéine de surface externe
- ✓ bonne à très bonne sensibilité
- ✓ haute spécificité
- ✓ hautement antigénique
- ✓ forte variation en fonction du stade et évolution
- ✓ rapide diminution après traitement favorable

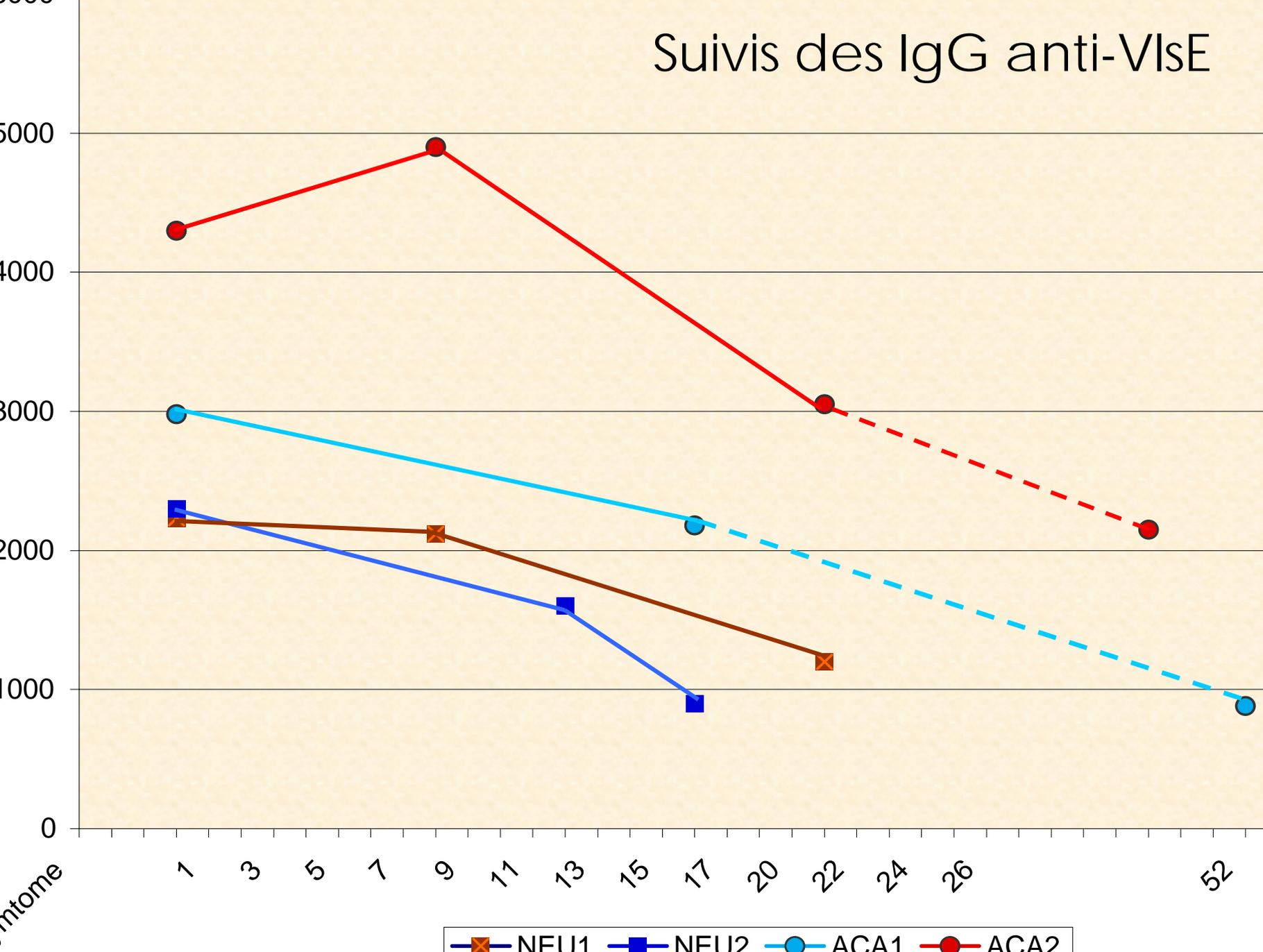
C₆-Peptide du VlsE

- ✓ IR6 = Invariable Region 6
- ✓ Région conservée et immunodominante
- ✓ C₆ = peptide synthétique de 26 aa
- ✓ EIA test en IgM+IgG
- ✓ Sensibilité élevée (60-100% selon stade)
- ✓ Spécificité très élevée (>95%)
- ✓ Séroprévalence région NE = 13% (!)

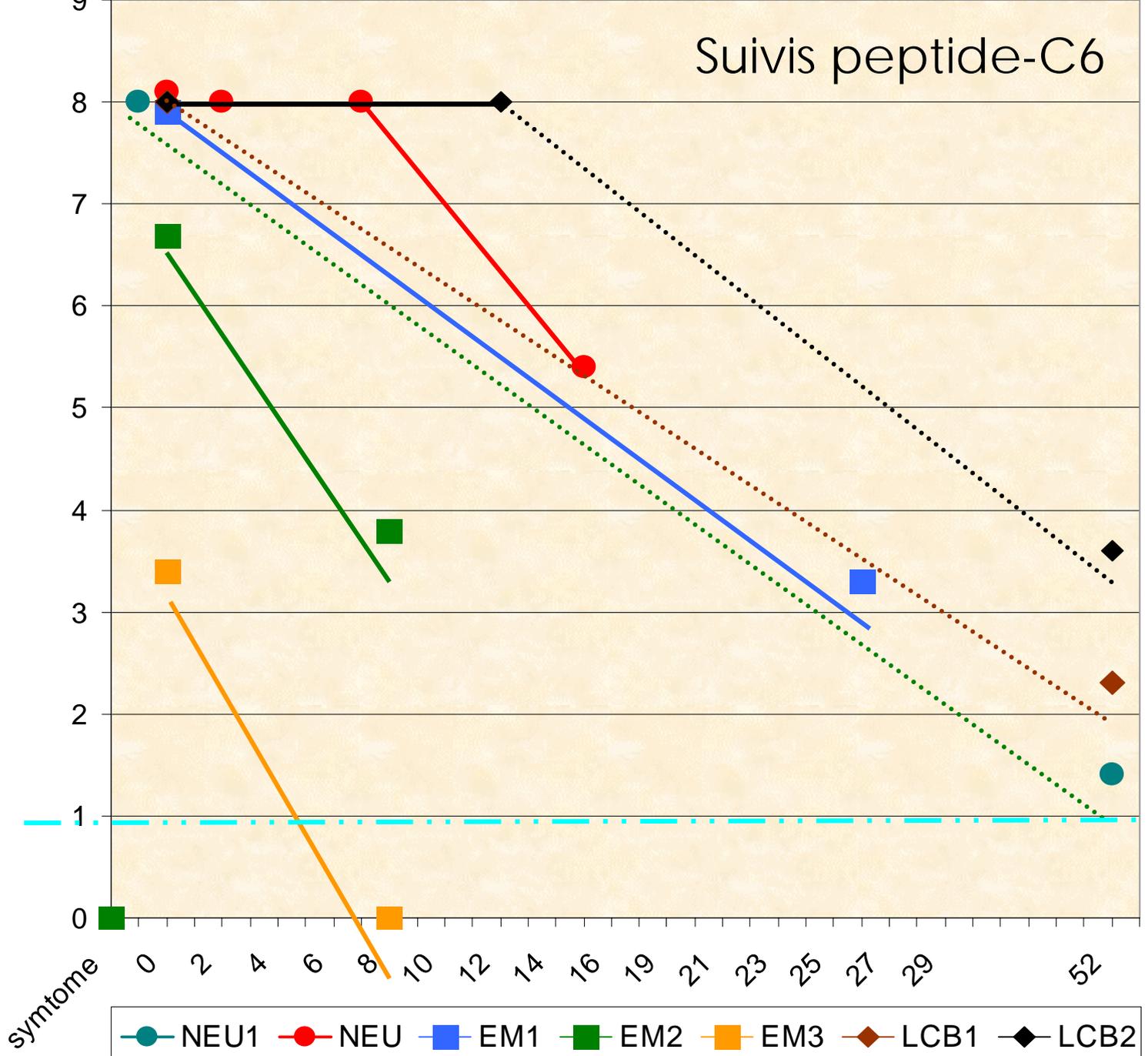
Suivis des IgG anti-VlsE stades précoces

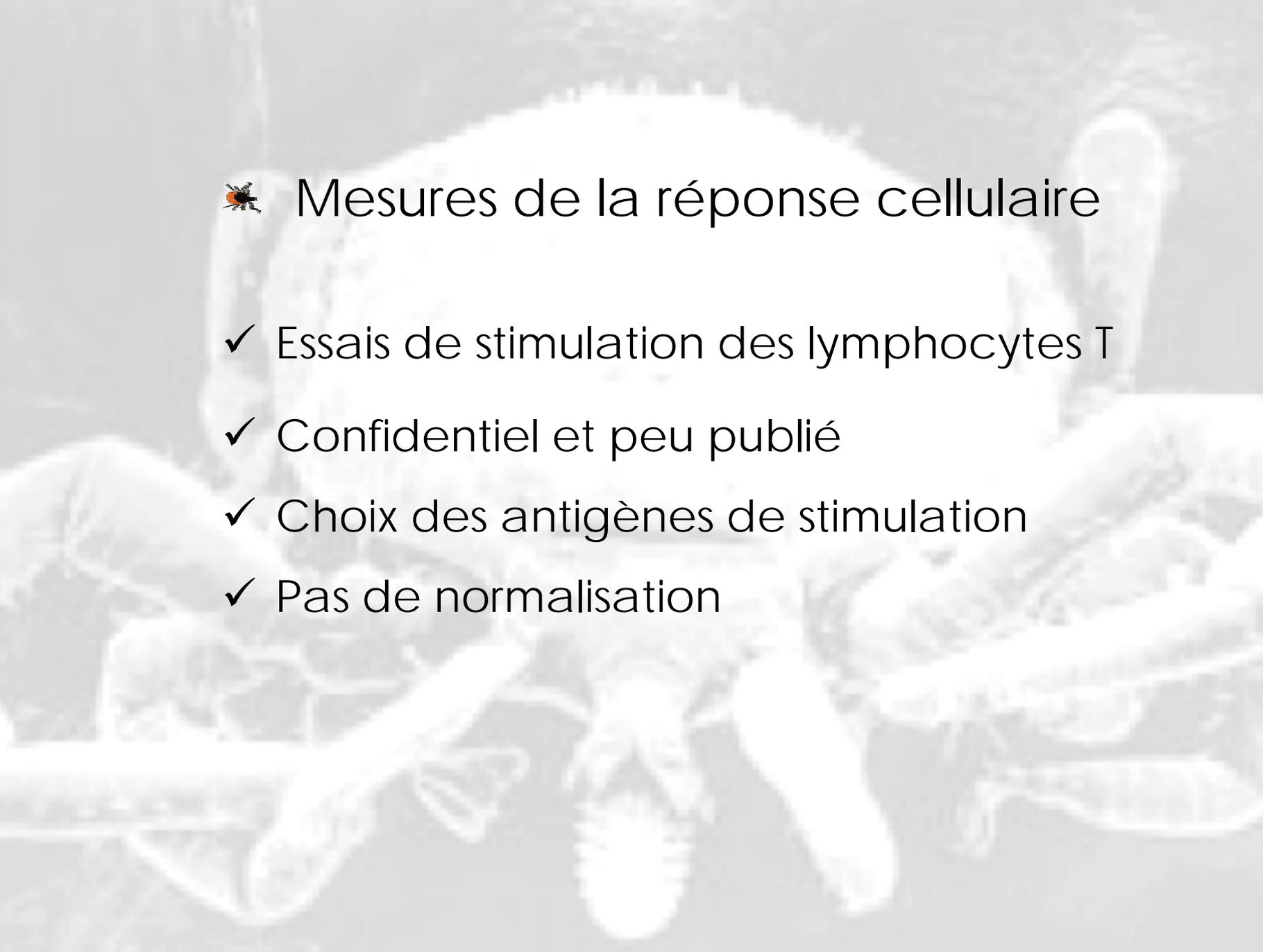


Suivis des IgG anti-VlsE



Suivis peptide-C6





🐛 Mesures de la réponse cellulaire

- ✓ Essais de stimulation des lymphocytes T
- ✓ Confidentiel et peu publié
- ✓ Choix des antigènes de stimulation
- ✓ Pas de normalisation

Diagnostic génomique

- ✓ Rares indications
- ✓ Preuve d'une infection généralement
- ✓ Sensibilité variables
- ✓ Multiplicité des cibles
- ✓ Multiplicité des génotypes
- ✓ Manque de normalisation

Indications

- ✓ **Biopsie de peau** permet la confirmation d' un EM, LCB ou ACA
sensibilité de 75 %
- ✓ **Liquide ou tissu synovial** pour Arthrite de Lyme
sensibilité de 65 - 85%
- ✓ **LCR** de neuroborréliose avec atteinte du SNC
sensibilité de < 20%

Ehrlichioses humaines

🐛 Anaplasmosse granulocytaire humaine

✓ *Anaplasma phagocytophilum*

✓ *Ixodes*

✓ env 50 cas décrit en Europe, présente aux USA

✓ EF, céphalées, thrombopénie,
lymphocytopénie

✓ intracellulaire des neutrophiles

✓ mortalité 0.5 %

Ehrlichioses humaines

🐛 Ehrlichiose monocyttaire humaine

- ✓ *Ehrlichia chaffeensis*
- ✓ *Amblyomma*
- ✓ Sud-Est des USA, mais absente en Europe
- ✓ EF, céphalées, thrombopénie, lymphocytopénie
- ✓ intracellulaire des monocytes, macrophages
- ✓ mortalité 2.7 %

Ehrlichioses humaines

🐛 Ehrlichiose granulocytaire humaine

- ✓ *Ehrlichia ewingii*
- ✓ *Amblyomma*
- ✓ 8 cas aux USA, absente en Europe
- ✓ EF, céphalées, thrombopénie, lymphocytopénie
- ✓ intracellulaire des monocytes, macrophages

Diagnostic des anaplasmoses humaines

- ✓ Observation minutieuse des frottis sanguins en phase aiguë de la maladie.
- ✓ Chercher la présence d'inclusions dans les neutrophiles ou monocytes (morulae)

Diagnostic direct des anaplasmoses humaines

- ✓ Phase aiguë de la maladie.
- ✓ Observation minutieuse des frottis sanguins colorés au Giemsa.
- ✓ Chercher la présence d'inclusions (morulae) dans les neutrophiles ou monocytes.
- ✓ Différenciation possible au type mais pas à l'espèce

Anaplasma phagocytophilum: morula



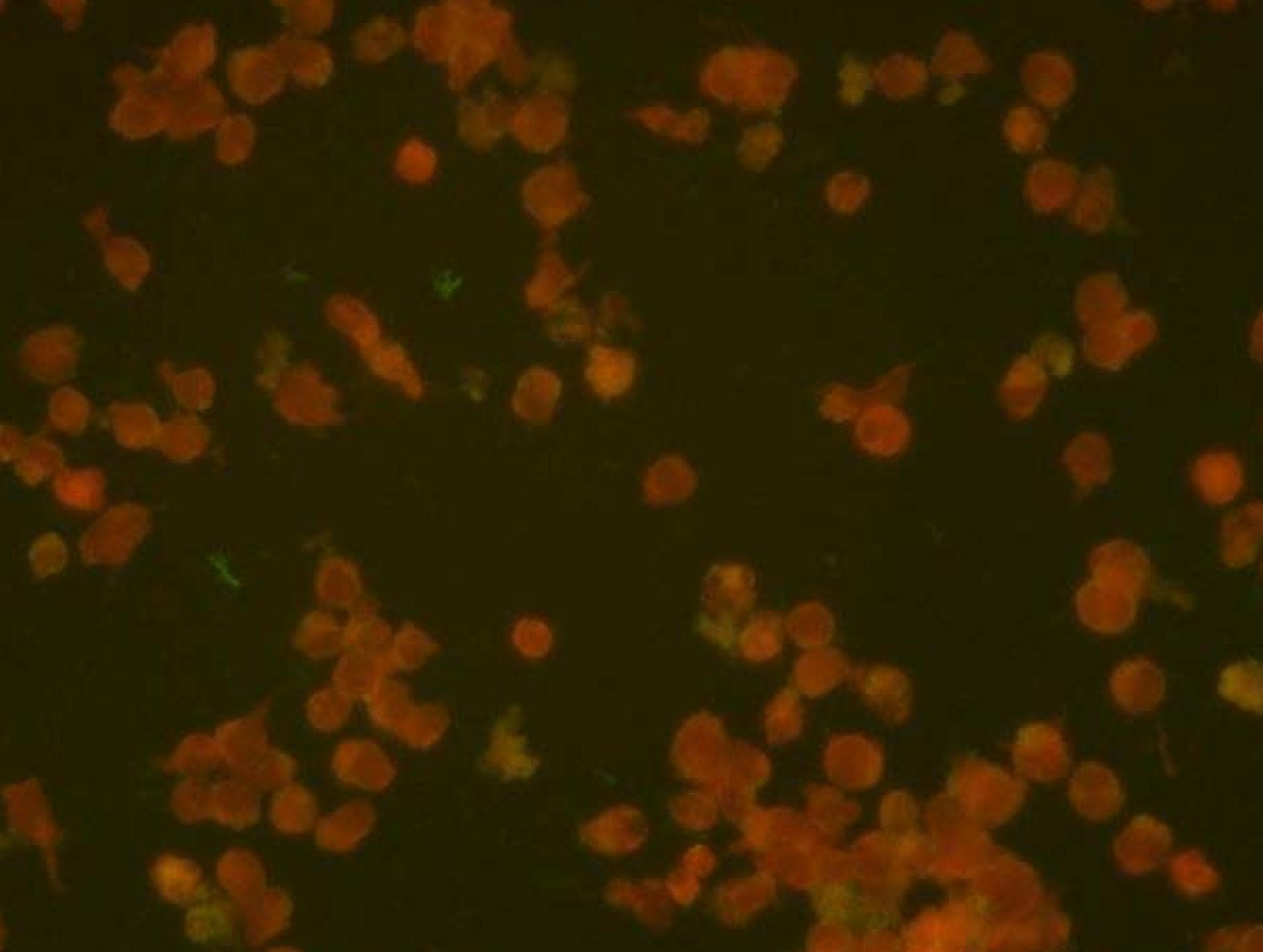


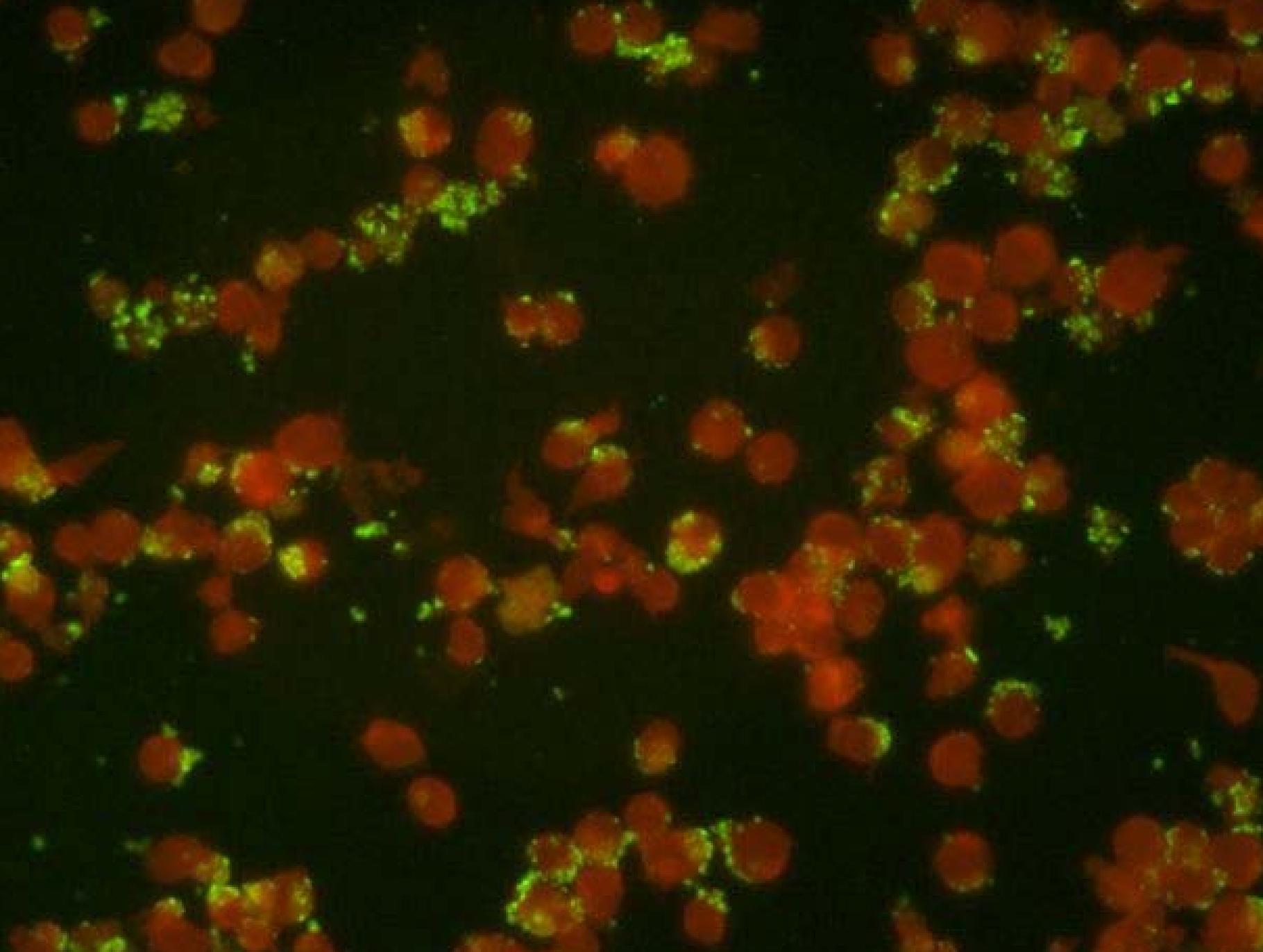
Diagnostic direct des anaplasmoses humaines

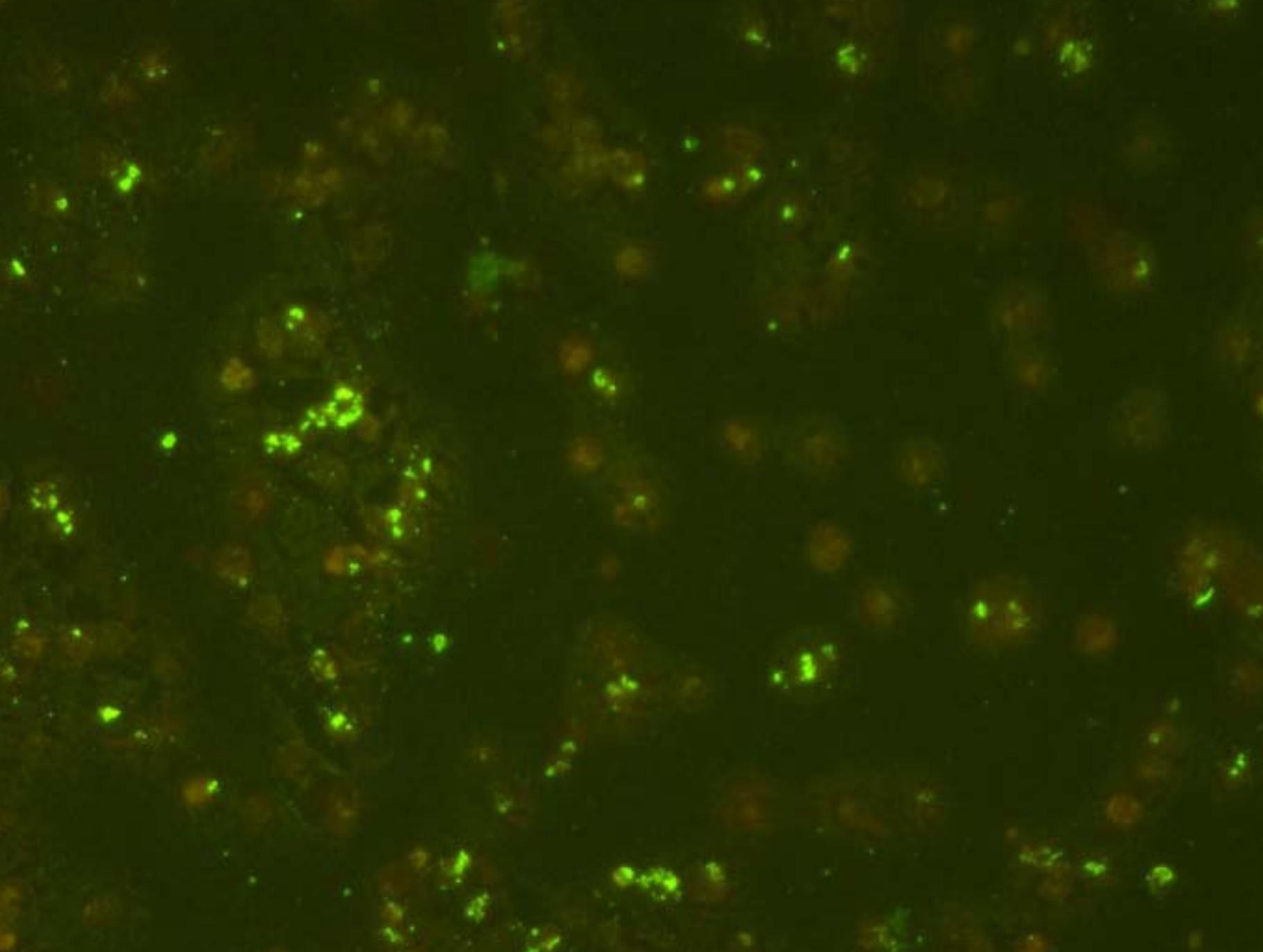
- ✓ Cet examen doit être complété par une PCR sur le sang complet ou Buffy coat pour l'identification de la bactérie intracellulaire.
- ✓ Inoculation en culture de cellules possible mais nécessite un laboratoire et du personnel spécialisés

Diagnostic indirect des anaplasmoses humaines

- ✓ Phase aiguë et convalescente de la maladie.
- ✓ 2ème sérum à 2-4 semaines après les symptômes
- ✓ *Anaplasma phagocytophilum* en culture de cellule
- ✓ IFI en IgG mais aussi possible en IgM
- ✓ Seuil à la dilution 1/64
- ✓ Mise en évidence de la séroconversion IgG







Sérologie *A.phagocytophilum*

Etudes 23 patients avec culture positive (JCM2000).

- ✓ Délai de séroconversion = 0 à 36 jours
- ✓ 95% obtiennent un titre $< 1/640$
- ✓ Titre maximal = $1/2'500$
- ✓ Pic obtenu après 7 j à 4 mois
- ✓ Pour 90% titre maximal à < 30 jours
- ✓ Séropositivité chez 50% des patients après 11 mois

Cas de transmission par transfusion 2007 (Canada)

Sérologie *A.phagocytophilum*

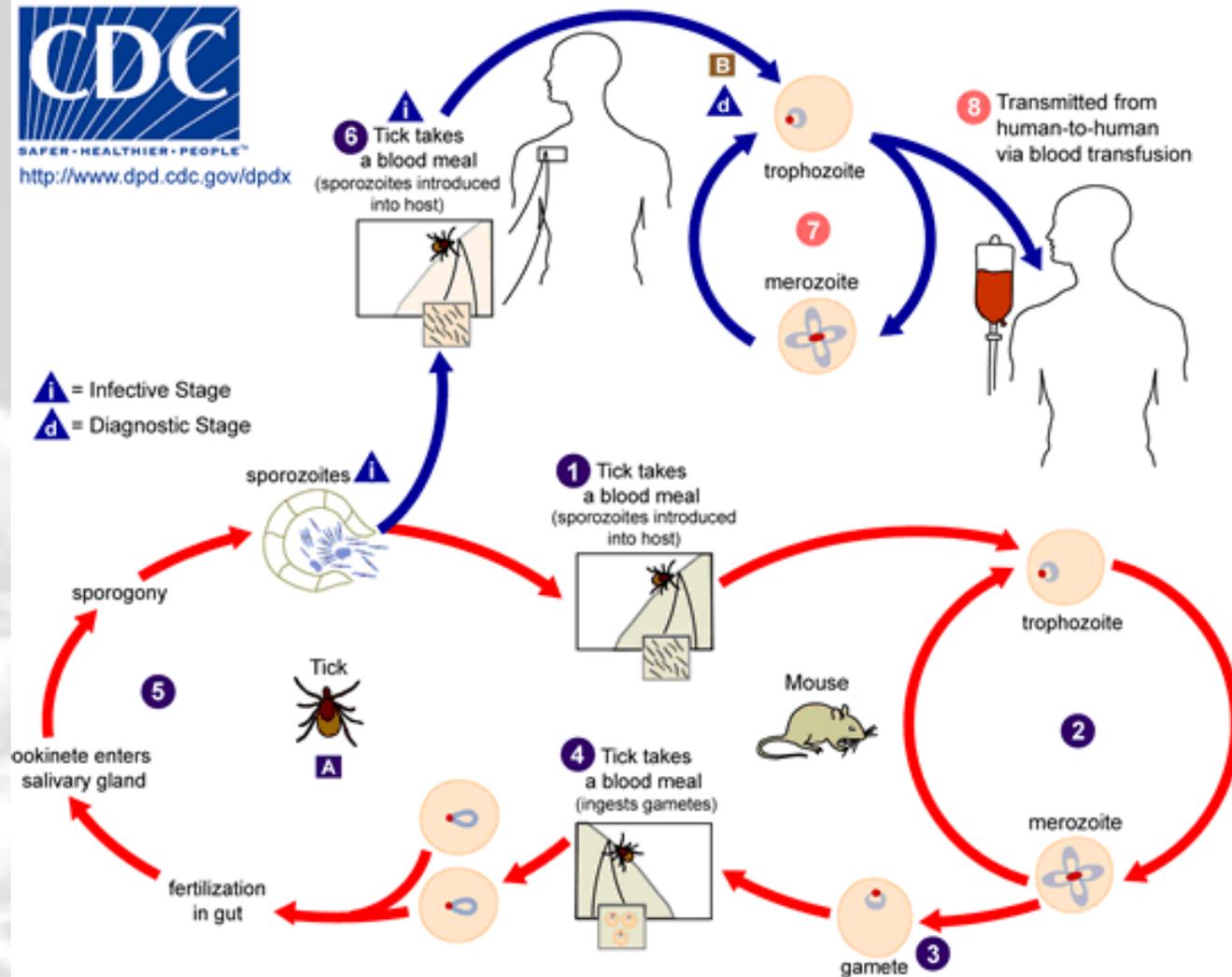
Littérature.

- ✓ 1er cas en Europe 1997
- ✓ Actuellement > 60 cas décrits
- ✓ Séroprévalences:
 - zone endémique (USA) 15 à 36 %
 - moyenne en Europe 6% (max.21%)
 - Neuchâtel (Lancet 1995) à 13 %

Travaux diplôme ECLM.

- ✓ Séroprévalence en région NE : 8 % (n=155)

Babésies



Babésioses humaines

Babesia

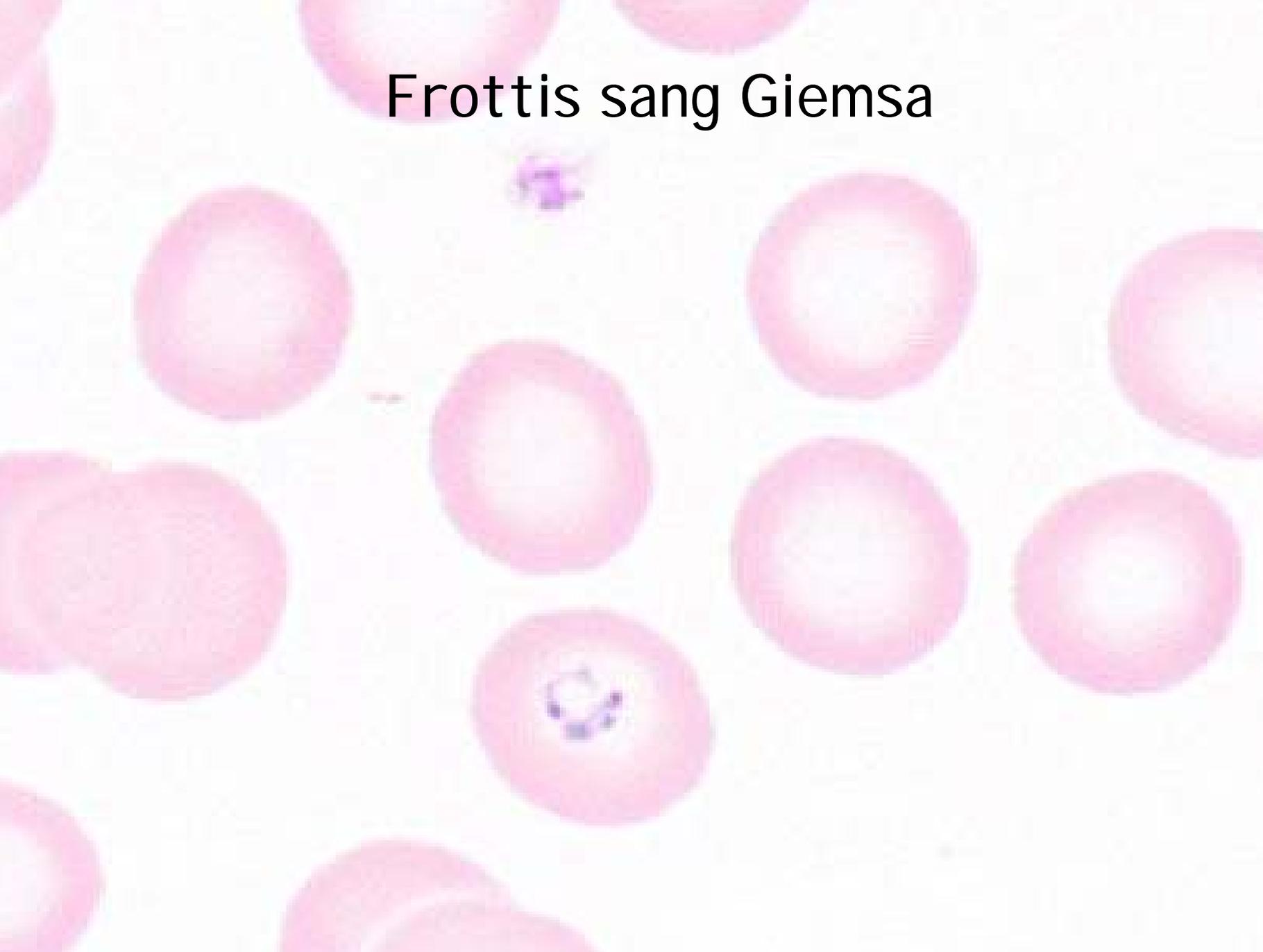
- ✓ *B. microti*, *B. divergens*,
+ souches WA1, MO1 et EU1
- ✓ En Europe rares cas, *B. divergens* chez patients splénectomisés
- ✓ Aux USA endémie locale *B. microti* tout patient
- ✓ EF, frissons, myalgies, fatigue, hépatosplénomégalie
- ✓ intracellulaire erythrocyte
- ✓ mortalité peut être très élevée
- ✓ Cas asymptomatiques

Diagnostic direct des babésioses

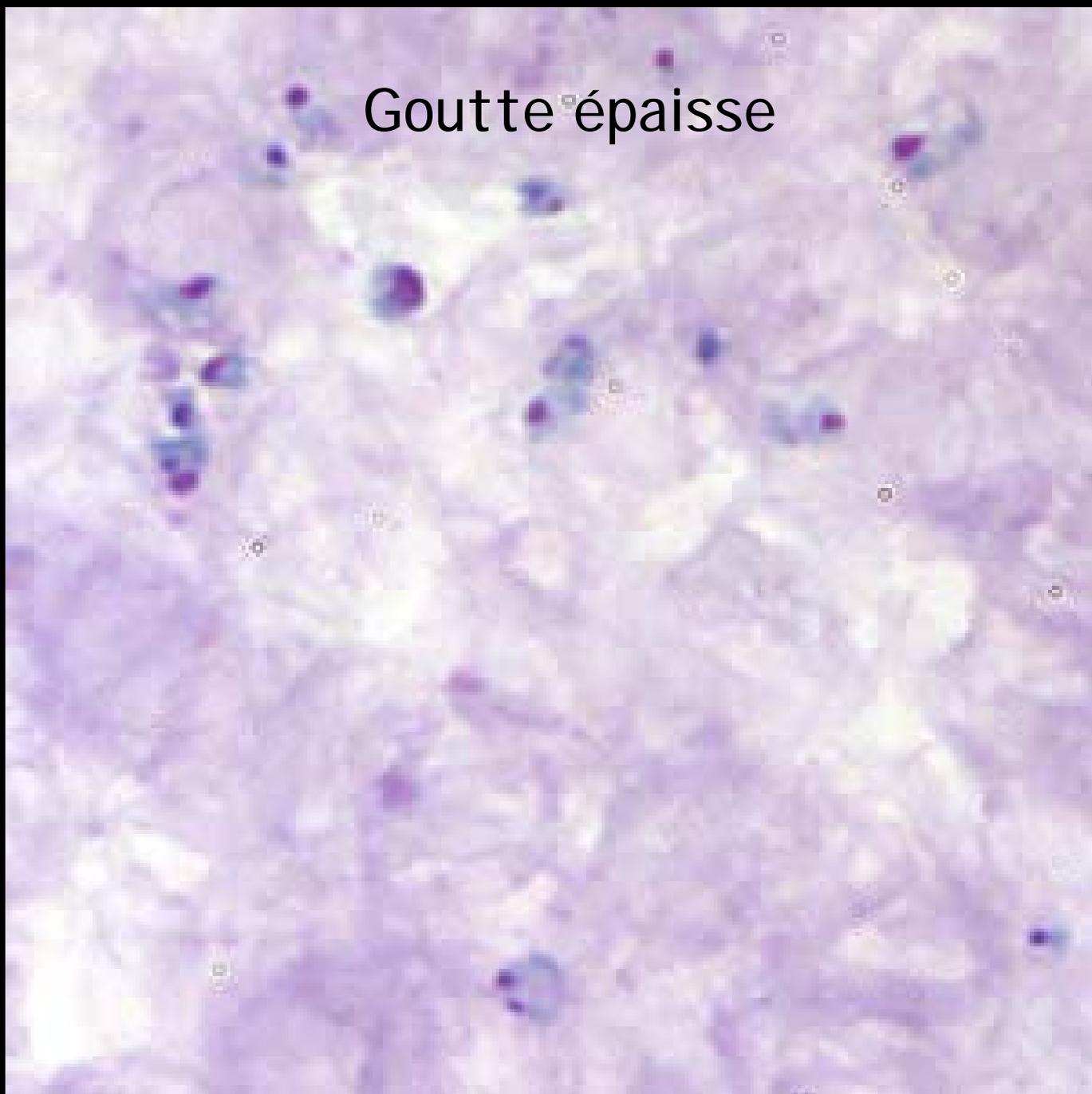
- ✓ Phase aiguë de la maladie.
- ✓ Observation des frottis sanguins colorés au Giemsa
- ✓ Observation de gouttes épaisses
- ✓ Présence de piroplasmes dans les érythrocytes
- ✓ Ressemble aux Plasmodium
- ✓ Mesure de la parasitémie



Frottis sang Giemsa

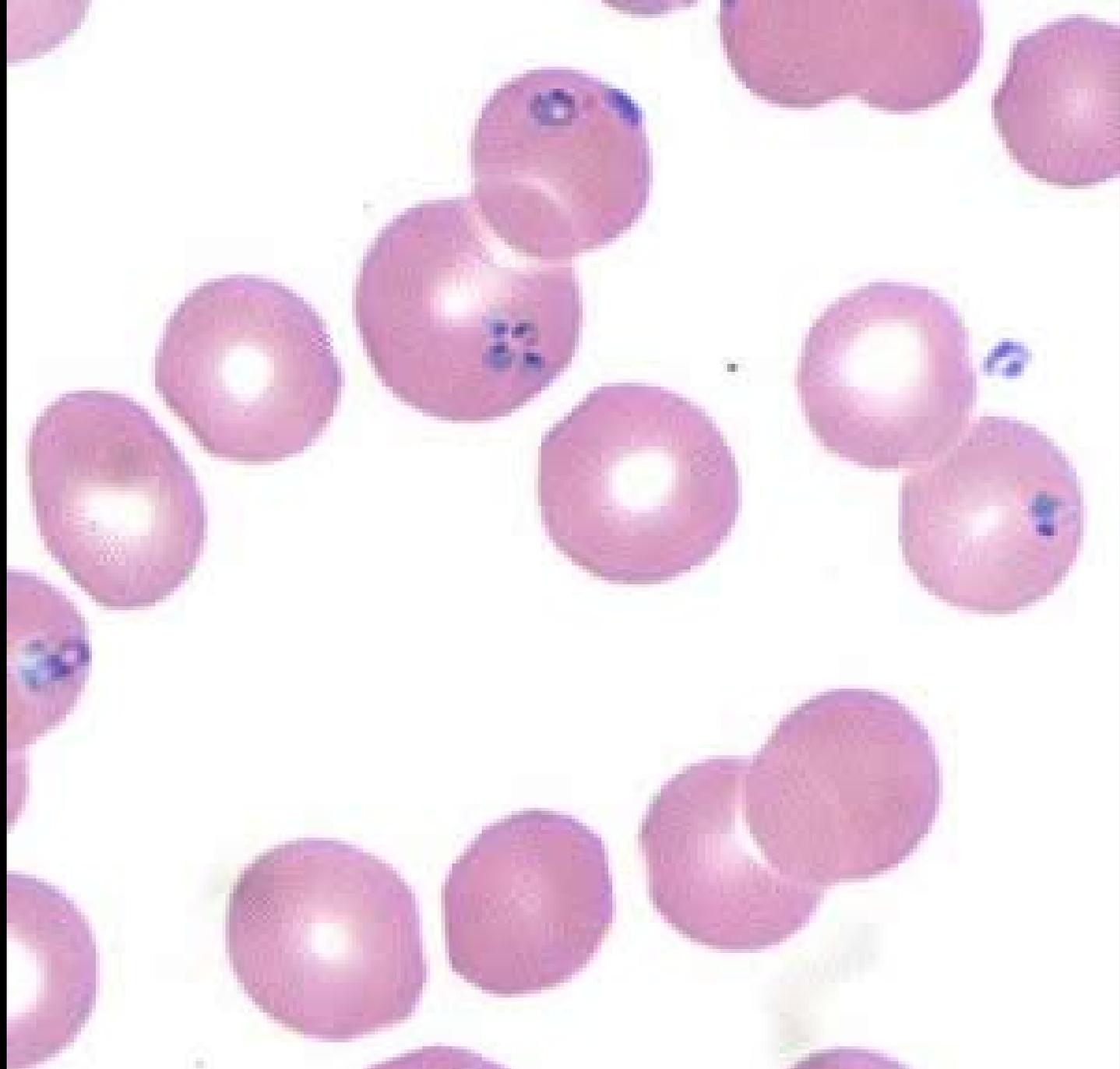


Goutte épaisse



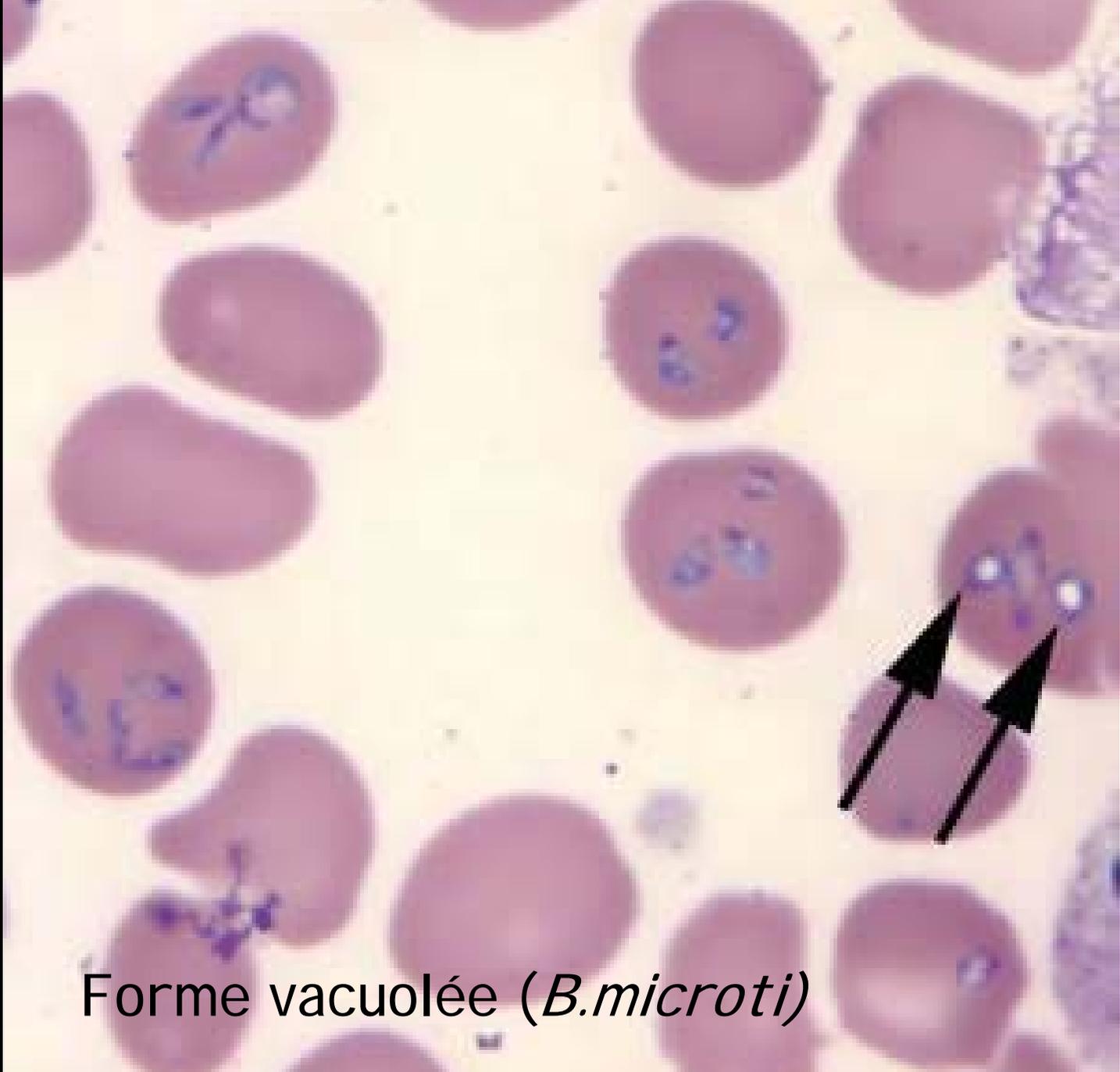


Forme en croix

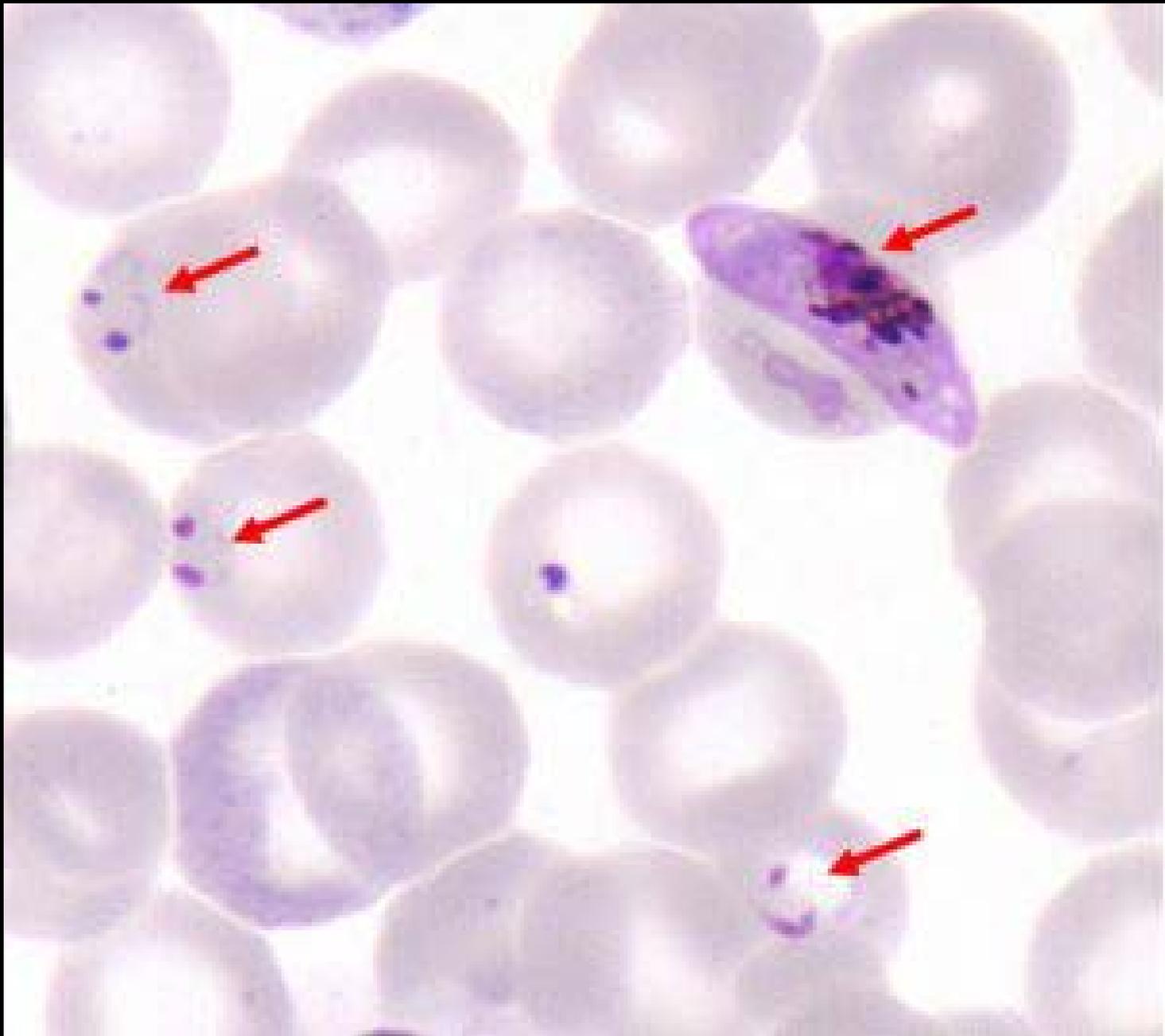




Formes extracellulaires



Forme vacuolée (*B. microti*)



Diagnostic direct des babésioses

- ✓ Culture de cellules en laboratoire spécialisé
- ✓ Différenciation au genre selon expérience
- ✓ Différenciation définitive seulement par PCR au genre ou espèce

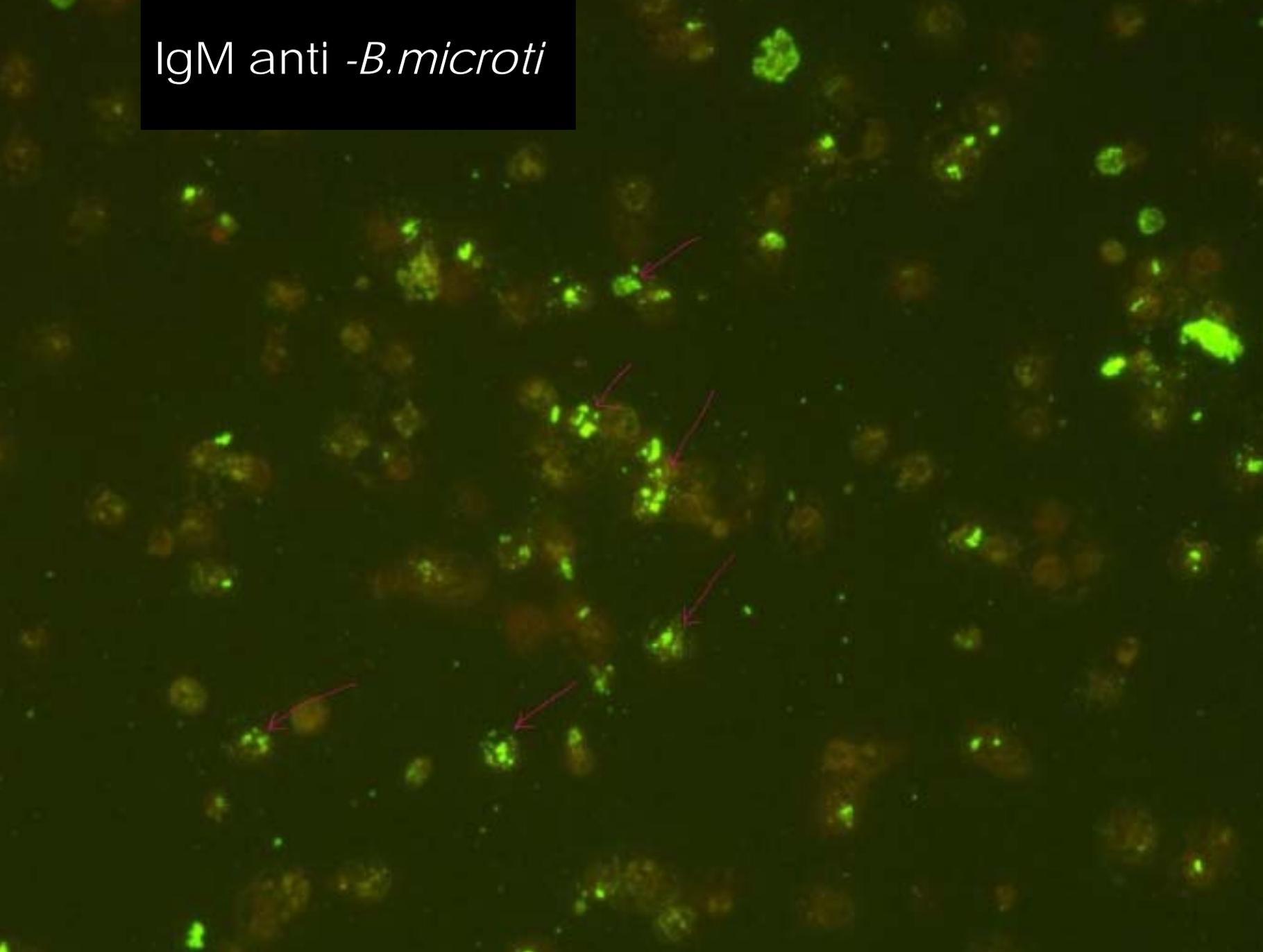
Diagnostic indirect des babésioses

- ✓ Phase aiguë et convalescente de la maladie.
- ✓ Indiquée si parasitémie faible
- ✓ Différenciation avec plasmodium
- ✓ Diagnostic rétrospectif après traitement

Diagnostic indirect des babésioses

- ✓ IF avec *B.microti* mais réactions croisées faibles ou inexistantes ! IF sur les autres souches utiles si nég.
- ✓ Titre à 1/1024 en 2 - 6 semaines
- ✓ Diminution en 6 mois (1/125), persistance possible
- ✓ Séroprévalence NE 1,5 % - Europe 2 - 8 %

IgM anti -*B. microti*



Fièvre d'origine inattendue

Dr M.Gallachi (SSMTP 08)



- ✓ Femme 67 ans secrétaire
- ✓ 3 semaines de fièvre, frissons, anémie, hépatopathie thrombocytopénie, leucopénie
- ✓ Labo: forme en anneau intra-érythrocytaire (1%) et test

rapide malaria négatif

- ✓ Voyage en Europe et 2,5 mois New-York

 Piquêre de tique



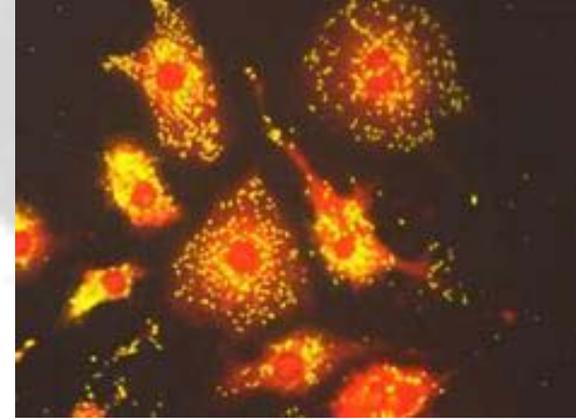
Rickettsias

R. conorii

1 μ m



Rickettsioses



Rickettsia conorii subsp *conorii*

Fièvre boutonneuse méditerranéenne
France, Italie, Espagne, Portugal, Grèce
Rhippicephalus sanguineus

R.slovaca

TIBOLA, DEBONEL

Europe Sud, France, Suisse, Slovaquie, ...

Dermacentor spp

Diagnostic biologique

🦋 Sérologie

IFI pour la recherche de IgM et IgG

Réponses IgM à 16 jours et IgG à 22 jours après le début des symptômes

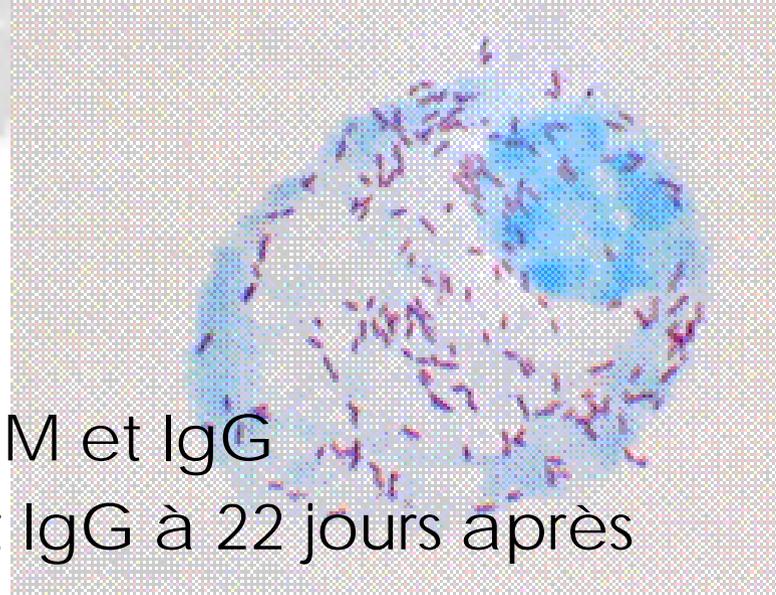
Réactions croisées fréquentes sur rickettsies

🦋 Coloration de Gimenez

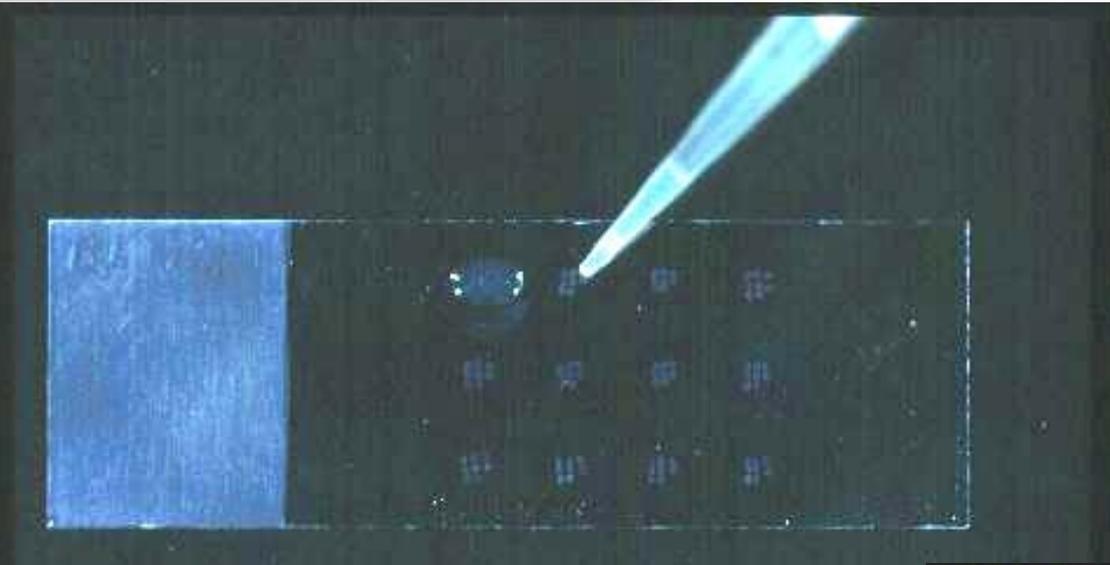
🦋 Détection par IF sur biopsies (BSL3)

🦋 Culture de biopsie ou sang (BSL3)

🦋 Diagnostic moléculaire



Microimmunofluorescence



O.Péter ICHV Sion



Rickettsia conorii

Critères bactériologiques

	points
Isolement de <i>Rickettsia conorii</i> dans des échantillons cliniques	25
Détection de <i>Rickettsia conorii</i> dans une biopsie cutanée par IF	25

Critères sérologiques

Sérum unique avec Ig totales > 1 : 128	5
Sérum unique avec IgG > 1 : 128 et IgM > 1 : 64	10
Augmentation de 2 dilutions des titres d'Ig dans l'Intervalle de semaines	20



Piqûres de tiques - Risques

 100 sérums dépistés pour la Lyme (2005)
avec 3 érythèmes migrants

16% sérologies positives

9% dépistages confirmés (WB)

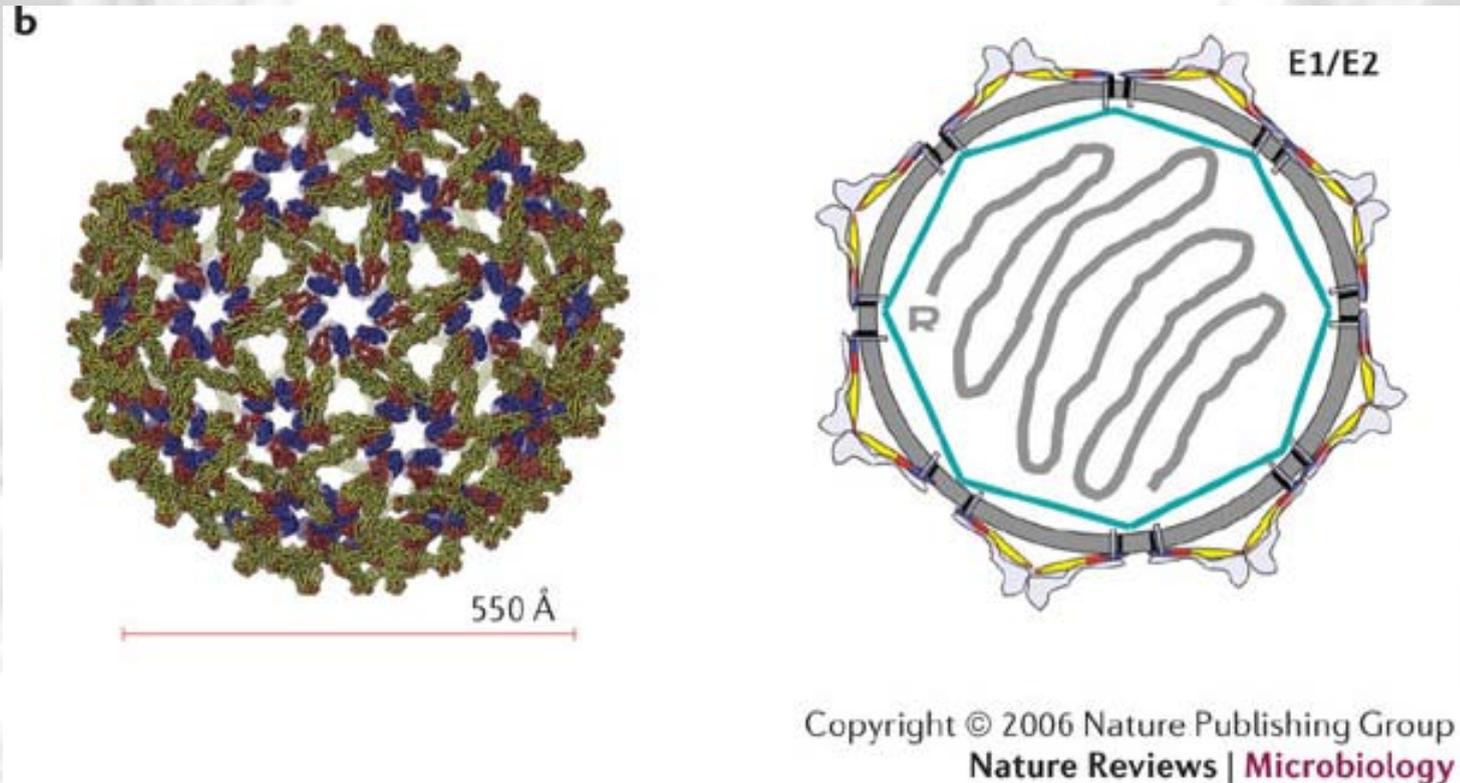
3% de séroconversions

- 1 seul EM avec séroconversion
- 2 EM séronégatives

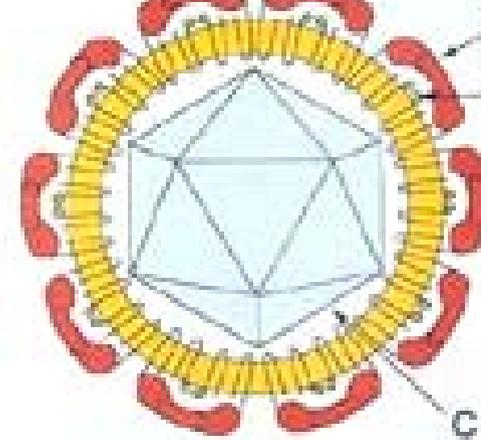
 Sur 474 personnes 14 EM avec sérologie

- 0 confirmé en WB
- 2 séroconversions

FSME – MEVE – TBE (Flavivirus)



FSME



- 🐛 Diagnostic sérologique exclusivement
- 🐛 Infection aiguë si les IgM sont positifs
- 🐛 Intervalle de 7-10 jours avant d'exclure FSME
- 🐛 Sérum suffisant pour un diagnostic
- 🐛 Sensibilité des IgM de $>98\%$
- 🐛 Spécificité selon présence d'autres IgM
- 🐛 Sensibilité des IgG $>98\%$

FSME

- 🐛 Réponse humorale dans le LCR rarement utile
- 🐛 Réactions croisées avec autres flaviviridés
- 🐛 Diagnostic moléculaire permet la différenciation, un diagnostic plus précoce et documentation chez patients vaccinés

Méningo-encéphalite

Diagnostic « interprété »

	2000	2001	2002
Encéphalite sans étiologie	971	871	1055
Encéphalite à herpès	121	154	62
Encéphalite à VZV	81	65	43
Encéphalite à arbovirus	10	22	24
Encéphalite à entérovirus	10	7	5
Rougeole compliquée d'encéphalite	3	4	5
Encéphalite à adénovirus	2	1	1
Méningoencéphalite listérienne	7	6	1
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2	3	2
Maladie de Lyme	1	1	1
autres	16	31	15
Total	1218	1165	1215

A. Mailles, InVS. 7èmes Journées internationales d'infectiologie. Bordeaux 8-9 mars 2005.



Merci pour
votre
attention

Etude NE piqûres de tiques

(D.Hügli pour une thèse chez Dr Lise Gern, Unine)
2003-05

- 🐛 Tique amenée chez médecin
- 🐛 Questionnaire
- 🐛 Sérologie faite à la piqûre de tique et 2 mois plus tard
- 🐛 Analyse des 2ème sérums
- 🐛 Reprise du sérum de contrôle en cas de positivité

Piqûres de tiques - Etude NE

- 🐛 474 personnes participantes
- 🐛 15 Erythèmes migrants
- 🐛 14 sérologies faite
- 🐛 0 confirmée positive en WB
- 🐛 2 séroconversions

Vecteur (CH)

- ✓ Borrelia
- ✓ Anaplasma
- ✓ Rickettsia
- ✓ Babesia
- ✓ Francisella
- ✓ Bartonella
- ✓ Virus (FSME - TBE)



Techniques moléculaires

- **Cibles des amorces**

ospA (plasmide)

ospB

fla protéines flagellaires

p66

recA

ARNr 16S

ARNr 23S

Intergenic spacer 5S/23S

Comparaison de tests sérologiques

	limite	positif	équivoque	négatif	n	sensibilité	prévalence	spécificité	n
idas ELFA	0.75-1.0	28	12	60	100	40.0%	88% NE05	92% NE05	100
apture IgM Dako	0.9	41	/	59	100	41.0%	92.3% NE05 93% CF05	92.3% NE05 95% CF05	194 100
6 Immunetics	0.100 - 0.120	45	0	55	100	45.0%	87.6% NE05	95% NE05	97
or M Genbio	100-150	27	16	57	100	43.0%	91% NE05 98% +	90.2% NE05 97.8% +	100
or M Rb biopharm	12 - 17	30	3	65	98	33.7%	90% NE05 95% +	90% NE05 95% +	100
or G Rb biopharm	10 - 14	46	6	47	99	52.5%	63% NE05 81% +	72% NE05 89 %	100
apture IgM Dako	0.9	41	/	59	100	41.0%	93% CF05	95% CF05	100
B IgM B.garini	5 points	20	/	69	89	22.5%	97% CF05	97% CF05	100
B IgM B.garini	4 points	30	/	59	89	33.7%	87% CF05	87% CF05	100

Sensibilité

- **Sang /EM** *B.b. sensu lato*
Europe 3 études 10% (4-100)
USA 3 études 18% (0-59)
B.b. sensu stricto
USA plasma 18%
- Sensibilité faible due à une spirochétémie transitoire absente (?) ou par la présence d'inhibiteurs
- Syndrome post-Lyme n=78 0%
- Dès 2000 (E-U et Europe) 35 - 50% !

Immunoblots

🐜 Colora

OspC VlsE p39 DbpA p58 p83



Limites

- Variabilité des espèces
 - Variabilité des souches
 - Choix approprié de la cible et des amorces
-
- Pas de corrélation claire avec activité de la maladie
 - Pas de suivi de traitement possible à court terme
 - Quantification hasardeuse
 - Faible sensibilité dans le sang vs meilleure par culture!

Conclusion

- La PCR n'est pas une technique de premier choix
- Méthode toujours invasive
- Le liquide et tissu synovial est l'indication majeure
- N'est pas obligatoirement un marqueur d'infection aiguë
- Analyse doit comprendre 2 cibles distinctes
- Ne peut remplacer la sérologie