

Agents pathogènes d'importance médicale et vétérinaire chez *Ixodes ricinus* en Suisse : infections et co-infections chez les tiques en quête et les tiques d'oiseaux

Thèse de doctorat présentée à la Faculté des Sciences

Institut de Biologie

Laboratoire d'éco-épidémiologie des parasites

Université de Neuchâtel



Pour l'obtention du grade de docteur ès sciences

par

Elena Lommano



Acceptée sur proposition du jury :

Dr Lise Gern, directrice de thèse (Université de Neuchâtel, Suisse)

Dr Maarten Voordouw (Université de Neuchâtel, Suisse), rapporteur

Dr méd. Charles Dvořák (spéc. FMH en médecine générale, Vallorbe, Suisse), rapporteur

Dr Karen D. McCoy (Université de Montpellier, France), rapporteur

Dr Nathalie Boulanger (Université de Strasbourg, France), rapporteur

Soutenue le 31 juillet 2012

Présentée publiquement le 14 septembre 2012

IMPRIMATUR POUR LA THESE**Agents pathogènes d'importance médicale et
vétérinaire chez *Ixodes ricinus* en Suisse :
infections et co-infections chez les tiques en
quête et les tiques d'oiseaux****Elena LOMMANO**

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du juryProf. Lise Gern, UniNe, directrice de thèse
Dr Maarten Voordouw, UniNe
Dr Karen D. McCoy, Centre IRD, Montpellier F
Dr Nathalie Boulanger, Université de Strasbourg F
Dr méd. Charles Dvorák, FMH en médecine générale, Vallorbe, CH

autorise l'impression de la présente thèse.



Neuchâtel, le 20 septembre 2012

Le doyen :
P. Kropf

"C'est en croyant aux roses qu'on les fait éclore."

Anatole France

RÉSUMÉ -----	5
ABSTRACT -----	6
Avant-propos -----	9
1 Introduction -----	11
1.1 <i>Le vecteur</i> -----	11
1.1.1 <i>Systématique</i> -----	11
1.1.2 <i>Morphologie</i> -----	12
1.1.3 <i>Habitat et cycle de vie</i> -----	13
1.1.4 <i>Un vecteur : la tique</i> -----	14
1.2 <i>Les agents pathogènes</i> -----	16
1.2.1 <i>Borrelia spp.</i> -----	16
1.2.1.1 <i>Systématique et morphologie</i> -----	16
1.2.1.2 <i>Maintenance du pathogène dans la nature</i> -----	18
1.2.1.3 <i>Distribution géographique et prévalence</i> -----	19
1.2.1.4 <i>Epidémiologie et manifestations cliniques</i> -----	20
1.2.2 <i>Rickettsia spp.</i> -----	21
1.2.2.1 <i>Systématique et morphologie</i> -----	21
1.2.2.2 <i>Maintenance du pathogène dans la nature</i> -----	22
1.2.2.3 <i>Distribution géographique et prévalence</i> -----	23
1.2.2.4 <i>Epidémiologie et manifestations cliniques</i> -----	24
1.2.3 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> -----	24
1.2.3.1 <i>Systématique et morphologie</i> -----	25
1.2.3.2 <i>Maintenance du pathogène dans la nature</i> -----	25
1.2.3.3 <i>Distribution géographique et prévalence</i> -----	26
1.2.3.4 <i>Epidémiologie et manifestations cliniques</i> -----	27
1.2.4 <i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i> -----	28
1.2.4.1 <i>Systématique et morphologie</i> -----	28
1.2.4.2 <i>Maintenance du pathogène dans la nature</i> -----	29
1.2.4.3 <i>Distribution géographique et prévalence</i> -----	30
1.2.4.4 <i>Epidémiologie et manifestations cliniques</i> -----	31
1.2.5 <i>Babesia spp.</i> -----	31
1.2.5.1 <i>Systématique et morphologie</i> -----	31
1.2.5.2 <i>Maintenance du protozoaire dans la nature</i> -----	32
1.2.5.3 <i>Distribution géographique et prévalence</i> -----	33
1.2.5.4 <i>Epidémiologie et manifestations cliniques</i> -----	34
1.2.6 <i>Virus de l'encéphalite à tique (TBEV)</i> -----	35
1.2.6.1 <i>Systématique et morphologie</i> -----	36
1.2.6.2 <i>Maintenance du virus dans la nature</i> -----	37
1.2.6.3 <i>Distribution géographique et prévalence</i> -----	39
1.2.6.4 <i>Epidémiologie et manifestations cliniques</i> -----	41
1.2.7 <i>Infections multiples</i> -----	42
1.3 <i>Objectifs de l'étude</i> -----	42

2	Matériel et méthodes	45
2.1	Récolte de tiques et zones d'étude	45
2.1.1	Récolte de tiques sur les oiseaux	45
2.1.1.1	<i>Oiseaux migrateurs</i>	45
2.1.1.2	<i>Oiseaux nicheurs</i>	46
2.1.2	Récolte de tiques libres	47
2.1.2.1	<i>Tiques libres pour la détection du TBEV</i>	47
2.1.2.2	<i>Tiques libres pour la détection de pathogènes émergents</i>	48
2.2	Extractions d'acides nucléiques	49
2.2.1	Extraction d'acides nucléiques totaux	49
2.2.2	Extraction d'ARN au TRIzol®	50
2.2.3	Extraction d'ADN au NH ₄ OH	50
2.3	Détection et identification des pathogènes	50
2.3.1	Principe de la PCR	51
2.3.2	Principe de la Reverse Line Blot (RLB)	52
2.3.3	Principe de la PCR en temps réel	53
2.3.4	Principe de RT-PCR en temps réel	54
2.3.5	Gènes ciblés pour la détection des pathogènes	54
2.3.5.1	<i>Borrelia spp.</i>	54
2.3.5.2	<i>Rickettsia spp.</i>	55
2.3.5.3	<i>Candidatus N. mikurensis</i>	55
2.3.5.4	<i>A. phagocytophilum</i>	55
2.3.5.5	<i>Babesia spp.</i>	58
2.3.5.6	<i>Virus TBE</i>	58
2.4	Analyses ADN et séquençage	58
2.4.1	Purification des produits PCR	59
2.4.2	Séquençage	59
2.4.3	Analyse et comparaison des séquences	59
2.4.4	Analyses phylogénétiques	59
2.4.5	Statistiques	60
3	Résultats	61
3.1	Publication 1	63
3.2	Publication 2	75
3.3	Publication 3	85
4	Discussion	123
5	Conclusion	137
6	Remerciements	139
7	Annexe 1 : Matériel et solutions	143
7.1	Extractions d'acides nucléiques totaux	143

7.1.1	Matériel	143
7.1.2	Solutions	143
7.2	Extraction d'ARN au TRIzol®	143
7.2.1	Matériel	143
7.2.2	Solutions	144
7.3	Extraction d'ADN au NH ₄ OH	144
7.4	Matériel pour les PCR, PCR en temps réel et RT-PCR en temps réel	144
7.4.1	Produits	144
7.4.2	Matériel	144
7.4.3	Solutions	145
7.5	Matériel pour les gels d'agarose	146
7.6	Matériel pour les purifications d'acides nucléiques	146
8	Annexe 2: Séquences nucléotidiques publiées dans Genbank	147
8.1	Séquences nucléotidiques publiées issues de tiques d'oiseaux	147
8.1.1	<i>A. phagocytophilum</i> groESL	147
8.1.2	<i>R. monacensis</i> 23S-5S	147
8.1.3	<i>Rickettsia</i> sp. gltA	147
8.2	Séquences nucléotidiques publiées issues de tiques libres	147
8.2.1	<i>A. phagocytophilum</i> groESL	147
8.2.2	<i>A. phagocytophilum</i> 16S	148
8.2.3	<i>R. monacensis</i> 23S-5S	148
8.2.4	<i>Candidatus</i> N. mikurensis 16S	148
8.2.5	Virus TBE NS5	148
9	Bibliographie	149

<i>Figure 1 : Morphologie externe des 3 stades d'I. ricinus.....</i>	<i>12</i>
<i>Figure 2: Distribution géographique de la tique I. ricinus.....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 3 : Cycle de développement d'I. ricinus.</i>	<i>14</i>
<i>Figure 4 : Phylogrammes basés sur le gène 16S et l'opéron groEL de souches de Candidatus N. mikurensis en relation avec d'autres membres de la famille des Anaplasmatacea.....</i>	<i>29</i>
<i>Figure 5 : Distribution géographique des deux vecteurs principaux du TBEV : I. ricinus en Europe et I. persulcatus en Extrême Orient.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 6 : Carte de distribution des zones endémiques (foyers) en Suisse.....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 7 : Sites de capture d'oiseaux migrateurs et nicheurs dans l'Ouest de la Suisse, leurs coordonnées géographiques suisses ainsi que les années de récolte.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 8 : Filets japonais utilisés pour capturer les oiseaux migrateurs au Col de Jaman (VD).</i>	<i>46</i>
<i>Figure 9 : Emplacement géographique des sites de récolte de tiques pour la recherche du TBEV.....</i>	<i>47</i>
<i>Figure 10: Emplacement géographique des sites de récolte de tiques libres pour la détection des pathogènes, leurs coordonnées suisses ainsi que l'année de récolte.....</i>	<i>49</i>
<i>Figure 11 : Trois types d'extraction ont été réalisés en fonction des différentes tiques récoltées.....</i>	<i>49</i>
<i>Figure 12 : Représentation schématique de la PCR.</i>	<i>52</i>
<i>Figure 13 : Principe de la RLB.....</i>	<i>53</i>
<i>Figure 14 : Principe de la technologie TaqMan.....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 16 : Zone d'étude, située dans la partie ouest du pays.....</i>	<i>124</i>

Mots clés : *Ixodes ricinus*, Suisse, pathogènes, oiseaux, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp., virus de l'encéphalite à tiques, FSME, prévalence.

Keywords : *Ixodes ricinus*, Switzerland, tick-borne pathogens, birds, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp., tick-borne encephalitis virus, prevalence.

RÉSUMÉ

Dans les régions tempérées de l'hémisphère nord, les tiques représentent le premier vecteur d'agents infectieux d'importance médicale et vétérinaire. Parmi elles, *Ixodes ricinus*, abondante en Europe, transmet bon nombre de microorganismes aux Hommes et aux animaux, aussi bien des bactéries, des virus, que des protozoaires, pour la plupart responsables de zoonoses considérées comme émergentes. Ces microorganismes sont *Borrelia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., *Babesia* spp. ou encore le virus de l'encéphalite à tique (TBEV). Depuis les années 80', plus d'une dizaine d'agents pathogènes pour l'Homme ont été découverts dans les tiques en Europe. En Suisse, de nouvelles espèces comme *Babesia venatorum*, *Rickettsia monacensis*, *Borrelia miyamotoi* ou *B. spielmanii* ont fait leur apparition durant la dernière décennie. De plus, un cas de septicémie dû à *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, une bactérie transmise par *I. ricinus*, a récemment été signalé chez un homme résident en Suisse, sans que la bactérie n'ait jamais été décrite dans les tiques du pays. Face à l'émergence de ces pathogènes, nous avons évalué leur distribution géographique ainsi que leur prévalence dans les tiques dans l'Ouest de la Suisse afin d'identifier les zones à risque. Nous avons recherché *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* et *Candidatus N. mikurensis* dans les tiques en quête récoltées dans 11 sites. Globalement, 34.2% (505/1'476) des tiques étaient infectées par au moins un pathogène. *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp. et *Candidatus N. mikurensis* étaient présents dans tous les sites investigués avec des prévalences de 22.5%, 10.2% et 6.4%, respectivement. A l'inverse, *Babesia* spp. et *A. phagocytophilum* ont démontré une répartition géographique plus restreinte et une prévalence plus faible (1.9% et 1.5%). Des co-infections, impliquant le plus souvent *Borrelia* spp. et *Rickettsia helvetica*, ont été détectées dans 19.6% des tiques infectées. Nous avons identifié *Candidatus N. mikurensis* pour la première fois dans les tiques sur le territoire helvétique ainsi que des espèces rarement signalées comme *R. monacensis*, *B. lusitaniae* et *B. spielmanii*.

En Suisse, ces dernières années, des cas humains d'encéphalite à tiques ont été déclarés hors du périmètre qui délimitait les foyers de TBEV jusque-là, dans l'Ouest du pays. Ainsi, à partir des années 2'000, de nouvelles zones endémiques au TBEV ont été répertoriées dans cette région. Nous avons confirmé la présence du TBEV dans les tiques libres dans l'une de ces nouvelles zones endémiques au virus, la Plaine de l'Orbe avec une prévalence globale de 0.1% (6/6'120). Parmi les cinq foyers

identifiés, la prévalence du virus variait de 0.21 à 0.95. La diversité génétique des souches virales nous laisse supposer que les oiseaux pourraient être impliqués dans l'émergence de ces foyers, probablement par la dissémination de tiques infectées dans des milieux propices. Pour valider cette hypothèse et estimer l'éventail des pathogènes disséminés par les oiseaux, 1'205 tiques récoltées sur ces hôtes vertébrés ont été analysées. Cinq pathogènes de genres différents ont été détectés dans les tiques d'oiseaux. Le plus fréquent est *Borrelia* spp. (19.5%), suivi de *Rickettsia* spp. (12.3%), *A. phagocytophilum* (2%), *Candidatus N. mikurensis* (3.3%) et du TBEV (0.2%). L'identification du TBEV dans deux larves et une nymphe fixées sur des oiseaux migrateurs (deux rouges-gorges et un merle noir) étaié notre hypothèse de l'implication des oiseaux dans l'émergence de foyers de TBEV dans l'Ouest de la Suisse. Par ailleurs, cette étude constitue un des premiers rapports de *Candidatus N. mikurensis* dans les tiques d'oiseaux et montre que plusieurs espèces de passereaux, dont le merle noir, sont impliquées dans les cycles de transmission de ces microorganismes. Nos résultats mettent en relief la circulation et co-circulation d'agents pathogènes d'importance médicale et vétérinaire dans les tiques en Suisse et l'implication des oiseaux dans le maintien de certains de ces pathogènes.

ABSTRACT

In temperate regions of the northern hemisphere, ticks are considered as the primary vector of infectious agents of human and medical relevance. Among them, *Ixodes ricinus* is the most abundant in Europe. This tick species transmits to humans and animals many microorganisms that may cause zoonoses, including bacteria, viruses and protozoa like, for example, *Borrelia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., *Babesia* spp. or the TBE virus (TBEV). In Europe since the 80s, more than 10 human pathogenic agents have been described in ticks. In Switzerland, new pathogen species like *Babesia venatorum*, *Rickettsia monacensis*, *Borrelia miyamotoi* or *B. spielmanii* appeared recently. Moreover, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, transmitted by *I. ricinus* ticks, was detected in the blood of one man with signs of septicemia in Switzerland whereas this bacterium had never been described in ticks in the country before. In this context, our aim was to evaluate the geographic distribution and prevalence of tick-borne pathogens in order to identify risk areas in western Switzerland. Therefore, we prospected the presence of *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* and *Candidatus N. mikurensis* in ticks collected at 11 sites. Globally, 34.2% (505/1'476) of ticks were infected with at least one pathogen. *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp. and *Candidatus N. mikurensis* were present at all investigated sites with prevalences of 22.5%, 10.2% and 6.4%, respectively. Conversely, *Babesia* spp. and *A. phagocytophilum* had smaller geographical ranges and lower prevalence rates (1.9% and 1.5%). Co-infections, involving mostly *Borrelia* spp. and

Rickettsia helvetica, were detected in 19.6% of infected ticks. We identified *Candidatus N. mikurensis* for the first time in ticks in Switzerland as well as species rarely reported like *R. monacensis*, *B. lusitaniae* and *B. spielmanii*.

In Switzerland, over the last years, human TBE cases have been reported in the West of the country, outside a perimeter that included all TBEV foci until then. Thus, since the early 2000s, new TBE endemic areas were recognised in this region. Our results confirmed the presence of TBEV in ticks in one of these new endemic areas, the Plaine de l'Orbe, with a global prevalence of 0.1% (6/6'120). In this area, five foci were identified with TBEV prevalence values ranging from 0.21 to 0.95. The genetic diversity of the virus circulating in this endemic area led us suggest that birds were implicated in the emergence of these new TBEV foci, probably by disseminating infected ticks in environments favourable to the maintenance of TBEV foci. To test this hypothesis and evaluate the diversity of tick-borne pathogens that can be disseminated by birds, 1'205 bird-feeding ticks were analysed. Five pathogens of different genera were detected; *Borrelia* spp. was the most frequent (19.5%), followed by *Rickettsia* spp. (12.3%), *A. phagocytophilum* (2%), *Candidatus N. mikurensis* (3.3%) and TBEV (0.2%). The identification of TBEV in two larvae et one nymph feeding on migrating birds (two European robins and one blackbird) support our hypothesis on the implication of birds in the emergence of TBEV foci in western Switzerland. In addition, our study is one of the first reports on *Candidatus N. mikurensis* in bird-feeding ticks and shows that several passerines, including the blackbird, are implicated in the transmission cycles of these microorganisms. Our results highlight the circulation and co-circulation of tick-borne pathogens of medical and veterinary importance in ticks in Switzerland and the implication of birds in the maintenance of some of them in nature.

AVANT-PROPOS

Les tiques sont considérées comme le deuxième plus important vecteur d'agents pathogènes humains au monde, juste après les moustiques (Heyman et al. 2010). Dans les régions tempérées, elles représentent même le premier vecteur d'agents infectieux (Capelli et al. 2012). En Europe, parmi la trentaine de tiques présentes, *Ixodes ricinus* est la plus abondante et répandue. Elle transmet bon nombre de microorganismes dangereux pour l'Homme et les animaux, parmi lesquels des bactéries, des protozoaires et des virus. La plupart des maladies causées par ces microorganismes sont actuellement considérées comme émergentes. A titre d'exemple, depuis les années 80', plus d'une dizaine d'agents pathogènes pour l'Homme ont été découverts en Europe (Parola et Raoult 2001). En Suisse, durant la dernière décennie, de nouvelles espèces ont été décrites dans les tiques, à l'image de *B. venatorum*, *R. monacensis* et *B. spielmanii* (Casati et al. 2006b, Boretti et al. 2009, Gern et al. 2010b). Une autre, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, a été identifiée comme agent causal d'une septicémie chez un Homme résidant en Suisse (Fehr et al. 2010), sans que ce pathogène n'ait été jamais décrit dans les tiques du pays. Parallèlement, le virus TBE, longtemps confiné au Nord-Est de la Suisse, semble avoir amorcé une progression vers l'Ouest et le Sud (de Vallière et al. 2006, Gäumann et al. 2010), probablement par le biais d'oiseaux migrateurs transportant des tiques infectées. C'est dans ce contexte que s'insère notre étude. Elle vise à améliorer la connaissance de ces pathogènes dans l'Ouest de la Suisse, puisque mis-à-part *Borrelia*, ils ont été peu étudiés. De plus, le rôle des oiseaux comme hôtes réservoirs de ces pathogènes est pour la plupart méconnu. L'étude de la relation hôte-vecteur-pathogène constitue donc un point de départ pour une meilleure compréhension de ces zoonoses.

1 INTRODUCTION

1.1 Le vecteur

1.1.1 Systématique

Les tiques sont des ectoparasites obligatoires, se nourrissant du sang des vertébrés, en particulier de celui des mammifères, oiseaux et reptiles. Ce sont des arachnides qui appartiennent à l'ordre des Acariens (Tableau 1).

Actuellement, 896 espèces de tiques sont regroupées en trois familles: *Ixodidae* (ou tiques dures, 702 espèces), *Argasidae* (ou tiques molles, 193 espèces) et *Nuttalliellidae* (1 espèce) (Guglielmone et al. 2010) (Tableau 1). La famille des *Ixodidae* est la plus importante au vu du nombre d'espèces comprises et de leur importance médicale et vétérinaire (Oliver 1989). La famille des *Nuttalliellidae* est représentée par une seule espèce, confinée à l'Afrique du Sud.

Embranchement	<i>Arthropoda</i>		
Classe	<i>Chelicerata</i>		
Sous-classe	<i>Arachnida</i>		
Ordre	<i>Acari</i>		
Sous-ordre	<i>Ixodida</i>		
Famille	<i>Ixodidae</i>	<i>Argasidae</i>	<i>Nuttalliellidae</i>
Genres	<i>Ixodes</i> (243 espèces)	<i>Argas</i>	<i>Nuttalliella</i>
	<i>Amblyomma</i>	<i>Carios</i>	
	<i>Anomalohimalaya</i>	<i>Ornithodoros</i>	
	<i>Bothriocroton</i>	<i>Otobius</i>	
	<i>Cosmiomma</i>		
	<i>Cornupalpum</i>		
	<i>Dermacentor</i>		
	<i>Haemaphysalis</i>		
	<i>Hyalomma</i>		
	<i>Margaropus</i>		
	<i>Nosomma</i>		
	<i>Rhipicentor</i>		
	<i>Rhipicephalus</i>		

Tableau 1 : Systématique des tiques selon Hoogstraal et Aeschlimann (1982), modifié d'après Barker et Murrell (2004) et Guglielmone et al. (2010).

1.1.2 Morphologie

Les tiques sont des acariens de grande taille. Les larves sont hexapodes et les nymphes et adultes possèdent 8 pattes (Figure 1). La taille des tiques appartenant à la famille des *Ixodidae* varie selon le stade de développement. A titre d'exemple, la larve d'*I. ricinus* mesure, à jeun, 0.6 à 1mm alors que la taille d'une femelle peut atteindre 3 à 4mm. Les mâles sont plus petits que les femelles.



Figure 1 : Morphologie externe des 3 stades d'*I. ricinus*.
En haut : à gauche la femelle, à droite le mâle. En bas : à gauche la nymphe, à droite la larve.

Photo : O : Rais et F. Morán (Université de Neuchâtel)

Les tiques dures (*Ixodidae*) possèdent une caractéristique commune : la présence d'une plaque dorsale sclérifiée, le scutum. Celui-ci recouvre presque la totalité du corps du mâle alors que chez les larves, les nymphes et les femelles, il est réduit à la partie antérieure (Figure 1). Le corps est divisé en deux parties : à l'avant, le capitulum (tête) qui porte les pièces buccales (rostre) et dans la partie postérieure, l'idiosome, composé du scutum rigide et d'une partie plus souple et extensible permettant l'augmentation de volume pendant le repas sanguin. Les pièces buccales sont composées de l'hypostome, au centre, et d'une paire de chélicères, situées latéralement. Tels des couteaux, les

chélicères permettent à la tique de percer la peau de son hôte alors que l'hypostome, pourvu de dents, sert à son ancrage sur l'hôte.

Le système digestif de la tique occupe une grande partie de son idiosome. En position antérieure, on trouve une paire de glandes salivaires, en forme de grappes. La salive de la tique contient de nombreuses substances lui permettant le bon déroulement de son repas de sang, notamment anesthésiantes, anticoagulantes, vaso-dilatatrices et immunosuppressives. La tique possède également des organes olfactifs, dont celui de Haller, situé sur la première paire de pattes, sensibles aux phéromones, au CO₂, aux vibrations, aux variations de température et à l'humidité. Les pédipalpes, avec leurs chémorécepteurs, jouent également un rôle sensoriel.

L'étude des pièces buccales et des premières coxae (structures chitinisées et de ce fait indéformables) permet généralement d'identifier les différentes espèces appartenant à la famille des *Ixodidae*. La présence d'une épine coxale située sur les premières coxae est un des critères de distinction d'*I. ricinus*, la tique européenne, principal sujet de la présente étude.

1.1.3 Habitat et cycle de vie

La tique *I. ricinus* est l'espèce la plus fréquente en Europe. On la trouve dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord depuis la côte Atlantique jusqu'en Russie et de la Scandinavie au Nord de l'Afrique (Lindgren et al. 2000) (Figure 2).



Figure 2: Distribution géographique de la tique *I. ricinus*.
(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a5/Ixodes_ricinus_range_map.svg)

I. ricinus est une tique exophile (Cotty et al. 1986) qui vit dans la litière et la végétation basse des forêts à feuillus à sous-bois denses (herbes, broussailles), où sont maintenus des taux d'humidité élevés. Dans les régions pluvieuses (Grande-Bretagne, Irlande), *I. ricinus* peut aussi se trouver en abondance dans les forêts de conifères et les milieux ouverts comme les prairies et les pâturages (Gray et al. 1998). *I. ricinus* étant très sensible à la dessiccation, elle préfère des habitats avec un minimum de fluctuations de température et un maximum d'humidité atmosphérique (Sonenshine 1991).

I. ricinus est une tique triphasique. Son cycle de développement, tout comme celui des *Ixodidae*, est caractérisé par une alternance de phases de vie libre, au sol ou à l'affût d'un hôte sur la végétation (quête), et de phases parasitaires (Figure 3). Malgré tout, la tique passe plus de 90% de sa vie à attendre le passage d'un hôte. Chaque stade (larve, nymphe, adultes) se nourrit sur un hôte vertébré différent. La durée du repas sanguin varie de deux à trois jours pour la larve à une dizaine de jours pour la femelle. Le repas sanguin est nécessaire aux larves et aux nymphes pour accomplir les mues et à la femelle pour la production d'œufs. Le mâle ne se nourrit que très peu. Après chaque repas de sang, les larves et les nymphes vont se détacher de l'hôte, digérer puis muer. Après copulation (généralement sur l'hôte), la femelle se gorge entièrement, se détache de son hôte et pond des milliers d'œufs (Gern 2004). La durée du cycle peut varier entre 2 et 6 ans selon les conditions climatiques et la disponibilité en hôtes, mais il s'effectue généralement en 3 ans (Gray 1991).

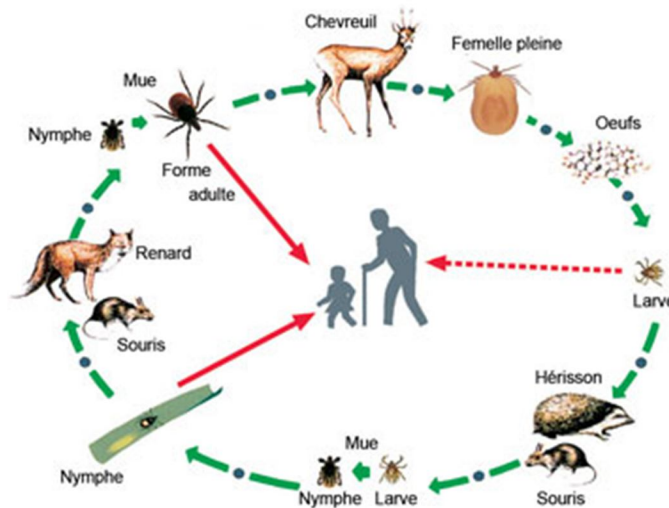


Figure 3 : Cycle de développement d'*I. ricinus*.
http://www.tiques.fr/htdocs/vie_tiques.html

I. ricinus peut potentiellement se nourrir sur tous les vertébrés qu'elle rencontre. Toutefois, la hauteur de quête sur la végétation, différente pour chaque stade de développement (larve, nymphe ou adultes) (Mejlon et Jaenson 1997), va influencer sur la diversité des hôtes rencontrés. Ainsi, les larves, très sensibles à la dessiccation, vont quêter près du sol et vont ainsi s'agripper aux micromammifères ainsi qu'aux passereaux de petite taille. Les nymphes, plus résistantes, peuvent quêter plus haut sur la végétation et se gorgent volontiers sur des mammifères de taille moyenne (renard, blaireau, lièvre, etc.), des oiseaux et des reptiles. Les adultes, quant à eux, choisissent des mammifères de grande taille tels que les cervidés et bovidés. L'Homme ne constitue qu'un hôte accidentel car il ne participe pas au cycle de développement d'*I. ricinus*.

1.1.4 Un vecteur : la tique

Les *Ixodidae* possèdent des caractéristiques comportementales qui favorisent leur capacité de vecteurs (Parola et Raoult 2001). Ils se nourrissent pendant une relativement longue période, durant laquelle ils restent fermement attachés à leur hôte, permettant un éventuel échange de pathogènes. La piqûre étant indolore, ils ont la capacité de passer inaperçus durant toute la durée du repas sanguin. Ils peuvent se nourrir sur une grande variété d'animaux, qui ont chacun une niche écologique différente (Sonenshine 1991).

Pour être considéré comme compétent, le vecteur doit être capable de se nourrir sur des hôtes infectés, d'acquérir le pathogène durant le repas sanguin et de maintenir l'infection pendant les mues (passage transstadial), et enfin il doit transmettre le pathogène aux hôtes sur lesquels il se nourrit (Kahl et al. 2002). De ce fait, le vecteur est impliqué dans le cycle naturel du pathogène (Kahl et al. 2002), tout comme l'hôte réservoir. L'hôte réservoir doit être une source d'infection pour les

tiques qui se nourrissent de son sang. Il doit permettre la multiplication du pathogène et sa survie au sein de son organisme, pour un certain temps au moins (Kahl et al. 2002).

Dans la nature, une tique peut acquérir un pathogène (« s'infecter ») de trois manières différentes :

- La plus courante est l'acquisition d'un pathogène lors d'un repas de sang sur un hôte développant une infection systémique (généralement l'hôte réservoir). C'est la transmission horizontale.
- Pour une même tique, le pathogène peut survivre aux mues successives et donc lors du passage d'un stade gorgé au stade suivant non gorgé. C'est le passage transstadial. Ce mode de transmission est obligatoirement présent chez un arthropode dit « vecteur » et de plus, il est nécessaire à la survie à long terme du microorganisme dans la nature (Gern et Humair 2002).
- Plus rarement, lorsque les ovaires d'une femelle sont infectés par le pathogène, celle-ci peut transmettre son infection à sa descendance. C'est la transmission transovarienne ou verticale.

Pour certains agents pathogènes, les trois voies de transmission sont possibles (ex. *Rickettsia* spp.). Dans ce cas, les tiques constituent également des hôtes réservoirs du pathogène.

La transmission de pathogènes par co-feeding est un phénomène particulier. Il a été décrit pour la première fois en 1987 pour le virus Thogoto (Jones et al. 1987) et il a été depuis démontré pour d'autres virus tels que TBEV ou le virus du louping-ill (Alekseev et Chunikhin 1990, Randolph et al. 1996). Gern et Rais (1996) ont montré que la bactérie *B. burgdorferi* si pouvait également être transmise par co-feeding. La transmission par co-feeding est la transmission d'un agent pathogène (virus ou bactérie) d'une tique infectée (le plus souvent une nymphe) à une tique non infectée (une larve) se nourrissant à proximité sur l'hôte, en l'absence d'infection systémique chez ce dernier.

Au sein du genre *Ixodes*, quatre espèces sont particulièrement importantes au vu du nombre de pathogènes qu'elles peuvent transmettre à l'Homme. Il s'agit d'*I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. scapularis* et *I. pacificus*. Les deux premières espèces peuvent transmettre aussi bien des bactéries (*Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma/Ehrlichia* spp.), que des protozoaires (*Babesia* spp.) ou des virus (virus de l'encéphalite à tiques (TBEV), virus du louping-ill). Quant à *I. scapularis* et *I. pacificus*, elles transmettent *B. burgdorferi* sensu stricto (ss), *A. phagocytophilum* mais aussi *B. microti* (Thill et al. 2005). Chacune de ces espèces a une distribution géographique bien définie. *I. ricinus* est la tique la plus répandue en Europe alors qu'en Eurasie il s'agit d'*I. persulcatus*. Aux USA, *I. pacificus* se trouve sur la côte ouest du pays alors qu'*I. scapularis* est prévalent sur la côte est.

Tous les spirochètes appartenant au genre *Borrelia* partagent des caractéristiques communes : a) ils sont tous transmis aux vertébrés par des arthropodes hématophages, b) on observe fréquemment une transmission transovarienne de *Borrelia* chez l'arthropode et c) le contenu en guanosine-cytosine dans l'ADN génomique se situe entre 27% et 32% (Barbour et Hayes 1986).

Le complexe *B. burgdorferi* sl regroupe actuellement 19 géoespèces (Tableau 3) ; la dernière identifiée étant *B. finlandensis*, isolée en Finlande à partir d'*I. ricinus* (Casjens et al. 2011).

Génoespèces	Vecteurs	Distribution géographique	Références
<i>B. afzelii</i>	Iric, lper	Eurasie	Canica et al. (1993)
<i>B. garinii</i>	Iric, lper, lhex, lnip	Eurasie	Baranton et al. (1992)
<i>B. valaisiana</i>	Iric, lgra	Eurasie	Wang et al. (1997)
<i>B. andersonii</i>	Iden	USA	Marconi et al. (1995)
<i>B. bavariensis</i>	Iric	Europe	Margos et al. (2009)
<i>B. lusitaniae</i>	Iric	Europe, Afrique du Nord	Le Fleche et al. (1997)
<i>B. americana</i>	lpac, lmin	USA	Rudenko et al. (2009b)
<i>B. californiensis</i>	lpac, ljel, lspj	USA	Postic et al. (2007)
<i>B. burgdorferi</i> ss	Iric, lsca, lpac	Europe, USA	Baranton et al. (1992)
<i>B. bissettii</i>	Iric, lsca, lpac, lmin	Europe, USA	Postic et al. (1998)
<i>B. japonica</i>	lova	Japon	Kawabata et al. (1993)
<i>B. kurtenbachii</i>	lsca	Europe, USA	Margos et al. (2010)
<i>B. carolinensis</i>	lmin	USA	Rudenko et al. (2009a)
<i>B. turdi</i>	ltur	Japon, Europe	Fukunaga et al. (1996)
<i>B. sinica</i>	lova	China	Masuzawa et al. (2001)
<i>B. tanukii</i>	ltan	Japon	Fukunaga et al. (1996)
<i>B. spielmanii</i>	Iric	Europe	Richter et al. (2006)
<i>B. yangtze</i>	lgra	Chine	Chu et al. (2008)
<i>B. finlandensis</i>	Iric	Europe	Casjens et al. (2011)

Tableau 3 : Liste des géoespèces appartenant au complexe de *B. burgdorferi* sl, leurs vecteurs et distribution géographique.

Iric : *I. ricinus*, lpac : *I. pacificus*, lper : *I. persulcatus*, lmin : *I. minor*, lden : *I. dentatus*, lsca : *I. scapularis*, ljel : *I. jellisonii*, lspj : *I. spinipalpis*, lhex : *I. hexagonus*, lnip : *I. nipponensis*, lova : *I. ovatus*, ltan : *I. tanuki*, ltur : *I. turdus*, lgra : *I. granulatus*). Modifié à partir de Rudenko et al. (2011).

Une espèce de *Borrelia* appartenant au complexe des fièvres récurrentes, *B. miyamotoi*, est également d'importance dans cette étude puisque présente en Europe. Ce spirochète a d'abord été décrit chez *I. persulcatus* en Asie (Fukunaga et al. 1995), puis identifié chez *I. ricinus* en Suède (Fraenkel et al. 2002).

Dans la suite de ce manuscrit, le terme générique de *Borrelia* spp. sera utilisé pour parler des génoespèces appartenant au complexe de *B. burgdorferi* sl et de *B. miyamotoi* appartenant au groupe des fièvres récurrentes.

1.2.1.2 Maintenance du pathogène dans la nature

Les vecteurs principaux de *B. burgdorferi* sl sont des tiques appartenant au genre *Ixodes*. Il s'agit d'*I. scapularis* et *I. pacificus* aux USA, *I. ricinus* en Europe et *I. persulcatus* en Eurasie, Chine et Japon (Wang et al. 1999). D'autres espèces de tiques appartenant au genre *Ixodes* ainsi que quelques-unes appartenant à d'autres genres peuvent être naturellement infectées et transmettre *Borrelia* dont les plus connus sont *I. hexagonus*, *I. trianguliceps*, *I. uriae*, *I. ovatus*, *Amblyomma americanum*, *Haemaphysalis longicornis* et *H. concinna* (Rudenko et al. 2011). La plupart de ces tiques ne piquent que rarement l'Homme et de ce fait ne sont pas importantes au point de vue de la santé humaine. Elles peuvent toutefois, dans certaines zones, servir au maintien d'un cycle de transmission secondaire (Rudenko et al. 2011). Les vecteurs principaux de *B. miyamotoi* sont *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. pacificus* et *I. scapularis* (Platonov et al. 2011).

Les *Borrelia* survivent aux mues successives d'*I. ricinus* et *I. hexagonus*; elles sont donc transmises de manière transstadiale (Gern et Humair 2002). En revanche, la transmission transovarienne de *Borrelia* spp. est relativement rare puisque seul 1% des femelles transmet son infection à la progéniture (Bellet-Edimo et al. 2005). Cependant, lorsqu'elle a lieu, la transmission transovarienne est efficace puisqu'entre 43% et 100% des larves provenant d'une femelle sont ainsi infectées (Bellet-Edimo et al. 2005). La transmission par co-feeding a été démontrée pour *Borrelia* (Gern et Rais 1996, Randolph et al. 1996) et se révèle d'une grande importance chez les hôtes incapables de développer une infection systémique (Randolph et Gern 2003).

Tous les hôtes d'*I. ricinus* (~ 300 espèces) sont potentiellement des hôtes réservoirs de *Borrelia* spp. Seuls certains d'entre eux ont fait l'objet d'investigations concernant leur compétence de réservoir. Les rongeurs ont été largement étudiés et certaines espèces de mulots (*Apodemus* spp.), campagnols (*Myodes glareolus*, *Microtus agrestis*), souris (*Peromyscus* spp.), rats (*Rattus* spp.) et musaraignes constituent des hôtes réservoirs importants (pour les références voir dans Gern et Humair (2002)). D'autres micromammifères comme les écureuils (*Sciurus vulgaris* et *S. carolinensis*), les lièvres (*Lepus* spp.) et le hérisson (*Erinaceus europaeus*) se sont également révélés être des réservoirs compétents de la bactérie (Gern et al. 1997, Humair et Gern 1998, Gern et Humair 2002). Après une période de doute (Matuschka et Spielman 1992), le rôle des oiseaux dans le maintien du cycle naturel de *Borrelia* a été démontré (Humair et al. 1998, Kurtenbach et al. 1998a). A l'inverse, les cervidés sont des réservoirs incompetents car leur sérum démontre une activité bactéricide (Kurtenbach et al.

2002a) mais ils représentent des hôtes amplificateurs importants, permettant aux adultes de se nourrir et de perpétuer le cycle.

Dans la nature, des associations relativement strictes sont observées entre génoespèces et hôtes. Ces associations reflètent les capacités inégales qu'ont les différents hôtes à transmettre *Borrelia* spp. aux tiques (Kurtenbach et al. 1998b). Ainsi, *B. garinii* et *B. valaisiana* sont associées aux oiseaux (Humair et al. 1998, Kurtenbach et al. 1998a, Kurtenbach et al. 2002b) tandis que *B. afzelii* est inféodée aux rongeurs (Kurtenbach et al. 1998b, Humair et al. 1999). Les écureuils sont quasi exclusivement des réservoirs de *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss (Humair et Gern 1998) et les lézards de *B. lusitaniae* (Richter et Matuschka 2006).

1.2.1.3 Distribution géographique et prévalence

Les membres du complexe *B. burgdorferi* sl ainsi que *B. miyamotoi* sont présents sur l'ensemble des régions tempérées de l'hémisphère Nord (USA et Eurasie) avec des prévalences variant à l'échelle locale, régionale et nationale. En Europe, les prévalences moyennes observées dans les tiques libres varient de 11.3% (Luxembourg) à 35% (Suisse, (Burri et al. 2007)) (Tableau 4). Les adultes sont généralement plus infectés que les nymphes. Des études européennes reportent qu'environ 10% des nymphes et 17-18% des adultes sont porteurs de la bactérie (Hubalek et Halouzka 1998, Rauter et Hartung 2005). Les plus hauts taux d'infection sont observés en Europe centrale (Autriche, République Tchèque, Sud de l'Allemagne, Suisse, Slovaquie et Slovénie) (Rauter et Hartung 2005).

Pays	Prévalence	Références
Bulgarie	22.3%	Christova et al. (2001)
Pologne	12.7%	Sroka et al. (2009)
France	20.6%	Reis et al. (2010)
Allemagne	27%	Hildebrandt et al. (2010b)
Italie	16.7%	Bertolotti et al. (2006)
Luxembourg	11.3%	Reye et al. (2010)
Pays-Bas	13%	Schouls et al. (1999)
Norvège	15.8%	Jenkins et al. (2001)
Suisse	25.9%	Jouda et al. (2004b)
Suisse	31.2%	Morán-Cadenas et al. (2007)
Suisse	35%	Burri et al. (2007)

Tableau 4 : Prévalence de *Borrelia* spp. dans les tiques *I. ricinus* en quête de quelques pays européens.

En Suisse, on observe de grandes variations de prévalence selon les régions, de 9 à 40% chez les nymphes et de 22 à 47% chez les adultes (Jouda et al. 2004b, 2004a, Burri et al. 2007, Morán Cadenas et al. 2007).

Chaque géoespèce a une distribution géographique particulière. Ainsi, 12 espèces ont été identifiées en Eurasie et sont strictement associées à cette zone (Rudenko et al. 2011). Il s'agit de *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii*, *B. japonica*, *B. lusitaniae*, *B. sinica*, *B. spielmanii*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. valaisiana*, *B. yangtze* et *B. finlandensis*. Quatre géoespèces, *B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis* et *B. kurtenbachii*, ont été exclusivement identifiées aux USA alors que *B. burgdorferi* ss, *B. bissettii* et *B. carolinensis* ont la particularité d'être présentes en Eurasie et aux USA.

On observe que le continent eurasiatique possède une plus grande diversité de *Borrelia* que le continent Nord-Américain, avec 15 géoespèces identifiées en Europe contre sept aux USA. *B. miyamotoi* est présente sur les deux continents. En Europe, les espèces les plus fréquemment identifiées sont *B. afzelii* et *B. garinii*, suivis de *B. valaisiana* et *B. burgdorferi* ss (Rauter et Hartung 2005). La prévalence des géoespèces varie d'un pays à l'autre, d'une région à l'autre, probablement en fonction des différents hôtes réservoirs disponibles.

En Suisse, 8 espèces de *Borrelia*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* ss, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis* et *B. miyamotoi* ont été identifiées dans les tiques libres (Gern et al. 2010a), avec des prévalences et des répartitions différentes. *B. afzelii* et *B. garinii* sont prédominantes, suivi de *B. valaisiana* et *B. burgdorferi* ss (Jouda et al. 2004b, Burri et al. 2007, Morán Cadenas et al. 2007).

Dans certaines zones endémiques, plusieurs géoespèces peuvent circuler entre les hôtes vertébrés et le vecteur (Piesman et Gern 2004). De ce fait, des infections mixtes impliquant plusieurs espèces de *Borrelia* spp. peuvent être détectées dans les tiques, généralement avec des prévalences plus faibles que les taux d'infections n'impliquant qu'une seule espèce. Rauter et Hartung (2005) reportent une prévalence moyenne d'infections mixtes de 13% et l'association la plus fréquente est *B. garinii* et *B. valaisiana*.

1.2.1.4 Epidémiologie et manifestations cliniques

Toutes les espèces appartenant au complexe de *B. burgdorferi* sl n'ont pas le même potentiel pathogène pour l'Homme. Ainsi, Rudenko et al. (2011) distinguent deux groupes :

- Un groupe de 9 espèces qui n'ont jamais été isolées chez l'Homme, *a priori* non pathogènes. Il s'agit de *B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis*, *B. carolinensis*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica* et *B. yangtze*.

- Un groupe de 9 autres espèces avec un potentiel pathogène, incluant *B. afzelii*, *B. burgdorferi* ss, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. kurtenbachii*, *B. lusitaniae* et *B. spielmanii*, *B. valaisiana*. Les quatre premières espèces sont les plus communément isolées chez l'Homme.

Il faut signaler qu'aux Etats-Unis seul *B. burgdorferi* ss cause la borréliose de Lyme.

La pathogénicité de *B. miyamotoi* a été récemment mise en évidence chez des patients russes (Platonov et al. 2011).

La borréliose de Lyme est composée de trois phases cliniques distinctes (Steere 1989):

1. le **stade précoce localisé** (phase aigüe) caractérisé par une lésion cutanée, l'érythème migrant, qui apparaît 4 à 25 jours après la piqûre de tique. L'érythème migrant est causé par la migration sous-cutanée des spirochètes inoculés au point de piqûre. Ce stade est souvent associé à des symptômes grippaux.
2. le **stade précoce disséminé** caractérisé par des manifestations articulaires, neurologiques, cardiaques et oculaires. Il survient quelques semaines voire quelques mois après le premier stade.
3. le **stade tardif** caractérisé par des atteintes chroniques de type dermatologique (acrodermatite chronique atrophiante), rhumatologique (arthrites chroniques), neurologique (neuroborréliose) et ophtalmique. Ce stade survient quelques années après la piqûre de tique infectée.

Les différentes espèces de *Borrelia* pathogènes démontrent chacune un organotropisme et, de ce fait, causent des manifestations cliniques distinctes. *B. burgdorferi* ss est responsable d'atteintes articulaires, *B. afzelii* cause l'acrodermatite chronique atrophiante et *B. garinii* est souvent observé dans les cas de neuroborréliose.

1.2.2 *Rickettsia* spp.

Les rickettsioses causées par les espèces de Rickettsies transmises par les tiques sont parmi les maladies à vecteurs les plus anciennes (Parola et al. 2005). On doit leur nom à Howard Ricketts, un microbiologiste américain, qui décrit pour la première fois les Rickettsies comme agents étiologiques de la fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses (USA) (Ricketts 1906).

1.2.2.1 *Systématique et morphologie*

Les Rickettsies sont de petites bactéries Gram-négatives intracellulaires possédant un unique chromosome circulaire (Roux et al. 1992). Elles sont immobiles et dépourvues de flagelle.

Actuellement, le genre *Rickettsia* est divisé en trois groupes, le groupe des fièvres pourprées (spotted fever group, SFG), le groupe des typhus et le groupe ancestral récemment identifié par séquençage

d'ADN (Vitorino et al. 2007, Dobler et Wölfel 2009) (Tableau 5). La plupart des espèces appartenant au premier groupe ainsi que les deux espèces appartenant au groupe ancestral sont transmises par des tiques de la famille des *Ixodidae*. Quant à *Rickettsia typhi* et *R. prowazekii*, appartenant au groupe des typhus, elles sont transmises par les déjections des poux et des puces.

Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Alphaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Rickettsiales</i>
Famille	<i>Rickettsiaceae</i>
Genre	<i>Rickettsia</i>
	◇ Groupe des fièvres pourprées (SFG) (> 20 espèces)
	◇ Groupe des typhus (2 espèces)
	- <i>R. typhi</i>
	- <i>R. prowazekii</i>
	◇ Groupe ancestral (2 espèces)
	- <i>R. bellii</i>
	- <i>R. canadensis</i>

Tableau 5 : Classification du genre *Rickettsia* selon la taxonomie de maladie-a-tiques.com, modifiée selon Roux et Raoult (2000).

Le groupe des fièvres pourprées comprend plus de 20 espèces dont *R. slovaca*, *R. helvetica*, *R. conorii*, *R. massiliae* et *R. monacensis*, toutes rencontrées en Europe. *R. rickettsii* est une espèce strictement américaine et l'agent étiologique de la fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses. Dans cette étude, notre intérêt va se porter sur les *Rickettsiae* appartenant au SFG et plus précisément sur les espèces déjà identifiées chez *I. ricinus* en Europe, comme *R. helvetica*, et *R. monacensis* (Dobler et Wölfel 2009).

1.2.2.2 Maintenance du pathogène dans la nature

Les tiques dures (*Ixodidae*) sont les vecteurs de toutes les SFG *Rickettsiae* (Raoult et Roux 1997). *R. helvetica* et *R. monacensis* sont toutes deux transmises par *I. ricinus* (Beati et al. 1993, Simser et al. 2002). Les *Rickettsies* se multiplient dans presque tous les organes de la tique, y compris les ovaires (Brouqui et al. 2007). Il en découle une infection systémique qui est la condition *sine qua none* de l'existence d'une transmission transovarienne des bactéries. Les *Rickettsies* sont également maintenues dans les populations de tiques grâce à la transmission transstadiale. Les tiques sont donc à la fois des vecteurs et des réservoirs du pathogène et de ce fait, la distribution géographique des *Rickettsies* va être semblable à celle de leurs vecteurs. La transmission par co-feeding de *Rickettsia* semble également exister (Parola et al. 2005) ; elle a été notamment démontrée avec *R. rickettsii* (Philip 1959). Enfin, la transmission sexuelle du mâle à la femelle a même été décrite pour *I. ricinus*

(Hayes et al. 1980). Au vu de l'existence de tous ces modes de transmission, tous les stades (larves, nymphes et adultes) peuvent être infectieux et les tiques sont donc considérées comme principaux réservoirs des SFG *Rickettsiae*. Le rôle des vertébrés dans le maintien de ces microorganismes dans la nature est encore sujet de débat. Pour être des hôtes réservoirs efficaces, les vertébrés doivent être, d'une part, susceptibles aux *Rickettsiae* et d'autre part, développer une rickettsiémie relativement longue (Brouqui et al. 2007). Une récente étude suggère que les micromammifères pourraient être des hôtes réservoirs de ces bactéries (Schex et al. 2011).

1.2.2.3 Distribution géographique et prévalence

En Europe, la prévalence des SFG *Rickettsiae* dans les tiques est très variable, les valeurs s'échelonnant de 5.1% à 36.5% (Tableau 6). On observe de grandes variations de la prévalence au sein d'un même pays, comme par exemple en Allemagne où des valeurs de 5.3% (Silaghi et al. 2008b) et 34.2% (Strube et al. 2011) ont été mesurées, respectivement dans le Sud et le Nord du pays (Tableau 6).

Pays	Prévalence	Références
Grande-Bretagne	6.5%	Tijssse-Klasen et al. (2011)
Danemark	13%	Svendesen et al. (2009)
France	5.8%	Reis et al. (2010)
Allemagne	5.3%	Silaghi et al. (2008b)
Allemagne	34.2%	Strube et al. (2011)
Italie	36.5%	Bertolotti et al. (2006)
Luxembourg	5.1%	Reye et al. (2010)
Suède	16%	Nilsson et al. (1999b)
Espagne	12.5%	Toledo et al. (2009)
Autriche	35.6%	Blaschitz et al. (2008a)
Suisse	11.1%	Beati et al. (1994)
Suisse	11.7%	Boretti et al. (2009)

Tableau 6 : Prévalence de *Rickettsia* spp. dans les tiques *I. ricinus* en quête de quelques pays européens.

Parmi les SFG *Rickettsia* identifiés chez *I. ricinus*, *R. helvetica* est l'espèce la plus commune et la plus abondante (Reis et al. 2010, Reye et al. 2010) alors que *R. monacensis* démontre une distribution plus restreinte et une prévalence plus faible (Reye et al. 2010, Schorn et al. 2011a). Cette même

situation est observée en Suisse, où *R. monacensis* n'est détectée que sporadiquement alors que *R. helvetica* est fréquemment identifiée dans les tiques (Boretti et al. 2009, Burri et al. 2011a).

En Suisse, trois espèces de Rickettsies d'importance médicale ont été identifiées dans les tiques, *R. slovacica* (*D. marginatus*), *R. helvetica* (*I. ricinus*) et *R. monacensis* (*I. ricinus*) (Burgdorfer et al. 1979, Beati et al. 1994, Bernasconi et al. 2002, Boretti et al. 2009, Burri et al. 2011a).

1.2.2.4 Epidémiologie et manifestations cliniques

Les symptômes les plus communément observés dans les cas de rickettsioses sont des fièvres, maux de têtes, nausées, éruptions cutanées et une escarre au point d'inoculation. Des signes cliniques plus spécifiques apparaissent en fonction de l'espèce concernée.

R. helvetica a longtemps été considérée comme non pathogène pour l'Homme mais, depuis 1999, cette espèce est suspectée d'être impliquée dans des cas aigus de périmyocardite (Nilsson et al. 1999a) et sarcoïdose (Nilsson et al. 2002) ainsi que dans des cas d'états fébriles (Fournier et al. 2000, Fournier et al. 2004). Plus récemment, *R. helvetica* a même été isolée à partir d'un patient souffrant de méningite (Nilsson et al. 2010).

En ce qui concerne *R. monacensis*, trois cas cliniques ont été reportés jusqu'à présent, dont deux en Espagne (Jado et al. 2007) et un en Italie (Madeddu et al. 2012). En Espagne, *R. monacensis* a pu être isolé à partir du sang des deux patients, ces derniers souffrant de fièvres, maux de tête et atteintes dermatologiques (Jado et al. 2007). En Italie, le patient souffrait de fièvres et de maux de tête (Madeddu et al. 2012).

1.2.3 *Anaplasma phagocytophilum*

A. phagocytophilum est le nom qui désigne, à la suite d'une réorganisation récente de la systématique (Dumler et al. 2001), trois espèces de bactéries, *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* et l'agent responsable de l'ehrlichiose granulocytaire humaine (**H**uman **G**ranulocytic **E**hrlichiosis, HGE) (Woldehiwet 2010). Cette bactérie est responsable de la fièvre à tiques chez le bétail (« tick-borne fever »), les chèvres et les moutons, de l'ehrlichiose équine chez les chevaux et de l'HGE chez l'homme. *A. phagocytophilum* est également reconnu comme l'agent étiologique de l'anaplasmose granulocytaire canine (Madewell et Gribble 1982).

Aux USA, *A. phagocytophilum* est plutôt d'importance médicale, touchant rarement le bétail alors qu'en Europe c'est une maladie d'importance vétérinaire touchant le bétail, les chevaux, les moutons et les chèvres, mais rarement l'Homme (Rar et Golovljova 2011).

Actuellement, l'infection causée par *A. phagocytophilum* est appelée anaplasmose granulocytaire humaine (**H**uman **G**ranulocytic **A**naplasmosis, HGA).

1.2.3.1 Systématique et morphologie

A. phagocytophilum est une bactérie Gram-négative intracellulaire obligatoire qui infecte les granulocytes des mammifères (Dumler et al. 2001). Elle possède un unique chromosome circulaire. La forme de la bactérie peut varier mais elle est généralement coccoïde ou ellipsoïdale.

L'ordre des *Rickettsiales* a été réorganisé en 2001 sur la base de l'analyse de l'ARNr 16S et de l'opéron groESL (Dumler et al. 2001). *E. phagocytophila*, *E. equi* et l'agent étiologique de l'HGE ont ainsi été regroupés en un seul et même taxon, *A. phagocytophilum*, qui appartient à la famille des *Anaplasmatacea* (Tableau 7).

Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Alphaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Rickettsiales</i>
Famille	<i>Anaplasmatacea</i>
Genre	<i>Anaplasma</i>
Espèce	<i>A. phagocytophilum</i> (<i>E. phagocytophila</i> , <i>E. equi</i> , HGE)

Tableau 7 : Classification d'*A. phagocytophilum* selon la taxonomie de NCBI.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>)

Toutefois, la notion de « variant » de la même espèce est utilisée pour distinguer des souches qui diffèrent tant au niveau moléculaire que biologique (distribution géographique, gamme d'hôtes ou pathogénicité) (Dumler et al. 2001). Des associations hôtes-pathogènes sont alors observées. Ainsi, un variant associé aux chevreuils est incapable d'infecter des rongeurs alors que les souches associées aux cas humains peuvent infecter des rongeurs et non des chevreuils (Rar et Golovljova 2011).

1.2.3.2 Maintenance du pathogène dans la nature

Dans la nature, *A. phagocytophilum* est maintenu dans un cycle impliquant le vecteur, des rongeurs et des ruminants, l'homme n'étant qu'un hôte accidentel (Woldehiwet 2010). Les vecteurs principaux appartiennent tous au genre *Ixodes*. Il s'agit d'*I. scapularis* à l'Est des Etats-Unis (Des Vignes et Fish 1997), *I. pacificus* à l'Ouest des USA (Richter et al. 1996), *I. ricinus* en Europe (Liz et al. 2000, von Loewenich et al. 2003, Katargina et al. 2012) et *I. persulcatus* en Eurasie (Rar et al. 2005, Rar et al. 2011b). Il semblerait qu'*I. trianguliceps*, une tique endophile inféodée aux micromammifères et qui ne pique que rarement l'homme (Gern et Aeschlimann 1986), puisse également jouer un rôle important par le fait qu'elle maintienne le pathogène dans un cycle de transmission parallèle impliquant des rongeurs, et ce en l'absence d'*I. ricinus* (Ogden et al. 1998, Bown et al. 2009). Cette tique n'a toutefois qu'un rôle peu significatif dans la transmission à l'Homme du fait de son activité nidicole.

Chez les tiques, la transmission transovarienne de la bactérie est inexistante (MacLeod 1936, Ogden et al. 1998) alors que la transmission transstadiale a lieu (Telford et al. 1996, Ogden et al. 1998). Une étude de Levin and Fish (2000) démontre que la transmission par co-feeding d'*A. phagocytophilum* chez des souris saines a une efficacité de 100% alors qu'elle est réduite à 30% chez des souris immunes.

Aux USA, les hôtes réservoirs diffèrent en fonction de la distribution géographique des vecteurs. La souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*) et le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*) sont les principaux réservoirs dans l'aire de répartition d'*I. scapularis* (Ravyn et al. 2001, Tate et al. 2005) alors qu'une espèce de rat (*Neotoma fuscipes*) représente un important réservoir dans l'aire de répartition d'*I. pacificus* (Nicholson et al. 1999).

En Europe, les animaux domestiques sont capables d'héberger *A. phagocytophilum* et les moutons peuvent constituer des hôtes réservoirs efficaces (Pfister et al. 1987, Ogden et al. 1998, Pusterla et al. 1998a). Chez les animaux sauvages, une vaste gamme d'hôtes mammifères est naturellement infectée par la bactérie (Thomas et al. 2009). Les cervidés, principalement le chevreuil (*Capreolus capreolus*) et le cerf (*Cervus elaphus*), sont des hôtes réservoirs importants pour le maintien d'*A. phagocytophilum* dans la nature (Liz et al. 2002). A une échelle moindre, le chamois (*Rupicapra rupicapra*), le renard (*Vulpes vulpes*), le sanglier (*Sus scrofa*) peuvent également jouer un rôle (Liz et al. 2002, Petrovec et al. 2003). Les micromammifères (*Apodemus flavicollis*, *A. sylvaticus*, *M. glareolus*, *Sorex araneus*) pourraient également jouer un rôle de réservoirs (Liz et al. 2000, Bown et al. 2003, Bown et al. 2011).

1.2.3.3 Distribution géographique et prévalence

En Europe, la présence d'*A. phagocytophilum* est étroitement liée à son vecteur, *I. ricinus*. La prévalence dans les tiques en quête varie généralement de 0.6% à 10%, toutefois, elle peut, dans de rares cas, atteindre 13.4% (Russie) et 17.1% (Norvège) (Tableau 8). Les adultes sont souvent plus infectés que les nymphes (Pusterla et al. 1999, Hildebrandt et al. 2002, Silaghi et al. 2008a, Schorn et al. 2011b). La séroprévalence moyenne observée en Europe (6.2%) (Dumler et al. 2005) se trouve dans cet intervalle de 1 à 10% observé chez les tiques libres. La variabilité de la prévalence d'*A. phagocytophilum* peut s'expliquer par des différences géographiques et environnementales qui influencent la gamme d'hôtes à disposition ainsi que les réservoirs.

Pays	Prévalence	Références
Pologne	0.6%	Alekseev et al. (2001)
Suisse	1.4%	Liz et al. (2000)

Suisse	2%	Burri et al. (2011a)
Estonie	1.7%	Katargina et al. (2012)
Russie	13.4%	Katargina et al. (2012)
Grande-Bretagne	7.3%	Ogden et al. (1998)
Luxembourg	1.9%	Reye et al. (2010)
Norvège	17.1%	Rosef et al. (2009)
Autriche	6.6%	Polin et al. (2004)
Allemagne	2.9%	Silaghi et al. (2008a)
France	1%	Reis et al. (2010)
Portugal	6.9%	Richter et Matuschka (2012)

Tableau 8 : Prévalence d'*A. phagocytophilum* dans les tiques *I. ricinus* en quête de quelques pays européens.

En Suisse, la présence d'*A. phagocytophilum* a été démontrée dans les tiques en quête avec une prévalence variant de 0.8% à 2% (Pusterla et al. 1998b, Liz et al. 2000, Burri et al. 2011a) (Tableau 8). Des études ont montré qu'en régions d'endémie, 21.7% et 26.5% des tiques prélevées sur du bétail infecté étaient porteuses du pathogène (Pusterla et al. 1998b, Lempereur et al. 2011). Étonnamment, dans ces mêmes régions d'endémie, la prévalence était de 4.4% sur un troupeau sain (Pusterla et al. 1998b).

1.2.3.4 Épidémiologie et manifestations cliniques

La distribution géographique de la maladie chez l'Homme est en lien étroit avec la distribution du vecteur. Aux USA, la plupart des cas sont recensés au Nord-Est du pays, là où *I. scapularis* est présent (Rar et Golovljova 2011). En Europe, la maladie est observée sur toute l'aire de répartition d'*I. ricinus*. Le premier cas clinique d'HGA est apparu aux USA en 1994 (Chen et al. 1994). D'une manière générale, la plupart des cas sont observés aux USA, avec plus de 4'000 cas de 2003 à 2010 (Rar et Golovljova 2011). La prévalence d'infection en Europe est beaucoup plus faible (Rar et Golovljova 2011). Depuis le premier cas signalé en Slovénie en 1997 (Petrovec et al. 1997), une soixante de cas ont été observés dont la majorité en Europe centrale (Petrovec et al. 1997) et en Suède (Bjoersdorff et al. 1999, Hildebrandt et al. 2010a). En Suisse, aucun cas n'a été déclaré jusqu'à présent (Gern et al. 2010a) malgré la détection d'anticorps chez des personnes résidants en Suisse (Pusterla et al. 1998c). L'HGA peut être asymptomatique ou causer de légères fièvres voire des épisodes fébriles sévères (Thomas et al. 2009). Les manifestations cliniques les plus fréquemment observées sont des fièvres, céphalées, malaises, myalgies, leucopénie et troubles hépatiques. On observe plus rarement des nausées, vomissements et diarrhées (Dumler et al. 2005). Dans 1% des cas, l'issue est fatale mais elle

est souvent causée par une infection secondaire (Thomas et al. 2009), *A. phagocytophilum* ayant une action immunosuppressive sur son hôte (Dumler 1997, Woldehiwet 2008).

1.2.4 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*

Candidatus N. mikurensis est une bactérie transmise par les tiques et nouvellement incriminée dans des cas cliniques d'ehrlichiose humaine en Europe (Fehr et al. 2010, von Loewenich et al. 2010, Welinder-Olsson et al. 2010, Pekova et al. 2011).

La première mention de cette bactérie date de 1999 aux Pays-Bas, où l'on décrit la présence d'une bactérie encore inconnue désignée par *Ehrlichia*-like « Schotti variant » chez des adultes *I. ricinus* (Schouls et al. 1999). Par la suite, des organismes similaires ont été isolés à partir de rats sauvages (*Rattus norvegicus*) en Chine (Pan et al. 2003) et au Japon (Kawahara et al. 2004), représentant dès lors un nouveau groupe génétique avec *Ehrlichia*-like « Schotti variant » (Kawahara et al. 2004). Actuellement, cette bactérie est considérée comme un agent pathogène émergent.

1.2.4.1 *Systématique et morphologie*

Candidatus N. mikurensis est une bactérie Gram-négative intracellulaire obligatoire qui infecte les cellules endothéliales des rats (Kawahara et al. 2004).

De récentes études phylogénétiques sur le gène ribosomal 16S indique que *Candidatus N. mikurensis* représente un nouveau groupe génétique au sein de la famille des *Anaplasmatacea*, déjà composé de cinq genres, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Wolbachia* et *Aegyptianella* (Kawahara et al. 2004) (Tableau 9 et Figure 4). D'autres études phylogénétiques, basées sur l'opéron *groEL* de séquences issues de *R. norvegicus* et *I. ovatus* au Japon, confirment l'appartenance de ce nouveau groupe à la famille des *Anaplasmatacea* (Kawahara et al. 2004) (Figure 4).

Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Alphaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Rickettsiales</i>
Famille	<i>Anaplasmatacea</i>
Genre	<i>Candidatus Neoehrlichia</i>
Espèce	<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>

Tableau 9 : Classification de *Candidatus N. mikurensis* selon la taxonomie de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>).

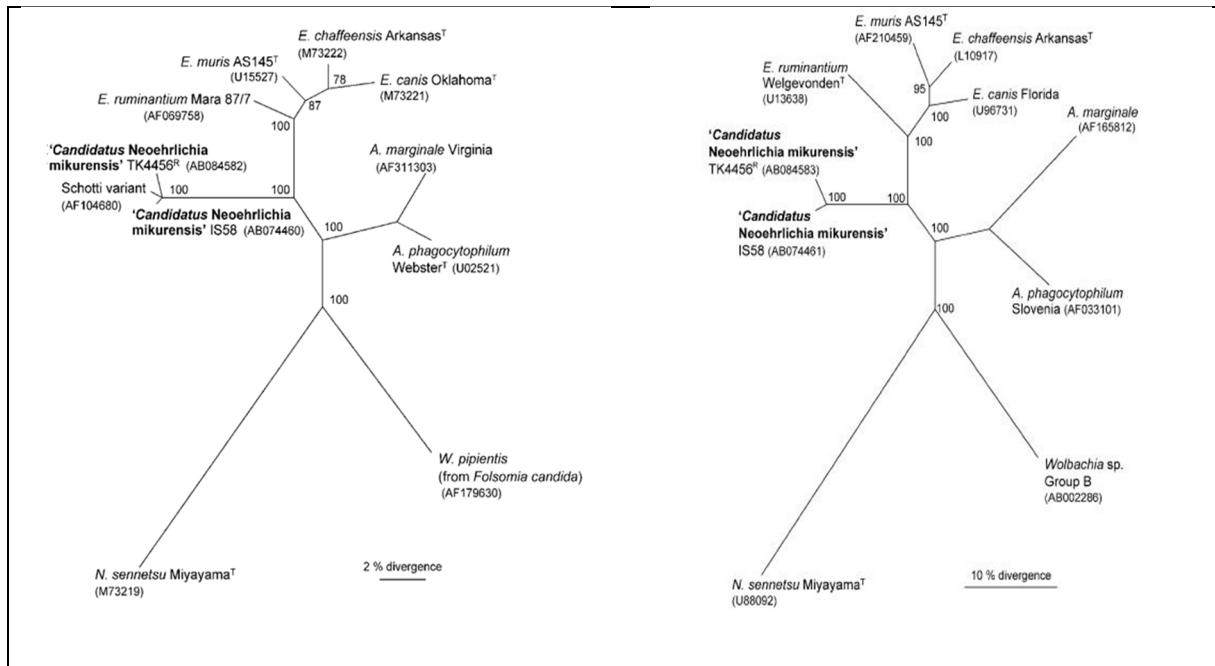


Figure 4 : Phylogrammes basés sur le gène 16S (à gauche) et l'opéron groEL (à droite) de souches de *Candidatus N. mikurensis* en relation avec d'autres membres de la famille des *Anaplasmataceae*. Tiré de Kawahara et al. (2004).

Un organisme similaire, voire identique, a été identifié chez *I. ricinus* en Italie et nommé « *Candidatus Ehrlichia walkerii* » (Brouqui et al. 2003). L'analyse du gène ribosomal 16S démontre 99% d'homologie avec *Ehrlichia*-like « schotti-variant » détecté aux Pays-Bas (no accession AF104680) par Schouls et al. (1999) (Brouqui et al. 2003) et 99.1% d'homologie avec les souches identifiées au Japon (Kawahara et al. 2004).

1.2.4.2 Maintenance du pathogène dans la nature

Jusqu'à présent, *Candidatus N. mikurensis* a été décrit uniquement dans les tiques du genre *Ixodes*. En Europe centrale, le vecteur principal semble être *I. ricinus* (Wielinga et al. 2006, Fertner et al. 2012, Richter et Matuschka 2012) alors qu'en Russie extrême-orientale, la bactérie a été décrite chez *I. persulcatus* (Rar et al. 2010, Rar et al. 2011a). Au Japon, elle a été identifiée chez des tiques de l'espèce *I. ovatus* (Kawahara et al. 2004). Une étude récente a investigué la présence du pathogène chez d'autres espèces de tiques, comme *D. reticulatus*, *I. arboricola* (une tique inféodée aux oiseaux), et *I. hexagonus*, par PCR, mais aucune trace d'ADN n'a été détectée (Jahfari et al. 2012).

Candidatus N. mikurensis est une bactérie dont la pathogénicité pour l'homme et les animaux n'a été décrite que très récemment (Fehr et al. 2010, Welinder-Olsson et al. 2010, Diniz et al. 2011). De ce fait, les différents modes de transmission du pathogène sont encore inconnus. Toutefois, son absence dans les larves en quête (se trouvant au sein de populations infectées) pourrait nous faire penser que la transmission transovariante n'a pas lieu (Jahfari et al. 2012).

Les hôtes réservoirs de *Candidatus N. mikurensis* semblent être les micromammifères tels que les mulots (*Apodemus* spp.), les campagnols (*M. glareolus*, *M. agrestis*) et les rats sauvages (*R. norvegicus*) (Pan et al. 2003, Kawahara et al. 2004, Beninati et al. 2006, Rar et al. 2010, Andersson et Raberg 2011, Jahfari et al. 2012). Une étude récente indique que 8.8% des micromammifères sont porteurs de la bactérie (Andersson et Raberg 2011). Au contraire, la musaraigne ne paraît pas jouer un rôle dans le cycle naturel du pathogène (Andersson et Raberg 2011).

1.2.4.3 Distribution géographique et prévalence

Candidatus N. mikurensis semble être bien répandu en Europe. Sa répartition géographique s'étend de l'Italie aux Pays-Bas et en Russie (Tableau 10). La prévalence de *Candidatus N. mikurensis* dans les tiques *I. ricinus* en quête semble être plus élevée que celle observée chez *I. persulcatus* et *I. ovatus*. (Tableau 10). En Italie, « *Candidatus Ehrlichia walkerii* » a été détecté dans 6.5% des tiques (*I. ricinus*) libres (Koutaro et al. 2005). Richter et Matuschka (2012) ont recherché la présence du pathogène dans des adultes *I. ricinus* en quête provenant de différents pays d'Europe : Allemagne, France, République Tchèque, Pologne et Portugal (Madère). Cette étude montre une certaine variabilité géographique de la prévalence de *Candidatus N. mikurensis* puisqu'en Allemagne 8.1% des tiques sont infectées alors qu'au Portugal, le pathogène n'a pas été détecté. Ces disparités peuvent être dues à des sensibilités différentes des méthodes de détection mais elles peuvent également refléter des variations écologiques locales (microclimat, disponibilité en hôtes).

En Suisse, aucune investigation n'a été menée pour mettre en évidence la présence de la bactérie dans les tiques libres.

Pays	Vecteur	Prévalence	Références
Pays-Bas	<i>I. ricinus</i>	7.4%	Schouls et al. (1999)
Pays-Bas	<i>I. ricinus</i>	3.5%	Wielinga et al. (2006)
Pays-Bas	<i>I. ricinus</i>	11.7%	Van Overbeek et al. (2008)
Pays-Bas	<i>I. ricinus</i>	8%	Jahfari et al. (2012)
Russie	<i>I. ricinus</i>	7.1%	Alekseev et al. (2001)
Europe centrale	<i>I. ricinus</i>	^a 6.2%	Richter et Matuschka (2012)
Italie	<i>I. ricinus</i>	^a 10.5%	Capelli et al. (2012)
Danemark	<i>I. ricinus</i>	inconnue	Fertner et al. (2012)
Slovaquie	<i>I. ricinus</i>	^a 2.9%	Spitalska et al. (2008)
Russie	<i>I. persulcatus</i>	0.2%	Rar et al. (2010)

Russie	<i>I. persulcatus</i>	0.2%	Rar et al. (2011a)
Japon	<i>I. ovatus</i>	^a 2.4%	Kawahara et al. (2004)

Tableau 10 : Prévalence de *Candidatus N. mikurensis* dans les tiques en quête du genre *Ixodes*.

^a taux de prévalence observé dans les tiques adultes uniquement

1.2.4.4 Epidémiologie et manifestations cliniques

Jusqu'à présent, six cas cliniques ont été décrits en Suisse (Fehr et al. 2010), en Allemagne (von Loewenich et al. 2010), en Suède (Welinder-Olsson et al. 2010) et en Pologne (Pekova et al. 2011). Dans la plupart des cas, les patients étaient immunosupprimés (Rar et Golovljova 2011). Trois d'entre eux étaient splénectomisés et un quatrième avait subi une thérapie immunosuppressive (von Loewenich et al. 2010). Les infections causées par *Candidatus N. mikurensis* sont sévères. Dans deux cas, les symptômes ont persisté de 3 à 8 mois et une infection fut fatale.

Une infection à *Candidatus N. mikurensis* a même été observée chez un chien en Allemagne (Diniz et al. 2011). Malgré certaines anomalies hématologiques, le chien était asymptomatique. D'autres études sont donc nécessaires pour connaître la pathogénicité de la bactérie chez les animaux domestiques.

La symptomatologie résulte de l'affinité du pathogène pour les cellules endothéliales de son hôte. On observe souvent des troubles hématologiques tels que coagulopathie, thromboembolisme, anévrismes, hémorragies sous-cutanées. Des fièvres récurrentes sont toujours associées à ces infections.

1.2.5 *Babesia* spp.

La babésiose, causée par des protozoaires du genre *Babesia* spp., est avant tout une maladie d'importance vétérinaire touchant le bétail et les animaux de compagnie. Son importance en médecine humaine n'a été mise en évidence qu'en 1957 avec le premier cas découvert en ex-Yougoslavie (Skrabalo et Deanovic 1957), elle est actuellement considérée comme zoonose mondiale émergente (Gray et al. 2010). Les *Babesia* sont parmi les parasites sanguins les plus répandus dans le monde (Telford et Goethert 2004).

1.2.5.1 Systématique et morphologie

Les protozoaires du genre *Babesia* spp. sont des parasites intra-érythrocytaires causant la babésiose chez l'homme et les animaux. De par leur aspect piriforme à l'intérieur des globules rouges, la babésiose est aussi appelée piroplasmose.

La classification taxinomique place ce protozoaire dans l'embranchement des *Apicomplexa* et dans l'ordre des *Piroplasmida* (Homer et al. 2000) (Tableau 11). Plus de 100 espèces ont été identifiées jusqu'à présent, infectant des mammifères et quelques espèces d'oiseaux (Homer et al. 2000).

Embranchement	<i>Apicomplexa (Sporozoa)</i>
Classe	<i>Aconoidasida (Piroplasmaea)</i>
Ordre	<i>Piroplasmida</i>
Famille	<i>Babesiidae</i>
Genre	<i>Babesia</i> (> 100 espèces)

Tableau 11 : Classification de *Babesia* sp. selon Homer et al. (2000).

Selon des critères morphologiques, on classe les *Babesia* en deux groupes : les petites (1-2.5 µm) et les grandes babésies (2.5-5 µm). Les petites babésies regroupent *Babesia gibsoni*, *B. rodhaini*, *B. bigemina*, *B. microti* et les grandes rassemblent *B. bovis*, *B. caballi* et *B. canis*. Cette classification morphologique est cohérente avec la classification phylogénétique basée sur le gène *18S*, à l'exception de *B. divergens* qui ressemble à une petite babésie mais qui appartient génétiquement aux grandes babésies.

D'un point de vue médical, *B. microti*, *B. divergens* et *B. venatorum* sont les espèces les plus importantes. *B. venatorum* a été provisoirement appelé *Babesia* EU1 (« European Union 1 ») faisant référence à un organisme identifié en Europe par opposition aux WA1, CA1 et MO1 identifiés aux USA (Herwaldt et al. 2003). *B. divergens* est également d'importance vétérinaire puisqu'il est responsable de la babésiose bovine en Europe, nommée également « Redwater Fever ».

1.2.5.2 Maintenance du protozoaire dans la nature

Toutes les babésies sont transmises de manière transstadiale dans les tiques. Par contre, la transmission transovarienne n'a lieu que chez les grandes babésies (*B. divergens* et *B. venatorum*) (Zintl et al. 2003, Bonnet et al. 2007), ce qui implique que tous les stades (larves, nymphes et adultes) sont capables de transmettre *B. divergens* et *B. venatorum* lors d'un repas sanguin.

Tous les vecteurs connus de *Babesia* spp. appartiennent au genre *Ixodes* (Gray et al. 2010). *I. scapularis* est le vecteur principal des souches américaines de *B. microti* (Spielman 1976) mais d'autres espèces endophiles comme *I. spinipalpis*, *I. angustus* et *I. muris* peuvent transmettre le pathogène (Hunfeld et al. 2008). Ces tiques ne piquant pas l'homme, le potentiel zoonotique des souches qu'elles transmettent est actuellement inconnu (Hunfeld et al. 2008).

Les souches européennes de *B. microti* sont transmises par *I. ricinus* et *I. trianguliceps* alors qu'en Angleterre, *I. trianguliceps*, semble être le vecteur principal de *B. microti* (Randolph 1995, Bown et al. 2008). En Europe, *B. divergens* et *B. venatorum* sont également transmis par *I. ricinus* (Zintl et al. 2003, Becker et al. 2009).

B. microti parasite une grande diversité d'hôtes, dont des insectivores, des carnivores et des rongeurs (*Apodemus* spp., *M. glareolus*, *M. agrestis*), ces derniers étant considérés comme réservoirs

principaux (Goethert et Telford 2003, Beck et al. 2011). *B. divergens* est un parasite des cerfs et des bovidés, et le bétail constitue le réservoir principal (Zintl et al. 2003, Gray et al. 2010). Le principal réservoir de *B. venatorum* est le chevreuil (Duh et al. 2005, Bonnet et al. 2007).

En raison de l'existence d'une transmission transovariante et transstadiale de *B. divergens* et *B. venatorum* dans le vecteur *I. ricinus*, ce dernier joue également un rôle de réservoir (Zintl et al. 2003, Bonnet et al. 2007).

1.2.5.3 Distribution géographique et prévalence

En Europe, les trois espèces pathogènes de Babésies sont présentes dans les tiques libres avec une prévalence variant localement de 0.8%, en Suisse, à 51% en Autriche (Tableau 12).

Pays	Prévalence	Références
Pologne	16.3%	Skotarczak et Cichocka (2001)
Slovénie	9.6%	Duh et al. (2001)
France	20.6%	Halos et al. (2005)
Allemagne	1%	Hartelt et al. (2004)
Italie	1.6%	Piccolin et al. (2006)
Luxembourg	2.7%	Reye et al. (2010)
Estonie	1.4%	Katargina et al. (2011)
Pays-Bas	1.1%	Wielinga et al. (2009)
Autriche	51%	Blaschitz et al. (2008b)
Suisse	0.8%	Casati et al. (2006b)
Suisse	1.7%	Gigandet et al. (2011)

Tableau 12 : Prévalence de *Babesia* spp. dans les tiques *I. ricinus* en quête de quelques pays européens.

La répartition des différentes espèces de *Babesia* spp. diffère également d'un pays à l'autre. En Allemagne, *B. divergens* est l'espèce la plus fréquemment identifiée dans les tiques (Hartelt et al. 2004) alors qu'au Luxembourg il s'agit de *B. venatorum* (Reye et al. 2010).

B. divergens est largement répandue en Europe, sa distribution se calquant sur celle de son vecteur, *I. ricinus* (Zintl et al. 2003). Des études épidémiologiques ont démontré la présence de foyers chez les bovins en Autriche, Allemagne, Belgique, France, Irlande, Pays-Bas et en Suisse (Zintl et al. 2003). Sa prévalence dans les tiques en quête varie de 0.07% à 3% (Gigandet et al. 2011). L'espèce *B. venatorum*, récemment décrite en Europe (Herwaldt et al. 2003), a fait l'objet de peu d'investigations

jusqu'à présent et son cycle zoonotique ainsi que sa répartition géographique sont encore mal connus. On signale sa présence chez les tiques libres (Wielinga et al. 2009, Reye et al. 2010) et les tiques gorgées sur des ruminants sauvages et domestiques (Becker et al. 2009). *B. venatorum* étant inféodé aux chevreuils, on décrit sa présence dans 20% des tiques récoltées sur ces animaux sauvages (Duh et al. 2005, Bonnet et al. 2007). *B. microti* est présente en Europe. Elle a été reportée dans des tiques libres (Duh et al. 2001, Skotarczak et Cichocka 2001, Hartelt et al. 2004) ainsi que dans des tiques de rongeurs (Beck et al. 2011, Bown et al. 2011, Burri et al. 2011a). Deux études séroépidémiologiques réalisées en Suisse (Foppa et al. 2002) et en Allemagne (Hunfeld et al. 2002) démontrent que 1.5% et 5.4%, respectivement, des personnes exposées aux tiques possèdent des anticorps contre *B. microti*.

En Suisse, les trois espèces pathogènes, *B. divergens*, *B. venatorum* et *B. microti*, ont été identifiées dans la tique *I. ricinus* (Foppa et al. 2002, Casati et al. 2006b, Hilpertshauer et al. 2006, Burri et al. 2011a, Gigandet et al. 2011). Dans les tiques en quête, la prévalence de *Babesia* spp. varie de 0.8% à 1.7% et *B. venatorum* est, de loin, l'espèce la plus fréquemment identifiée (Casati et al. 2006b, Gigandet et al. 2011).

1.2.5.4 Epidémiologie et manifestations cliniques

Aux USA, plusieurs centaines d'infections humaines ont été déclarées jusqu'à présent, incriminant le plus souvent *B. microti* (Gray et al. 2010). Toutefois, d'autres types de *Babesia* spp. comme WA1 (Washington), CA1 (Californie) et MO1 (Missouri) se sont révélées pathogènes pour l'Homme (Gorenflot et al. 1998, Kjemtrup et Conrad 2000).

En Europe, depuis le premier cas de babésiose humaine en 1957 en ex-Yougoslavie (Skrabalo et Deanovic 1957), une quarantaine de cas ont été recensés (Croatie, France, Irlande, Portugal, Grande-Bretagne, Espagne, Suède) (Hunfeld et al. 2008). Le principal agent étiologique est *B. divergens* qui infecte le plus souvent des patients splénectomisés (Gorenflot et al. 1998). Quelques cas impliquant *B. venatorum* ont été récemment découverts en Autriche, Italie et Allemagne, (Herwaldt et al. 2003, Haselbarth et al. 2007). En Europe, seuls deux cas d'infection à *B. microti* ont été identifiés (Meerscherrer et al. 2004, Hildebrandt et al. 2007). En Suisse, quelques rares cas, dus à *B. microti* et *B. divergens* et dont un est importé du Pays de Galles, ont été observés (Loutan et al. 1993, Meer-Scherrer et al. 2004).

L'homme acquiert une babésiose de diverses manières mais la plus courante étant par le biais d'une piqûre de tique infectée. La transmission du protozoaire par transfusion sanguine a déjà été observée aux USA et tous les cas impliquent *B. microti* (Homer et al. 2000). La transmission transplacentaire n'a été observée que rarement (Kjemtrup et Conrad 2000). Dans tous les cas, les patients aspléniques ou immunodéprimés constituent un groupe à haut risque. De plus, la présence

d'une co-infection avec un autre agent infectieux transmis par les tiques, comme *Borrelia* spp., constitue un facteur aggravant.

Sept espèces de *Babesia* spp. peuvent engendrer une babésiose humaine : *B. microti*, *B. divergens*, *B. bovis*, *B. canis*, *B. duncani*, *B. venatorum* et un nouveau type appelé provisoirement KO1 (Korea, Corée) (Hunfeld et al. 2008). Aux USA ; l'infection à *B. microti* se rencontre le plus fréquemment chez des patients non splénectomisés alors que les autres types (WA1, CA1 et MO1) touchent généralement des patients splénectomisés ou immunosupprimés (Gorenflot et al. 1998). La babésiose américaine due à *B. microti* est la forme la moins sévère de la maladie et ne nécessite souvent pas de traitement. Seuls 5% des cas sont mortels (Gorenflot et al. 1998). Les pathologies dues à *B. divergens* observées en Europe, généralement rencontrées chez des patients splénectomisés, sont beaucoup plus graves et provoquent la mort dans 42% des cas (Gorenflot et al. 1998). Récemment, en Alsace, deux cas ont été décrits chez des patients immunocompétents (Martinot et al. 2011). Au contraire, les symptômes provoqués par *B. venatorum*, pour la plupart observés chez des patients splénectomisés, sont généralement peu sévères (Hunfeld et al. 2008).

Les manifestations cliniques de la babésiose humaine sont provoquées par la multiplication asexuée du protozoaire suivie de la lyse des érythrocytes (Homer et al. 2000). La période d'incubation varie de 1 à 6 semaines après la piqûre de tique. Le spectre des symptômes peut être large, en lien avec le niveau de parasitémie dans le sang. Certaines infections sont peu sévères, s'appariant à une maladie grippale et d'autres sont fulminantes, ressemblant à une malaria et peuvent être fatales. Dans des cas graves, on assiste à une insuffisance rénale ou respiratoire et à des œdèmes pulmonaires.

1.2.6 Virus de l'encéphalite à tique (TBEV)

Le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) est l'agent étiologique de l'encéphalite à tique (TBE pour **tick-borne encephalitis**), une zoonose potentiellement fatale et endémique en Eurasie.

Les toutes premières mentions de l'encéphalite à tiques datent probablement du 18^e siècle dans les archives de l'église finlandaise. En 1931, la maladie est décrite en tant qu'entité clinique et Schneider (1931) mentionne son incidence saisonnière. Le virus est isolé pour la première fois en Russie en 1937 (Zilber 1939), où une incidence élevée d'encéphalite est observée chez l'Homme depuis les années 1930. Zilber démontre également que le virus est transmis à l'Homme par la tique *I. persulcatus* (Zilber 1939). En 1939, Pavlovsky décrit la transmission entre les tiques et les mammifères (Pavlovsky 1947).

En Suisse, la maladie est désignée par les termes **Frühsommer-Meningo-Enzephalitis** (FSME) dans la partie germanophone du pays ou **Méningo-encéphalite verno-estivale** (MEVE) en Suisse romande. Dans ce manuscrit, ce sont les termes anglophones TBE et TBEV qui seront utilisés.

1.2.6.1 *Systématique et morphologie*

D'un point de vue taxonomique, le TBEV appartient au genre *Flavivirus* dans la famille des *Flaviviridae* (Mandl et al. 1997, Calisher et Gould 2003) (Tableau 13). Le genre *Flavivirus* inclut également d'autres virus d'importance médicale comme le virus du Nil occidental (**West Nile Virus**, WNV), le virus de la dengue (DENV) et le virus de la fièvre jaune. Il est divisé en trois sous-groupes en fonction du vecteur du virus : les virus transmis par des tiques, par des moustiques ou par des vecteurs arthropodes encore inconnus (Tableau 13). Le groupe des *Flavivirus* transmis par les tiques est, quant à lui, scindé en deux groupes, le groupe des mammifères et le groupe des oiseaux marins. Le TBEV appartient au premier groupe.

Famille	<i>Flaviviridae</i>
Genre	<i>Flavivirus</i> (< 50 espèces)
	<ul style="list-style-type: none"> ◇ Virus transmis par les tiques <ul style="list-style-type: none"> ◆ Groupe des mammifères (9 virus dont) <ul style="list-style-type: none"> - Virus de l'encéphalite à tiques (3 sous-types) - Virus du louping-ill ◆ Groupe des oiseaux marins (3 virus) ◇ Virus transmis par les moustiques, dont <ul style="list-style-type: none"> ◆ Virus du Nil occidental ◆ Virus de la dengue ◆ Virus de la fièvre jaune ◇ Virus transmis par des vecteurs arthropodes inconnus

Tableau 13 : Classification du virus TBE selon Calisher et Gould (2003).

Le virus de l'encéphalite à tiques est divisé en trois sous-types génétiquement et antigéniquement proches (Ecker et al. 1999, Calisher et Gould 2003):

- 1/ le sous-type européen (*Western*, W-TBEV), appelé auparavant CEE (Central European Encephalitis)
- 2/ le sous-type sibérien (*Siberian*, S-TBEV)
- 3/ le sous-type extrême oriental (*Far-Eastern*, FE-TBEV), appelé autrefois RSSE (Russian Spring-Summer Encephalitis).

La souche Neudoerfl, isolée en Autriche, est la souche de référence pour le sous-type européen alors que les souches Sofjin et Vasilchenko, isolées toutes deux en Russie, sont les souches de références pour les sous-types extrême-oriental et sibérien, respectivement (Hayasaka et al. 2001).

Le virus de l'encéphalite a pour origine une région proche de la Sibérie ou de l'extrême Orient (Pfeffer et Dobler 2010). En se dispersant vers le Sud-ouest de l'Europe, le virus a évolué et de

nouveaux sous-types sont apparus, le sous-type européen virus TBE et le virus du louping-ill au Royaume-Uni, en Espagne et Norvège (Pfeffer et Dobler 2010). Des mouvements de dispersion vers l'Est ont permis l'apparition du sous-type extrême-oriental (Chine et Japon) et du virus Powassan, présent en Russie et en Amérique du Nord. D'après des études phylogénétiques récentes, les sous-types sibérien et extrême-oriental sont plus étroitement liés entre eux qu'avec le sous-type européen du TBEV qui est, lui, plus proche du virus du louping-ill (Ecker et al. 1999, Grard et al. 2007).

Les Flavivirus partagent quelques caractéristiques morphologiques et génétiques : ce sont des virus enveloppés de symétrie icosaédrique et de très petite taille (40-65 nm). Leur génome linéaire consiste en un ARN simple brin de polarité positive (10'000-11'000 bases). Leur cadre de lecture (open reading frame, ORF) unique code pour trois protéines structurales (la protéine C pour la capsid, la protéine M pour la membrane et la protéine E pour l'enveloppe) et sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Chambers et al. 1990). Les parties terminales en 5' et 3' sont non codantes. L'ARN viral du génome est infectieux.

1.2.6.2 Maintenance du virus dans la nature

Le virus TBEV est maintenu dans la nature dans un cycle impliquant le vecteur et des rongeurs infectés. En Europe de l'Ouest, *I. ricinus* est le principal vecteur du sous-type européen alors que le vecteur des sous-types sibérien et extrême oriental est *I. persulcatus* (Gritsun et al. 2003a) (Figure 5). Deux voire même les trois-types du virus peuvent co-circuler dans une même région, là où la distribution géographique des deux vecteurs principaux, *I. ricinus* et *I. persulcatus*, se chevauche. C'est le cas en Finlande (Jaaskelainen et al. 2006), en Estonie (Golovljova et al. 2004) et en Lettonie (Lundkvist et al. 2001) (Figure 5). Une étude récente signale toutefois la présence du sous-type européen dans une tique de l'espèce *I. persulcatus* en Finlande (Jaaskelainen et al. 2011) ainsi que dans des tiques du genre *Haemaphysalis* en Corée du Sud (Kim et al. 2009). En Europe, d'autres espèces de tiques dures ont démontré des compétences de vecteurs dont *I. hexagonus*, *I. arboricola*, *Haemaphysalis punctata* et *H. concinna* (Süss 2003).

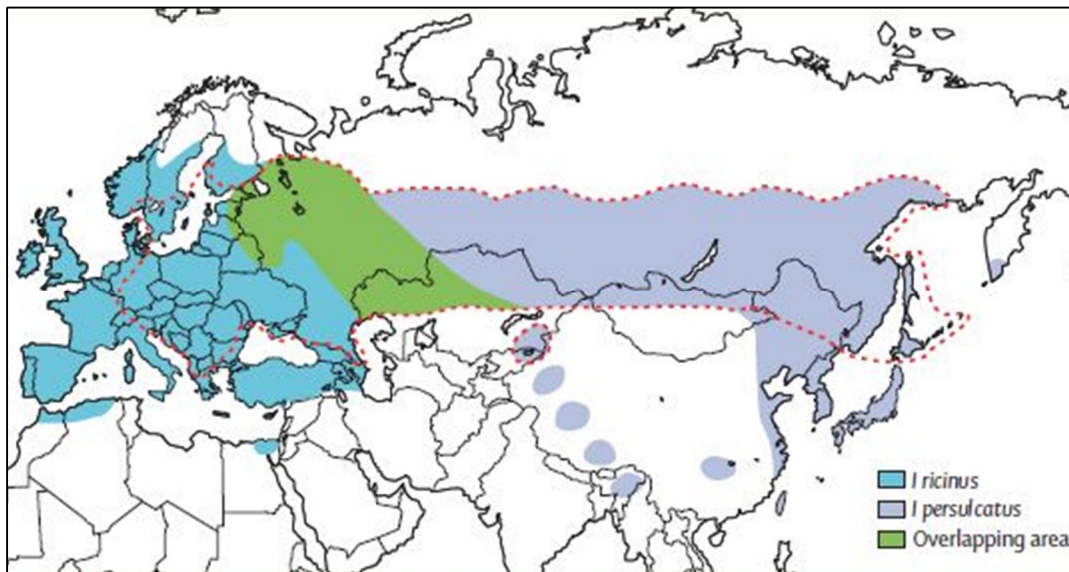


Figure 5 : Distribution géographique des deux vecteurs principaux du TBEV : *I. ricinus* en Europe (bleu ciel) et *I. persulcatus* en Extrême Orient (mauve). La zone verte correspond à la zone de chevauchement des deux vecteurs. La zone traitillée en rouge est la zone endémique au TBEV. Tiré de Lindquist et Vapalahti (2008).

Lorsqu'une tique est infectée, elle est capable de maintenir l'infection d'un stade à un autre ; il y a transmission transstadiale. La transmission transovarienne a également lieu mais elle est peu efficace (0.2-0.8%) (Danielova et Holubova 1991). Le co-feeding (ou « co-repas ») est un mécanisme d'infection très important pour le maintien du virus au sein d'un foyer (Labuda et al. 1993, Labuda et Randolph 1999). Ce phénomène a lieu en l'absence de virémie chez l'hôte et permet la transmission du virus d'une tique infectée (généralement une nymphe) à une tique non infectée (une larve) se nourrissant à proximité (Labuda et al. 1993). La transmission non virémique du TBEV ne semble avoir lieu que chez les rongeurs (*Apodemus* spp.) (Labuda et Randolph 1999). Pour que la transmission par co-feeding ait lieu, les larves doivent impérativement être en quête en même temps que les nymphes (Labuda et Randolph 1999). Cette synchronicité requiert des conditions microclimatiques particulières, notamment une température de 10°C (température de quête minimale des larves) rapidement atteinte au printemps (Randolph et al. 2000). L'acquisition du virus TBE par co-feeding semble bien plus efficace que le mode d'infection classique, c'est-à-dire par repas sanguin sur un animal infectieux (donc ayant développé une infection systémique) (Randolph et al. 1996). Le maintien du virus dans un foyer semble également être assuré par des infections latentes dans certains organes chez les rongeurs (Tonteri et al. 2011).

Diverses espèces d'insectivores, comme les taupes (*Talpa europea*) et les musaraignes (*S. araneus*), ainsi qu'une dizaine d'espèces de rongeurs sont considérées comme hôtes réservoirs du virus TBE (Kozuch et al. 1967, Labuda et al. 1993). Les plus importants sont le mulot sylvestre (*A. sylvaticus*), le mulot à collier (*A. flavicollis*) et le campagnol roussâtre (*M. glareolus*). Ces espèces ont une virémie de courte durée mais permettent toutefois la transmission du virus par co-feeding.

Les grands mammifères, comme les cervidés, sont des hôtes non compétents car ils ne peuvent pas transmettre le virus aux tiques de par leur faible et courte virémie (Gerth et al. 1995) et ils ne sont pas un support au co-feeding. Ils sont néanmoins indispensables au maintien du virus dans un foyer endémique puisqu'ils représentent des hôtes amplificateurs, permettant aux tiques adultes de se nourrir et de perpétuer le cycle. La séroprévalence chez ces grands mammifères peut être un moyen indirect pour mesurer l'intensité de circulation du virus dans une zone endémique ; on dit alors qu'ils sont des hôtes indicateurs. Ils peuvent donc être utilisés comme sentinelles dans des études épidémiologiques (Charrel et al. 2004).

De par leur capacité à maintenir le virus durant les mues successives (passage transstadial) et leur durée de vie relativement longue, les tiques constituent un réservoir efficace des *Flavivirus* (Nuttall et Labuda 2003).

1.2.6.3 Distribution géographique et prévalence

La carte de répartition des zones endémiques au virus TBE est réalisée grâce à la déclaration des cas cliniques recensés ou à la détection du virus dans les tiques. En Suisse, trois cas doivent être décrits dans un périmètre restreint pour que l'Office Fédéral de la Santé Publique (OFSP) déclare une zone endémique.

Le virus TBE est endémique de l'Alsace-Lorraine à Vladivostok et touche également la Chine, le Japon et la Corée du Sud (Hou et al. 1997, Takashima et al. 1997, Dumpis et al. 1999, Kim et al. 2009) (Figure 5). En 2004, la présence du virus est répertoriée dans 25 pays européens et 7 asiatiques (Charrel et al. 2004). En Europe, la distribution du virus n'est pas uniforme mais focale (Pavlovsky 1964, Randolph et al. 1999). Au sein de ces foyers d'endémie, dont la taille peut varier de quelques mètres à plusieurs kilomètres (Zeman 1997, Süss 2003), le virus est maintenu dans un cycle impliquant des tiques et des micromammifères infectés (Pavlovsky 1964). Le cycle de transmission du virus dans ces foyers naturels est très fragile et dépend de conditions microclimatiques particulières (Randolph et Rogers 2000). Les tiques infectées par le TBEV ne sont pas réparties de manière uniforme au sein des foyers mais démontrent une distribution en agrégats.

Dans les zones endémiques, le taux de prévalence du TBEV dans les tiques en quête varie en fonction de la région, du foyer investigué mais également en fonction de la méthode d'analyse choisie. Il est donc important de comparer ces valeurs avec précaution. En Europe, des taux variant de 0.5% à 5% sont généralement observés (Dumpis et al. 1999) (Tableau 14). Toutefois, en Russie, des valeurs allant jusqu'à 40% ont été reportées (Smorodintsev 1958). D'une manière générale, on observe une prévalence d'infection plus élevée chez les adultes que chez les nymphes (Gäumann et al. 2010).

Pays	Prévalence	Références
Pologne	1.6%	Wojcik-Fatla et al. (2011)
Slovénie	0.47%	Durmisi et al. (2010)
République tchèque	0.6%	Danielova et al. (2002)
Finlande	0.34%	Han et al. (2001)
Italie	0.21%	D'Agaro et al. (2009)
Luxembourg	0%	Reye et al. (2010)
Allemagne	0.23%	Kupca et al. (2010)
Autriche	0.44%	Stanek (2009)
Lituanie	0.2%	Han et al. (2005)
Suisse	0.46%	Gäumann et al. (2010)
Suisse	0.1%	Burri et al. (2011b)

Tableau 14 : Prévalence du TBEV dans les tiques en quête (*I. ricinus* et *I. persulcatus*) de quelques pays européens.

En Suisse, les régions endémiques au TBEV ont longtemps été confinées dans un périmètre restreint et stable au Nord-Est de la Suisse (cercle vert, Figure 6). Depuis 2006, de nouvelles zones endémiques au virus ont été déclarées par l'OFSP et actuellement plus de 15 cantons sont touchés. Les régions les plus à risque sont Zürich, St-Gall et Schaffhouse. A l'exception de deux foyers nouvellement identifiés dans le canton du Valais (Gäumann et al. 2010), le Sud du pays semble être épargné.

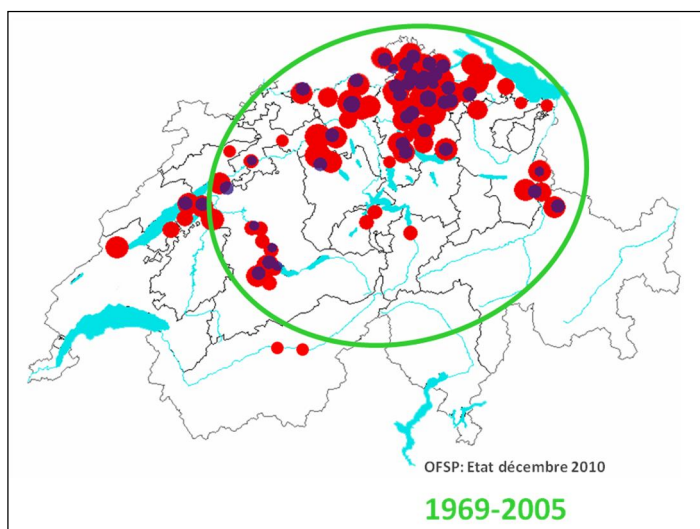


Figure 6 : Carte de distribution des zones endémiques (foyers) en Suisse. Source : Office Fédéral de la Santé publique (OFSP), modifiée. Les points violets représentent les zones endémiques plus anciennes et les points rouges les nouvelles zones endémiques.

Une étude effectuée à l'échelle nationale montre que, dans les zones endémiques, 0.46% des tiques libres sont infectées par le virus TBE (Gäumann et al. 2010). Toutefois, une prévalence 14.3% a été observée dans un foyer du virus TBE connu et situé dans le canton de Berne (centre du pays) (Casati et al. 2006a).

1.2.6.4 Epidémiologie et manifestations cliniques

Chaque année, plus de 10'000 cas cliniques sont déclarés en Eurasie et, si l'on exclut la Russie, environ 3000 cas sont traités annuellement en Europe (Lindquist et Vapalahti 2008). Les pays les plus à risque sont la Russie, les pays Baltes, la Slovénie, la Pologne et la République Tchèque. Aucun cas clinique n'est décrit dans la péninsule Ibérique, en Irlande, en Grande-Bretagne et dans les Etats du Benelux. En Suisse, entre 2003 et 2007, une moyenne de 165 cas cliniques ont été annuellement recensés (Süss 2008).

Depuis les années 90', on assiste à une augmentation du nombre de cas cliniques dans la plupart des pays européens où le virus est présent (Randolph et al. 2008, Süss 2008). De 1976 à 1989, une moyenne de 2'755 cas étaient déclarés annuellement alors qu'entre 1990 et 2007, la moyenne était de 8'755 cas cliniques annuels (Süss 2008). La même tendance a été observée en Suisse. De 1995 à 2004, la moyenne annuelle était de 92 cas cliniques alors qu'en 2006, plus de 240 cas ont été déclarés (Randolph et al. 2008). Selon l'OFSP, il y a eu 115 cas en 2009, 93 en 2010 et 178 en 2011 (Bull. OFSP, 52/11). Les causes pouvant expliquer ce phénomène sont multiples. Le réchauffement climatique a souvent été mis en cause puisqu'une augmentation de température à long terme peut accélérer le cycle de développement des tiques et ainsi influencer la densité de population (Kunze and the ISW TBE). De plus, des hivers plus doux prolongent la période d'activité des tiques et conjointement la durée d'exposition aux tiques infectées. Cependant, d'autres facteurs comme une modification du comportement de l'Homme et une augmentation de la densité des hôtes réservoirs tels que les rongeurs peuvent également modifier l'épidémiologie de cette maladie (Süss, 2006).

L'Homme acquiert l'infection de trois manières : par une piqûre de tique infectée (voie la plus courante), par l'ingestion de lait ou de fromages non pasteurisés issus d'animaux infectés (plutôt des chèvres) (Holzmann et al. 2009) ou par inhalation des particules virales sous forme d'aérosols en laboratoire (très rare) (Avsic-Zupanc et al. 1995).

Les trois sous-types du TBEV sont associés à des degrés différents de sévérité de la maladie. L'encéphalite causée par le sous-type européen (W-TBEV) est généralement moins grave que celles provoquées par les deux autres sous-types (S-TBEV et FE-TBEV) et le taux de mortalité ne dépasse pas le seuil de 1% (Haglund et Gunther 2003). Le FE-TBEV est le sous-type le plus virulent avec des issues fatales dans 20-60% des cas (Dumpis et al. 1999, Gritsun et al. 2003b). Le S-TBEV cause des encéphalites moins sévères que le FE-TBEV mais il est souvent associé à des formes chroniques ou

prolongées de la maladie ; le taux de mortalité n'excède généralement pas 6-8% (Gritsun et al. 2003b).

L'encéphalite à tiques observée en Europe et causée par le W-TBEV est généralement une maladie biphasique (Haglund et Gunther 2003, Süss et al. 2010). Après une période d'incubation d'approximativement une semaine, la première phase (1-8 jours) débute avec des symptômes grippaux (fièvres, myalgies, fatigue, céphalées) et correspond à la propagation du virus dans le corps (phase virémique) (Haglund et Gunther 2003). Après un intervalle asymptomatique d'environ 8 jours, le virus atteint le système nerveux central et provoque des symptômes tels que méningite, encéphalite, radiculite, paralysie, perte de conscience, etc. Cette deuxième phase n'est présente que chez 20-30% des patients infectés, mais elle est souvent associée à une guérison incomplète et des séquelles à long terme (Lindquist et Vapalahti 2008). On observe des issues fatales dans moins de 1% des cas (Haglund et Gunther 2003).

Toutes les classes d'âge peuvent développer des symptômes toutefois, on observe que la maladie est généralement moins grave chez les enfants que chez les adultes et elle est particulièrement sévère chez les patients de plus de 60 ans (Dumpis et al. 1999).

1.2.7 Infections multiples

Les infections multiples par plusieurs pathogènes présentes chez les tiques sont encore mal connues. Elles relèvent toutefois d'une grande importance pour le corps médical puisqu'elles sont susceptibles d'augmenter la sévérité des symptômes ou d'engendrer des formes pathologiques atypiques chez les individus atteints (Belongia 2002). L'action immunosuppressive d'*A. phagocytophilum*, observée tant chez le bétail que chez l'Homme, permet l'apparition d'infections secondaires rendant le diagnostic difficile (Woldehiwet 2008).

Dans cette étude, deux types d'infections multiples sont distinguées. D'une part, les infections mixtes impliquent des pathogènes de même genre, comme les associations *B. valaisiana* et *B. garinii*. Ce type d'infection multiple a été discuté dans le chapitre 1.2.1.3. D'autre part, les co-infections impliquent des pathogènes de genres différents, comme *B. afzelii* et *R. helvetica* ou encore *B. afzelii* et *A. phagocytophilum*.

En Europe, la prévalence de tiques infectées par de multiples pathogènes varie entre 3% et 30% (Reye et al. 2010, Tomanovic et al. 2010).

1.3 Objectifs de l'étude

La tique *I. ricinus* est vectrice de nombreux agents pathogènes d'importance médicale et vétérinaire tels que *Borrelia* spp., *Coxiella burnetti*, *A. phagocytophilum*, *Candidatus N. mikurensis* et le virus

TBE. La plupart des zoonoses causées par ces microorganismes sont actuellement considérées comme émergentes (de La Fuente et al. 2008). En Suisse, de nouvelles espèces comme *B. venatorum*, *R. monacensis*, *B. miyamotoi* ou *B. spielmanii* ont fait leur apparition durant la dernière décennie (Casati et al. 2006b, Boretti et al. 2009, Gern et al. 2010b, Burri et al. 2011a). De plus, le TBEV, longtemps confiné au Nord-Est du pays (Matile 1982, de Marval 1994), a progressé vers l'Ouest et le Sud, et de nouveaux foyers endémiques ont été répertoriés à partir des années 2000 (OFSP 2007, Gäumann et al. 2010).

Notre étude s'insère dans cette situation d'émergence de nouveaux pathogènes en Suisse et de progression du virus TBE dans le pays. Nous nous sommes intéressés à la circulation de ces pathogènes dits « émergents » dans les tiques de l'Ouest du pays puisqu'à l'exception de *Borrelia* spp., ils n'ont fait l'objet que de peu d'investigations. Nous avons souhaité également appréhender le rôle des oiseaux dans la dispersion de tiques infectées mais aussi dans le maintien de ces pathogènes au sein de foyers naturels.

Concrètement, dans un premier temps, nous avons recherché la présence du virus TBE dans les tiques en quête de 49 sites dans le but de confirmer ou infirmer la présence du virus. Ces sites sont situés dans trois zones endémiques, la Plaine de l'Orbe, la Rive sud du lac de Neuchâtel et la région de Moutier, et une zone non endémique mais suspectée d'endémie, la Rive nord du lac de Neuchâtel. En cas de détection du TBEV dans ces régions, notre but a été d'analyser la diversité génétique des isolats obtenus et leur phylogénie afin de les comparer à d'autres souches suisses et européennes.

Dans un deuxième temps, nous avons recherché la présence de *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum*, *Candidatus N. mikurensis* et *Babesia* spp. dans les tiques en quête de 11 sites afin de mieux connaître la distribution géographique de ces pathogènes et d'évaluer leur fréquence dans les tiques. De plus, nous nous sommes intéressées aux infections multiples, impliquant des agents pathogènes de même genre (infections mixtes) et/ou de genres différents (co-infections) dans ces mêmes tiques. Nous avons évalué les fréquences d'apparition de ces infections multiples et les associations les plus fréquemment observées.

Enfin, nous avons recherché la présence de *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum* et du TBEV dans des tiques se nourrissant sur des oiseaux (migrateurs et nicheurs) afin de mieux comprendre le rôle de ces derniers en tant que transporteurs de tiques et de disséminateurs d'agents infectieux et de saisir leur importance dans le cycle naturel de ces pathogènes.

Notre curiosité nous a amené à rechercher la présence de *Candidatus N. mikurensis*, un pathogène encore peu connu, dans quelques tiques d'oiseaux afin de voir si ces hôtes vertébrés peuvent jouer un rôle dans le cycle du pathogène.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Récolte de tiques et zones d'étude

Pour cette étude, qui s'est déroulée dans la partie ouest de la Suisse, nous avons prélevé des tiques sur des oiseaux ainsi que des tiques en quête sur la végétation.

2.1.1 Récolte de tiques sur les oiseaux

Pour la récolte de tiques sur les oiseaux, nous avons capturé des individus lors de leur migration automnale sur le Col de Jaman (Vaud, VD) et des individus nicheurs dans deux forêts mixtes de l'Ouest de la Suisse, Agiez (VD) et Neuchâtel (NE) (Figure 7).

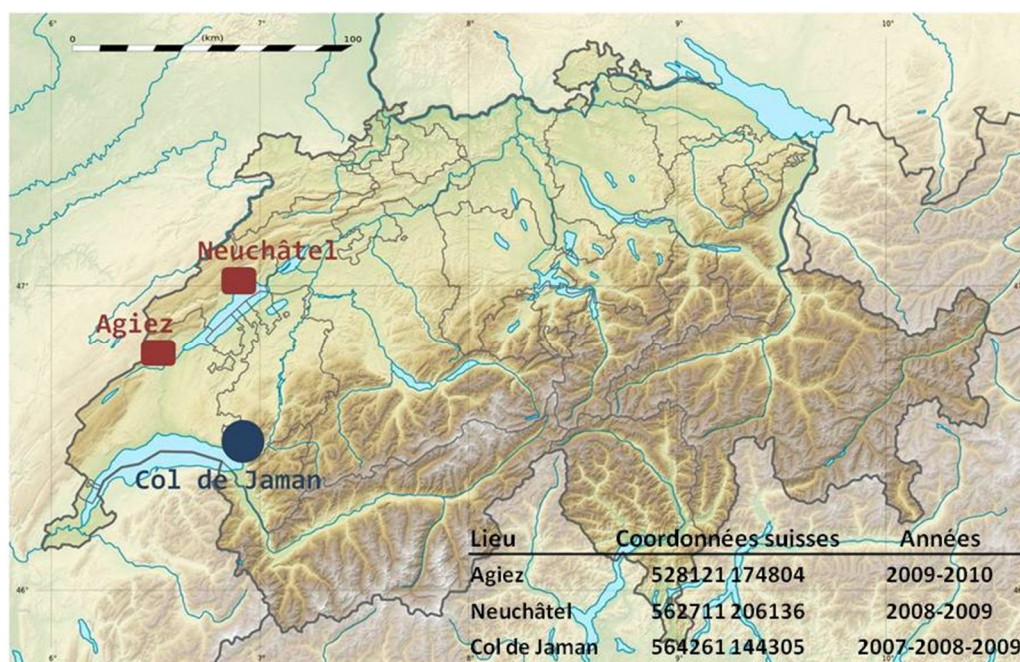


Figure 7 : Sites de capture d'oiseaux migrateurs (en bleu) et nicheurs (en rouge) dans l'Ouest de la Suisse, leurs coordonnées géographiques suisses ainsi que les années de récolte.

2.1.1.1 Oiseaux migrateurs

La récolte de tiques sur les oiseaux migrateurs s'est étendue de 2007 à 2009 sur le Col de Jaman dans les Préalpes vaudoises, à une altitude de 1512m. Il s'y déroule chaque année, de début août à fin octobre, un camp d'étude de la migration effectué par le Cercle Ornithologique de Lausanne. Les oiseaux migrant vers le sud sont capturés à l'aide de filets dit « japonais » d'une étendue de 1300 m² (Figure 8), mesurés, bagués puis relâchés par des ornithologues certifiés. Certaines espèces d'oiseaux locaux peuvent également être prises dans les filets. C'est avant d'être relâché que chaque individu

est minutieusement examiné pour la présence de tiques au niveau du bec et du pourtour des yeux. Les tiques sont délicatement prélevées à l'aide d'une pince courbe et l'oiseau est ensuite relâché. Toutes les tiques d'un même individu sont stockées dans un tube de plastique avec quelques brins d'herbe pour conserver une humidité adéquate à la survie des tiques. Après identification à la loupe (Cotty 1985), les tiques sont lavées à l'éthanol 70%, rincées à l'eau distillée, puis conservées à -20°C jusqu'à leur prochaine utilisation. En 2007, les tiques ont été congelées dans une solution stabilisante RNeasy (Qiagen) alors qu'en 2008 et 2009 aucune solution n'a été utilisée.



Figure 8 : Filets japonais utilisés pour capturer les oiseaux migrants au Col de Jaman (VD). Photos : E. Lommano

Un maximum d'individus de toute espèce a été examiné chaque année. Toutefois, lorsque l'affluence d'oiseaux était trop grande, nos recherches se sont concentrées essentiellement sur les Turridés : merle noir, grive musicienne, grive draine, grive litorne et rouge-gorge. En 2008, l'accent a également été mis sur les pipits des arbres et un grand nombre de tiques a été récolté durant la fin du mois d'août et le mois de septembre par les ornithologues bénévoles présents sur place.

2.1.1.2 Oiseaux nicheurs

Des oiseaux nicheurs ont été capturés durant le printemps-été des années 2008, 2009 et 2010. Deux sites ont été choisis en zone forestière : le Bois de l'Hôpital qui se situe au-dessus de la ville de Neuchâtel, aux alentours de l'Etang de la Combacervey (NE) et une forêt mixte située à l'Ouest du village d'Agiez, dans la plaine de l'Orbe (VD). La forêt située à proximité d'Agiez est connue pour abriter un foyer d'encéphalite à tiques (Lommano et al. 2012). Les captures, effectuées à l'aide de filets japonais (4 filets de 6 m et 1 filet de 9 m), se déroulent le matin, généralement de 7h à 13h. Chaque oiseau capturé est soigneusement examiné autour des yeux et du bec et les tiques fixées sont retirées puis placées dans un tube plastique avec des brins d'herbes. Tous les oiseaux capturés sont examinés pour la présence de tiques sans discrimination d'espèces. Après identification à la loupe selon Cotty (1985), les tiques sont lavées à l'éthanol 70%, rincées à l'eau distillée, séchées puis conservées à -20°C jusqu'à leur prochaine utilisation.

Dans cette étude, nous avons inclus des tiques provenant d'un gros-bec casse-noyau blessé, récupéré dans les alentours de l'Etang de la Combacervey

2.1.2 Récolte de tiques libres

Les sites de récolte de tiques libres se situent tous dans la partie ouest de la Suisse et peuvent être classés en deux groupes ; le premier groupe réunit les sites dans lesquels on a recherché la présence du virus TBE dans les tiques dans le but de confirmer les zones d'endémie. Le deuxième regroupe les sites investigués pour la présence de tiques infectées par des pathogènes émergents.

Toutes les tiques libres ont été récoltées avec la méthode du drapeau, en traînant un linge éponge blanc d'1m² sur la végétation. Aucune mesure climatique, ni de densité de tique n'a été relevée. Les tiques, uniquement des nymphes et des adultes, sont placées dans des tubes avec quelques brins d'herbe. Au laboratoire, les tiques sont lavées à l'éthanol 70%, rincées à l'eau distillée, séchées puis conservées à -20°C jusqu'à l'extraction d'acides nucléiques.

2.1.2.1 Tiques libres pour la détection du TBEV

Les tiques libres analysées pour détecter le virus TBE ont été collectionnées durant trois années consécutives (2008, 2009 et 2010) dans 28 sites répartis sur trois cantons : Vaud, Fribourg (FR) et Neuchâtel (Tableau 15 et Figure 9). Ces sites ont été choisis car ils sont localisés dans deux nouvelles régions endémiques pour le TBE (la Plaine de l'Orbe (VD) et la Rive sud du lac de Neuchâtel (VD/FR)) et dans une région non endémique située entre deux zones endémiques connues (la Rive nord du lac de Neuchâtel (NE)). Un maximum de tiques a été échantillonné entre avril et juillet. La plupart des sites de la Plaine de l'Orbe et de la Rive sud du lac de Neuchâtel ont été choisis selon le témoignage de patients ayant contracté une infection au TBEV et décrivant avec plus ou moins de précision les sites de piqûre de tique (de Vallière et al. 2006, Schlaefli et al. 2007) (Tableau 15 et Figure 9). Quelques sites ont été choisis en fonction des cas répertoriés par l'OFSP. Les sites localisés sur la Rive Nord du lac de Neuchâtel ont été choisis de manière aléatoire.



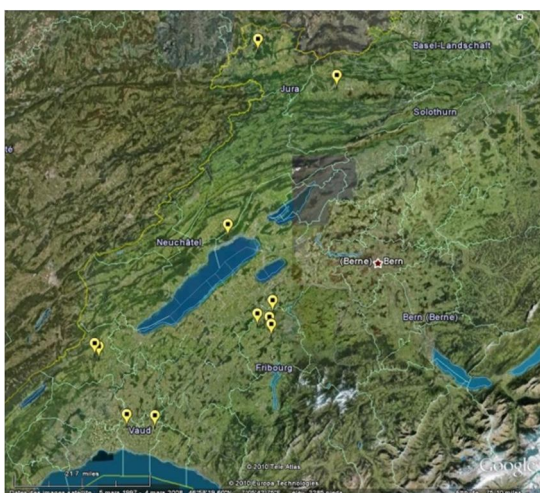
Figure 9 : Emplacement géographique des sites de récolte de tiques pour la recherche du TBEV. A gauche : la Plaine de l'Orbe, au milieu : la Rive sud du lac de Neuchâtel, à droite : la Rive nord du lac de Neuchâtel.

	Sites de récolte	Coordonnées suisses	Année de récolte	Sources
Plaine de l'Orbe	Les Clées 2	526704 175332	2008	de Vallière et al. (2006), OFSP
	Montcherand 1	527652 176450	2009-2010	OFSP
	Montcherand 2	527318 176310	2008-2009-2010	OFSP
	La Russille	527634 177308	2008-2010	aléatoire
	Agiez	528121 174804	2008-2009-2010	de Vallière et al. (2006)
	Les Uttins	536829 181550	2008-2009	de Vallière
	Lignerolle	524829 177848	2009	aléatoire
	Le Gothard	527157 179801	2009	aléatoire
	Conrad Bourgeois	527515 179727	2009	aléatoire
	L'Abergement	526575 179032	2009-2010	Schlaefli, OFSP
Rive sud du lac de Neuchâtel	Portalban	564254 196527	2008-2009	de Vallière et al. (2006), OFSP
	Chabrey 1	566268 197658	2008-2010	de Vallière et al. (2006), OFSP
	Chabrey 2	566251 197609	2008-2009	de Vallière et al. (2006), OFSP
	Chabrey 3	566534 197190	2008-2009	de Vallière et al. (2006), OFSP
	Chabrey 4	566059 197046	2008-2009	de Vallière et al. (2006), OFSP
	Chabrey 5	567036 198073	2009	de Vallière et al. (2006), OFSP
	Salavaux 1	570340 194618	2008	aléatoire
	Salavaux 2	569853 195053	2008-2009-2010	aléatoire
	Salavaux 3	569120 196109	2008	aléatoire
	Salavaux 4	569960 194902	2008-2009	aléatoire
	Cudrefin 1	565503 198529	2008-2009	de Vallière et al. (2006), OFSP
	Cudrefin 2	570033 202203	2008-2009-2010	de Vallière et al. (2006), OFSP
	Cudrefin 3	569891 202 293	2008	de Vallière et al. (2006), OFSP
	Cudrefin refuge	566900 198328	2008-2009	de Vallière et al. (2006), OFSP
Neuchâtel	Hauterive 2	564742 207736	2008-2009-2010	aléatoire
	Cadolles	560859 205742	2008-2009-2010	aléatoire
	Bois de l'Hôpital	562711 206136	2008-2009	aléatoire
	La Coudre	563618 206980	2008-2009-2010	aléatoire

Tableau 15 : Sites de récolte de tiques pour la recherche du TBEV, leurs coordonnées suisses, l'année de récolte ainsi que les sources d'information utilisées pour le choix des sites.

2.1.2.2 Tiques libres pour la détection de pathogènes émergents

La présence d'ADN de pathogènes émergents tels que *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., *Candidatus* N. mikurensis et *A. phagocytophilum* a été recherchée dans des tiques libres provenant de 11 sites choisis aléatoirement et répartis sur 4 cantons (VD, FR, NE et Jura (JU)) (Figure 10). Ces sites, tous situés au sein de forêts mixtes, se situent entre 400 m et 900 m d'altitude. Les sites de Romanel et du Chalet-à-Gobet ont été investigués mensuellement, durant 12 mois consécutifs, de juillet 2009 à juin 2010. Pour les autres terrains, un maximum de tiques a été échantillonné entre avril et juillet.



	Lieu	Coordonnées suisses	Années
JU	Delémont	591000 247000	2009
	Mormont	570000 254000	2009
VD	Agiez	528121 174804	2009
	Montcherand	527318 176310	2009-2010
	Romanel	535692 158752	2009-2010
	Chalet-à-Gobet	542134 157668	2009-2010
FR	Rosé	572468 182645	2009-2010
	Belfaux	573443 187114	2009-2010
	Matran	573180 180913	2010
	Seedorf	569467 183483	2010
NE	Neuchâtel	562711 206136	2009-2010

Figure 10: Emplacement géographique des sites de récolte de tiques libres pour la détection des pathogènes, leurs coordonnées suisses ainsi que l’année de récolte.

2.2 Extractions d’acides nucléiques

Trois méthodes d’extraction d’acides nucléiques ont été utilisées en fonction des pathogènes recherchés dans les tiques (Figure 11). Pour les tiques d’oiseaux, nous avons procédé à une extraction d’acides nucléiques totaux sur une machine automatisée dans le laboratoire ADMED, à la Chaux-de-Fonds. Pour les tiques libres, nous avons effectué une extraction d’ADN à l’hydroxyde d’ammonium (NH₄OH) (détection de pathogènes) ou une extraction d’ARN au TRIzol® (détection du TBEV), toutes deux dans les locaux de l’Université de Neuchâtel.

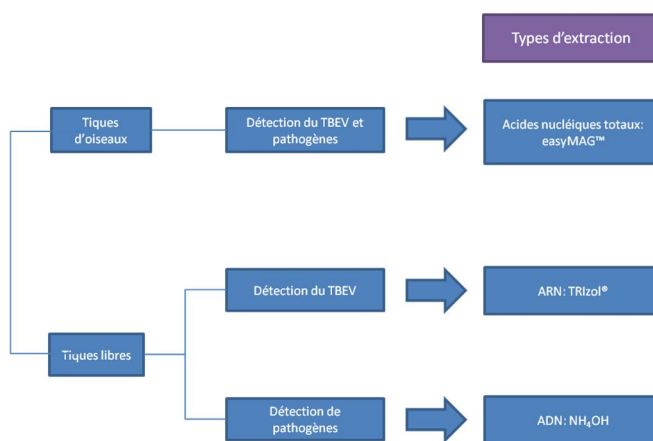


Figure 11: Trois types d’extraction ont été réalisés en fonction des différentes tiques récoltées.

2.2.1 Extraction d’acides nucléiques totaux

L’extraction des acides nucléiques totaux a été réalisée sur une machine automatisée (NucliSENS® easyMAG™, bioMérieux) avec les réactifs fournis du fabricant. La lyse est externe, cela signifie qu’elle

n'est pas effectuée par la machine mais par nos soins dans les laboratoires de l'Université de Neuchâtel. Pour cela, chaque tique est placée individuellement dans un tube de 2 ml avec une bille de 3 mm de diamètre et 50 µl de tampon Tris-EDTA (pH = 8) et broyée durant 5 minutes (mixer mill MM 300, Retsch). Un volume de 1,5 ml de tampon de lyse (fourni par le fabricant) est ajouté au broyat. Les tiques récoltées en 2007 et stockées dans une solution stabilisante RNA*later*[®] Solution (Ambion[®]) sont préalablement séchées sur du papier absorbant avant d'être placées dans les tubes pour être broyées. Au laboratoire ADMED, la procédure d'extraction démarre avec une étape d'incubation durant laquelle les acides nucléiques sont capturés par des billes de silice magnétiques. Ces dernières sont magnétisées contre la paroi des tubes, emportant avec elles les acides nucléiques, ce qui permet au système de procéder à des lavages. Les acides nucléiques sont ensuite libérés des billes de silice par une étape de chauffage et séparés de celles-ci lorsqu'elles sont magnétisées contre la paroi des tubes. Les acides nucléiques sont élués dans un volume final de 110 µl. Chaque échantillon est directement aliquoté dans plusieurs tubes pour les analyses qui suivront et congelé à -20°C. De plus, deux tubes « stock » sont réalisés par échantillon : l'un stocké à -80°C pour garantir la stabilité de l'ARN et l'autre à -20°C pour l'ADN. Des contrôles négatifs, contenant les réactifs sans tique, sont inclus lors de chaque session d'extraction.

2.2.2 Extraction d'ARN au TRIzol[®]

Le protocole d'extraction au TRIzol[®] (Chomczynski et Sacchi, 1987) utilisé dans cette étude est celui fourni par le fabricant (Invitrogen), modifié comme décrit dans Lommano et al. (2012b). Pour l'extraction d'ARN à partir de tiques libres, des pools regroupant de 1 à 20 nymphes et de 1 à 10 adultes ont été constitués. Un contrôle négatif est inclus lors de chaque extraction (réactifs sans tique).

2.2.3 Extraction d'ADN au NH₄OH

L'extraction d'ADN des tiques récoltées pour la détection de pathogènes a été réalisée à l'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) selon un protocole décrit par Guy et Stanek (1991) et Rijpkema et al. (1995). Des contrôles négatifs, contenant uniquement les réactifs (sans tique), ont été inclus lors de chaque extraction.

2.3 Détection et identification des pathogènes

Au total, six pathogènes différents (bactéries, protozoaires et virus) ont été recherchés dans les tiques récoltées lors de cette étude. Ce sont : *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum*, *Candidatus* N. mikurensis, *Babesia* spp. et le TBEV. Les tiques d'oiseaux ainsi que les tiques libres

analysées pour les pathogènes ont été examinées individuellement alors que la recherche du TBEV a été réalisée dans des pools de tiques libres.

Différentes méthodes d'amplification, de détection et d'identification ont été utilisées pour la recherche de pathogènes dans les tiques (Tableau 16). *Rickettsia* spp. et *Candidatus N. mikurensis* sont détectées et identifiées par réaction en chaîne par polymérase (PCR) (voir 2.3.1) suivie d'une Reverse Line Blot (RLB) (voir 2.3.2), alors qu'*A. phagocytophilum* est détecté par PCR en temps réel (voir 2.3.3). Pour la détection et l'identification de *Borrelia* spp. (voir 2.3.5.1), deux procédés ont été utilisés. Les tiques sont soit directement analysées par PCR/RLB (pour les tiques libres récoltées à Romanel, Chalet-à-Gobet, Mormont et Delémont ainsi que quelques tiques d'oiseaux), soit un screening est effectué par PCR en temps réel suivie d'une identification des géoespèces par PCR/RLB sur les échantillons positifs. Pour la recherche du TBEV (virus à ARN), une reverse transcriptase (RT)-PCR en temps réel est réalisée sur chaque tique individuellement (tiques d'oiseaux) ou sur des pools (tiques libres).

	<i>Borrelia</i> spp.	<i>Rickettsia</i> spp.	<i>Candidatus N. mik</i> ¹	<i>A. phagocyto</i> ²	<i>Babesia</i> spp.	virus TBE
Cible	ADN	ADN	ADN	ADN	ADN	ARN
Méthode d'analyse	PCR temps réel/ PCR + RLB	PCR + RLB	PCR + RLB	PCR temps réel	PCR + RLB	RT-PCR temps réel

Tableau 16 : Tableau récapitulatif des méthodes d'amplification, de détection et d'identification des pathogènes dans les tiques. ¹ *Candidatus N. mikurensis*, ² *A. phagocytophilum*.

2.3.1 Principe de la PCR

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une technique de biologie moléculaire de réplication ciblée *in vitro*. Elle permet de copier en grand nombre un fragment d'ADN ou d'ARN connu à partir de petites séquences spécifiques d'ADN (amorces ou « primers »). Un million de copies du fragment désiré est obtenu en quelques heures, l'amplification étant exponentielle. Cette technique a été imaginée en 1985 (K. Mullis, prix Nobel en 1993) et commercialisée en 1988. La découverte d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées (Taq polymérase) a permis l'automatisation de la technique.

La technique consiste en une succession de cycles de transition de température (~30 à 40) qui comprennent chacun trois étapes (Figure 12):

1. la dénaturation : séparation des deux brins d'ADN par chauffage
2. l'hybridation : appariement des amorces aux brins d'ADN complémentaires
3. élongation : synthèse du brin complémentaire

Dans des conditions idéales, le nombre de copies double après chaque cycle.

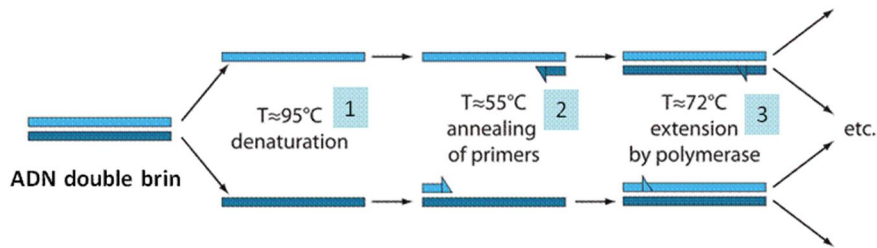


Figure 12 : Représentation schématique de la PCR.
<http://microfluidics.stanford.edu/Projects/Current/OnChipPCR/PCRschematic.PNG>

2.3.2 Principe de la Reverse Line Blot (RLB)

La Reverse Line Blot (RLB) est une méthode relativement simple et rapide pour la détection et l'identification de microorganismes dans des échantillons provenant du terrain. La rapidité de cette méthode repose sur le fait qu'elle permet de tester simultanément la réactivité de 43 échantillons sur 43 sondes différentes.

La RLB pour *Borrelia* a été développée par Rijpkema et al. (1995) dans le but d'identifier les différentes géoespèces appartenant à *B. burgdorferi* sl dans les tiques. Elle a ensuite été modifiée par Schouls et al. (1999) pour permettre de détecter simultanément différentes espèces telles qu'*Ehrlichia* spp., *B. burgdorferi* sl et *Bartonella* spp.

La RLB possède des avantages certains qui font d'elle un outil de choix pour la détection de multiples pathogènes dans les tiques :

- La méthode est sensible, ce qui nous permet de travailler avec des échantillons dont la quantité d'ADN est faible, comme des larves d'*I. ricinus*.
- Elle permet de distinguer les infections multiples que l'on rencontre fréquemment chez les tiques.
- Elle permet la détection simultanée de plusieurs espèces.
- Elle est rapide puisqu'elle permet l'identification de pathogènes en évitant la méthode gel-séquençage.

Brièvement, lors de la RLB, des produits PCR biotinés sont hybridés à une membrane en nylon sur laquelle sont fixées de manière covalente des sondes spécifiques oligonucléotidiques. La détection des pathogènes se fait par chimiluminescence (Figure 13).

On distingue globalement trois étapes :

1. La sensibilisation de la membrane par liaison covalente des sondes.
2. L'hybridation de la membrane et détection des réactions.
3. La déshybridation de la membrane pour permettre une utilisation ultérieure.

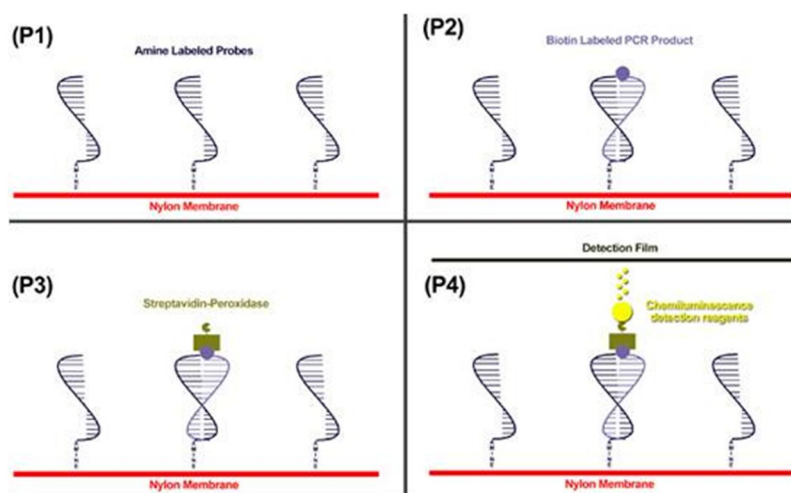


Figure 13 : Principe de la RLB. (P1) Les sondes sont fixées de manière covalente à la membrane. (P2) Les produits PCR biotinés sont hybridés aux sondes. (P3) La streptavidine, marquée à la peroxydase, est déposée sur la membrane et se lie à la biotine. (P4) La peroxydase va réagir avec les produits de détection ECL, produisant une réaction lumineuse, mise en évidence sur des films photosensibles.

(<http://www.jove.com/video/2781/multiplex-pcr-and-reverse-line-blot-hybridization-assay-mPCR-rlb>)

2.3.3 Principe de la PCR en temps réel

La PCR en temps réel aussi appelée PCR quantitative (qPCR) est une technique dérivée de la PCR classique qui permet l'amplification, la détection et la quantification simultanée (en temps réel) du segment d'ADN cible. La quantité d'ADN synthétisé (amplicon) est mesurée à chaque cycle d'amplification grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'ADN polymérisé.

Plusieurs systèmes de détection sont utilisés pour la détection et quantification du signal : les agents intercalants et les sondes. La technologie utilisée dans cette étude fait partie du second système précité et se nomme TaqMan (ou hydrolyse des sondes) (Figure 14). La technique TaqMan (dont le nom provient de Taq polymérase et de PacMan) utilise une sonde oligonucléotidique (sonde TaqMan) marquée à ses extrémités par deux fluorophores : le fluorophore émetteur (« reporter », dans notre cas le FAM) à son extrémité 5' et le fluorophore suppresseur (« quencher », dans notre cas le TAMRA) en 3'. Ce dernier inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont proches. La dégradation de la sonde (par hydrolyse) lors du passage de la Taq polymérase va séparer les deux fluorophores et engendrer une fluorescence proportionnelle au nombre de sondes hydrolysées, mesurée au cours de l'élongation.

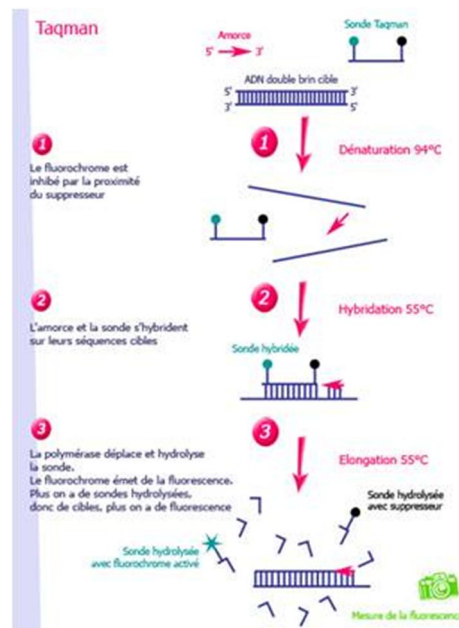


Figure 14 : Principe de la technologie TaqMan.
(<http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>)

2.3.4 Principe de RT-PCR en temps réel

Il s'agit d'une PCR en temps réel (qPCR) après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc). Elle permet de synthétiser le brin complémentaire d'une séquence d'ARN en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante tout en le quantifiant en temps réel. On la nomme aussi : qRT-PCR.

2.3.5 Gènes ciblés pour la détection des pathogènes

2.3.5.1 *Borrelia* spp.

La PCR en temps réel utilisée pour la détection d'ADN de *Borrelia* spp. dans les tiques amplifie un fragment de 132 pb du gène de la *flagelline* (Schwaiger et al. 2001). Les amorces (FlaF1a et FlaR1) et la sonde (Flaprobe1) sont décrites dans les tableaux 17 et 18. Des isolats de *B. burgdorferi* ss (B31), *B. garinii* (NE11), *B. afzelii* (NE632) et *B. valaisiana* (VS116) ont été utilisés comme contrôles positifs. Un contrôle négatif (H₂O) est inclus lors de chaque PCR en temps réel. Chaque échantillon dont le signal est positif en PCR en temps réel est ensuite analysé par PCR/RLB pour l'identification des génoespèces. Pour cela, l'espace intergénique entre les sous-unités 5S-23S codant pour l'ARN ribosomal (410 pb) est amplifié (Alekseev et al. 2001) selon une méthode de touch-down PCR décrite par Burri et al. (2007). Les amorces (B5S-Bor et 23S-Bor) sont décrites dans le Tableau 17. Des isolats de *B. burgdorferi* ss (B31), *B. garinii* (NE11), *B. afzelii* (NE632), *B. valaisiana* (VS116) et *B. lusitaniae* (PotiB1, PotiB2) ont été utilisés comme contrôles positifs. Un contrôle négatif (H₂O) a également été inclus lors de chaque étape d'amplification. Pour l'identification par RLB (Schouls et al. 1999), les

produits PCR obtenus ont ensuite été hybridés à 15 sondes spécifiques répertoriées dans le tableau 18 et décrites par Gern et al. (2010b).

2.3.5.2 *Rickettsia spp.*

Pour *Rickettsia spp.*, l'espace intergénique 23S-5S a été amplifié (345 pb) selon une méthode décrite par Jado et al. (2006). Les amorces (RCK/23-5F et RCK/23-5R) sont décrites dans le Tableau 17. Un contrôle positif (ADN *R. conorii*) et un contrôle négatif (H₂O) sont inclus lors de chaque étape d'amplification. La RLB a été exécutée selon Jado et al. (2006), avec les modifications de température suivantes : hybridation à 48°C et lavage à 52°C. Les sondes utilisées sont répertoriées dans le Tableau 18.

2.3.5.3 *Candidatus N. mikurensis*

La détection de *Candidatus N. mikurensis* a été réalisée par PCR/RLB, comme décrit dans Tonetti et al. (2009). Le gène ciblé, un fragment d'environ 500 pb, est la région hypervariable V1 de la sous-unité ribosomale 16S (Schouls et al. 1999). La touch-down PCR (modifiée d'après Bekker et al. (2002)) a été exécutée selon Tonetti et al. (2009). Les amorces (16S8FE et BGA1B-new) sont listées dans le Tableau 17. Lors de chaque étape d'amplification, un contrôle négatif (H₂O) et un contrôle positif (*A. phagocytophilum* souche Webster, obtenue de A. S. Santos) sont inclus. Les conditions de la RLB sont décrites dans Tonetti et al. (2009) et les sondes utilisées sont listées dans le Tableau 18.

2.3.5.4 *A. phagocytophilum*

La détection d'*A. phagocytophilum* a été réalisée grâce à une PCR en temps réel amplifiant le gène *msp2* (77 pb) et décrite par Courtney et al. (2004). Les amorces (ApMSP2f et ApMSP2r) ainsi que la sonde (ApMSP2p) sont décrites dans les tableaux 17 et 18. Un contrôle négatif (H₂O) et positif (*A. phagocytophilum* souche Webster, obtenu d'A. S. Santos) sont inclus lors de chaque procédure d'amplification. Afin d'identifier et de caractériser les souches d'*A. phagocytophilum* détectées dans les tiques, certains échantillons positifs en PCR en temps réel ont été séquencés. Il s'agit de tous les échantillons positifs provenant de tiques d'oiseaux et de quelques échantillons issus des tiques libres. Pour le séquençage, le gène 16S et l'opéron *groESL* (1296pb) ont été amplifiés. Pour le gène 16S, les amorces sont les mêmes que celles utilisées pour la détection de *Candidatus N. mikurensis* (voir 2.3.5.3). L'amplification de l'opéron *groESL* est réalisée grâce à une PCR traditionnelle suivie d'une nested (nichée) PCR (Sumner et al. 1997, Liz et al. 2000). Les deux paires d'amorces utilisées (HS1a, HS6 et HS43, HSVR) sont listées dans le Tableau 17 Des contrôles négatif (H₂O) et positif (*A. phagocytophilum* souche Webster) ont également été inclus lors des deux étapes d'amplification.

Agent pathogène	Amorces	Sequence (5'-3')	Utilisé pour	Gène cible	Longueur du fragment (pb)	Références
Genre <i>Rickettsia</i>	RCK/23-5-F	biotin-GATAGGTCRGRGTGGAAAGCAC	PCR/SEQU	23S-5S rRNA	345	Jado et al. 2006
	RCK/23-5-R	TCGGGAYGGATCGTGTTTC	PCR/SEQU	23S-5S rRNA		Jado et al. 2006
Genre <i>Rickettsia</i>	Rp877p	GGGGGCTGCTCAGCGGG	PCR/SEQU	gItA	380	Bernasconi et al. 2002
	Rp1258n	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	PCR/SEQU	gItA		Roux et al. 1997
Genre <i>Babesia/Theileria</i>	RLB-F2	GACACAGGGAGGTAGTGACAAG	PCR/SEQU	18S rRNA	450	Georges et al. 2001
	RLB-R2	biotin-CTAAGAAITTCACCTCTGACAGT	PCR/SEQU	18S rRNA		Georges et al. 2001
<i>A. phagocytophilum</i>	ApMSP2f	ATGGAAGGTAGTGTGGTTATGGTATT	PCR temps réel	<i>msp2</i>	77	Courtney et al. 2004
	ApMSP2r	TGGTCTGAAGCGCTCGTA	PCR temps réel	<i>msp2</i>		Courtney et al. 2004
Genre <i>Anaplasma/Ehrlichia</i>	16S8FE	GGAATTCAGAGTTGGATCMTGGYTCAG	PCR/SEQU	16s rRNA	425	Schouls et al. 1999
	B-GA1B	biotin-CGGGATCCGAGTTTCCGGGACTTCT	PCR/SEQU	16s rRNA		Bekker et al. 2002
<i>A. phagocytophilum</i>	HS1a	AITGGGCTGGTAITGAAAT	PCR	<i>groESL</i> operon	1667	Liz et al. 2000
	HS6a	CCICIGGIACIAIACCTTC	PCR	<i>groESL</i> operon		Liz et al. 2000
<i>A. phagocytophilum</i>	HS43	AT(A/T)GC(A/T)AA(G/A)GAAGCATAGTC	Nested/SEQU	<i>groESL</i> operon	1300	Sumner et al. 1997
	HSVR	CTCAACAGCAGCTCTAGTAGC	Nested/SEQU	<i>groESL</i> operon		Lotric-Furlan et al. 1998
<i>B. burgdorferi</i> sI	FlaF1A	AGCAAATTTAGGTGCTTTCCAA	PCR temps réel	<i>Flagelline</i>	132	Schwaiger et al. 2001
	FlaR1	GCAATCATTGCCATTGCAGA	PCR temps réel	<i>Flagelline</i>		Schwaiger et al. 2001
<i>B. burgdorferi</i> sI	B-5SBor	biotin-GAGTTGCGGGAGAGTAGGTTATT	PCR/SEQU	5S-23S spacer	410	Alekseev et al. 2001
	23SBor	TCAGGGTACTTAGATGGTTCACTT	PCR/SEQU	5S-23S spacer		Alekseev et al. 2001
Virus TBE	F-TBE1	GGGCGGTTCTGTCTTC	RT-PCR temps réel	3' NCR	28	Schwaiger et Cassinotti 2003
	R-TBE1	ACACATCACCTCCTTGTCAGACT	RT-PCR temps réel	3' NCR		Schwaiger et Cassinotti 2003
Virus TBE	FSM-1	GAGGCTGAACAACTGCACGA	RT-PCR	NS5	358	Puchhammer-Stöckl et al. 1995
	FSM-2	GAACACGTCCATTCTCGAATCT	RT-PCR	NS5		Puchhammer-Stöckl et al. 1995
Virus TBE	FSM-1i	ACGGAACGTGACAAGGCTAG	Nested/SEQ	NS5	252	Puchhammer-Stöckl et al. 1995
	FSM-2i	GCTTGTTACCATCTTTGGAG	Nested/SEQ	NS5		Puchhammer-Stöckl et al. 1995

Tableau 17 : Description des amorces utilisées dans cette étude.

Nested=nested PCR ; SEQU=séquençage.

Agent pathogène	Sondes	Sequence (5'-3')	Concentration pour RLB (pmol)	Gène cible	Références
Genre <i>Rickettsia</i>	GP-RICK	TAGCTGGATTGRTTACTTTG	100	23S-5S rRNA	Jado et al. 2006
SFG <i>Rickettsiae</i>	RCK-SFG	ACTCAARGTTATCAGGT	500	23S-5S rRNA	Jado et al. 2006
<i>R. helvetica</i>	P-HELV	CATGGCTTGATCCAGGTA	100	23S-5S rRNA	Jado et al. 2006
Genre <i>Babesia/Theileria</i>	catch-all B/T	TAATGGTTAATAGGARCRGTTG	50	18S rRNA	Georges et al. 2001
<i>B. venatorum</i>	<i>B. venatorum</i>	GAGTTATTGACTCTGTCTTTAA	500	18S rRNA	Gigandet et al. 2011
<i>B. divergens</i>	<i>B. divergens</i>	GTTAATATTGACTAATGTGCGAG	500	18S rRNA	Gubbels et al. 1999
<i>B. microti</i>	<i>B. microti</i>	GCTCCGAGCGTTTTTTAT	500	18S rRNA	Gigandet et al. 2011
Genre <i>Anaplasma/Ehrlichia</i>	catch-all A/E	GGGGAAAGATTTATCGCTA	100	16s rRNA	Bekker et al. 2002
<i>Candidatus N. mikurensis</i>	A-Eschat	GCTGTAGTTTACTATGGGTA	500	16s rRNA	Schouls et al. 1999
<i>B. burgdorferi</i> sI	SL1	CTTTGACCATATTTTATCTTCCA	75	5S-23S spacer	Rijpkema et al. 1995
<i>B. burgdorferi</i> ss	SS	AACACCAATATTTAAAAACATAA	75	5S-23S spacer	Rijpkema et al. 1995
<i>B. garinii</i>	GA	AACATGAACATCTAAAAACATAA	75	5S-23S spacer	Rijpkema et al. 1995
<i>B. garinii</i>	GA NE	CAAAAACATAAATCTAAAAACATAA	75	5S-23S spacer	Poupon et al. 2006
<i>B. afzelii</i>	AF	AACATTTAAAAAATAAATTCAGG	75	5S-23S spacer	Rijpkema et al. 1995
<i>B. valaisiana</i>	VSNE	TATATCTTTTGTTCATTCATGT	75	5S-23S spacer	Poupon et al. 2006
<i>B. lusitaniae</i>	LusINE	TCAAGATTTGAAAGTATAAAAAATAA	75	5S-23S spacer	Poupon et al. 2006
<i>B. lusitaniae</i>	LusINE1	CATTCAAAAAATAAACAATTTAAAAACAT	100	5S-23S spacer	Germ et al. 2010
<i>B. lusitaniae</i>	LusINE2	AAATCAAAACATTCAAAAAATAAAC	100	5S-23S spacer	Germ et al. 2010
<i>B. miyamotoi</i>	RFLNE	CTATCCATTGATCAATGC	100	5S-23S spacer	Germ et al. 2010
<i>B. spielmanii</i>	SpiNE2	GAATGGTTTATCAAATAACATA	100	5S-23S spacer	Germ et al. 2010
<i>B. spielmanii</i>	SpiNE3	GAATAAGCCATTTAAATAACATA	100	5S-23S spacer	Germ et al. 2010
<i>B. garinii</i>	GA NE1	AAAAACAATGTTAAAGTATAAAAT	100	5S-23S spacer	Germ et al. 2010
<i>B. bissettii</i>	BisNE1	AAACACTAACATTTAAAAACAT	100	5S-23S spacer	Germ et al. 2010
<i>B. bissettii</i>	BisNE2	AACTAACAAACATTTAAAAACAT	100	5S-23S spacer	Germ et al. 2010
Virus TBE	TBE-WT	FAM-TGAGCCACCATCACCAGACACA-TAMRA	-	3' NCR	Schwaiger et Cassinotti 2003
<i>B. burgdorferi</i> sI	Flaprobe1	FAM-TGCTAACACCTACTCTGTCATTGTAGCATCTTTTATTG-TAMRA	-	Flagelline	Schwaiger et al. 2001
<i>A. phagocytophilum</i>	ApMSP2p	FAM-TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG-TAMRA	-	mSP2	Courtney et al. 2004

Tableau 18 : Description des sondes utilisées dans cette étude (RLB et PCR en temps réel).
Toutes les sondes utilisées pour la RLB contiennent un groupement amine en 5'.

2.3.5.5 *Babesia spp.*

Une PCR, amplifiant le gène 18S (450 pb), suivie d'une RLB ont été utilisés pour identifier *Babesia spp* dans les tiques (Georges et al. 2001, Gigandet et al. 2011). Les amorces (F2 et B-R2) sont listées dans le Tableau 17. Lors de chaque réaction, un contrôle négatif (H₂O) et un contrôle positif (ADN *B. microti* ou *B. divergens*, obtenus de C. Ruehle) ont été inclus. La technique de la RLB a été utilisée pour l'identification des espèces (Gigandet et al. 2011). Les sondes sont répertoriées dans le Tableau 18.

2.3.5.6 *Virus TBE*

La recherche du virus TBE dans les tiques a été réalisée par RT-PCR en temps réel (voir 2.3.4), comme décrit dans Lommano et al. (2012b). C'est un fragment de 28 pb de la région non codante située en 3' qui est amplifié (Schwaiger et Cassinotti 2003). Les amorces (F-TBE1 et R-TBE1) ainsi que la sonde (TBE-WT) sont décrites dans les tableaux 17 et 18. Lors du processus d'amplification, un contrôle négatif (H₂O RNase free) ainsi qu'un contrôle positif (souche humaine du TBEV, obtenue de P. de Mendonça) ont été ajoutés. La présence du virus TBE dans les échantillons positifs en RT-PCR en temps réel est confirmée par PCR et nested PCR comme décrit dans Lommano et al. (2012b). Pour cela, l'ARN extrait doit d'abord être transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par le biais d'une enzyme, la reverse transcriptase. Le protocole exécuté est celui fourni par le fabricant de l'enzyme (Invitrogen) et l'enzyme utilisée est la M-MLV. Un contrôle négatif (H₂O RNase free) et un contrôle positif sont ajoutés lors de cette étape de transcription.

L'ADNc obtenu est directement utilisé pour l'étape suivante : l'amplification d'un fragment de 358 pb du gène codant pour la protéine non structurale NS5, selon Puchhammer-Stockl et al. (1995). Les amorces (FSM-1 et FSM-2) sont décrites dans le Tableau 17. Les amplicons ainsi obtenus peuvent être stockés à 4°C ou directement utilisés comme cibles pour la nested PCR, qui amplifie un fragment plus interne de 252 pb (Puchhammer-Stockl et al. 1995). Les amorces internes (FSM-1i et FSM-2i) sont décrites dans le Tableau 18.

2.4 Analyses ADN et séquençage

Le séquençage d'échantillons positifs a été effectué pour plusieurs raisons :

- Échantillons non identifiés au niveau de l'espèce (*Borrelia spp.*, *Babesia spp.*, *Rickettsia spp.*)
- Confirmation de positifs (TBEV)
- Caractérisation de positifs dans un but comparatif (TBEV, *A. phagocytophilum*, *Candidatus N. mikurensis*).

Les gènes ciblés pour le séquençage sont parfois les mêmes que ceux amplifiés pour la détection/identification des pathogènes (*Borrelia* spp., *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *Candidatus N. mikurensis*). Dans ce cas, ce sont les produits PCR déjà existants qui sont purifiés. Dans d'autres cas, les gènes ciblés sont différents de ceux traditionnellement amplifiés lors de la détection (*A. phagocytophilum*, TBEV, *Rickettsia* spp.). Un autre gène est donc amplifié dans le but unique d'être séquencé. Toutes les amorces utilisées ainsi que les gènes séquencés sont répertoriés dans le tableau 17.

Le séquençage se déroule en 2 étapes : les produits d'amplification PCR sont tout d'abord purifiés au laboratoire à l'aide d'un kit (Promega), puis ils sont envoyés chez Microsynth AG (Balgach, Switzerland) (www.microsynth.ch) pour le séquençage.

2.4.1 Purification des produits PCR

Cette étape permet l'élimination des nucléotides non incorporés et des amorces en excès nécessaire au bon déroulement du séquençage. Dans cette étude, le protocole de purification exécuté est celui du fabricant (Promega), avec une modification du volume de l'éluat (25 µl d'H₂O nucléase free au lieu de 50 µl).

2.4.2 Séquençage

Le séquençage de l'ADN purifié a été réalisé (dans un sens ou les deux) grâce à la méthode de Sanger par Microsynth AG (www.microsynth.ch). Pour cela, on réunit l'ADN cible (15 ng pour 100 pb), une des deux amorces (2 µl) et de l'H₂O nucléase free, dans un volume final de 10 µl.

Toutes les séquences soumises à GenBank database ont été séquencées dans les deux sens.

2.4.3 Analyse et comparaison des séquences

Les séquences obtenues par Microsynth ont été contrôlées manuellement, éventuellement corrigées et traitées à l'aide des logiciels suivants: Lasergene version 8 (DNASTAR Inc., Madison, USA), GENTle 1.9.4 (M. Manske, Cologne, Germany) ou BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, USA). Une fois corrigées et nettoyées, les séquences ont été comparées à celles répertoriées dans GenBank en utilisant la commande "BLAST" (basic local alignment search tool) dans Pubmed. Le logiciel ClustalW a été utilisé pour aligner et comparer les séquences.

2.4.4 Analyses phylogénétiques

Des analyses phylogénétiques ont été réalisées en utilisant les logiciels Bioedit et PHYLIP 3.69 (Felsenstein 1993). L'arbre phylogénétique résultant a été visualisé et présenté grâce au programme TreeView 1.6.6. (Page 1996).

Les sites internet correspondants aux logiciels précités sont les suivants :

- Bioedit : <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>
- PHYLIP: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
- TreeView: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>

2.4.5 Statistiques

Le test du chi² (χ^2) a été utilisé pour répondre à différentes questions que nous nous sommes posées lors du traitement des résultats:

- est-ce que les stades d'*I. ricinus* exercent une influence sur la fréquence d'infection par *Borrelia* ?
- est-ce que certaines espèces d'oiseaux sont plus infestées ou co-infestées (par larves et nymphes) que d'autres ?
- est-ce que les oiseaux locaux sont plus infestés que les oiseaux migrants ?
- est-ce que certaines espèces d'oiseaux sont plus souvent infestées par des tiques infectées que d'autres ?
- est-ce que la prévalence des pathogènes est plus fréquente dans les tiques collectées sur des migrants ? ou des nicheurs ?

3 RÉSULTATS

PUBLICATION 1

Prevalence and genotyping of tick-borne encephalitis virus in questing *Ixodes ricinus* ticks in a new endemic area in Western Switzerland.

J. Med. Entomol. 2012. 49: 156-164.

PUBLICATION 2

Infections and coinfections of questing *Ixodes ricinus* ticks by emerging zoonotic pathogens in Western Switzerland.

Appl. Environ. Microbiol. 2012. 78: 4606-4612.

PUBLICATION 3

Tick-borne pathogens in ticks collected from local and migratory birds in Switzerland.

Ticks and Tick-borne diseases. *Submitted*.

3.1 **Publication 1**

Prevalence and genotyping of tick-borne encephalitis virus in questing *Ixodes ricinus* ticks in a new endemic area in Western Switzerland. 2012. J. Med. Entomol. 49: 156-164.

Elena Lommano, Caroline Burri, Gilles Maeder, Maude Guerne, Viktoria Bastic, Eva Patalas et Lise Gern.

Récemment, de nouvelles zones endémiques au TBEV ont été répertoriées par l'Office Fédérale de la Santé Publique (OFSP) en Suisse occidentale. Il s'agit principalement de la Plaine de l'Orbe, de quelques zones situées sur la Rive Sud du lac de Neuchâtel ainsi que de la région de Moutier. En Suisse, les zones endémiques au TBEV sont définies comme telles par l'OFSP lorsque le virus est détecté dans les tiques ou suite à la déclaration de trois cas cliniques dans un périmètre restreint. Dans les nouvelles zones endémiques précitées, le virus n'a jamais été mis en évidence dans les tiques. De plus, dans la Plaine de l'Orbe, la définition de trois cas cliniques dans un périmètre limité n'a pas été respectée puisque la déclaration d'endémicité a fait suite à une dizaine de cas dans toute la région. Dans la présente étude, notre but a donc été de confirmer la présence du TBEV dans ces zones endémiques par détection du virus dans les tiques en quête de l'espèce *I. ricinus*, d'évaluer le taux d'infection des tiques et la diversité des souches du virus y circulant. De plus, une zone suspectée d'endémie mais où aucun cas clinique n'a été reporté, la Rive Nord du lac de Neuchâtel, a également fait l'objet d'investigation afin d'infirmier son endémicité.

Prevalence and Genotyping of Tick-Borne Encephalitis Virus in Questing *Ixodes ricinus* Ticks in a New Endemic Area in Western Switzerland

E. LOMMANO, C. BURRI, G. MAEDER, M. GUERNE, V. BASTIC, E. PATALAS, AND L. GERN¹

Institute of Biology, Laboratory of Eco-Epidemiology of Parasites, University of Neuchâtel, Emile-Argand 11, 2000 Neuchâtel, Switzerland

J. Med. Entomol. 49(1): 156–164 (2012); DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/ME11044>

ABSTRACT Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is the causative agent of tick-borne encephalitis (TBE) and causes neurological disease in humans in Eurasia. TBEV is transmitted by ticks of the genus *Ixodes*. Currently 10,000–12,000 clinical cases are reported annually in ≈30 TBE endemic countries. Since 1990 the epidemiology of TBE is characterized by a global increase of clinical cases and an expansion of risk areas. Similar trends are also observed in Switzerland but few studies confirmed the emergence of new TBE foci by detecting viral RNA in field-collected ticks. In this study, free-living *Ixodes ricinus* (L.) ticks from one nonendemic and three new TBE endemic regions located in the Western part of Switzerland were screened during four consecutive years (2007–2010) for the presence of TBEV. A total of 9,868 *I. ricinus* ticks (6,665 nymphs and 3,203 adults) were examined in pools for TBEV by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. Our results confirmed the presence of viral RNA in 0.1% (6/6120) of questing ticks collected in one new endemic region. Among TBE endemic sites, the minimal infection rate per 100 ticks tested ranged from 0.21 (1/477) to 0.95 (1/105). Four positive samples were sequenced and phylogenetic analysis of the NS5 gene showed that all TBEV nucleotide sequences belonged to the European subtype and were split into two distinct lineages originating probably independently from two distinct foci located North–East and East of the study region.

KEY WORDS tick-borne encephalitis virus, *Ixodes ricinus*, Switzerland, phylogeny

Tick-borne encephalitis (TBE) is a viral zoonosis that can affect humans after the bite of infected *Ixodes ricinus* ticks in Western Europe and *Ixodes persulcatus* in Eastern Europe and Asia. The causal agent, the tick-borne encephalitis virus (TBEV) is an arbovirus, member of the Flaviviridae family and of the *Flavivirus* genus (Mandl et al. 1997). Three TBEV subtypes are distinguished: the European, the Far Eastern and the Siberian subtypes (Ecker et al. 1999).

TBE is endemic in many Eurasian countries and has a wide geographic occurrence extending from Eastern France to Japan (Hayasaka et al. 1999). Since 1990 the number of reported cases has increased in many European countries where TBEV is present (Süss 2008, Randolph et al. 2008). For example, between 1976 and 1989, an average of 2,755 TBE cases was documented annually in Europe and Russia while between 1990 and 2007 the average was 8,755 annual cases (Süss 2008).

In Switzerland, such an increase in the number of cases was also observed with a peak of 245 cases reported in 2006 while there was a mean of 92 annual cases between 1995 and 2004 (Randolph et al. 2008).

However, since 2006, the annual incidence is again around 100 cases (Swiss Federal Office of Public Health [SFOPH] 2010). Krech et al. (1969) and Spiess et al. (1969) reported the first human cases of TBE in the North–East of Switzerland in 1969. Since then and until 1999 all TBE cases were limited to the known distribution perimeter of TBE endemic areas reported by Wyler and Matile in 1984. This perimeter included the North and Eastern parts of the country with the East of the lake of Neuchâtel as western limit. However, between 2000 and 2006, TBE cases were registered West and South of the Lake of Neuchâtel, outside this perimeter (de Vallière et al. 2006, Schlaefli et al. 2007) and in the Jura Mountains (SFOPH 2007). Thereby, three new TBE endemic regions were recognized by the SFOPH in the Western part of the country (SFOPH 2007). In Switzerland, an area is considered as TBE endemic by the SFOPH when three clinical cases have been reported in this area or when TBEV has been detected in its vector *I. ricinus*. Nevertheless, very few studies have been conducted in this country on the prevalence of TBEV in *I. ricinus* ticks. The most recent studies reported TBEV in ticks from TBE endemic sites with a prevalence of the virus ranging from 0.04% to 14.3% (Wicki et al. 2000, Casati

¹ Corresponding author, e-mail: lise.gern@unine.ch.

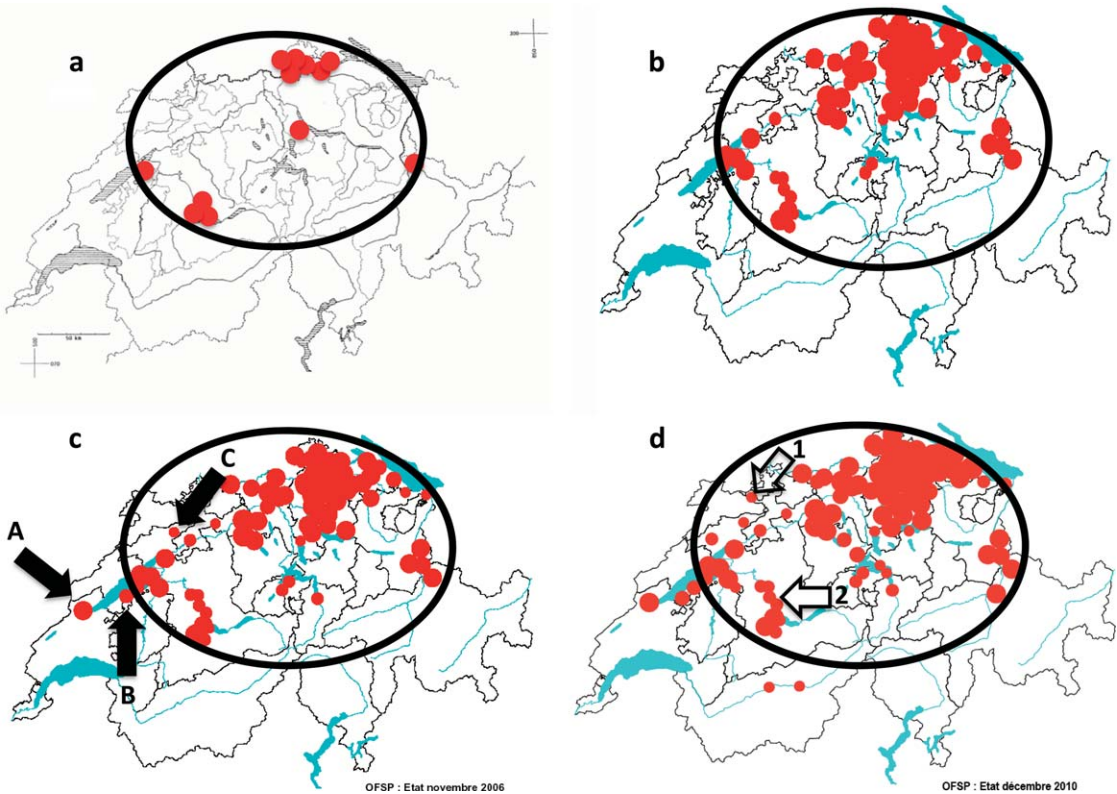


Fig. 1. Temporal evolution of the geographic distribution of TBE endemic areas in Switzerland. (a) Situation in 1984 according to Wyler and Matile (1984), (b) Situation in March 2006 (modified from SFOPH 2006), (c) Situation in November 2006 (modified from SFOPH 2007), (d) Situation in November 2010 (modified from SFOPH 2010). A circle represents the perimeter of the geographic distribution of TBE endemic areas (dots) between 1984 until March 2006. Black arrow A: Region A, black arrow B: Region B, black arrow C: Region C, empty arrow 1: Liestal (BL), empty arrow 2: Thun/Belp (BE). (Online figure in color.)

et al. 2006, Burri et al. 2011). Finally a study based on a national screening to assess prevalence of TBEV in *I. ricinus* ticks from 165 collection sites reported a mean TBEV prevalence of 0.46% (Gäumann et al. 2010).

Here, we screened for TBEV questing *I. ricinus* ticks collected at 49 sites located in the three new TBE endemic regions (SFOPH 2007) and in a neighboring nonendemic region (North of the Lake of Neuchâtel) to determine the geographic distribution of TBEV infected ticks. We also analyzed the genetic diversity of TBEV strains and their phylogeny to evaluate whether TBEV might have been imported in these new endemic regions from other parts of Switzerland.

Materials and Methods

Study Area and Tick Sampling. This study was carried out in the Western part of Switzerland in three new TBE endemic regions located outside a perimeter of distribution of TBE endemic sites delimited since 1984 by Wyler and Matile (1984) (Fig. 1). The studied regions were the following: region A (Plaine de l'Orbe), region B (South of the Lake of Neuchâtel), and region C (Jura Mountains, Moutier) (Fig. 1c, Fig.

2). In addition, investigation of TBEV in ticks was also conducted in the periurban forest of Neuchâtel, region D (North of the Lake of Neuchâtel) (Fig. 2).

Ticks were collected at 26 sites in endemic region A, 14 sites in region B and at two sites in region C (Table 1). Most of these sites were selected according to TBE cases reported by de Vallière et al. (2006), Schlaefli et al. (2007), and SFOPH (2007). In region D, seven sites were selected (Table 1). All sites were localized in mixed deciduous forests.

Questing *I. ricinus* ticks were collected with a 1-m² white flag in spring and summer of 2007, 2008, 2009, and 2010. Each site was prospected for TBEV between one and four times during the study period. All collected ticks were washed in ethanol 70%, dried, pooled from 1 to 25 nymphs and from 1 to 12 males or females and stored at -20°C until processed for TBEV detection.

TBEV RNA Isolation and Amplification. Ticks were crushed in pools in 300 μ l of TRIzol (Invitrogen, Basel, Switzerland) containing a 3-mm ball with a mixer mill MM 300 (Retsch, Arlesheim, Switzerland) during 3 min for nymphs and 5 min for adults. RNA was extracted according to Invitrogen protocol (Chomczynski and Sacchi 1987). Incubation times were 10 min for

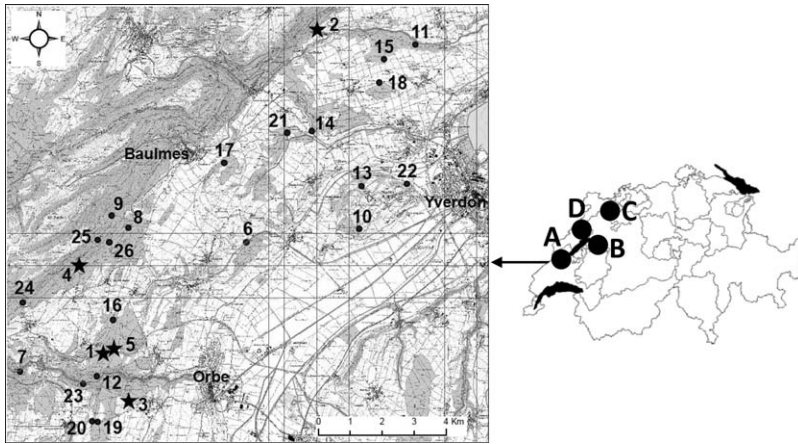


Fig. 2. Geographic location of TBE endemic regions A (West of the lake of Neuchâtel), B (South of the lake of Neuchâtel), C (Jura Mountains, Moutier), and TBE nonendemic region D (North of the Lake of Neuchâtel) where questing ticks were collected. For TBEV endemic region A, tick sampling sites are shown with black dots and stars indicate that TBE infected ticks were sampled at these sites. Sites 1: Montcherand 2; 2: Vugelles; 3: Agiez; 4: Abergement; 5: Montcherand 1; 6: Mathod; 7: Les Clées 1; 8: Le Suchet 1; 9: Le Suchet 2; 10: Suscevez; 11: Fiez; 12: Montcherand 3; 13: Chamblon; 14: Mornens; 15: Giez; 16: La Russille; 17: Baulmes; 18: Orges; 19: Bofflens 1; 20: Bofflens 2; 21: Champvent; 22: Les Uttins; 23: Les Clées 2; 24: Lignerolle; 25: Le Gothard; 26: Conrad Bourgeois.

chloroform and 10 min for isopropanol. Centrifugation time after adjunction of isopropanol was 15 min and 6 min after adjunction of 75% ethanol. Samples were then dried for 30–40 min, eluted in 30 μ l of RNase-free water (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland) and stored at -20°C until analysis by real-time reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). A negative control was included during each extraction procedure consisting of reagents without ticks.

TBEV RNA reverse transcription and amplification were performed in an iCycler (Biorad, Reinach, Basel Land, Switzerland) as described in Burri et al. (2011) and modified from Schwaiger and Cassinotti (2003). Reaction volume (25 μ l) consisted in 12.5 μ l of reaction mix (containing dNTPs, 0.04 mM each), primers and probes: 3 μ M of F-TBE1 (5'GGG CGG TTC TTG TTC TCC 3'), 0.6 μ M of R-TBE1 (5'ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT 3'), and 0.8 μ M of probe TBE-WT (5'FAM-TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA-TAMRA 3'), 0.5 μ l Superscript III Platinum *Taq* (Invitrogen, Basel, Switzerland, Superscript III Platinum One-step quantitative system) and 5 μ l of template RNA. The TBEV RNA extract was first reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) at 42°C for 30 min and then incubated for 10 min at 95°C . Directly after reverse transcription the noncoding region localized in 3' (NCR3') was amplified at 95°C for 15 s, 60°C for 1 min during 45 cycles according to Schwaiger and Cassinotti (2003). To monitor the real-time RT-PCR, a human TBEV isolate was used as positive control (provided by P. de Mendonça, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany). Negative controls (5 μ l RNase-free water; Qiagen) were included during the real-time RT-PCR amplification steps to exclude false-positive results.

Confirmation of Positive Real-Time RT-PCR Results and Sequencing of NS5 Gene. Amplicons that were positive by real-time RT-PCR were confirmed by amplifying the nonstructural protein NS5 using primers described in Puchhammer-Stöckl et al. (1995). Reaction mix for amplification was modified after Sakaida et al. (2005). Before amplification 10 μ l of RNA was transcribed into cDNA according to Invitrogen protocol. The first amplification was performed in a reaction volume of 50 μ l containing 5 μ l of Qiagen Buffer 10 \times , 200 μ M of each dNTP, 0.2 μ M each of primers FSM-1 and FSM-2 (Puchhammer-Stöckl et al. 1995), 1.5 U per test of DNA *Taq* polymerase (Qiagen) and 10 μ l of cDNA. Amplification was performed in 40 cycles (94°C , 30 s; 40°C , 30 s; 72°C , 30 s) followed by a 5 min elongation step (72°C). For the nested PCR, a 50 μ l reaction mixture consisting in 5 μ l of Qiagen Buffer 10 \times , 200 μ M of each dNTP, 0.2 μ M each of inner primers FSM-1i and FSM-2i (Puchhammer-Stöckl et al. 1995), 1.5 U per test of DNA *Taq* polymerase and 2 μ l of amplified DNA was used. The nested PCR program used the following conditions: 94°C , 2 min for an initial denaturation step followed by 40 cycles of amplification (94°C , 30 s; 53°C , 30 s; 72°C , 30 s) and 72°C , 5 min for the final elongation. Obtained amplified products (252 nucleotides) were visualized using an agarose gel 2% stained with red gel (Brunschwig, Basel, Switzerland) and visualized under UV light. All amplified products detected positive for TBEV were purified with a kit (Promega, Madison, WI) and sent for sequencing to Microsynth (Balgach, Switzerland).

Estimation of Infection Prevalence. TBEV infection prevalence in ticks was expressed as the minimum infection rate (MIR) per 100 tested ticks based on the

Table 1. Details on collection sites of questing ticks and TBEV infection in ticks

Region	Sampling sites	GPS coordinates		No tested ticks	No positive pools	
		Latitude	Longitude			
Region A	Les Clées 1	46°43'42" N	6°27'15" E	74	0	
	Les Clées 2	46°43'31" N	6°28'47" E	96	0	
	Le Suchet 1	46°46'8" N	6°29'51" E	139	0	
	Le Suchet 2	46°46'20" N	6°29'26" E	96	0	
	Suscevaz	46°46'10" N	6°35'31" E	172	0	
	Fiez	46°49'16" N	6°36'51" E	95	0	
	Montcherand 1	46°44'7" N	6°29'31" E	675	1	
	Montcherand 2	46°44'2" N	6°29'16" E	901	1	
	Montcherand 3	46°43'38" N	6°29'7" E	109	0	
	Vugelles	46°49'30" N	6°34'26" E	459	1	
	Chamblon	46°46'52" N	6°35'34" E	186	0	
	Mornens	46°47'48" N	6°34'20" E	215	0	
	Giez	46°49'1" N	6°36'5" E	156	0	
	La Russille	46°44'35" N	6°29'30" E	283	0	
	Baulmes	46°47'15" N	6°32'11" E	192	0	
	Orges	46°48'37" N	6°35'59" E	97	0	
	Bofflens 1	46°42'52" N	6°29'9" E	130	0	
	Bofflens 2	46°42'53" N	6°29'1" E	97	0	
	Champvent	46°47'46" N	6°33'44" E	153	0	
	Agiez	46°43'14" N	6°29'54" E	735	2	
	Les Uttins	46°46'56" N	6°36'41" E	125	0	
Method	46°45'55" N	6°32'45" E	137	0		
Lignerolle	46°44'51" N	6°27'18" E	21	0		
Le Gothard	46°45'55" N	6°29'6" E	169	0		
Conrad Bourgeois	46°45'53" N	6°29'23" E	71	0		
L'Abergement	46°45'30" N	6°28'39" E	537	1		
Total				6,120	6	
Region B	Portalban	46°55'8" N	6°58'10" E	179	0	
	Chabrey 1	46°55'45" N	6°59'45" E	105	0	
	Chabrey 2	46°55'43" N	6°59'44" E	32	0	
	Chabrey 3	46°55'30" N	6°59'57" E	114	0	
	Chabrey 4	46°55'25" N	6°59'35" E	70	0	
	Chabrey 5	46°55'59" N	7°0'21" E	10	0	
	Salavaux 1	46°54'7" N	7°2'58" E	18	0	
	Salavaux 2	46°54'21" N	7°2'35" E	505	0	
	Salavaux 3	46°54'55" N	7°1'60" E	7	0	
	Salavaux 4	46°54'16" N	7°2'40" E	98	0	
	Cudrefin 1	46°56'13" N	6°59'8" E	81	0	
	Cudrefin 2	46°58'13" N	7°2'41" E	433	0	
	Cudrefin 3	46°58'16" N	7°2'35" E	17	0	
	Cudrefin refuge	46°56'7" N	7°0'14" E	12	0	
	Total				1,681	0
	Region C	Moutier 1	47°16'57" N	7°23'25" E	43	0
		Moutier 2	47°17'17" N	7°22'15" E	156	0
Total				199	0	
Region D	Bevaix	46°55'11" N	6°47'2" E	226	0	
	Hauterive 1	47°0'60" N	6°58'18" E	61	0	
	Hauterive 2	47°1'11" N	6°58'30" E	448	0	
	Cadolles	47°0'6" N	6°55'26" E	484	0	
	Bois de l'Hôpital	47°0'19" N	6°56'54" E	283	0	
	La Coudre	47°0'46" N	6°57'37" E	332	0	
	Colombier	46°58'28" N	6°51'16" E	34	0	
Total				1,868	0	
Total				9,868	6	

assumption that at least one tick was positive within a positive pool.

Phylogenetic Analyses. NS5 sequences of different TBEV strains and a closely related flavivirus chosen from the NCBI GenBank database were used for genetic comparison: Omsk hemorrhagic fever (GenBank accession number AY323489); Siberian strain Vaslichenko (AF069066); Russian strains Zausaev (AF527415), 886–84 (EF469662), 178–79 (EF469661), and Glubinnoe 2004 (DQ862460); Finnish strains Kokkola-8 (DQ451298), Kokkola-84 (DQ451305), Kokkola-86 (DQ451307), Kokkola-4 (DQ451297), Kokkola-39 (DQ451302), and Kum-

linge (AJ298321); Sofjin-HO strain (AB062064); MDJ-01 (AY217093); Senzhang (AY182009); Turkish strain (DQ235151); Greek strain (DQ235153); Slovenian strains Stefanja Gora (EU057639), Sodaica (EU057638), and Kamnik EU057641; Czech Republic strain (DQ153877); Austrian strains Hypr (U39292), Neudoerfl (U27495), and U27491; Italian strains FVG Pt12 (FJ159007), FVG BM Forni di Sotto (FJ159002), and FVG ML Raccolana (FJ159003); Lithuanian strains Lith413 (DQ112086), Lith414 (DQ112087), and Lith418 (DQ112088); German strain K23 (AM600965); and Swiss strains NETBE1 (HM450136), NETBE2 (HM450137),

Table 2. Details on TBEV detected in ticks collected at five sites located in region A

Sites ^a	Locality	Sampling year	No infected/ analyzed ticks	MIR ^b	95% CI	NS5 sequence name	Accession no
1	Montcherand 2	2007	1/170	0.59	0.02–3.23	—	—
2	Vugelles	2007	1/339	0.29	0.01–1.63	NETBE8	HQ883373
3	Agiez	2008	1/105	0.95	0.02–5.19	NETBE9	HQ883374
3	Agiez	2009	1/477	0.21	0.01–1.16	NETBE10	HQ883375
4	Abergement	2009	1/281	0.36	0.01–1.97	—	—
5	Montcherand 1	2010	1/249	0.40	0.01–2.22	NETBE11	HQ883376

^a Site numbers refer to site numbers shown on Fig. 2.

^b Prevalence rate is expressed as the minimal infection rate (MIR) per 100 ticks tested.

NETBE3 (HM450138), NETBE4 (HM450139), NETBE5 (HM450140), NETBE6 (HM450141), NETBE7 (HQ883372).

Phylogenetic analyses were performed using Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) and PHYLIP 3.69 (<http://evolution.gs.washington.edu/phylip/getme.html>) (Felsenstein 1993). First 1000 bootstrap replicates of the sequence data (SEQBOOT) were executed. Then, distance matrices were calculated by using Kimura's two-parameter model (DNADIST) and analyzed by the neighbor-joining algorithm (NEIGHBOR). Alternatively, the DNAPARS program was used to find the trees with maximum parsimony. The bootstrap support percentages of particular branching points were calculated from these trees (CONSENSE). The resulting phylogenetic tree was presented using the program TreeView 1.6.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) (Page 1996). Alignment of the sequences was performed using ClustalW2.0.12 (Thompson et al. 1994).

Results

Between 2007 and 2010, a total of 9,868 *I. ricinus* ticks (6,665 nymphs, 1,699 males, and 1,504 females) collected at 49 sites (Table 1) in four different regions (A, B, C, and D) located in the Western part of Switzerland (Fig. 2) were tested for the presence of TBEV by pools.

In region A, a total of 6,120 ticks (3,965 nymphs and 2,155 adults) collected at 26 sites were tested for TBEV in 602 pools (265 pools of 1–25 nymphs and 337 pools of 1–12 adults) (Table 1). TBEV-specific RNA was detected in 6/602 pools of ticks collected at 5/26 sites (Table 2; Fig. 2). Two pools of eight and 20 nymphs were infected in 2007, one pool of 10 females in 2008, two pools of 10 and 20 nymphs in 2009 and one pool of 11 nymphs in 2010. Overall, the MIR per 100 tested nymphs for TBEV was 0.13 (5/3965 [95% CI: 0.04–0.13]) and 0.1 for females (1/1023 [95% CI: 0–0.54]) corresponding to a global MIR of 0.1 (6/6120 [95% CI: 0.04–0.21]). No male was found infected with TBEV. Among the five sites where TBEV-specific RNA was detected in ticks, the MIR per 100 tested ticks ranged from 0.21 (1/477 [95% CI: 0.01–1.16]) (site 3, in 2009) to 0.95 (1/105 [95% CI: 0.02–5.19]) (site 3, in 2008) (Table 2) and the mean of MIR was 0.37 (6/1621 [95% CI: 0.14–0.8]) per 100 tested ticks. At one site (site 3), we could detect TBEV in ticks over two consecutive

years (2008 and 2009) whereas in all other sites the virus was detected only sporadically in ticks over the study period although at two sites (sites 1 and 5) ticks were collected during four consecutive years (Fig. 2; Table 2). No TBEV could be detected in ticks collected in TBE endemic regions B ($n = 1,681$) and C ($n = 199$) nor in the nonendemic region D ($n = 1,868$).

Sequencing of the TBEV NS5 gene was possible for 4/6 positive samples and resulted in 209–211 nt amplicons (corresponding to the 252 nt bands without primers sequences). The NS5 gene sequences were submitted to the NCBI GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>) under the following accession numbers: HQ883373 (NETBE8), HQ883374 (NETBE9), HQ883375 (NETBE10), and HQ883376 (NETBE11) (Table 2). All TBEV sequences obtained in this study belonged to the European subtype relating them closely to Neudoerfl strain (U27495) but none of them were 100% identical to Neudoerfl strain. To relate the obtained TBEV nucleotide sequences with other TBEV sequences available in GenBank, a phylogenetic tree was constructed on the basis of the NS5 gene (Fig. 3). Two different lineages of TBEV sequences were clearly distinguishable in this region. First, a group of three genetically identical sequences (from sites 3 and 5, NETBE9, NETBE10, and NETBE11) showed 100% homology with a previously identified sequence (strain NETBE7, HQ883372) (Fig. 4) obtained from ticks collected at Liesberg, Canton Basel Land (BL), a new endemic region situated inside the perimeter of TBEV distribution known since 1984, North East of region A (Fig. 1d) (SFOPH 2010). Second, one single sequence (from site 2, NETBE8) segregated in a group of strains (HM450136, HM450137, HM450138, HM450140, HM450141; Burri et al. 2011) identified in ticks collected at Thun/Belp, Canton Bern, an endemic region located East of region A (Fig. 1d) and also included in the perimeter of TBEV distribution known since 1984, although this strain showed a divergence of 2.4% with the other sequences (Figs. 3 and 4).

Discussion

TBE is an increasing health problem in Eurasian countries with thousands of cases reported annually (Süss 2003). The distribution maps are generally elaborated with registered autochthonous cases of the

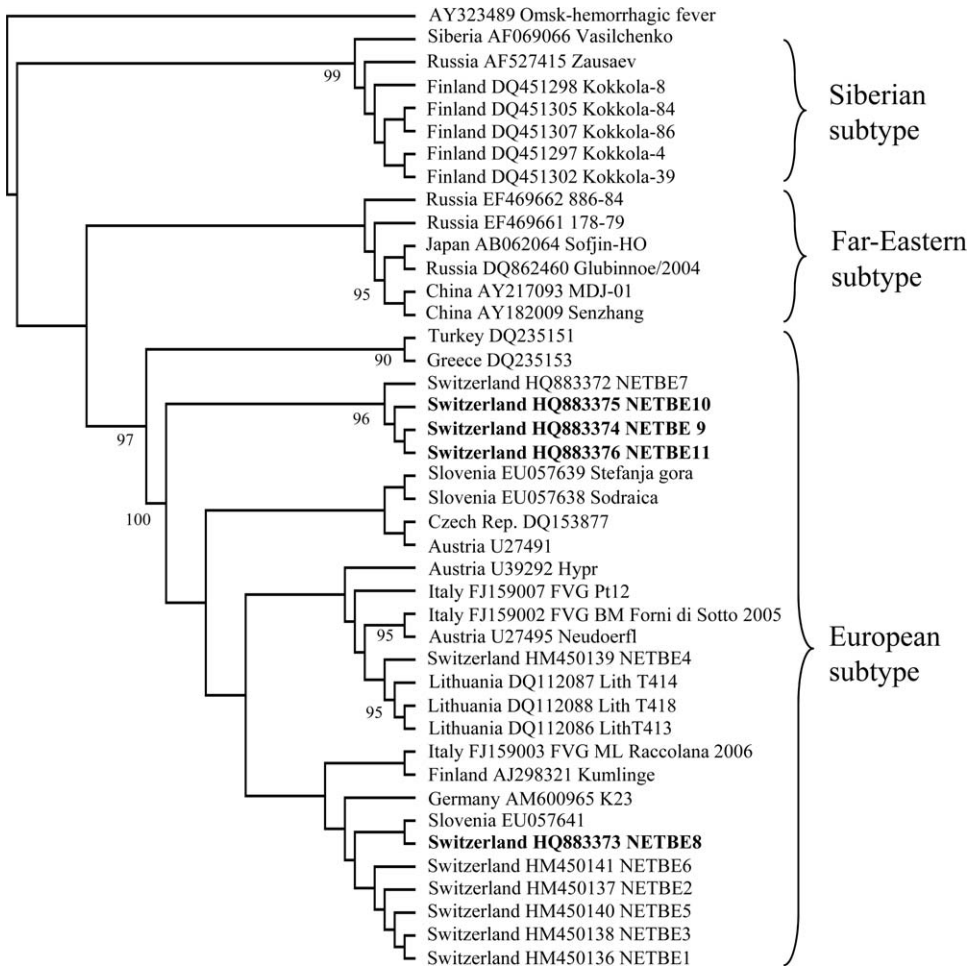


Fig. 3. Phylogenetic tree based on the NS5 gene. Only bootstrap values $\geq 90\%$ are shown. The tree is rooted by the Omsk-hemorrhagic fever virus. The TBEV sequences obtained in this study are shown in bold.

disease and few studies investigated the prevalence of TBEV in questing ticks. In Switzerland recent studies estimated the TBEV prevalence in free-living ticks (Wicki et al. 2000, Casati et al. 2006, Gäumann et al. 2010, Burri et al. 2011). During the last decade new TBE endemic areas emerged in the Western part of the country following the recording of clinical cases (SFOPH 2007). Therefore, we focused our attention on these new TBE endemic regions (regions A, B, and C) as well as on a neighboring region (region D). We investigated questing *I. ricinus* ticks for TBEV during four consecutive years to evaluate TBE risks. In this study, TBEV could not be detected in ticks collected in two out of three endemic regions (B and C) nor in the nonendemic region D. In region B, clinical cases were recently reported by de Vallière et al. (2006) and in 2010, Gäumann et al. detected TBEV in one pool of ticks with a local prevalence of 0.2% (1/500, Cudrefin). An explanation for this discrepancy could be that our sampling site did not exactly overlap the TBE site investigated by Gäumann et al. (2010). In fact, it has been reported that within a focus TBEV infected ticks

are not uniformly distributed (Blaskovic and Nosek 1972). Clinical cases were reported in region C (Jura Mountains, Moutier) (SFOPH 2006) but we were not able to confirm the presence of TBEV in ticks. Similarly, Gäumann et al. (2010) were not able to detect TBEV in ticks collected in this region. Part of explanation can be that the sampling sizes in both studies were too small ($n = 199$ in this study and $n = 392$ in Gäumann et al. 2010) to detect TBEV in ticks all the more so because the prevalence of TBEV in ticks is low. Nonendemic region D, located North of the Lake of Neuchâtel, was considered in this study because it is adjacent to known TBE endemic areas (SFOPH, <http://www.bag.admin.ch/themen/medizin/00682/00684/01069/index.html?lang=fr>). As no clinical TBE cases have been reported in this region and no TBEV has been detected in ticks ($n = 1868$) we conclude that currently the risk of TBEV infection is either very low or even absent in this region.

The presence of TBEV in questing ticks could be confirmed in one endemic region (region A, Plaine de l'Orbe), situated West of the Lake of Neuchâtel, with

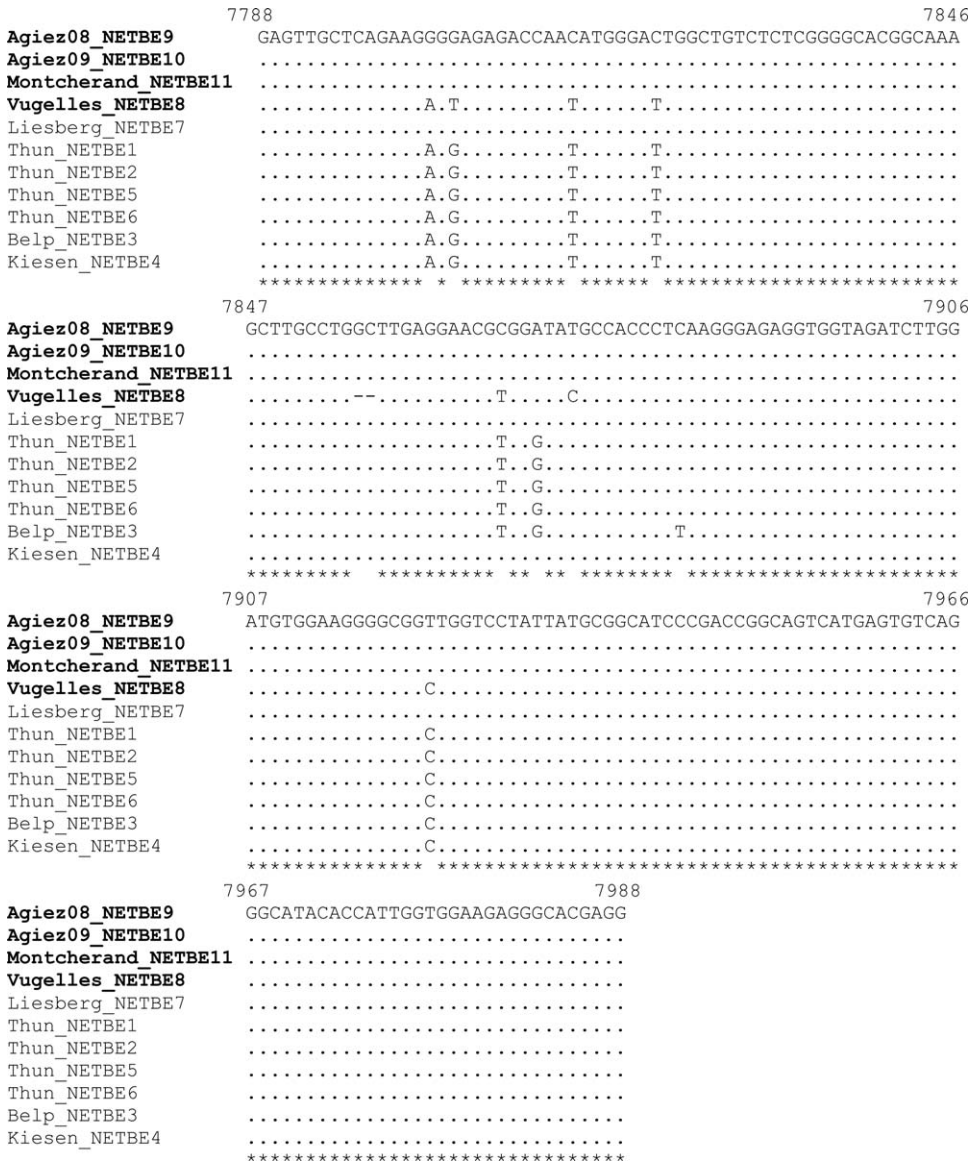


Fig. 4. Comparison of NS5 gene encoding sequences of TBEV strains obtained in this study (in bold) with previously identified Swiss strains (nt 7,788–7,988).

a global MIR of 0.1 per 100 tested ticks (6/6120). This prevalence is in accordance with the study of Burri et al. (2011) carried out in a known endemic region located near Bern (Switzerland) and is also in line with TBEV prevalence recorded in Europe (Durmisi et al. 2011, D’Agaro et al. 2009, Gäumann et al. 2010, Han et al. 2001).

In region A, TBEV infected ticks were detected at 5/26 sites. We could not detect viral RNA in ticks collected at the other investigated sites located in region A, even if they had been reported as endemic by de Vallière et al. (2006), Schlaefli et al. (2007) and SFOPH (2007). That could be explained by the low number of analyzed ticks at each of these sites (<300 ticks) in relation to the low mean TBEV MIR in natural

foci (0.37 per 100 tested ticks). This explanation seems to be consistent because at each site where TBEV was detected in ticks at least 450 ticks were screened (Table 1). This is exemplified by results from Gäumann et al. (2010) who reported 2/555 TBEV infected ticks at site six (Fig. 2) whereas we could not detect the virus in the 137 ticks we analyzed.

Phylogenetic analysis provided evidence that TBEV strains circulating in endemic region A belonged to the European subtype and that among them two different clusters were distinguishable. Each of these clusters included strains originating from two geographical distant areas (Liestal, BL and Thun/Belp, BE) in Switzerland located in the perimeter of TBE distribution known since 1984 (Wyler and Matile

1984) (Fig. 1d). The presence of two different lineages in region A, located outside the perimeter, suggests that TBE foci (at site 2, and at sites 3 and 5) emerged independently of each other after the introduction of TBEV infected ticks probably infesting migrating birds coming from the North-East, for example. This is supported by studies reporting that birds may carry TBEV infected ticks (Ernek et al. 1968, Waldenström et al. 2007).

Our results confirm the presence of TBEV in ticks collected in a new TBE endemic region in the Western part of Switzerland and underline risk of exposure to TBEV infected ticks in this region. Phylogenetic analysis showed that TBEV strains obtained from this region belonged to the European subtype. They were closely related to Swiss strains previously identified in the North and East of the country that could be explained by the introduction of TBEV infected ticks via migrating birds into regions where biotic and abiotic conditions were favorable for the maintenance of TBEV in ticks and vertebrate hosts.

Acknowledgments

Results are parts of the Ph.D. thesis of Lommano E. and Burri C. This work was financially supported by the Swiss National Foundation (grants 320000-113936/1 and 310030-127064/1). We are grateful to I. Golovljova (National Institute for Health Development, Tallinn, Estonia) for her introduction in phylogenetic analyses. We thank P. de Mendonça (Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany) for providing TBEV positive control. We would also like to thank M. Bouzelboudjen, N. Tonetti, and Y. Triponez (University of Neuchâtel, Neuchâtel, Switzerland) for their help in generating the map of sampling sites.

References Cited

- Burri, C., V. Bastic, G. Maeder, E. Patalas, and L. Gern. 2011. Microclimate and the zoonotic cycle of tick-borne encephalitis virus in Switzerland. *J. Med. Entomol.* 48: 939-944.
- Blaskovic, D., and J. Nosek. 1972. The ecological approach to the study of tick-borne encephalitis. *Prog. Med. Virol.* 14: 275-320.
- Casati, S., H. Sager, L. Gern, and J. C. Piffaretti. 2006. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 13: 65-70.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- D'Agaro, P., E. Martinelli, P. Burgnich, F. Nazzi, S. Del Fabbro, A. Iob, M. Ruscio, P. Pischutti, and C. Campello. 2009. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* from a novel endemic area of North Eastern Italy. *J. Med. Virol.* 81: 309-316.
- Durmisi, E., N. Knap, A. Saksida, T. Trilar, D. Duh, and T. Avsic-Zupanc. 2011. Prevalence and molecular characterization of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovenia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11: 659-664.
- Ecker, M., S. L. Allison, T. Meixner, and F. X. Heinz. 1999. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.* 80: 179-185.
- Ernek, E., O. Kozuch, M. Lichard, and J. Nosek. 1968. The role of birds in the circulation of tick-borne encephalitis virus in the Tribec region. *Acta Virol.* 12: 468-470.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP: phylogeny inference package, version 3.5c. University of Washington, Seattle, WA. (<http://evolution.gs.washington.edu/phylip/getme.html>)
- Gäumann, R., K. Mühlemann, M. Strasser, and C. M. Beuret. 2010. High-throughput procedure for tick surveys of tick-borne encephalitis virus and its application in a national surveillance study in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 4241-4249.
- Han, X., M. Aho, S. Vene, M. Peltomaa, A. Vaheri, and O. Vapalahti. 2001. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in Finland. *J. Med. Virol.* 64: 21-28.
- Hayasaka, D., Y. Suzuki, H. Kariwa, L. Ivanov, V. Volkov, V. Demenev, T. Mizutani, T. Gojobori, and X. Takashim. 1999. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-Eastern Russia. *J. Gen. Virol.* 80: 3127-3135.
- Krech, U., F. Jung, and M. Jung. 1969. Zentraleuropäische Zeckenzephalitis in der Schweiz. *Schweiz. Med. Wschr.* 99: 282-285.
- Mandl, C. W., M. Ecker, H. Holzmann, C. Kunz, and F. X. Heinz. 1997. Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr. *J. Gen. Virol.* 78: 1049-1057.
- Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 357-358.
- Puchhammer-Stöckl, E., C. Kunz, C. W. Mandl, and F. X. Heinz. 1995. Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clin. Diagn. Virol.* 4: 321-326.
- Randolph, S. E., L. Asokliene, T. Avsic-Zupanc, A. Bormane, C. Burri, L. Gern, I. Golovljova, Z. Hubalek, N. Knap, M. Kondrusik, et al. 2008. Variable spikes in tick-borne encephalitis incidence in 2006 independent of variable tick abundance but related to weather. *Parasit. Vectors* 1: 44.
- Saksida, A., D. Duh, S. Lotric-Furla, F. Strle, M. Petrovec, and T. Avsic-Zupanc. 2005. The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis. *J. Clin. Virol.* 33: 331-335.
- Schlaefli, R., D. Randin, P. Wyss, S. de Vallière, P. Meylan, and A. Cometta. 2007. Méningo-encéphalite verno-estivale dans le Nord Vaudois. *Rev. Med. Suisse* 3: 2609-2613.
- Schwaiger, M., and P. Cassinotti. 2003. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J. Clin. Virol.* 27: 136-145.
- Spies, H., M. Mummenthaler, S. Burkhardt, and H. Keller. 1969. Zentraleuropäische Enzephalitis (Zeckenzephalitis) in der Schweiz. *Schweiz. Med. Wschr.* 99: 277-282.
- Süss, J. 2003. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine* 21 (Suppl. 1): S19-S35.
- Süss, J. 2008. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond—the epidemiological situation as of 2007. *Euro. Surveill.* 13. pii: 18916.

- (SFOPH) Swiss Federal Office for Public Health. 2006. Encéphalite à tiques: Recommandations pour la vaccination contre l'encéphalite à tiques. Bull. OFSP 13: 225–231.
- (SFOPH) Swiss Federal Office for Public Health. 2007. Encéphalites à tiques: nouvelle augmentation du nombre de cas rapportés en 2006. Bull. OFSP 4: 57–60.
- (SFOPH) Swiss Federal Office for Public Health. 2010. Encéphalite à tiques (FSME), Extension des foyers naturels (régions d'endémie). (<http://www.bag.admin.ch/themen/medizin/00682/00684/01069/index.html?lang=fr>)
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673–4680.
- de Vallière, S., A. Cometta, H. Zimmermann, B. Vaudaux, and P. Meylan. 2006. Evidence of new foci of tick-borne encephalitis in the French speaking part of Switzerland. Rev. Med. Suisse 2: 2189–2194.
- Waldenström, J., A. Lundkvist, K. I. Falk, U. Garpmo, S. Bergström, G. Lindegren, A. Sjöstedt, H. Mejlon, T. Fransson, P. D. Haemig, and B. Olsen. 2007. Migrating birds and tick-borne encephalitis virus. Emerg. Infect. Dis. 13: 1215–1218.
- Wicki, R., P. Sauter, C. Mettler, A. Natsch, T. Enzler, N. Pusterla, P. Kuhnert, G. Egli, M. Bernasconi, R. Lienhard, et al. 2000. Swiss army survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and tick-borne encephalitis virus in ticks. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 19: 427–432.
- Wyler, R., and H. Matile. 1984. Die Zeckenzephalitis in der Schweiz. Ph.D. dissertation. Institut für Virologie der Universität Zürich, Switzerland.

Received 4 March 2011; accepted 29 August 2011.

3.2 **Publication 2**

Infections and coinfections of questing *Ixodes ricinus* ticks by emerging zoonotic pathogens in Western Switzerland. Appl. Environ. Microbiol. 2012. [Epub ahead of print]

Elena Lommano, Luce Bertaiola, Christèle Dupasquier et Lise Gern.

Comme nous l'avons vu dans la première publication, la présence du TBEV dans les tiques (*I. ricinus*) provenant d'une zone récemment déclarée comme endémique par l'OFSP et située dans la partie ouest de la Suisse a été clairement établie. La progression du virus TBE dans le pays est donc confirmée. Cette progression va de pair avec l'apparition d'autres pathogènes émergents et également liés à *I. ricinus*, comme *B. venatorum*, *A. phagocytophilum*, *R. monacensis* ou encore *B. miyamotoi*. Tous ces microorganismes ont déjà été identifiés en Suisse, mais leur répartition géographique est encore mal connue. De plus, un autre pathogène semble avoir fait son apparition dans le pays puisqu'il a été récemment identifié comme agent causal d'une septicémie chez un patient suisse. Il s'agit de *Candidatus N. mikurensis*, une bactérie déjà détectée dans les tiques dans plusieurs pays européens (Allemagne, Pays-Bas, Danemark, Slovaquie) mais non identifiée dans les tiques sur le territoire helvétique.

C'est dans le but de mieux connaître la distribution et la prévalence de ces pathogènes dits « émergents » en Suisse que cette étude a été réalisée. Des tiques en quête provenant de 11 sites, tous situés dans l'ouest du pays, ont été examinées pour la présence de *Borrelia* spp., *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum* et *Candidatus N. mikurensis*.

Infections and Coinfections of Questing *Ixodes ricinus* Ticks by Emerging Zoonotic Pathogens in Western Switzerland

Elena Lommano, Luce Bertaiola, Christèle Dupasquier, and Lise Gern

Institute of Biology, Laboratory of Eco-Epidemiology of Parasites, University of Neuchâtel, Neuchâtel, Switzerland

In Europe, *Ixodes ricinus* is the vector of many pathogens of medical and veterinary relevance, among them *Borrelia burgdorferi* sensu lato and tick-borne encephalitis virus, which have been the subject of numerous investigations. Less is known about the occurrence of emerging tick-borne pathogens like *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis,” and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks. In this study, questing nymph and adult *I. ricinus* ticks were collected at 11 sites located in Western Switzerland. A total of 1,476 ticks were analyzed individually for the simultaneous presence of *B. burgdorferi* sensu lato, *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis,” and *A. phagocytophilum*. *B. burgdorferi* sensu lato, *Rickettsia* spp., and “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis” were detected in ticks at all sites with global prevalences of 22.5%, 10.2%, and 6.4%, respectively. *Babesia*- and *A. phagocytophilum*-infected ticks showed a more restricted geographic distribution, and their prevalences were lower (1.9% and 1.5%, respectively). Species rarely reported in Switzerland, like *Borrelia spielmanii*, *Borrelia lusitaniae*, and *Rickettsia monacensis*, were identified. Infections with more than one pathogenic species, involving mostly *Borrelia* spp. and *Rickettsia helvetica*, were detected in 19.6% of infected ticks. Globally, 34.2% of ticks were infected with at least one pathogen. The diversity of tick-borne pathogens detected in *I. ricinus* in this study and the frequency of coinfections underline the need to take them seriously into consideration when evaluating the risks of infection following a tick bite.

Ixodes ricinus is the most abundant and widespread tick species throughout Europe. It is the vector of many emerging pathogens of veterinary and human medical importance, including viruses like tick-borne encephalitis virus (TBEV); bacteria like *Borrelia burgdorferi* sensu lato, spotted fever group (SFG) rickettsiae, and *Ehrlichia-Anaplasma*; and protozoa such as *Babesia* spp.

B. burgdorferi sensu lato is the agent of Lyme borreliosis, the most prevalent tick-borne disease in Europe. Ten *Borrelia* species of the *B. burgdorferi* sensu lato complex (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. finlandensis*, *B. carolinensis*, and *B. lusitaniae*) and *Borrelia miyamotoi*, related to the relapsing fever spirochetes, have been detected in *I. ricinus* (11, 13, 22, 37), and most of them are known as pathogens of humans (22). In Switzerland, all these *Borrelia* genospecies, except *B. bissettii*, *B. finlandensis*, and *B. carolinensis* were detected in *I. ricinus* ticks (22).

Ehrlichia and *Anaplasma* species are intracellular bacteria. *Anaplasma phagocytophilum* was first established as a veterinary pathogen until the discovery of the first case of human granulocytic anaplasmosis in the United States (12, 63). In Europe, fewer than 100 clinical cases have been reported (22). In Switzerland, *A. phagocytophilum* has been detected in fewer than 2% of *I. ricinus* ticks, but no human case has been documented (36, 45). Recently, a newly described pathogen, “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis,” in blood samples of a patient with signs of septicemia was reported in Switzerland (18). The bacterium, a member of the family *Anaplasmataceae*, has been detected primarily in *I. ricinus* ticks in the Netherlands and was designated an *Ehrlichia*-like “Schotti variant” (50). Afterwards, a similar organism, “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis,” was isolated from wild rats in Japan, representing a novel genetic cluster together with the *Ehrlichia*-like Schotti variant (34). Ticks infected by members of this cluster were reported in Japan (34) and in Europe (1, 50, 59, 62) but never in Switzerland.

Tick-borne rickettsioses are caused by bacteria of the genus *Rickettsia*, belonging to the SFG. Rickettsiae are currently considered emerging pathogens, like, for example, *Rickettsia helvetica* and *R. monacensis* in Europe and Eurasia. The pathogenicity of *R. helvetica* remains unclear, although it was reported to be involved in some cardiac and neurological symptoms (19, 39, 40). *R. monacensis* was isolated from the blood of patients (31) and was found in *I. ricinus* ticks from different countries in Europe. In Switzerland, *R. helvetica* appears frequently in ticks (7), whereas *R. monacensis* is rare (9).

Babesiosis, caused by a protozoon of the genus *Babesia*, is a disease of veterinary importance but is getting increasing consideration as an emerging disease of humans. In Europe, *Babesia divergens*, *B. microti*, and *B. venatorum* (also known as *Babesia* sp. EU1) are of medical importance (27). In Switzerland, a recent study reported these three *Babesia* species in fewer than 2% of ticks (23).

Information on the occurrence of the above-mentioned pathogens, except *B. burgdorferi* sensu lato, is scarce, especially in Western Switzerland. Moreover, little is known about their coexistence in *I. ricinus* ticks. In Europe, the prevalence of ticks carrying multiple pathogens has been reported to vary between 3.2% (47) and 28.8% (57). Because mixed infections (involving species of same genus) and coinfections (involving species of different genera) are of medical relevance, by increasing the severity of symptoms in humans and animals (6), it is crucial to determine the prevalence

Received 22 December 2011 Accepted 11 April 2012

Published ahead of print 20 April 2012

Address correspondence to Lise Gern, lise.gern@unine.ch.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.07961-11

of ticks infected by more than one pathogen. Hence, our aim was to gain an insight into the prevalence and geographic distribution of *Borrelia* spp., *A. phagocytophilum*, “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis,” *Rickettsia* spp., and *Babesia* spp. as well as their coinfections in free-living *I. ricinus* ticks at various sites in the Western Swiss Plateau. (These results are part of the Ph.D. thesis of E. Lommano.)

MATERIALS AND METHODS

Study area and tick sampling. This study was carried out at 11 sites located between 400 and 900 m above sea level: Romanel (46°34.37'N, 6°35.59'E), Chalet-à-Gobet (46°34.04'N, 6°40.62'E), Agiez (46°43.23'N, 6°29.90'E), Montcherand (46°44.04'N, 6°29.26'E), Delémont (47°22.41'N, 7°19.40'E), Mormont (47°26.20'N, 7°02.61'E), Rosé (46°47.66'N, 7°04.68'E), Belfaux (46°50.07'N, 7°05.43'E), Matran (46°46.73'N, 7°05.24'E), Seedorf (46°48.10'N, 7°02.30'E), and Neuchâtel (47°01.00'N, 6°56.00'E). All sites were mixed deciduous forests. Questing ticks were collected by flagging vegetation in 2009 and 2010.

Amplification and detection of tick-borne pathogen DNA. Total DNA was extracted from nymphs and adults by using ammonium hydroxide (NH₄OH) (38). Each tick was tested individually for the presence of *A. phagocytophilum*, “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis,” *Rickettsia* sp., *Babesia* sp., and *B. burgdorferi* sensu lato DNAs using specific primers and probes (Table 1). All PCR amplifications were performed with final volumes of 25 µl with 5 µl of template DNA, except for *A. phagocytophilum* (2 µl) and *Babesia* spp. (10 µl). Negative (sterile water) and positive controls were included for each PCR amplification.

“*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis.” A ~500-bp fragment of the 16S rRNA gene spanning the V1 region of *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp. was amplified as described previously (50), using modifications described previously by Bekker et al. (5). The positive control consisted of 3 µl of *A. phagocytophilum* DNA (Webster strain). A touchdown PCR program, modified from a method described previously by Bekker et al. (5), was performed (58). The reverse line blot (RLB) technique was used to identify “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis” (50).

***A. phagocytophilum*.** A 77-bp fragment of the *msp2* gene of *A. phagocytophilum* was amplified and detected by using a real-time PCR method reported previously (9), with modifications (14). The positive control consisted of 2 µl of *A. phagocytophilum* (Webster strain). For sequencing, the 16S rRNA gene was amplified with primers 16S8FE and B-GA1B (5) (Table 1).

***Rickettsia* spp.** A PCR targeting the 23S-5S internal spacer of *Rickettsia* spp. (30) and amplifying a 345-bp fragment was coupled with an RLB hybridization procedure (9), modified as described previously by Jado et al. (30). DNA of *Rickettsia conorii* was used as the positive control.

***Babesia* spp.** For the detection of *Babesia* spp., a 450-bp fragment of the 18S rRNA gene was amplified (20). The positive control consisted of 1 µl of *B. microti* or *B. divergens* DNA. A touchdown PCR program was performed as described previously (58), followed by RLB for the identification of *Babesia* species (23).

***Borrelia* spp.** A real-time PCR was used to amplify a 132-bp fragment of the flagellin gene of *Borrelia* spp. (26, 51). Isolates of *B. burgdorferi* sensu stricto (B31), *B. garinii* (NE11), *B. afzelii* (NE632), and *B. valaisiana* (VS116) were used as positive controls. Each sample that was positive by real-time PCR was further analyzed by PCR and RLB to identify *B. burgdorferi* sensu lato genospecies (26). The amplification of the intergenic spacer region between the 5S and 23S rRNA genes was performed as described previously (1), using a touchdown program (8) followed by RLB for the identification of *Borrelia* species (Table 1) (21).

DNA sequencing. Positive PCR products were purified with a purification kit (Promega, Madison, WI) and sent to Microsynth AG (Balgach, Switzerland) for sequencing. Each obtained sequence was compared with sequences from an international database (NCBI BLAST) by the use of ClustalW2.0.12 (56).

Statistical analysis. The influence of *I. ricinus* life stages on *Borrelia* infection and coinfection was assessed by a χ^2 test on a contingency table.

Nucleotide sequence accession numbers. Three “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis” sequences were submitted to the NCBI GenBank database under accession numbers JQ014620, JQ014621, and JQ014622. GenBank accession numbers for one *R. monacensis* sequence and one *A. phagocytophilum* sequence were JQ670878 and JQ277467, respectively.

RESULTS

A total of 1,476 *I. ricinus* ticks, including 1,194 nymphs and 282 adults (144 females and 138 males), were collected and individually screened for the presence of *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* sp., *Borrelia* sp., and *Babesia* sp. DNAs (Table 2). The occurrence of “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis” was screened for in 818/1,476 ticks collected at 5/11 sites (648 nymphs, 91 females, and 79 males).

Borrelia spp. were the most frequently isolated pathogens in ticks, with a global prevalence of 22.5% (328/1,458) (Table 2). Some ticks ($n = 18/1,476$) could not be screened for *Borrelia* due to a lack of material. *Borrelia*-infected ticks were detected at all sites. Adults (30.8%; 87/282) were significantly more infected than nymphs (20.5%; 241/1,176) ($P < 0.001$ by χ^2 test). Due to a lack of material, the *Borrelia* species in 6 samples that were positive by real-time PCR could not be identified by RLB. Among the 328 *Borrelia*-infected ticks, 357 events of infection (including single and mixed infections) were detected by RLB, and 6 different genospecies were identified. *B. afzelii* was predominant (141/357; 39.5%), followed by *B. garinii* (92/357; 25.8%), *B. valaisiana* (59/357; 16.5%), *B. burgdorferi* sensu stricto (20/357; 5.6%), *B. bavariensis* (17/357; 4.8%), and *B. miyamotoi* (15/357; 4.2%). For 10 out of 357 (2.8%) infections, *Borrelia* isolates could not be identified to the species level. Additionally, *B. lusitaniae* was detected in two nymphs collected at Agiez and Delémont, and *B. spielmanii* was detected in one male (in a mixed infection with *B. afzelii*) at Montcherand.

Rickettsia-infected ticks were observed at all sites, with a global prevalence of 10.2% (150/1,476 ticks; 123/1,194 nymphs and 27/282 adults) (Table 2). *R. helvetica* was predominantly detected (136/150; 90.7%), followed by unidentified *Rickettsia* spp. (12/150; 8%). *R. monacensis* was identified in two nymphs (2/150; 1.3%) collected at two different sites (Agiez and Delémont) after sequencing the 23S-5S rRNA gene. Both sequences showed 100% homology with *Rickettsia* sp. strain 362 (accession number DQ139797).

A. phagocytophilum-infected ticks were recorded at 4/11 sites (Table 2). The global prevalence reached 1.5% (22/1,476; 18/1,194 nymphs and 4/282 adults), and the mean local prevalence (only sites where *A. phagocytophilum* was present are taken into consideration) was 2.7% (22/812). Sequencing (16S rRNA gene) was successful for one sample, which showed 100% homology with an *A. phagocytophilum* strain from a cat (accession number HM138366) and 99% homology (divergence of 1 base only) with strains isolated from human blood in Italy (accession number DQ029028), *I. ricinus* (accession number AF084907), and one horse (accession number AF057707) in Switzerland.

“*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis” DNA was found at all sites, with a global prevalence of 6.4% (52/818; 41/648 nymphs and 11/170 adults) (Table 2). Sequencing of 20/52 samples (16S rRNA gene) revealed 100% homology to each other and to other strains isolated from human blood in Switzerland (GenBank ac-

TABLE 1 Primers and probes used in this study for PCR, RLB, and real-time PCR^a

Primer or probe	Sequence (5'-3')	Concn (pmol) for RLB	Type of sequence	Target gene	Target organism	Reference
RCK/23-5-F	Biotin-GATAGGTCGRGTGTGGAAGCAC		Primer	23S-5S rRNA gene	<i>Rickettsia</i> genus	30
RCK/23-5-R	TCGGGAYGGGATCGTGTGTTTC		Primer	23S-5S rRNA gene	<i>Rickettsia</i> genus	30
GP-RICK	TAGCTCGAATGRTTACTTTG	100	Probe	23S-5S rRNA gene	<i>Rickettsia</i> genus	30
RCK-SFG	ACTCAACARRTTATCAGGT	500	Probe	23S-5S rRNA gene	SFG <i>Rickettsia</i>	30
P-HELV	CATGGCTTGATCCACGGTA	100	Probe	23S-5S rRNA gene	<i>R. helvetica</i>	30
RLB-F2	GACACGGGAGGTAGTGACAAG		Primer	18S rRNA gene	<i>Babesia-Theileria</i> genus	20
RLB-R2	Biotin-CTAAGAATTCACCTCTGACAGT	50	Primer	18S rRNA gene	<i>Babesia-Theileria</i> genus	20
Catch-all B/T	TAATGGTTAATAGGARCRGTTG	500	Probe	18S rRNA gene	<i>Babesia-Theileria</i> genus	20
<i>B. venatorum</i>	GAGTATTGACTCTTGICTTTAA	500	Probe	18S rRNA gene	<i>B. venatorum</i>	23
<i>B. divergens</i>	GTTAATATTGACTAATGTCGAG	500	Probe	18S rRNA gene	<i>B. divergens</i>	23a
<i>B. microti</i>	GCTTCGGAGCGTTTTTTAT	500	Probe	18S rRNA gene	<i>B. microti</i>	23
ApM SP2f	ATGGAAGGTAGTGTGGTTATGGTATT		Primer	<i>msp2</i> gene	<i>A. phagocytophilum</i>	14
ApM SP2r	TTGGTCTTGAAGGGCTCGTA		Primer	<i>msp2</i> gene	<i>A. phagocytophilum</i>	14
ApM SP2p	FAM-TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG-TAMRA		Probe	<i>msp2</i> gene	<i>A. phagocytophilum</i>	14
16S8FE	GGAATTCAGAGTTGGATCMGGYTCAG		Primer	16S rRNA gene	<i>Anaplasma-Ehrlichia</i> genus	50
B-GA1B	biotin-CGGGATCCGAGTTTCCGGGACTTYTCT	100	Probe	16S rRNA gene	<i>Anaplasma-Ehrlichia</i> genus	5
Catch-all A/E	GGGGAAAAGATTTATCGGTA		Probe	16S rRNA gene	<i>Anaplasma-Ehrlichia</i> genus	5
A-Eschof	GCTCTAGTTTACTAATGGGTA	100	Probe	16S rRNA gene	" <i>Candidatus</i> Neoehrlichia mikurensis"	50
FlaF1A	AGCAAAATTTAGGTGCTTTCCAA		Primer	Flagellin gene	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	51
FlaR1	GCAATCATTTGCCATTGCAGA		Primer	Flagellin gene	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	51
Flaprobe1	FAM-TGCTACAACCCTCATCTGCAATTTGAGCACTTTTAA		Probe	Flagellin gene	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	51
B-5SBor	Biotin-GAGTTCGGGGAGAGTAGGTTATT		Primer	5S-23S spacer	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	1
23SBor	TCAGGGTACTTAGATGGTTCACCT		Primer	5S-23S spacer	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	1
SL1	CTTTGACCATATTTTTATCTTCCA	75	Probe	5S-23S spacer	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	48a
SS	AAGACCAATATTTAAAAACATAA	75	Probe	5S-23S spacer	<i>B. garinii</i>	48a
GA	AACATGAACATCTAAAAACATAA	75	Probe	5S-23S spacer	<i>B. garinii</i>	48a
GANE	CAAAAACATAAATATCTAAAAACATAA	75	Probe	5S-23S spacer	<i>B. garinii</i>	43
AF	AAGATTTAAAAATAAATTCGAAG	75	Probe	5S-23S spacer	<i>B. afzelii</i>	48a
VSNE	TATATCTTTTGTTCATCCATGT	75	Probe	5S-23S spacer	<i>B. valaisiana</i>	43
Lus1NE	TCAAGATTTGAAGTATAAAAAATAA	75	Probe	5S-23S spacer	<i>B. lusitaniae</i>	43
Lus2NE1	CATTCAAAAAATAAACAATTTAAAAACAT	100	Probe	5S-23S spacer	<i>B. lusitaniae</i>	21
Lus2NE2	AAATCAAACATTTCAAAAAATAAAC	100	Probe	5S-23S spacer	<i>B. lusitaniae</i>	21
RFLNE	CTATCCATTTGATCAATGC	100	Probe	5S-23S spacer	<i>B. miyamotoi</i>	21
Sp1NE2	GAATGGTTTTATTCAAATAACATA	100	Probe	5S-23S spacer	<i>B. spielmannii</i>	21
Sp1NE3	GAATAAGCCATTTAAATAACATA	100	Probe	5S-23S spacer	<i>B. spielmannii</i>	21
GANE1	AAAAATCAATGTTTAAAGTATAAAAAAT	100	Probe	5S-23S spacer	<i>B. garinii</i>	21
Bis1NE1	AAAGACTAACAATTTAAAAAACAT	100	Probe	5S-23S spacer	<i>B. bissettii</i>	21
Bis2NE2	AACTAACAAACATTTAAAAAACAT	100	Probe	5S-23S spacer	<i>B. bissettii</i>	21

^a All probes for RLB were 5'-amino labeled. FAM, 6-carboxyfluorescein; TAMRA, 6-carboxytetramethylrhodamine.

TABLE 2 Prevalence of tick-borne pathogens detected in ticks according to sampling site^a

Sampling site	No. of ticks analyzed	No. of ticks positive for pathogen/total no. of ticks tested (%)					No. of ticks infected with at least 1 pathogen/total no. of ticks tested
		<i>A. phagocytophilum</i>	“ <i>Candidatus</i> Neoehrlichia mikurensis”	<i>Rickettsia</i> spp.	<i>Babesia</i> spp.	<i>Borrelia</i> spp.	
Romanel	86	0/86 (0)	6/86 (7)	12/86 (13.9)	1/86 (1.2)	8/86 (9.3)	26/86 (30.2)
Chalet-à-Gobet	129	3/129 (2.3)	3/129 (2.3)	15/129 (11.6)	3/129 (2.3)	22/129 (17)	39/129 (29.4)
Agiez	125	0/125 (0)	NA	11/125 (8.8)	3/125 (2.4)	26/122 (21.3)	39/125 (31.2)
Montcherand	156	5/156 (3.2)	NA	10/156 (6.4)	7/156 (4.5)	40/156 (25.6)	58/156 (37.2)
Delémont	145	0/145 (0)	6/145 (4.1)	16/145 (11)	2/145 (1.4)	38/145 (26.2)	51/145 (35.2)
Mormont	71	0/71 (0)	3/71 (4.2)	10/71 (14.1)	0/71 (0)	13/71 (18.3)	21/71 (29.6)
Rosé	131	0/131 (0)	NA	20/131 (15.3)	4/131 (3.1)	30/125 (24)	49/131 (37.4)
Belfaux	140	3/140 (2.1)	NA	22/140 (15.7)	4/140 (2.8)	34/140 (24.3)	52/140 (37.1)
Matran	24	0/24 (0)	NA	1/24 (4.2)	0/24 (0)	8/24 (33.3)	9/24 (37.5)
Seedorf	82	0/82 (0)	NA	9/82 (11)	2/82 (2.4)	21/82 (25.6)	29/82 (35.4)
Neuchâtel	387	11/387 (2.8)	34/387 (8.8)	24/387 (6.2)	2/387 (0.5)	88/378 (23.3)	132/387 (34.1)
Total	1,476	22/1,476 (1.5)	52/818 (6.4)	150/1,476 (10.2)	28/1,476 (1.9)	328/1,458 (22.5)	505/1476 (34.2)

^a NA, not available. Minimum and maximum prevalences are underlined.

cession number [GQ501090](#)) and Germany (accession number [EU810404](#)) and from *I. ricinus* in Germany (accession number [EU810405](#)).

Babesia-infected ticks were detected at 9/11 sites, with a global prevalence of 1.9% (28/1,476; 25/1,194 nymphs and 3/282 adults). Local prevalence varied between 0.5% (2/387 ticks for Neuchâtel) and 4.5% (7/156 for Montcherand) (Table 2). *B. venatorum* was the most prevalent species (18/28; 64.3%), followed by *B. divergens* (5/28; 17.9%). Five out of 28 (17.9%) *Babesia* sp. isolates could not be identified to the species level with RLB, and sequencing (18S rRNA gene) of these samples was not successful.

Mixed infections, involving two or three *Borrelia* genospecies, occurred in 2.1% (30/1,458) of ticks and in 9.1% (30/328) of *Borrelia*-infected ticks (Table 3). The *B. garinii*-*B. valaisiana* association was the most frequently found association (Table 3). Coinfections involving pathogens of different genera were detected in 4.7% (69/1,476) of ticks and in 13.7% (69/505) of infected ticks (Table 3). These coinfections involved mostly *B. afzelii* and *R. helvetica*. *B. afzelii* was found mostly in association with *R. helvetica* (13/36; 36.1%) and “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis” (12/36; 33.3%) (Table 3). Inversely, 60% of “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis” isolates were in coinfections with *B. afzelii* (12/20) (Table 3).

If we considered ticks to be infected by more than one pathogen species, we observed a global prevalence of 6.7% (99/1,476). Among infected ticks, 19.6% (99/505 ticks) were carrying more than one pathogen species. Globally, adult ticks (31/282; 11%) were more frequently infected with multiple pathogens than nymphs (68/1,194; 4.6%) ($P < 0.005$ by χ^2 test). Infections with three pathogen species were observed for 6 ticks (6/1,476). The *B. afzelii*-*B. garinii*-*B. valaisiana* association was found in two nymphs, and the *B. garinii*-*B. valaisiana*-*B. miyamotoi* association was observed in one male. The other three triple infections consisted of *B. afzelii*-*B. garinii*-*R. helvetica* (in one male), *B. garinii*-*B. valaisiana*-*R. helvetica* (in one nymph), and *B. valaisiana*-*R. helvetica*-“*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis” (in one nymph).

B. valaisiana occurred frequently in multiple infections (27/59; 45%), mostly with *B. garinii* (11/59; 18.6%) and *R. helvetica* (8/59; 13.6%) (Table 3). Additionally, *B. valaisiana* was implicated in 5/6

triple infections (see above). Similarly, *A. phagocytophilum* was frequently involved in coinfections, since 9/22 (41%) *A. phagocytophilum* infections were coinfections (Table 3).

Globally, the prevalence of ticks infected with at least one pathogen reached 34.2% (505/1,476) (Table 2).

DISCUSSION

Here, we assessed the prevalences and geographic distribution of five human-pathogenic microorganisms (*Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., *A. phagocytophilum*, and “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis”), as well as their coinfections, in questing ticks at 11 sites situated in Western Switzerland.

Borrelia spp., *Rickettsia* spp., and “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis” were present at all sites, while *Babesia* spp. and *A. phagocytophilum* showed a more restricted geographic distribution. Ticks infected with *Borrelia* genospecies were largely predominant, and the mean prevalence reached 22.5%, followed by *Rickettsia* spp., which were identified in 10.2% of ticks. This is in line with prevalences previously reported for Switzerland (7, 33). In contrast, the prevalence of *Babesia* spp. and *A. phagocytophilum* in ticks was lower than 2%, and they were not present at all sites. The absence of *Babesia* spp. at two sites can be explained by the relatively few ticks examined at these sites ($n = 24$ and $n = 71$) in relation with the low mean prevalence observed (1.9%). However, *A. phagocytophilum* was absent from sites where it could be reasonably expected to occur considering its mean local prevalence (2.7%) and the number of collected ticks, indicating a patchy distribution. A similar patchy distribution was reported previously for Spain and Sweden (3, 52). On the other hand, despite the low prevalence of infected ticks and their patchy distribution within a region, the “pockets of infection” were quite stable over years. In fact, when *A. phagocytophilum* was present at a location, it was detected again the following year (data not shown). The low prevalence of *Babesia* spp. and *A. phagocytophilum* is in the range (0 to 1.7% and 0.8 to 2%, respectively) of what has been observed in Switzerland (9, 10, 23, 45). The *A. phagocytophilum* sequence obtained here was identical or closely related (99 to 100% identity) to those of other pathogenic strains isolated from domestic animals in Switzerland and the Czech Republic (44; D. Hulinska, unpub-

TABLE 3 Coinfections (involving two pathogens) observed in ticks^b

Pathogen genus	Pathogen species	No. of ticks with coinfection with:														
		<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	<i>B. valaisiana</i>	<i>B. bavariensis</i>	<i>B. miyamotoi</i>	<i>B. spielmanii</i>	SL	SP	EU1	<i>B. divergens</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	" <i>Candidatus</i> Neoehrlichia mikurensis"	<i>Rickettsia helvetica</i>	<i>Rickettsia</i> sp. ^c
<i>Borrelia</i>	<i>B. afzelii</i>	5	3	2	11	2	1	1	1	1	2	1	12	13	1	
	<i>B. garinii</i>	3												6	2	
	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	2	11	3	3	3					1	1	1	8	1	
	<i>B. valaisiana</i>	2											3	1	1	
	<i>B. bavariensis</i>	2														
	<i>B. miyamotoi</i>	1														
	<i>B. spielmanii</i>															
	SL															
	SP															
	EU1															
<i>Babesia</i>	<i>B. divergens</i>															
	<i>A. phagocytophilum</i>															
<i>Anaplasma-Ehrlichia</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	2														
	" <i>Candidatus</i> Neoehrlichia mikurensis"	12														
<i>Rickettsia</i>	<i>Rickettsia helvetica</i>	13	6	2	8	1										
	<i>Rickettsia</i> spp. ^c	1	1	1	1											
Total coinfections (<i>n</i> = 93)		29	5	27	4	5	1	2	2	1	10	2	36	4		
Total infections (<i>n</i> = 505) ^a		92	20	59	17	15	1	1	1	22	52	136	12			

^a "Total infections" refers to the total number of infections involving the concerned pathogen.

^b SL, *Borrelia* spp. matching only with the SL1 probe (RLB); SP, *Borrelia* spp. that could not be identified by RLB due to a lack of DNA; EU1, *Babesia venatorum*.

^c Matching only with the generic probe.

lished data), from *I. ricinus* ticks in Switzerland (45), and from humans in Italy (15). Therefore, the presence of this pathogenic strain in ticks from Switzerland points out a real risk of infection for animals and humans.

This study reports for the first time the presence of "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis" in questing *I. ricinus* ticks from Switzerland. More than 6% of ticks were infected by this microorganism, which occurred at all sites. In Europe, the prevalence of "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis" is known to range from 3.5% to 7% (1, 50, 62). "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis" can currently be considered an emerging pathogen of veterinary and medical importance. In 2007, the bacterium was identified in a dog with hematological troubles in Germany (17). In 2010, four human cases were reported in Switzerland, Germany, and Sweden (18, 60, 61), one of which was fatal. All the sequences here were identical to sequences of strains detected in the blood samples of patients suffering from febrile bacteremia in Switzerland and Germany (18, 60) and of a strain from *I. ricinus* in Germany (59). Our findings indicate that "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis" is present in questing ticks in Western Switzerland, representing a risk of contracting "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis" for humans and pets.

Among the five pathogens identified here, *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp. demonstrated a high variability in their occurrences in ticks according to site. Their local prevalences ranged from 9.3% to 33.3% for *Borrelia* spp. and from 4.2% to 15.7% for *Rickettsia* spp. Similar variations were observed previously in Europe, where local prevalences of *Borrelia* spp. (33, 47) and *Rickettsia* spp. (24) differed greatly among areas. Ecological conditions present at each site, including reservoir host availability or a high density of reservoir-incompetent hosts, most certainly play a role in these local variations.

The prevalences of the different *Borrelia* genospecies in ticks were in agreement with previously reported findings in Switzerland (26), except that two uncommon genospecies (*B. lusitaniae* and *B. spielmanii*) were detected in this study. *B. lusitaniae*-infected ticks are very common around the southern limit of the distribution of *I. ricinus* ticks (16, 64) but are quite uncommon in other regions. In Switzerland, *B. lusitaniae* has been detected in free-living ticks in some localities of Canton Ticino (32), in ticks feeding on birds (43), and in Western Switzerland (33); our findings report its occurrence in two additional localities. In contrast, *B. spielmanii* has been reported only once in Switzerland (21). *B. spielmanii*, which is pathogenic to humans (4), has already been identified in ticks in France and Germany (46, 48).

Two different *Rickettsia* species were identified here. *R. helvetica* was the most common and the most abundant species. The other species, *R. monacensis*, was found in only two nymphs. Sequencing revealed 100% identity with *Rickettsia* sp. strain 362, isolated from the blood samples of patients with Mediterranean spotted fever in Spain (30) and recognized afterwards as *R. monacensis*, a novel *Rickettsia* species (54). The arrangement of *Rickettsia* species observed here (>90% *R. helvetica* and <2% *R. monacensis*) was similar to that reported previously for Switzerland, where few *R. monacensis*-infected ticks have been identified (7, 9), whereas *R. helvetica* is commonly identified in ticks (7, 41). *R. monacensis* is only sporadically present in Central Europe, while it tends to be more common in Southern Europe (49).

B. venatorum was by far the most prevalent *Babesia* sp. identi-

fied here, followed by unidentified *Babesia* spp. and *B. divergens*. The predominance of *B. venatorum* has also been recognized in other European countries (47, 49), including Switzerland (9, 23). Although most of the human clinical cases in Europe are due to *B. divergens*, *B. venatorum* was recently involved in clinical cases in Italy, Germany, and Austria (25, 27).

Mixed infections with two or three *Borrelia* genospecies occurred in 2.1% of ticks and in 9.1% of *Borrelia*-infected ticks. Moreover, coinfections with pathogens of different genera were detected in 4.7% of ticks and in 13.7% of infected ticks. Globally, 6.7% of ticks and 19.6% of infected ticks were carrying more than one pathogen (mixed infections and coinfections); among them, coinfections with *B. afzelii* and *R. helvetica* were the most frequent. This was not surprising, as they represented the most prevalent species. *B. afzelii* was strongly associated with *R. helvetica* and “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*,” probably due to their common reservoir hosts. In fact, *B. afzelii* is associated with rodents (22), and some previous studies designated rodents as potential reservoirs for “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” (2, 34). *I. ricinus* acts as both a vector and a reservoir host of *R. helvetica*, and no vertebrate host is really required for its maintenance. Nevertheless, it was demonstrated previously that mice and roe deer might also be reservoirs for *R. helvetica* (55).

B. valaisiana was frequently implicated in mixed infections with *B. garinii* and in coinfections with two or three pathogens, mostly with *R. helvetica*. *B. valaisiana* and *B. garinii* share a common reservoir host, songbirds (28). To our knowledge, only one previous study described coinfections involving *B. valaisiana* and *R. helvetica* (47). Interestingly, the level of involvement of *A. phagocytophilum* in coinfections was relatively high (0.6%), compared to its low prevalence (1.5%). Part of explanation for this finding is the immunosuppressive action of *A. phagocytophilum*, making infected animals and humans more susceptible to other infections (63). Triple infections were detected in two males and four nymphs, underlining the important role of hosts as sources of multiple infections for ticks by carrying various microorganisms. As expected, *I. ricinus* adults were more frequently infected with multiple pathogens than nymphs, probably due to consecutive feedings.

In our study area, five different pathogens were found to circulate, and surprisingly, a high frequency of ticks was infected with at least one pathogen (34.2%). Moreover, 19.6% of infected ticks were carrying more than one pathogen, and this prevalence could easily be expected to be higher if all collected ticks had been screened for “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*.” Compared to a previous study of the same pathogens (except “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*”) in Luxembourg (47), *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp. were found more frequently in ticks in this study (22.5% and 10.2%, respectively, compared to frequencies of 11.3% and 5.1%, respectively, reported previously [47]), while the prevalences of *Babesia* spp. and *A. phagocytophilum* were slightly lower (1.9% and 1.5%, respectively, compared to prevalences of 2.7% and 1.9%, respectively, reported previously [47]). Moreover, the global prevalence of ticks infected by at least one pathogen in this study (34.2%) and the prevalence of multiple infections in ticks (6.7%) were higher than those reported previously for Luxembourg (19.5% and 3.2%, respectively [47]). In conclusion, this study contributes to a better understanding of the occurrence and co-occurrence of human-pathogenic agents in questing *I. ricinus* ticks.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the Swiss National Foundation (grant no 310030-127064/1).

We are grateful to Mégane Pluess for her technical assistance and to Olivier Rais and Paul Monnerat and his students for having collected ticks in Neuchâtel and Jura, respectively. We thank Ana Sofia Santos (CEVDI, Portugal), Simona Casati (Istituto di Microbiologia, Ticino, Switzerland), and Olivier Péter (Institut Central des Hôpitaux du Valais, Sion, Switzerland) for providing positive controls.

REFERENCES

- Alekseev AN, Dubinina HV, Van De Pol I, Schouls LM. 2001. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. *J. Clin. Microbiol.* 39:2237–2242.
- Andersson M, Raberg L. 2011. Wild rodents and novel human pathogen *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, Southern Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* 17:1716–1718.
- Barandika JF, et al. 2008. Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8:829–835.
- Baranton G, De Martino SJ. 2009. *Borrelia burgdorferi* sensu lato diversity and its influence on pathogenicity in humans. *Curr. Probl. Dermatol.* 37:1–17.
- Bekker CP, de Vos S, Taoufik A, Sparagano OA, Jongejan F. 2002. Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. *Vet. Microbiol.* 89:223–238.
- Belongia EA. 2002. Epidemiology and impact of coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2:265–273.
- Boretti FS, et al. 2009. Molecular investigations of *Rickettsia helvetica* infection in dogs, foxes, humans, and *Ixodes* ticks. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:3230–3237.
- Burri C, Morán Cadenas F, Douet V, Moret J, Gern L. 2007. *Ixodes ricinus* density and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a north-facing altitudinal gradient in the Rhone Valley (Switzerland). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7:50–58.
- Burri C, Dupasquier C, Bastic V, Gern L. 2011. Pathogens of emerging tick borne diseases, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., and *Babesia* spp., in *Ixodes* ticks collected from rodents at four sites in Switzerland (Canton of Bern). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11:939–944.
- Casati S, Sager H, Gern L, Piffaretti JC. 2006. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 13:65–70.
- Casjens SR, et al. 2011. Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. *J. Bacteriol.* 193:1489–1490.
- Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. 1994. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.* 32:589–595.
- Cotté V, Bonnet S, Cote M, Vayssier-Taussat M. 2010. Prevalence of five pathogenic agents in questing *Ixodes ricinus* ticks from western France. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10:1–8.
- Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF. 2004. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 42:3164–3168.
- de la Fuente J, et al. 2005. Infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a seronegative patient in Sicily, Italy: case report. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 4:15.
- de Michelis S, et al. 2000. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from Mainland Portugal. *J. Clin. Microbiol.* 38:2128–2133.
- Diniz PP, Schulz BS, Hartmann K, Breitschwerdt EB. 2011. “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” infection in a dog from Germany. *J. Clin. Microbiol.* 49:2059–2062.
- Fehr JS, et al. 2010. Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 16:1127–1129.
- Fournier PE, Grunnenberger F, Jaulhac B, Gastinger G, Raoult D. 2000. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerg. Infect. Dis.* 6:389–392.
- Georges K, et al. 2001. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet. Parasitol.* 99:273–286.
- Gern L, Douet V, López Z, Rais O, Morán Cadenas F. 2010. Diversity of

- Borrelia* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in a Lyme borreliosis endemic area in Switzerland identified by using new probes for reverse line blotting. *Ticks Tick Borne Dis.* 1:23–29.
22. Gern L, Lienhard R, Péter O. 2010. Diseases and pathogenic agents transmitted by ticks in Switzerland. *Rev. Med. Suisse* 6:1906–1909. (In French.)
 23. Gigandet L, et al. 2011. Prevalence of three zoonotic *Babesia* species in *Ixodes ricinus* (Linné, 1758) nymphs in a suburban forest in Switzerland. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11:363–366.
 - 23a. Gubbels JM, et al. 1999. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 37:1782–1789.
 24. Hartelt K, et al. 2004. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* 293(Suppl 37):86–92.
 25. Häselbarth K, Tenter AM, Brade V, Krieger G, Hunfeld KP. 2007. First case of human babesiosis in Germany—clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int. J. Med. Microbiol.* 297:197–204.
 26. Herrmann C, Gern L. 2010. Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) under challenging conditions of temperature and humidity is influenced by *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection. *J. Med. Entomol.* 47:1196–1204.
 27. Herwaldt BL, et al. 2003. Molecular characterization of a non *Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 9:942–948.
 28. Humair PF, Postic D, Wallich R, Gern L. 1998. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. *Zentralbl. Bakteriol.* 287:521–538.
 29. Reference deleted.
 30. Jado I, et al. 2006. Molecular method for identification of *Rickettsia* species in clinical and environmental samples. *J. Clin. Microbiol.* 44:4572–4576.
 31. Jado I, et al. 2007. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 13:1405–1407.
 32. Joua F, Crippa M, Perret JL, Gern L. 2003. Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of canton Ticino (Switzerland). *Eur. J. Epidemiol.* 18:907–912.
 33. Joua F, Perret JL, Gern L. 2004. Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 4:23–32.
 34. Kawahara M, et al. 2004. Ultrastructure and phylogenetic analysis of ‘*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis’ in the family *Anaplasmataceae*, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1837–1843.
 35. Reference deleted.
 36. Liz JS, et al. 2000. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 38:1002–1007.
 37. Margos G, et al. 2009. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5410–5416.
 38. Morán-Cadenas F, et al. 2007. A comparison of two DNA extraction approaches in the detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from live *Ixodes ricinus* ticks by PCR and reverse line blotting. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7:555–561.
 39. Nilsson K, Lindquist O, Pahlson C. 1999. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet* 354:1169–1173.
 40. Nilsson K, Elfving K, Pahlson C. 2010. *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* 16:490–492.
 41. Péter O. 1985. Presence of antibodies against the Swiss *Rickettsia* in wild and domestic mammals of the Canton of Neuchâtel. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 127:461–468. (In French.)
 42. Reference deleted.
 43. Poupon, MA, et al. 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:976–979.
 44. Pusterla N, Huder JB, Feige K, Lutz H. 1998. Identification of a granulocytic *Ehrlichia* strain isolated from a horse in Switzerland and comparison with other rickettsiae of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup. *J. Clin. Microbiol.* 36:2035–2037.
 45. Pusterla N, et al. 1999. Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 37:1332–1334.
 46. Rauter C, Oehme R, Diterich I, Engele M, Hartung T. 2002. Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40:36–43.
 47. Reye AL, Hubschen JM, Sausy A, Muller CP. 2010. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:2923–2931.
 48. Richter D, Schlee DB, Allgower R, Matuschka FR. 2004. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6414–6419.
 - 48a. Rijpkema SG, Molkenboer MJ, Schouls LM, Jongejan F, Schellekens JF. 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 33:3091–3095.
 49. Schorn S, Pfister K, Reulen H, Mahling M, Silaghi C. 2011. Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasit. Vectors* 4:135. doi:10.1186/1756-3305-4-135.
 50. Schouls LM, Van De Pol I, Rijpkema SG, Schot CS. 1999. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J. Clin. Microbiol.* 37:2215–2222.
 51. Schwaiger M, Peter O, Cassinotti P. 2001. Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. *Clin. Microbiol. Infect.* 7:461–469.
 52. Severinsson K, Jaenson TG, Pettersson J, Falk K, Nilsson K. 2010. Detection and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in seven study areas in Sweden. *Parasit. Vectors* 3:66. doi:10.1186/1756-3305-3-66.
 53. Reference deleted.
 54. Simser JA, et al. 2002. *Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group rickettsia, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4559–4566.
 55. Sprong H, et al. 2009. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. *Parasit. Vectors* 2:41. doi:10.1186/1756-3305-2-41.
 56. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.
 57. Tomanovic S, Radulovic Z, Masuzawa T, Milutinovic M. 2010. Coexistence of emerging bacterial pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in Serbia. *Parasite* 17:211–217.
 58. Tonetti N, Berggoetz M, Ruhle C, Pretorius AM, Gern L. 2009. Ticks and tick-borne pathogens from wildlife in the Free State Province, South Africa. *J. Wildl. Dis.* 45:437–446.
 59. von Loewenich FD, et al. 2003. High diversity of *ankA* sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. *J. Clin. Microbiol.* 41:5033–5040.
 60. von Loewenich FD, et al. 2010. Detection of ‘*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis’ in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. *J. Clin. Microbiol.* 48:2630–2635.
 61. Welinder-Olsson C, Kjellin E, Vaht K, Jacobsson S, Wenneras C. 2010. First case of human ‘*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis’ infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Microbiol.* 48:1956–1959.
 62. Wielinga PR, et al. 2006. Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7594–7601.
 63. Woldehiwet Z. 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet. Parasitol.* 167:108–122.
 64. Younsi H, et al. 2005. Characterization of *Borrelia lusitaniae* isolates collected in Tunisia and Morocco. *J. Clin. Microbiol.* 43:1587–1593.

3.3 **Publication 3**

**Tick-borne pathogens in ticks collected from local and migratory birds in Switzerland.
*Submitted.***

Elena Lommano, Charles Dvořák, Laurent Vallotton, Lukas Jenni et Lise Gern.

Dans la première publication, le TBEV a été identifié dans les tiques provenant d'une nouvelle zone endémique au TBE (Plaine de l'Orbe) située dans la partie ouest de la Suisse, avec une prévalence minimale de 0.1%. L'analyse phylogénétique des souches du virus qui y circulent démontre leur probable origine dans des foyers endémiques plus anciens situés au Nord et à l'Est du pays. L'apparition de ces nouveaux foyers aurait fait suite à l'introduction de tiques infectées par les oiseaux migrateurs, dans des environnements adéquats à leur survie, leur multiplication, et au maintien d'un foyer de TBEV. Il a déjà été démontré que les oiseaux migrateurs peuvent transporter des tiques infectées par le TBEV, mais leur rôle exact dans le cycle de transmission du virus n'a pas encore été clairement établi. De même, l'implication des oiseaux dans les cycles naturels de certains pathogènes émergents, tels que *Candidatus N. mikurensis*, *R. monacensis* ou encore *A. phagocytophilum* n'a pas encore été défini. Cette situation floue nous a poussés à effectuer un screening des pathogènes d'importance médicale, tels que le TBEV, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Candidatus N. mikurensis* et *A. phagocytophilum*, dans les tiques prélevés sur des oiseaux. Nous avons choisi d'une part des oiseaux migrateurs pour identifier les microorganismes qu'ils pourraient disséminer au gré de leur migration et d'autre part des oiseaux capturés sur leur site de nidification afin de comprendre leur place dans le maintien de ces pathogènes dans la nature.

1
2 **Tick-borne pathogens in ticks collected from local and migratory birds in Switzerland**

3
4
5
6
7
8 Elena Lommano¹, Charles Dvořák², Laurent Vallotton^{3,4}, Lukas Jenni⁵ and Lise Gern¹

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22 ¹ Institute of Biology, Laboratory of Eco-Epidemiology of Parasites, Emile-Argand 11,
23
24 2000 Neuchâtel, Switzerland

25
26
27 ² Dr med., Rue Louis Ruchonnet 14, 1337 Vallorbe, Switzerland

28
29
30
31
32 ³ Department of Mammalogy and Ornithology, Natural History Museum of Geneva,
33
34 Switzerland

35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
⁴ Jaman's Group of faunal studies, Lausanne, Switzerland

⁵ Swiss Ornithological Institute, Seerose 1, 6204 Sempach, Switzerland

21 Corresponding author: Lise Gern
22 Institute of Biology
23 Laboratory of Eco-Epidemiology of Parasites
24 Emile-Argand 11
25 2000 Neuchâtel
26 Switzerland
27 Phone: 0041 32 718 3000
28 Fax: 0041 32 718 3001
29 E-mail: lise.gern@unine.ch

Abstract

33

34 From 2007 to 2010, 4558 migrating and local birds of 71 species were caught and
35 examined for ticks in Switzerland. A total of 1205 specimens were collected; all were
36 *Ixodes ricinus* ticks except one *Ixodes frontalis* female which was found on a common
37 chaffinch (*Fringilla coelebs*) for the first time in Switzerland. Each tick was analysed
38 individually for the presence of four pathogenic agents: *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp.,
39 *Anaplasma phagocytophilum* and tick-borne encephalitis virus (TBEV). Altogether, 11.4%
40 of birds (22 species) were infested and 39.8% of them (15 species) were carrying infected
41 ticks. Bird species belonging to the genus *Turdus* were the most frequently infested with
42 ticks and they were also carrying the most frequently infected ticks. All tick-borne
43 pathogens were identified in bird-feeding ticks: *Borrelia* spp. (19.5%) and *Rickettsia*
44 *helvetica* (10.5%) were predominantly detected whereas *A. phagocytophilum* (2%),
45 *Rickettsia monacensis* (0.4%) and TBEV (0.2%) were only sporadically detected.
46 Interestingly, *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis was identified in a few ticks (3.3%),
47 mainly from chaffinches. The common blackbird (*Turdus merula*) and the tree pipit
48 (*Anthus trivialis*) seem to act as reservoir hosts for some of these pathogenic agents.
49 Our study emphasizes the role of birds in the natural cycle of tick-borne pathogens that are
50 of human medical and veterinary relevance in Europe.

51

52

53

54 Keywords: tick-borne bacteria, tick-borne encephalitis virus, birds, Switzerland, *Ixodes*
55 *ricinus* ticks

56

57

Introduction

58

59 Wild birds play a significant role in the ecology and circulation of tick-borne pathogens.

60 They can act as reservoir hosts in natural foci of disease and disperse infected tick vectors

61 over long distances and across geographical barriers (Olsen et al. 1995, Humair et al. 1998).

62 In Europe, passerine birds are hosts of immature *Ixodes ricinus* ticks, which are vectors of a

63 wide range of zoonotic pathogens. Therefore they can transport and disseminate infected

64 ticks along their migration routes. Migratory birds have been found to harbour *I. ricinus*

65 ticks infected by tick-borne encephalitis virus (TBEV) (Ernek et al. 1968, Waldenström et

66 al. 2007), *Anaplasma phagocytophilum* (Alekseev et al. 2001b, Paulauskas et al. 2009,

67 Hildebrandt et al. 2010), *Borrelia* spp. (Olsen et al. 1995, Gylfe et al. 1999, Poupon et al.

68 2006, Dubska et al. 2009), *Rickettsia* spp. (Elfving et al. 2010, Movila et al. 2011) and

69 *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis (Spitalská et al. 2006). All these pathogens have been

70 described in questing ticks in Switzerland where they represent a threat for human health

71 (Lommano et al. in press).

72 The introduction of infected ticks into new areas can allow emergence of endemic foci of

73 disease if biotic and abiotic conditions are favourable for the maintenance of the pathogen

74 in ticks and vertebrate hosts. In Switzerland, birds have been suspected to play a role in the

75 emergence of new TBE foci (Lommano et al. 2012). In fact, at the beginning of 2000, new

76 TBE endemic areas have been identified in the Western part of the country outside a

77 perimeter where all clinical cases had been reported during the 30 previous years

78 (Lommano et al. 2012). Genotyping of TBEV strains detected in questing *I. ricinus* ticks

79 revealed that they were closely related to Swiss strains previously identified in the North

80 and the East of the country, two regions distant from the new TBE endemic area (Lommano

81 et al. 2012, Burri et al. 2011a).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

82 Implication of birds in the maintenance of tick-borne pathogen enzootic cycles has been
83 widely demonstrated for *Borrelia* spp. in Europe (Humair et al. 1998, Hanincová et al.
84 2003, Poupon et al. 2006, Michalik et al. 2008), in North America (Levine et al. 1991,
85 Hamer et al. 2011) as well as in Asia (Nakao et al. 1994). In Europe, the reservoir
86 competence of pheasants (*Phasianus colchicus*), common blackbirds (*Turdus merula*), song
87 thrushes (*Turdus philomelos*) and puffins (*Fratercula arctica*) for *B. garinii* and *B.*
88 *valaisiana* was clearly demonstrated (Humair et al. 1998, Kurtenbach et al. 1998, Gylfe et
89 al. 1999, Taragel'ova et al. 2008). However, the role of wild birds in the circulation and
90 transmission of *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum* and TBEV is still discussed. They are
91 suspected to be reservoir hosts for *A. phagocytophilum* (Daniels et al. 2002) and *Rickettsia*
92 spp. (Spitalská et al. 2011, Elfing et al. 2010) but their exact role is still unclear. The
93 contribution of wild birds to the TBEV life cycle was early suspected (Ernek et al. 1968,
94 Hoogstraal, 1972) but could never be clearly demonstrated.

95 Thus, the goal of the present study is to better understand the role of the avian host in the
96 circulation of four tick-borne pathogens: *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum*
97 and TBE virus.

98 Materials and Methods

99 **Bird trapping and tick sampling.** Both local and migrating birds were captured in the
100 western part of Switzerland using Japanese mist nets.

101 Local birds were captured in spring and summer in 2008, 2009 and 2010 at two sylvatic
102 locations situated between 600-650 m above sea level: Bois de l'Hôpital (Canton of
103 Neuchâtel, 47°01.00' N, 6°56.00' E) and Agiez (Canton of Vaud, 46°43.23' N, 6°29.90' E).
104 Both sites are mixed and deciduous forests and were subject to previous studies concerning
105 prevalence of pathogens in questing ticks (Jouda et al. 2004, Lommano et al. 2012,
106 Lommano et al. in press, Morán-Cadenas et al. 2007). At one site (Agiez), TBEV is known

107 to occur in free-living ticks (Lommano et al. 2012). All birds were carefully examined for
108 ticks, especially around the eyes and the beak. An injured hawfinch (*Coccothraustes*
109 *coccothraustes*) found 200 m from Bois de l'Hôpital and carrying ticks, was included in the
110 study.

111 From August to October 2007, 2008 and 2009, migratory birds were caught by
112 ornithologists during regular ringing work at the Col de Jaman (VD), a Pre-Alpine pass
113 situated at 1512 m above sea level (46°26.95' N, 6°58.41' E). Most birds were migrating
114 southwestward but local birds were also included in the study. At this site all birds
115 belonging to the genus *Turdus* and to the European robin species (*Erithacus rubecula*) were
116 carefully examined for ticks. Birds belonging to other species were checked occasionally.
117 In 2008 emphasis was put on tree pipits (*Anthus trivialis*) due to their high tick infestation
118 observed during the previous year.

119 All attached ticks were removed with forceps, identified to stage and species (Cotty 1985)
120 and stored at -20°C until further analysis, using a separate vial for each bird. Engorgement
121 status was recorded for most ticks. Ticks collected in 2007 were stored in RNAlater®
122 solution (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland) at 4°C for one week and then at -20°C until
123 nucleic acid extraction. All birds were released immediately after tick removal.

124 **Nucleic acid extraction.** Partially and totally engorged ticks were individually disrupted
125 and homogenized with a mixer mill MM 300 (Retsch, Arlesheim, Switzerland) during 5
126 min in tubes containing 50 µl Tris-EDTA buffer (pH = 8) and a 3-mm ball. Ticks collected
127 in 2007 and stored in RNAlater® solution (Qiagen) were first dried on a paper towel. Lysis
128 was performed by adding 1.5 ml of lysis buffer (bioMérieux, France) in each tube and
129 incubated during 30 min. Total nucleic acid extraction was performed using the
130 NucliSENS® easyMAG™ (bioMérieux, France) and the protocol provided by the
131 manufacturer. Negative controls, consisting of reagents without tick, were included in each

132 extraction session. A total of 120 µl of eluted nucleic acid was directly divided into 5 µl
133 and 10 µl aliquots ready for further amplifications and stored at – 20°C. The remaining
134 eluted nucleic acid was divided into two aliquots and stored at – 20°C (DNA) and – 80°C
135 (RNA).

136 ***Borrelia* spp.** A real-time PCR was used to amplify and detect a 132 bp fragment of the
137 *flagellin* gene of *Borrelia* spp. (Schwaiger et al. 2001), as described in Herrmann and Gern
138 (2010, 2012). The real-time PCR mixture consisted of 0.4 µM of each primer (FlaF1A and
139 FlaR1), 0.2 µM of TaqMan probe, 0.025 U of KAPATaq™ Hotstart (Kapabiosystems by
140 Labgene Scientific, Switzerland), 10x buffer (provided by the manufacturer), 200 µM
141 dNTPs, 500 µM MgCl₂ and 5 µl of template DNA. Isolate of *B. burgdorferi* ss (B31), *B.*
142 *garinii* (NE11), *B. afzelii* (NE632) and *B. valaisiana* (VS116) were used as positive
143 controls. Each positive sample in real-time PCR was analysed by PCR and RLB in order to
144 identify *B. burgdorferi* sl genospecies as previously described (Herrmann and Gern 2010,
145 2012). Amplification of the intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes was
146 performed (Alekseev et al. 2001a). The PCR reaction mixture consisted of each primer
147 (23S-Bor and B5S-Bor), 0.75 U of Taq polymerase (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland),
148 dNTPs, 10x buffer (provided by the manufacturer) and 5 µl of template DNA. Isolate of *B.*
149 *burgdorferi* ss (B31), *B. garinii* (NE11), *B. afzelii* (NE632), *B. lusitaniae* (PotiB1, PotiB2)
150 and *B. valaisiana* (VS116) were used as positive controls. A touchdown program (Burri et
151 al. 2007) was used as follows: amplification started by an initial denaturation step at 94°C
152 for 3 min, then cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 60°C lowering the annealing temperature of
153 1°C each cycle until reaching 52°C and 30 s at 72°C. An additional 40-cycles set consisting
154 of 20 s at 94°C, 30 s at 52°C, and 30 s at 72°C, followed the touchdown program. The PCR
155 ended by a final extension for 7 min at 72°C. For *Borrelia* identification by RLB, PCR
156 products were hybridized to 15 genospecies-specific probes (Gern et al. 2010).

157 ***Rickettsia* spp.** For the detection and identification of *Rickettsia* spp., a PCR targeting the
158 23S-5S internal spacer (Jado et al. 2006) coupled with RLB hybridization was used, as
159 described in Lommano et al. (in press). Each PCR mixture consisted of 0.5µM of each
160 primer (RCK/23-5F and RCK/23-5R), 200 µM dNTPs, 1.5U of Taq polymerase (Qiagen),
161 10x buffer (provided by the manufacturer) and 5 µl of template DNA. DNA of *R. conorii*,
162 kindly provided by Simona Casati (Istituto di Microbiologia, Ticino, Switzerland) and
163 Olivier Péter (Institut Central des Hôpitaux du Valais, Sion, Switzerland) was used as
164 positive control. The PCR protocol, amplifying a 345 bp fragment, was as follows: 94°C
165 for 9 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 1 min and 65°C for 4 min with
166 a final extension at 65°C for 7 min. RLB was performed with modifications in the
167 temperatures of hybridization (48°C) and washing steps (52°C) (Burri et al. 2011b,
168 modified from Jado et al. 2006). Probes for RLB are described in Lommano et al. (in
169 press). To identify the *Rickettsia* species of some samples, citrate synthase gene (*gltA*) was
170 amplified (Bernasconi et al. 2002) and sequenced.

171 ***A. phagocytophilum*.** For the screening of *A. phagocytophilum*, a 77 bp fragment of the
172 *msp2* gene was amplified and detected using a real-time PCR modified after Courtney et al.
173 (2004) as described in Lommano et al. (in press). The real-time PCR mixture consisted of
174 0.72 µM of each primer (ApMSP2f and ApMSP2r), 0.12 µM of TaqMan probe ApMSP2p-
175 FAM, 0.75 U of KAPATaq Hotstart (Kapabiosystems by Labgene Scientific, Switzerland),
176 200 µM dNTPs, 6 mM MgCl₂, 10x buffer (provided by the manufacturer) and 5µl of
177 template DNA. Amplifications were performed with the following conditions: 15 min at
178 95°C for an initial activation followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min.
179 Positive control consisted of 3 µl of *A. phagocytophilum* (Webster strain, kindly provided
180 by Ana Sofia Santos, CEVDI, Portugal). For further sequencing and characterization, each
181 positive sample was submitted to another amplification reaction targeting the partial

182 *groESL* heat shock operon (Katargina et al. 2012). Primers HS1 and HS6 were used for the
183 first PCR amplification (Sumner et al. 1997). Products of amplification (1 µl) of the
184 primary reaction were used as template for the nested PCR using primers HS43 and HSVR
185 (Liz et al. 2000, Lotric-Furlan et al. 1998). The results of PCR amplifications (~ 1297 bp)
186 were assessed using a 1.5% agarose gel stained with red gel (Brunschwig, Basel,
187 Switzerland) and visualized under UV light.

188 **TBEV.** TBEV RNA reverse transcription and amplification of the non-coding region
189 localized in 3' (NCR3') were performed in an iCycler (Biorad, Reinach, Switzerland)
190 (Lommano et al. (2012) and modified from Schwaiger and Cassinotti (2003). Reaction
191 volume (25 µl) consisted of 12.5 µl of reaction mix (containing dNTP's, 0.04 mM each),
192 primers and probes: 3 µM of F-TBE1, 0.6 µM of R-TBE1 and 0.8 µM of probe TBE-WT,
193 0.5 µl Superscript III Platinum Taq (Invitrogen, Basel, Switzerland, Superscript III
194 Platinum One-step quantitative system) and 10 µl of template RNA. The TBEV RNA
195 extract was first reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) at 42°C for 30 min
196 and then incubated for 10 min at 95°C. Directly after reverse transcription, NCR3' was
197 amplified at 95°C for 15 s, 60°C for 1 min during 45 cycles (Schwaiger and Cassinotti
198 2003). A human TBEV isolate was used as positive control (provided by P. de Mendonça,
199 Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany). Negative control, consisting of 10
200 µl RNase-free water (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland) was included in each run.

201 ***Candidatus N. mikurensis*.** A selected batch of ticks (n=215, 124 larvae, 90 nymphs and 1
202 female *I. frontalis*) from 8 different bird species was screened for the presence of
203 *Candidatus N. mikurensis*. Analysed ticks included all ticks from common chaffinches
204 (n=69) and local birds (except the ticks from the hawfinch) (n=72), and some randomly
205 chosen ticks (n=75) (Tables 3 and 4). For the detection of *Candidatus N. mikurensis*, a ~
206 500 bp fragment of the 16S rRNA gene spanning the V1 region of *Anaplasma* spp. and

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

207 *Ehrlichia* spp. was amplified (Schouls et al. 1999, modified by Bekker et al. 2002). Each
208 PCR mixture consisted of 0.2 µM of each primer (16S8FE and BGA1B-new), 200 µM
209 dNTPs, 0.63 U of Taq polymerase (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland), 1 mM MgCl₂,
210 10x buffer (provided by the manufacturer) and 5 µl of template DNA. Positive control
211 consisted of 3 µl of DNA (Webster strain, kindly provided by Ana Sofia Santos, CEVDI,
212 Portugal). A touchdown PCR program (Tonetti et al. 2009) was performed: 3 min at 94°C,
213 then cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 67°C lowering the annealing temperature of 1°C each
214 cycle until reaching 57°C, 30 s at 72°C. An additional 40-cycle set with 20 s at 94°C, 30 s
215 at 57°C and 30 s at 72°C was used. The PCR ended by a final extension for 10 min at 72°C.
216 RLB technique with specific probes was used to identify *Candidatus* N. mikurensis
217 (Schouls et al. 1999, Bekker et al. 2002).

218 **DNA sequencing.** DNA of pathogens that could not be identified at the species level with
219 RLB and other samples that we wanted to characterize were purified with a purification kit
220 (Promega, Madison, USA) and sent for sequencing to Microsynth AG (Balgach,
221 Switzerland). Each obtained sequence was compared with available sequences from the
222 international databank (NCBI BLAST) with the use of ClustalW 2.0.12 (Thompson et al.
223 1994).

224 **Phylogenetic analyses.** In order to compare and relate *A. phagocytophilum* sequences
225 obtained here with others, a phylogenetic tree based on the *groESL* operon was constructed
226 using Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) and PHYLIP 3.69
227 (<http://evolution.gs.washington.edu/phylip/getme.html>) (Felsenstein 1993). First 1000
228 bootstrap replicates of the sequence data (SEQBOOT) were executed. Then, distance
229 matrices were calculated by using Kimura's two-parameter model (DNADIST) and
230 analysed by the neighbour-joining algorithm (NEIGHBOR). Alternatively, the DNAPARS
231 program was used to find the trees with maximum parsimony. The bootstrap support

1 232 percentages of particular branching points were calculated from these trees (CONSENSE).

2 233 The resulting phylogenetic tree was presented using the program TreeView 1.6.6

3 234 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) (Page 1996).

4 235 For tree reconstruction, partial DNA sequences (776 bp) of the *groESL* operon of different

5 236 *A. phagocytophilum* strains, an *Ehrlichia platys* strain (outgroup) and four sequences

6 237 obtained from host-seeking *I. ricinus* ticks from Western Switzerland were chosen from the

7 238 NCBI GenBank database.

8 239 **Statistical analysis.** The χ^2 test was used to analyse the differences in the prevalence of

9 240 tick-borne pathogens in ticks.

10 241 Results

11 242 **Tick infestation of birds.** Local birds (n=33), belonging to 11 species, were caught at two

12 243 sylvatic sites, Agiez and Bois de l'Hôpital, from 2008 to 2010, and examined for ticks

13 244 (Table 1). Eighty-one ticks (28 larvae and 53 nymphs) were removed from 16 infested

14 245 birds, giving a mean prevalence of 48.5% (16/33) (no. infested/examined birds). Mean

15 246 density (no. collected ticks/examined birds) was 2.45 ticks per bird (81/33) and infestation

16 247 intensity (no. collected ticks/infested birds) reached 5.06 ticks (81/16) (Table 1). Maximum

17 248 number of ticks collected on a single individual was 16. All ticks were determined as *I.*

18 249 *ricinus*, except 2 damaged nymphs belonging to *Ixodes* spp.

19 250 Migratory birds (n=4525), belonging to 71 species, were caught at Col de Jaman (VD) from

20 251 2007 to 2009 and examined for ticks (Table 2). A total of 1124 attached ticks (722 larvae,

21 252 401 nymphs and 1 female) was collected from 504 infested birds, giving a mean prevalence

22 253 of 11.1% (504/4525). Mean density was 0.25 tick per bird (1124/4525) and infestation

23 254 intensity reached 2.23 ticks per infested bird (1124/504) (Table 2). The maximum number

24 255 of ticks collected from a single individual was 15. The majority of ticks was determined as

1 256 *I. ricinus* (n=1091) except one female *Ixodes frontalis* collected from a common chaffinch
2
3 257 (*Fringilla coelebs*) and 32 specimens, partly damaged, belonging to *Ixodes* spp.

4
5 258 Altogether, 520 local and migratory birds (22 species) were carrying 1205 ticks (750 larvae,
6
7 259 454 nymphs and 1 female) (Tables 1 and 2). The redwing (*Turdus iliacus*) (64.3%), the
8
9 260 common blackbird (*T. merula*) (52.4%) and the song thrush (*T. philomelos*) (27.6%) were
10
11 261 the most frequently infested species, and the most heavily infested birds were the common
12
13 262 blackbird (3.45 ticks/infested bird), the redwing (2.78) and the tree pipit (*A. trivialis*)
14
15 263 (2.73). If we consider birds infested by immature *I. ricinus* stages only (n=519), 226
16
17 264 (43.5%) were infested by larvae, 162 (31.2%) by nymphs and 131 (25.2%) were co-infested
18
19 265 by both stages. The song thrush (42.9%, 18/42) and the common blackbird (34.1%, 15/44)
20
21 266 were the most frequently co-infested species and they were also carrying more nymphs than
22
23 267 larvae (Tables 1 and 2). Tree pipits were more frequently infested by both stages
24
25 268 simultaneously (36/120, 30%) than European robins (47/227, 20.7%) but this was not
26
27 269 significant.

28
29 270 **Tick-borne infections.** A total of 1205 ticks (750 larvae, 454 nymphs and 1 female)
30
31 271 collected from 16 local and 504 migratory birds were individually screened for the presence
32
33 272 of *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum*, TBEV and *Candidatus* N.
34
35 273 mikurensis. Altogether, 39.8% (207/520) of infested birds were carrying infected ticks.
36
37 274 Globally, 30.8% (371/1205) of ticks collected from birds were infected with at least one
38
39 275 pathogen species (Tables 3 and 4) and 5.8% (70/1205) were harbouring more than one
40
41 276 pathogen. Nymphs (175/454, 38.5%) were significantly more infected than larvae (196/750,
42
43 277 26.1%) (χ^2 test $p < 0.0001$) (Tables 3 and 4). The single female *I. frontalis* was not infected
44
45 278 and therefore we considered only immature ticks in the infection rates mentioned below.
46
47 279 Ticks from local birds were more infected (44.4%, 36/81) than those from migrating birds
48
49 280 (29.8%, 335/1124) but this was not significant.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 281 Ticks collected from birds belonging to *Turdus* species were highly infected by pathogens
2 282 (136/228, 59.6%) and ticks collected from tree pipits (95/328, 29%) were significantly
3
4 283 more infected than ticks collected on European robins (81/484, 16.7%) (χ^2 test $p < 0.0001$)
5
6 284 (Tables 3 and 4).

7
8
9 285 The most prevalent pathogen in ticks collected from local and migratory birds was *Borrelia*
10
11 286 spp. (19.5%), followed by *Rickettsia* spp. (12.3%), *Candidatus* N. mikurensis (3.3%), *A.*
12
13 287 *phagocytophilum* (2%) and TBEV (0.2%).

14
15
16 288 ***Rickettsia* spp.** Rickettsial infections were detected in 12.3% of ticks (148/1204) (Tables 3
17
18 289 and 4). Larvae (13.6%, 102/750) were more infected than nymphs (10.1%, 46/454), but this
19
20 290 was not significant. Prevalence of *Rickettsia* spp. in ticks feeding on migrants (11.9%,
21
22 291 134/1123) was lower than in ticks feeding on local birds (17.3%, 14/81) without statistical
23
24 292 significance (Tables 3 and 4). The common blackbird (11/44, 25%) and the tree pipit
25
26 293 (28/120, 23.3%) were the species the most frequently infested with *Rickettsia*-infected
27
28 294 ticks. However, in ticks from tree pipits (15.9%, 52/328) the prevalence was higher than the
29
30 295 one in ticks from common blackbirds (11.8%, 18/152). Interestingly, the prevalence
31
32 296 reached 75% (9/12) in ticks from one tree pipit and 40% (6/15) in ticks from one common
33
34 297 blackbird. Larvae from tree pipits (17.3%, 42/243) were more infected than nymphs
35
36 298 (11.8%, 10/85) and in addition larvae feeding on individuals infested by larvae only
37
38 299 showed the same infection prevalence (17.9%) that larvae feeding with nymphs (16.3%).

39
40
41 300 Among *Rickettsia* spp. infections identified with RLB (n=148), *R. helvetica* was
42
43 301 predominant with 126 occurrences (85.1%, 85 larvae and 41 nymphs) (Tables 3 and 4). *R.*
44
45 302 *monacensis* (3.4%) was identified in ticks from 5 migratory birds: robins (n=2) (2 larvae),
46
47 303 European serin (*Serinus serinus*) (1 larva), common blackbird (1 nymph) and song thrush
48
49 304 (1 nymph). GenBank accession numbers for the 23S-5S partial sequences of *R. monacensis*
50
51 305 are: JQ838250, JQ838251, JQ838252 and JQ838253. Seventeen *Rickettsia* spp. infections
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

306 (11.5%, 14 larvae and 3 nymphs) were identified at the genus level only. Sequencing part
307 of the *gltA* gene of 2/17 *Rickettsia* sp. obtained from larvae feeding on two European robins
308 (accession numbers: JQ922509 and JQ922510) revealed 100% homology with another
309 unidentified *Rickettsia* sp. sequence from one tick feeding on one European robin
310 (JN849396). European robin was the main host for ticks infected with *Rickettsia* sp. that
311 could not be identified at the species level (64.7%, 10/14 larvae and 1/3 nymphs).

312 ***Candidatus N. mikurensis***. Seven of the 215 ticks (3.3%) screened for the presence of
313 *Candidatus N. mikurensis* were infected. The pathogen was detected exclusively in nymphs
314 and from migrants (Tables 3 and 4). Interestingly, 85.7% (6/7) of infected nymphs were
315 from common chaffinches and 24% (6/25) of nymphs feeding on this species were infected,
316 with a prevalence reaching 21.4% (3/14) in ticks from one chaffinch.

317 ***A. phagocytophilum***. The presence of *A. phagocytophilum* DNA was detected in 24 ticks
318 feeding on 4 bird species: common blackbird (n=7), European robin (n=2), song thrush
319 (n=1) and chaffinch (n=1) (Tables 3 and 4). All infected larvae (8/8) and 75% (12/16)
320 infected nymphs were feeding on common blackbirds, resulting in a global prevalence of
321 13.2% (20/152) (Tables 3 and 4). The highest prevalence (54.5%) was observed in ticks
322 collected from one common blackbird. All *A. phagocytophilum*-infected larvae (n=8),
323 except one, were carrying simultaneously other pathogen species, namely *B. garinii* (n=2),
324 *B. valaisiana* (n=5) and *R. helvetica* (n=1).

325 From the three *groESL* operon sequences (~1200 bp), two (from nymphs collected from
326 one chaffinch (pending accession no) and one European robin (pending accession no)) were
327 100% identical to each other. On the phylogenetic tree based on the *groESL* operon (776
328 bp), they clustered with sequences belonging to lineage 2, obtained from *I. ricinus* and roe
329 deer (*Capreolus capreolus*) and described as nonpathogenic (Katargina et al. 2012) (Figure
330 1). The third sequence (pending accession no), obtained from one larva feeding on one

1 331 common blackbird, showed only 97% homology with the two others (22/777 nucleotides
2
3 332 difference) and formed a separate branch on the phylogenetic tree (Figure 1).
4
5 333 **TBEV**. Two larvae feeding on two European robins and one nymph from one common
6
7 334 blackbird (all captured at Col de Jaman) were infected by TBEV (Table 4). Sequencing of
8
9 335 TBEV NS5 gene failed for all three samples. None of the ticks feeding on birds captured at
10
11 336 Agiez (known as TBE endemic area) (n=33) and at Bois de l'Hôpital (n=48) was infected
12
13 337 by TBEV (Table 3).
14
15
16 338 **Borrelia spp.** *Borrelia* spp. was detected in 30.9% (25/81) and 18.7% (210/1123) of ticks
17
18 339 collected from local and migratory birds, respectively (Tables 5 and 6), giving a global
19
20 340 prevalence of 19.5% (235/1204). Nymphs (26.9%, 122/454) were significantly more
21
22 341 infected than larvae (15.1%, 113/750) (χ^2 test $p < 0.0001$) and that was observed for both
23
24 342 local (37.7% vs 17.9%), although not significant, and migratory birds (25.4% vs 15%, $p <$
25
26 343 0.0001). Conversely, larvae feeding on common blackbirds (65.9%, 27/41) and tree pipits
27
28 344 (19.3%, 47/243) were more infected than nymphs (50.4%, 56/111 and 16.5%, 14/85
29
30 345 respectively) but this was not significant. The common blackbird (75%, 33/44) was the
31
32 346 species carrying the most frequently *Borrelia* spp. infected ticks and 54.6% (83/152) of
33
34 347 ticks were infected (Tables 5 and 6).
35
36 348 Six different *Borrelia* genospecies were identified in ticks from migratory birds (Table 6).
37
38 349 *B. garinii* (n=91) and *B. valaisiana* (n=75) were the most frequent followed by *B. afzelii*
39
40 350 (n=18), *B. bavariensis* (n=8), *B. miyamotoi* (n=6) and *B. burgdorferi* ss (n=3) (Table 6). In
41
42 351 addition, 34 *Borrelia* infections could be identified at the genus level only, among which 33
43
44 352 were positive with real-time PCR only (24 larvae and 9 nymphs) and one was real-time
45
46 353 PCR positive and hybridized only on the genus probe (SL) with RLB (Table 6). Sequencing
47
48 354 of the latter was not successful. In ticks collected from local birds (n=81), five genospecies
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 were identified with *B. garinii* and *B. valaisiana* being predominant (Table 5). In contrast
2
3 356 to ticks collected from migrants, *B afzelii* was not detected in these ticks.

4
5 357 Considering *Borrelia* species in ticks from migrant and local birds, *B. garinii* was
6
7 358 predominantly identified in infected ticks from tree pipits (74.5%, 35/47 identified *Borrelia*
8
9 359 species) whereas *B. valaisiana* was predominant in infected ticks from common blackbirds
10
11 360 (75%, 60/80 identified *Borrelia* species) (Table 5 and 6). Among *B. afzelii* infections,
12
13 361 94.4% (17/18) were detected in nymphs and interestingly most of them (66.7%, 12/18) in
14
15 362 slightly engorged ticks. *B. bavariensis* was more frequently found in larvae (88.9%, 8/9)
16
17 363 than in nymphs (11.1%, 1/9) and most infected larvae (5/8) were collected from tree pipits.

18
19 364 Mixed *Borrelia* infections involving more than one genospecies were detected in 30/235
20
21 365 (12.8%) ticks: two genospecies were observed in 29 ticks (10 larvae and 19 nymphs)
22
23 366 (Tables 5 and 6) and three genospecies (*B. garinii*, *B. valaisiana* and *B. miyamotoi*) were
24
25 367 observed in one larva from one tree pipit. Most mixed infections (with two different
26
27 368 genospecies) associated *B. garinii* and *B. valaisiana* (21/30). The other associations were *B.*
28
29 369 *afzelii/B. valaisiana* (n=3), *B. valaisiana/B. bavariensis* (n=2), *B. afzelii/B. garinii* (n=1), *B.*
30
31 370 *garinii/B. miyamotoi* (n=2) and *B. valaisiana/B. miyamotoi* (n=1). Mixed infections were
32
33 371 predominantly observed in ticks from common blackbirds (53.3%, 16/30). Interestingly, in
34
35 372 addition to the fact that ticks from tree pipits were mainly infected by *B. garinii*, no mixed
36
37 373 infection, except the triple infection (see above), was found in these ticks.

38
39 374 **Mixed *Borrelia* infections and co-infections.** Among all infected ticks (n=371), we
40
41 375 observed more co-infections involving different pathogen species (n=43) than infections
42
43 376 with more than one *Borrelia* species (mixed infections) (n=30). Most co-infections were *B.*
44
45 377 *garinii/R. helvetica* (n=19) or *B. valaisiana/A. phagocytophilum* (n=10). Interestingly, most
46
47 378 *B. garinii/R. helvetica* associations were found in ticks from tree pipits (13/19) whereas
48
49 379 most *B. valaisiana/A. phagocytophilum* associations were detected in ticks from common
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 380 blackbirds (9/10). Co-infections involving *B. valaisiana*, *A. phagocytophilum* and *R.*
2 381 *helvetica* were found in two ticks from common blackbirds: one larva and one nymph
3
4
5 382 (which was harbouring *B. garinii* as well).
6

7 383 Discussion

8
9
10 384 Wild birds are hosts of some tick species, among them *I. ricinus* is the most common
11
12 385 (Papadopoulos et al. 2002). *I. ricinus* is the vector of many tick-borne pathogens of medical
13
14
15 386 and veterinary relevance. Here, *I. ricinus* was clearly the dominant tick species on birds.
16
17 387 One *I. frontalis* female was found on one chaffinch for the first time in Switzerland. In
18
19 388 addition to be hosts for ticks, birds play an important role in the dispersal of ticks and tick-
20
21
22 389 borne pathogenic agents (Olsen et al. 1995, Elfving et al. 2010). For some of these agents,
23
24
25 390 like *B. burgdorferi* s.l., birds can also act as reservoir hosts (Humair et al. 1998, Hanincova
26
27 391 et al. 2003). Here we report the occurrence of five tick-borne pathogens in bird-feeding
28
29 392 ticks: *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum*, TBEV and *Candidatus* N.
30
31 393 *mikurensis*.
32
33

34
35 394 *Borrelia* spp. was the most frequently identified pathogen with a prevalence of 19.6%,
36
37 395 which is similar to the prevalence reported by Poupon et al. (2006) in Switzerland. Six
38
39 396 different genospecies were found and among them *B. garinii* and *B. valaisiana* were clearly
40
41 397 predominant. This is not surprising since the reservoir competence of birds for these
42
43 398 genospecies is already known (Humair et al. 1998, Kurtenbach et al. 1998, Taragel'ova et
44
45 399 al. 2008). Nymphs were globally more infected than larvae probably as a result of
46
47 400 consecutive feedings. However, ticks from common blackbirds and tree pipits showed the
48
49 401 opposite pattern. Since questing larvae usually show a very low prevalence of infection
50
51 402 (Richter et al. 2012) this may indicate these bird species as sources of infection and
52
53 403 accordingly as reservoir hosts. Thus, tree pipits seemed to play a role in the transmission of
54
55 404 *Borrelia* spp., and more precisely of *B. garinii* since most larvae feeding on them were
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

405 infected with this genospecies. In addition, the occurrence of *B. bavariensis*, a rodent-
406 associated genospecies (Huegli et al. 2002, Margos et al. 2009), in most larvae from tree
407 pipits suggests that this bird species might also be a reservoir host for this genospecies.
408 *B. afzelii*, a rodent-associated species (Humair et al. 1999), was identified in 18 ticks and
409 most of them (66.7%) were only slightly engorged. This finding supports the concept of
410 selective transmission of *Borrelia* spirochetes that suggests that *B. afzelii* is lysed in the gut
411 of the tick during blood meal (Kurtenbach et al. 2002). However, here, *B. afzelii* was also
412 identified in completely engorged ticks. *B. afzelii* is currently more and more frequently
413 reported in bird-feeding ticks, and even in larvae (Humair et al. 1998, Poupon et al. 2006,
414 Taragel'ova et al. 2008, Duska et al. 2009, Franke et al. 2010) suggesting that birds can act
415 as reservoir hosts for this genospecies (Franke et al. 2010). We suggest that some *B. afzelii*
416 variants, adapted to avian host complement, can survive in the gut of ticks during feeding
417 on birds and that birds could be reservoirs for these *B. afzelii* variants. This suggestion
418 could be paralleled with the observation in rodents (Huegli et al. 2002) of OspA serotype 4
419 spirochetes of *B. garinii*, a bird associated species (Humair et al. 1998), which are now
420 recognized as belonging to *B. bavariensis* (Margos et al. 2009).

421 Birds are known to transport *Rickettsia*-infected ticks (Spitalská et al. 2011, Elfving et al.
422 2010, Movila et al. 2011) but the contribution of birds in the natural cycle of the pathogen
423 remains unclear. In this study, we report the presence of *Rickettsia* spp. in bird-feeding ticks
424 for the first time in Switzerland. The prevalence observed (12.3%) is in line with what was
425 reported from migratory birds in Sweden (11.3%) (Elfving et al. 2010) and with prevalence
426 observed in free-living ticks in Switzerland (10.2%) (Lommano et al. in press). Here, the
427 reservoir competence of tree pipits for *R. helvetica* is suggested since larvae (17.3%) were
428 more infected than nymphs (11.8%). Furthermore, larvae feeding with nymphs (16.3%)
429 showed the same infection prevalence as larvae feeding alone on host (without nymphs)

1 430 (17.9%), suggesting that co-feeding transmission is not the main mean of transmission and
2
3 431 that birds may be the source of infection. Common blackbirds seem also important in the
4
5 432 life cycle of *Rickettsia*, since they are the species carrying the most frequently infected ticks
6
7 433 (25% of birds) and because prevalence of ticks collected from one bird reached 40%.
8
9 434 *Rickettsia*emic birds, rather than co-feeding transmission, seemed to be the most probable
10
11 435 source of infection for ticks. Thus, common blackbirds and tree pipits might represent
12
13 436 efficient sources for infecting ticks with *Rickettsia* spp. in nature. Besides *I. ricinus*, which
14
15 437 is vector and reservoir of *R. helvetica* (Parola et al. 2005), it is not clear which vertebrate
16
17 438 can act as reservoir host of the bacteria. A recent study designed small mammals as
18
19 439 potential efficient source of infection (Schex et al. 2011) but the reservoir competence of
20
21 440 some birds belonging to the genus *Parus* (family *Paridae*) for *Rickettsia* spp. was also
22
23 441 suggested by others (Spitalská et al. 2011, Elfving et al. 2010).
24
25 442 Two different species of *Rickettsia* spp. were identified in bird-feeding ticks: *R. helvetica*
26
27 443 was predominantly detected in ticks from local and migratory birds (85.1%) whereas *R.*
28
29 444 *monacensis* was rarely identified (3.4%) and only in ticks from migrants. *R. monacensis*
30
31 445 was identified in free-living ticks at Agiez (Lommano et al. in press), one of the site where
32
33 446 birds were caught, but its low prevalence at this site (< 1%, Lommano et al. in press) may
34
35 447 explain its scarcity in ticks from birds (0/33) at this site. The reservoirs for *R. monacensis*
36
37 448 remain to be identified although infected ticks were removed from a rodent in Switzerland
38
39 449 (Burri et al. 2011) and from birds in Germany, Sweden and Russia (Hildebrandt et al. 2010,
40
41 450 Elfving et al. 2010, Movila et al. 2011). Our finding of *Rickettsia* sp. (*gltA* gene and 23S-5S
42
43 451 internal spacer) in two larvae feeding on European robins is of particular interest. The *gltA*
44
45 452 nucleotide sequences were 100% similar to another sequence obtained from a tick feeding
46
47 453 on one European robin as well (L. Dubska, unpublished). Moreover, the European robin
48
49 454 was, in the present study, the main host (64.7%) for ticks infected with unidentified
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

455 *Rickettsia* sp., among them 10 larvae and one nymph. We could therefore wonder whether
456 European robins are infected with a particular *Rickettsia* species.
457 Involvement of birds in the circulation of *A. phagocytophilum* is still discussed. The
458 pathogen has been identified in ticks feeding on birds, and even in larvae suggesting a
459 potential role of birds as reservoir hosts (Daniels et al. 2002, Paulauskas et al. 2009). In this
460 study, only 2% of bird-feeding ticks were infected with *A. phagocytophilum*, which is in
461 line with previous reports (Hildebrandt et al. 2010, Franke et al. 2010). But surprisingly,
462 15.8% of ticks from common blackbirds were carrying the bacteria and all infected larvae
463 were feeding on that bird species. Since transovarial transmission of *A. phagocytophilum*
464 (Ogden et al. 1998) and transmission by co-feeding (Rar et al. 2011) seem to be inefficient
465 or absent, infection of larvae should result from infectious blood meals. At a local level (at
466 Bois de l'Hôpital), we observed that bird-feeding ticks (6.3%) and especially the ones
467 feeding on common blackbirds (9.4%) (data not shown) were more infected by *A.*
468 *phagocytophilum* than free-living ticks (2.8%) (Lommano et al. in press). An infection
469 prevalence of 54.5% was even observed in ticks from one common blackbird, supporting
470 the fact that common blackbirds may be a source of infection for ticks. This statement is
471 strengthened by the finding of an unusual nucleotide sequence of *A. phagocytophilum* in a
472 larva feeding on a common blackbird, which may belong to a new genetic variant adapted
473 to its avian host. It would be therefore necessary to investigate in that field to confirm our
474 hypothesis. Interestingly, most *A. phagocytophilum*-infected larvae (7/8) were
475 simultaneously harbouring other pathogen species (*B. garinii*, *B. valaisiana*, *R. helvetica*)
476 confirming the immunosuppressive role of the bacteria which allows secondary infections
477 in host (Woldehiwet 2010) and suggesting that this immunosuppressive effect also occurs
478 in birds, particularly in common blackbirds. To our knowledge, this is the first report of the
479 immunosuppressive effect of *A. phagocytophilum* in birds.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

480 In the present study, TBEV was detected in only three ticks, all from migratory birds. None
481 of the birds caught at the TBEV endemic site (Agiez) was carrying infected ticks. The low
482 number of bird-feeding ticks collected at this site (n=33) in relation to the low prevalence in
483 questing ticks (0.34%, Lommano et al. 2012) may possibly explain the absence of TBEV in
484 our samples. The fact that we detected TBEV in ticks from migratory birds can explain the
485 emergence of new TBE endemic area in Western Switzerland (Lommano et al. 2012).
486 However, the role of birds in the maintenance of TBEV in endemic foci cannot be
487 excluded. In fact, two larvae from European robins were infected supporting the hypothesis
488 of Waldenström et al. (2007) that this bird species may be reservoir of the virus. Co-feeding
489 transmission of TBEV is of significance for the maintenance of the virus in nature (Labuda
490 et al. 1993) but this mechanism could be reasonably excluded in this study because in any
491 case larvae were simultaneously feeding with nymphs.

492 Wild rodents are reservoir hosts for *Candidatus N. mikurensis* (Andersson and Raberg
493 2011). Whether other vertebrates are of importance in the natural cycle of the parasite is
494 still unknown. To our knowledge this pathogen has been described only once in ticks
495 feeding on birds (Spitalská et al. 2006). The prevalence of *Candidatus N. mikurensis* in
496 ticks from birds observed in this study was lower (3.3%) than the prevalence observed in
497 questing ticks in Switzerland (6.4%) (Lommano et al. in press). Moreover, no larva was
498 infected by this pathogen suggesting that birds are less likely to play a role as reservoir
499 hosts. Nevertheless, the findings that 24% (6/25) of nymphs from chaffinches were infected
500 with *Candidatus N. mikurensis*, that 6/7 infected ticks were obtained from this bird species
501 and that 21.4% (0/8 larvae and 3/6 nymphs) of ticks from one individual were infected,
502 question about the exact role of this bird species in the natural cycle of *Candidatus N.*
503 *mikurensis*.

1 504 Birds are important in the ecology and circulation of tick-borne pathogens. They can
2
3 505 disperse infected ticks over long distances but they can also serve as reservoir hosts for
4
5 506 infectious agents. In regard to these aspects, the common blackbird appears to be the most
6
7 507 significant species. According to our results, common blackbirds were the most frequently
8
9 508 and heavily infested bird species and 83.3% of infested individuals were carrying infected
10
11 509 ticks. They represent also an efficient source of infection since 70.7% of larvae feeding on
12
13 510 this species were infected with at least one pathogen and 29.3% were harbouring more than
14
15 511 one pathogen. Moreover, since common blackbirds are frequently infested with larvae and
16
17 512 nymphs simultaneously, they may play a significant role in the co-feeding transmission of
18
19 513 tick-borne pathogens.
20
21
22
23

24 514 Rodents are commonly designated as important hosts and reservoirs of numerous tick-
25
26 515 borne pathogens. However, our findings that 30.8% of bird-feeding ticks were infected with
27
28 516 at least one of the five pathogens investigated and that 39.8% of infested birds were
29
30 517 carrying infected ticks emphasize the role of birds in the natural cycle of tick-borne
31
32 518 pathogens that are of human medical and veterinary relevance.
33
34
35

36 519 Acknowledgments

37
38
39 520 Results are parts of the PhD thesis of Lommano E. This work was financially supported by
40
41 521 the Swiss National Foundation (grants no 320000-113936/1 and no 310030-127064/1).
42
43

44 522 Local birds were trapped with permission of the Federal Office for the Environment.
45

46 523 We would like to thank ADMED (Laboratory of Medical Microbiology, La Chaux-de-
47
48 524 Fonds, Switzerland) for lending extraction machine and Reto Lienhard for his valuable
49
50 525 advices. A special thanks to Mégane Pluess for her precious technical assistance.
51
52

53
54 526 We thank all the ornithologists working at Col de Jaman (Groupe d'études faunistiques de
55
56 527 Jaman) for the precious help in collecting ticks on birds, especially Lionel Maumary,
57
58 528 Romain Fuerst, Anatole Gerber and Samuel Progin. We are thankful to Romain Béguelin,
59
60
61
62
63
64
65

1 529 Caroline Burri and Eva Patalas (Institute of Biology, University of Neuchâtel, Switzerland)
2
3 530 and all other people for their help in birds trapping; Matthieu Dvorak, Marion Quartier for
4
5 531 valuable help and advice.

6
7 532 We are also grateful to Ana Sofia Santos (CEVDI, Portugal), Simona Casati (Istituto di
8
9 533 Microbiologia, Ticino, Switzerland), Olivier Péter (Institut central des Hôpitaux du Valais,
10
11 534 Sion, Switzerland), Philippe de Mendonça (Ludwig-Maximilians-Universität, München,
12
13 535 Germany) for providing positive controls and Irina Golovljova for the protocol for
14
15 536 sequencing of *A. phagocytophilum*.

19 537 References

20
21
22 538 Alekseev, A.N., Dubinina, H.V., Van de Pol, I., Schouls, L.M., 2001a. Identification of
23
24 539 *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia.
25
26 540 J. Clin. Microbiol. 39, 2237-2242.

27
28
29 541 Alekseev, A.N., Dubinina, H.V., Semenov, A.V., Bolshakov, C.V., 2001b. Evidence of
30
31 542 ehrlichiosis agents found in ticks (Acari: *Ixodidae*) collected from migratory birds. J.
32
33 543 Med. Entomol. 38, 471-474.

34
35
36
37 544 Andersson, M., Raberg, L., 2011. Wild rodents and novel human pathogen *Candidatus*
38
39 545 *Neoehrlichia mikurensis*, Southern Sweden. Emerg. Infect. Dis. 17, 1716-1718.

40
41
42 546 Bekker, C.P., de Vos, S., Taoufik, A., Sparagano, O.A., Jongejan, F., 2002. Simultaneous
43
44 547 detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia*
45
46 548 *ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. Vet.
47
48 549 Microbiol. 89, 223-238.

49
50
51 550 Bernasconi, M.V., Casati, S., Peter, O., Piffaretti, J.C., 2002. *Rhipicephalus* ticks infected
52
53 551 with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino). Infect. Genet.
54
55 552 Evol. 2, 111-120.

56
57
58
59 553 Burri, C., Morán Cadenas, F., Douet, V., Moret, J., Gern, L., 2007. *Ixodes ricinus*

1 554 density and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a North-
2 facing altitudinal gradient in the Rhone Valley (Switzerland). Vector-Borne Zoonotic
3 Dis. 7, 50-58.
4
5 555
6
7 556
8
9 557 Burri, C., Bastic, V., Maeder, G., Patalas, E., Gern, L., 2011a. Microclimate and the
10 zoonotic cycle of tick-borne encephalitis virus in Switzerland. J. Med. Entomol. 48,
11 615-627.
12
13 558
14
15 559 Burri, C., Dupasquier, C., Bastic, V., Gern, L., 2011b. Pathogens of emerging tick-borne
16 diseases, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., and *Babesia* spp., in *Ixodes*
17 ticks collected from rodents at four sites in Switzerland (Canton of Bern). Vector-
18 Borne Zoonotic Dis. 11, 939-944.
19
20 560
21
22 561
23
24 562 Cotty, A., 1985. Clé de détermination des Ixodidae et Amblyommidae de Suisse. Thèse,
25 Université de Neuchâtel, Neuchâtel.
26
27 563
28
29 564 Courtney, J.W., Kostelnik, L.M., Zeidner, N.S., Massung, R.F., 2004. Multiplex real-time
30 PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. J. Clin.
31 Microbiol. 42, 3164-3168.
32
33 565
34
35 566
36
37 567 Daniels, T.J., Battaly, G.R., Liveris, D., Falco, R.C., Schwartz, I., 2002. Avian reservoirs of
38 the agent of human granulocytic ehrlichiosis? Emerg. Infect. Dis. 8, 1524-1525.
39
40 568
41
42 569 Dubska, L., Literak, I., Kocianova, E., Taragel'ova, V., Sychra, O., 2009. Differential role
43 of passerine birds in distribution of *Borrelia* spirochetes, based on data from ticks
44 collected from birds during the postbreeding migration period in Central Europe. Appl.
45 Environ. Microbiol. 75, 596-602.
46
47 570
48
49 571
50
51 572 Elfving, K., Olsen, B., Bergström, S., Waldenström, J., Lundkvist, A., Sjöstedt, A., Mejlom,
52 H., Nilsson, K., 2010. Dissemination of spotted fever *Rickettsia* agents in Europe by
53 migrating birds. PLoS ONE 5, e8572.
54
55 573
56
57 574
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 578 Ernek, E., Kozuch, O., Lichard, M., Nosek, J., 1968. The role of birds in the circulation of
579 tick-borne encephalitis virus in the Tribec region. *Acta Virol.* 12, 468-470.
- 580 Felsenstein, J., 1993. PHYLIP: Phylogeny inference package, version 3.5c. University of
581 Washington, Seattle, WA, USA. Available at
582 <http://evolution.gs.washington.edu/phylip/getme.html>.
- 583 Franke, J., Moldenhauer, A., Hildebrandt, A., Dorn, W., 2010. Are birds reservoir hosts for
584 *Borrelia afzelii*? *Ticks Tick-borne Dis.* 1, 109-112.
- 585 Gern, L., Douet, V., López, Z., Rais, O., Morán Cadenas, F., 2010. Diversity of
586 *Borrelia* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in a Lyme borreliosis endemic area in
587 Switzerland identified by using new probes for reverse line blotting. *Ticks Tick-*
588 *borne Dis.* 1, 23-29.
- 589 Gylfe, A., Olsen, B., Strasevicius, D., Marti Ras, N., Weihe, P., Noppa, L., Ostberg, Y.,
590 Baranton, G., Bergström, S., 1999. Isolation of Lyme disease *Borrelia* from puffins
591 (*Fratercula arctica*) and seabird ticks (*Ixodes uriae*) on the Faeroe Islands. *J. Clin.*
592 *Microbiol.* 37, 890-896.
- 593 Hamer, S.A., Hickling, G.J., Sidge, J.L., Rosen, M.E., Walker, E.D., Tsao, J.I., 2011.
594 Diverse *Borrelia burgdorferi* strains in a bird-tick cryptic cycle. *Appl. Environ.*
595 *Microbiol.* 77, 1999-2007.
- 596 Hanincová, K., Taragel'ova, V., Koci, J., Schafer, S.M., Hails, R., Ullmann, A.J., Piesman,
597 J., Labuda, M., Kurtenbach, K., 2003. Association of *Borrelia garinii* and *B.*
598 *valaisiana* with songbirds in Slovakia. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2825-2830.
- 599 Herrmann, C., Gern, L., 2010. Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) under
600 challenging conditions of temperature and humidity is influenced by *Borrelia*
601 *burgdorferi* sensu lato infection. *J. Med. Entomol.* 47, 1196-1204.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 602 Herrmann, C., Gern, L., 2012. Do the level of energy reserves, hydration status and
603 *Borrelia* infection influence walking by *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks?
604 Parasitology 139, 330-337.
- 605 Hildebrandt, A., Franke, J., Meier, F., Sachse, S., Dorn, W., Straube, E., 2010. The
606 potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma*
607 *phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. Ticks Tick-borne Dis. 1, 105-107.
- 608 Hoogstraal, H., 1972. Birds as tick hosts and as reservoirs and disseminators of tickborne
609 infectious agents. Wiad. Parazytol. 18, 703-706.
- 610 Huegli, D., Hu, C.M., Humair, P.F., Wilske, B., Gern, L., 2002. *Apodemus* species mice are
611 reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland. J. Clin.
612 Microbiol. 40, 4735-4737.
- 613 Humair, P.F., Rais, O., Gern, L., 1999. Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus*
614 mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission
615 pattern and overwintering maintenance. Parasitology. 118, 33-42.
- 616 Humair, P.F., Postic, D., Wallich, R., Gern, L., 1998. An avian reservoir (*Turdus merula*)
617 of the Lyme borreliosis spirochetes. Zentralbl. Bakteriologie. 287, 521-538.
- 618 Jado, I., Escudero, R., Gil, H., Jimenez-Alonso, M.I., Sousa, R., Garcia-Perez, A.L.,
619 Rodriguez-Vargas, M., Lobo, B., Anda, P., 2006. Molecular method for
620 identification of *Rickettsia* species in clinical and environmental samples. J. Clin.
621 Microbiol. 44, 4572-4576.
- 622 Jouda, F., Perret, J.L., Gern, L., 2004. *Ixodes ricinus* density, and distribution and
623 prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient.
624 J. Med. Entomol. 41, 162-169.
- 625 Katargina, O., Geller, J., Alekseev, A., Dubinina, H., Efremova, G., Mishaeva, N.,
626 Vasilenko, V., Kuznetsova, T., Järvekülg, L., Vene, S., Lundkvist, A., Golovljova,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

627 I., 2012. Identification of *Anaplasma phagocytophilum* in tick populations in
628 Estonia, the European part of Russia and Belarus. Clin. Microbiol. Infect. 18, 40-46.
629 Kurtenbach, K., Peacey, M., Rijpkema, S.G., Hoodless, A.N., Nuttall, P.A., Randolph, S.E.,
630 1998. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu
631 lato by game birds and small rodents in England. Appl. Environ. Microbiol. 64,
632 1169-1174.
633 Kurtenbach, K., Schafer, S.M., H. S. Sewell, M. Peacey, A. Hoodless, P. A. Nuttall, and S.
634 E. Randolph. 2002. Differential survival of Lyme borreliosis spirochetes in ticks
635 that feed on birds. Infect Immun 70: 5893-5895.
636 Labuda, M., Danielova, V., Jones, L.D., Nuttall, P.A., 1993. Amplification of tick-borne
637 encephalitis virus infection during co-feeding of ticks. Med. Vet. Entomol. 7, 339-
638 342.
639 Levine, J.F., Sonenshine, D.E., Nicholson, W.L., Turner, R.T., 1991. *Borrelia burgdorferi*
640 in ticks (Acari, *Ixodidae*) from Coastal Virginia. J. Med. Entomol. 28, 668-674.
641 Liz, J.S., Anderes, L., Sumner, J.W., Massung, R.F., Gern, L., Rutti, B., Brossard, M.,
642 2000. PCR detection of granulocytic *ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* ticks and wild
643 small mammals in western Switzerland. J. Clin. Microbiol. 38, 1002-1007.
644 Lommano, E., Bertaiola, L., Dupasquier, C., Gern, L., in press. Infections and co-infections
645 of questing *Ixodes ricinus* ticks by emerging zoonotic pathogens in Western
646 Switzerland. Appl. Environ. Microbiol.
647 Lommano, E., Burri, C., Maeder, G., Guerne, M., Bastic, V., Patalas, E., Gern, L., 2012.
648 Prevalence and genotyping of tick-borne encephalitis virus in questing *Ixodes*
649 *ricinus* ticks in a new endemic area in western Switzerland. J. Med. Entomol. 49,
650 156-164.

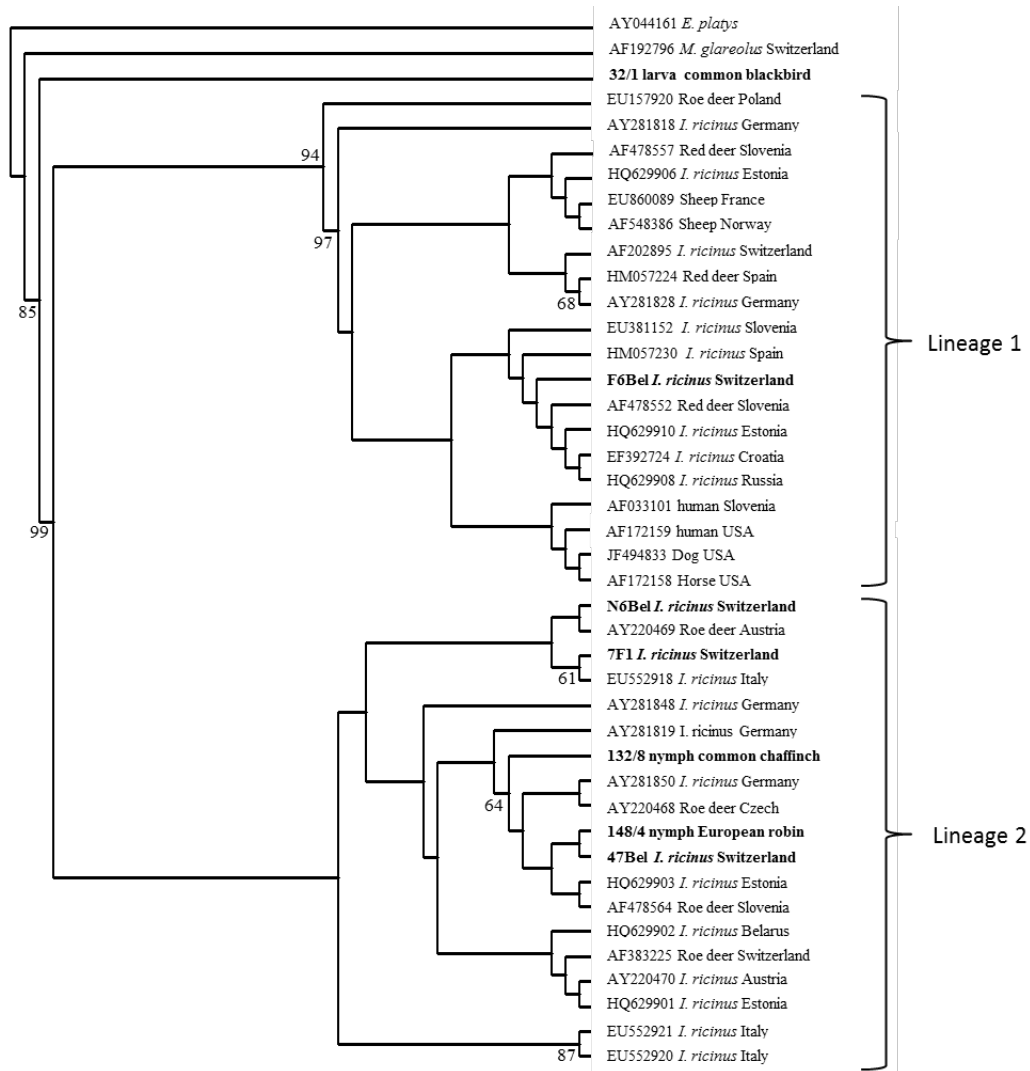
- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 651 Lotric-Furlan, S., Petrovec, M., Zupanc, T.A., Nicholson, W.L., Sumner, J.W., Childs, J.E.,
652 Strle, F., 1998. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: clinical and laboratory
653 findings for four patients from Slovenia. *Clin. Infect. Dis.* 27, 424-428.
- 654 Margos, G., Vollmer, S.A., Cornet, M., Garnier, M., Fingerle, V., Wilske, B., Bormane, A.,
655 Vitorino, L., Collares-Pereira, M., Drancourt, M., Kurtenbach, K., 2009. A new
656 *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes.
657 *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5410-5416.
- 658 Michalik, J., Wodecka, B., Skoracki, M., Sikora, B., Stanczak, J., 2008. Prevalence of
659 avian-associated *Borrelia burgdorferi* s.l. genospecies in *Ixodes ricinus* ticks
660 collected from blackbirds (*Turdus merula*) and song thrushes (*T. philomelos*). *Int. J.*
661 *Med. Microbiol.* 298, 129-138.
- 662 Morán Cadenas, F., Rais, O., Jouda, F., Douet, V., Humair, P.F., Moret, J., Gern, L., 2007.
663 Phenology of *Ixodes ricinus* and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato
664 along a north- and south-facing altitudinal gradient on Chaumont Mountain,
665 Switzerland. *J. Med. Entomol.* 44, 683-693.
- 666 Movila, A., Dubinina, H.V., Tolstenkov, O.O., Toderas, I., Alekseev, A.N., 2011. Detection
667 of *Babesia* sp. EU1 and members of Spotted Fever Group *Rickettsiae* in ticks
668 collected from migratory birds at Curonian Spit, North-Western Russia. *Vector-*
669 *Borne Zoonotic Dis.* 1, 89-91.
- 670 Nakao, M., Miyamoto, K., Fukunaga, M., 1994. Lyme disease spirochetes in Japan:
671 enzootic transmission cycles in birds, rodents and *Ixodes persulcatus* ticks. *J. Infect.*
672 *Dis.* 170, 878-882.
- 673 Ogden, N.H., Bown, K., Horrocks, B.K., Woldehiwet, Z., Bennett, M., 1998. Granulocytic
674 *Ehrlichia* infection in *ixodid* ticks and mammals in woodlands and uplands of the
675 U.K. *Med. Vet. Entomol.* 12, 423-429.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 676 Olsen, B., Jaenson, T.G, Bergstrom, S., 1995. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu
677 lato-infected ticks on migrating birds. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3082-3087.
- 678 Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal
679 computers. Comput. Appl. Biosci. 12, 357-358.
- 680 Papadopoulos, B., Humair, P.F., Aeschlimann, A., Vaucher, C., Büttiker, W., 2002. Ticks
681 on birds in Switzerland. Acarologia. 42, 3-19.
- 682 Parola, P., Paddock, C.D., Raoult, D., 2005. Tick-borne rickettsioses around the world:
683 emerging diseases challenging old concepts. Clin. Microbiol. Rev. 18, 719-756.
- 684 Paulauskas, A., Radzijeuskaja, J., Rosef, O., 2009. *Anaplasma* in ticks feeding on migrating
685 birds and questing ticks in Lithuania and Norway. Clin. Microbiol. Infect. 15, 34-
686 36.
- 687 Poupon, M.A., Lommano, E., Humair, P.F., Douet, V., Rais, O., Schaad, M., Jenni, L.,
688 Gern, L., 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from
689 migratory birds in Switzerland. Appl. Environ. Microbiol. 72, 976-979.
- 690 Rar, V., Golovljova, I., 2011. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus* Neoehrlichia”
691 bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review.
692 Infect. Genet. Evol. 11, 1842-1861.
- 693 Richter, D., Debski, A., Hubalek, Z., Matuschka, F.R., 2012. Absence of Lyme disease
694 spirochetes in larval *Ixodes ricinus* ticks. Vector-Borne Zoonotic Dis. 12, 21-27.
- 695 Schex, S., Dobler, G., Riehm, J., Muller, J., Essbauer, S., 2011. *Rickettsia* spp. in wild
696 small mammals in Lower Bavaria, South-Eastern Germany. Vector-Borne Zoonotic
697 Dis. 11, 493-502.
- 698 Schouls, L.M., Van De Pol, I., Rijpkema, S.G., Schot, C.S., 1999. Detection and
699 identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species
700 in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. J. Clin. Microbiol. 37, 2215-2222.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 701 Schwaiger, M., Peter, O., Cassinotti, P., 2001. Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi*
702 (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. Clin. Microbiol. Infect. 7, 461-
703 469.
- 704 Schwaiger, M., Cassinotti, P., 2003. Development of a quantitative real-time RT-PCR
705 assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis
706 virus (TBEV) RNA. J. Clin. Virol. 27, 136-145.
- 707 Spitalská, E., Literák, I., Sparagano, O.A., Golovchenko, M., Kocianová, E., 2006. Ticks
708 (*Ixodidae*) from passerine birds in the Carpathian region. Wien. Klin. Wochenschr.
709 118, 759-764.
- 710 Spitalská, E., Literák, I., Kocianová, E., Taragel'ova, V., 2011. The importance of *Ixodes*
711 *arboricola* in transmission of *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and
712 *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the Czech Republic, Central Europe. Vector-
713 Borne Zoonotic Dis. 11, 1235-1241.
- 714 Sumner, J.W., Nicholson, W.L., Massung, R.F., 1997. PCR amplification and comparison
715 of nucleotide sequences from the groESL heat shock operon of *Ehrlichia* species. J.
716 Clin. Microbiol. 35, 2087-2092.
- 717 Taragel'ova, V., Koci, J., Hanincova, K., Kurtenbach, K., Derdakova. M., Odgen, N.H.,
718 Literák, I., Kocianová, E., Labuda, M., 2008. Blackbirds and song thrushes
719 constitute a key reservoir of *Borrelia garinii*, the causative agent of borreliosis in
720 Central Europe. Appl. Environ. Microbiol. 74, 1289-1293.
- 721 Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. Clustal W: improving the
722 sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,
723 position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22,
724 4673-4680.

1 725 Tonetti, N., Berggoetz, M., Rühle, C., Pretorius, A.M., Gern, L., 2009. Ticks and tick-borne
2
3 726 pathogens from wildlife in the Free State Province, South Africa. J. Wildl. Dis. 45,
4
5 727 437-446.
6
7 728 Waldenström, J., Lundkvist, A., Falk, K.I., Garpmo, U., Bergström, S., Lindegren, G.,
8
9 729 Sjostedt, A., Mejlom, H., Fransson, T., Haemig, P.D., Olsen, B., 2007. Migrating
10
11 birds and tick-borne encephalitis virus. Emerg. Infect. Dis. 13, 1215-1218.
12
13 730
14 731 Woldehiwet, Z., 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. Vet. Parasitol.
15 732 167, 108-122.
16 733
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 Figure 1. Phylogenetic tree based on partial *groESL* operon sequences (776 bp) of *A.*
- 2 *phagocytophilum* found in ticks feeding on birds (**bold**), in comparison to sequences
- 3 obtained from GenBank database. Only bootstrap values of > 60% are shown.



1 Table 1. Prevalence and intensity of tick infestation of local birds caught at Bois de
2 l'Hôpital and Agiez in spring-summer 2008, 2009 and 2010.

3 Table 2. Prevalence and intensity of tick infestation of migratory birds captured at the Col
4 de Jaman in summer-autumn 2007, 2008 and 2009.

5 Table 3. Prevalence of *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum* (*A. phago*),
6 TBEV and *Candidatus* N. mikurensis (*C. N. mikurensis*) in immature *I. ricinus* ticks (L,
7 larva, N, nymph) from local birds.

8 Table 4. Prevalence of *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum* (*A. phago*),
9 TBEV and *Candidatus* N. mikurensis (*C. N. mikurensis*) in immature *I. ricinus* ticks (L,
10 larva, N, nymph) from migratory birds.

11 Table 5. Prevalence of *Borrelia* genospecies in immature *I. ricinus* ticks (L, larva, N,
12 nymph) collected from local birds. *Borrelia* sl: *Borrelia* spp. matching only with the SL1
13 probe (RLB); *Borrelia* sp.: *Borrelia* sp. that could not be identified with RLB but was
14 positive with real-time PCR.

15 Table 6. Prevalence of *Borrelia* genospecies in immature *I. ricinus* ticks (L, larva, N,
16 nymph) collected from migratory birds. *Borrelia* sl: *Borrelia* spp. matching only with the
17 SL1 probe (RLB); *Borrelia* sp.: *Borrelia* sp. that could not be identified with RLB but was
18 positive with real-time PCR.

Birds species (name)	No. infested/ examined birds (%)	No. ticks (larvae;nymphs)	Infestation intensity
<i>Certhia familiaris</i> (Eurasian treecreeper)	1/2 (50)	1 (0;1)	1
<i>Coccothraustes coccothraustes</i> (Hawfinch)	1/1 (100)	9 (3;6)	9
<i>Dendrocopos major</i> (Great spotted woodpecker)	0/2		
<i>Erithacus rubecula</i> (European robin)	6/13 (46.2)	27 (21;6)	4.5
<i>Fringilla coelebs</i> (Common chaffinch)	1/3 (33.3)	1 (0;1)	1
<i>Parus major</i> (Great tit)	4/5 (80)	5 (1;4)	1.25
<i>Pariparus ater</i> (Coal tit)	0/2		
<i>Phylloscopus collybita</i> (Common chiffchaff)	0/1		
<i>Sylvia atricapilla</i> (Blackcap)	0/1		
<i>Turdus merula</i> (Blackbird)	2/2 (100)	32 (0;32)	16
<i>Turdus philomelos</i> (Song thrush)	1/1 (100)	6 (3;3)	6
Total	16/33 (48.5)	81 (28;53)	5.06

19

Bird species (name)	No. infested/ examined birds (%)	No. collected ticks (larvae;nymphs;female)	Infestation intensity
<i>Accipiter nisus</i> (Eurasian sparrowhawk)	0/5		
<i>Acrocephalus scirpaceus</i> (Eurasian reed warbler)	0/2		
<i>Aegithalus caudatus</i> (Long-tailed tit)	0/8		
<i>Alauda arvensis</i> (Eurasian skylark)	1/66 (1.5)	1 (0;1;0)	1
<i>Anthus pratensis</i> (Meadow pipit)	0/21		
<i>Anthus spinoletta</i> (Water pipit)	0/59		
<i>Anthus trivialis</i> (Tree pipit)	120/673 (17.8)	328 (243;85;0)	2.73
<i>Carduelis flammea cabaret</i> (Lesser redpoll)	0/4		
<i>Carduelis cannabina</i> (Common linnnet)	0/9		
<i>Carduelis carduelis</i> (European goldfinch)	0/57		
<i>Carduelis citrinella</i> (Citril finch)	0/32		
<i>Carduelis flammea</i> (Common redpoll)	0/1		
<i>Carduelis spinus</i> (Eurasian siskin)	0/442		
<i>Certhia brachydactyla</i> (Short-toed treecreeper)	0/4		
<i>Certhia familiaris</i> (Eurasian treecreeper)	0/5		
<i>Chloris chloris</i> (European greenfinch)	0/3		
<i>Coccothraustes coccothraustes</i> (Hawfinch)	2/20 (10)	2 (0;2;0)	1
<i>Coturnix coturnix</i> (Common quail)	0/35		
<i>Cyanistes caeruleus</i> (Eurasian blue tit)	0/12		
<i>Delichon urbicum</i> (Common house martin)	0/1		
<i>Dendrocopos major</i> (Great spotted woodpecker)	0/6		
<i>Emberiza cia</i> (Rock bunting)	0/1		
<i>Emberiza citrinella</i> (Yellowhammer)	0/1		
<i>Emberiza hortulana</i> (Ortolan bunting)	0/20		
<i>Erithacus rubecula</i> (European robin)	221/1216 (18.2)	457 (335;122;0)	2.07
<i>Ficedula hypoleuca</i> (European pied flycatcher)	0/35		
<i>Fringilla coelebs</i> (Common chaffinch)	37/533 (6.9)	68 (42;25;1)	1.84
<i>Fringilla montifringilla</i> (Brambling)	7/121 (5.8)	7 (2;5;0)	1
<i>Garrulus glandarius</i> (Eurasian jay)	0/3		
<i>Glaucidium passerinum</i> (Eurasian pygmy owl)	0/2		
<i>Jynx torquilla</i> (Eurasian wryneck)	0/2		
<i>Lanius collurio</i> (Red-backed shrike)	0/1		
<i>Locustella naevia</i> (Common grasshopper warbler)	0/27		
<i>Lophophanes cristatus</i> (European crested tit)	0/4		
<i>Loxia curvirostra</i> (Red crossbill)	0/27		
<i>Lullula arborea</i> (Woodlark)	1/33 (3)	1 (0;1;0)	1
<i>Luscinia megarhynchos</i> (Common nightingale)	0/2		
<i>Motacilla alba</i> (White wagtail)	0/1		
<i>Motacilla cinerea</i> (Grey wagtail)	0/3		
<i>Motacilla flava</i> (Western yellow wagtail)	0/11		
<i>Muscicapa striata</i> (Spotted flycatcher)	0/2		
<i>Nucifraga caryocatactes</i> (Spotted nutcracker)	1/48 (2.1)	1 (0;1;0)	1
<i>Oenanthe oenanthe</i> (Northern wheatear)	1/20 (5)	1 (0;1;0)	1
<i>Parus major</i> (Great tit)	1/25 (4)	1 (1;0;0)	1
<i>Periparus ater</i> (Coal tit)	0/150		
<i>Phoenicurus ochruros</i> (Black redstart)	1/37 (2.7)	1 (0;1;0)	1
<i>Phoenicurus phoenicurus</i> (Common redstart)	1/22 (4.5)	4 (3;1;0)	4
<i>Phylloscopus collybita</i> (Common chiffchaff)	0/18		
<i>Phylloscopus trochilus</i> (Willow warbler)	5/38 (13.2)	7 (2;5;0)	1.4
<i>Poecile montanus</i> (Willow tit)	0/5		
<i>Poecile palustris</i> (Marsh tit)	0/1		
<i>Prunella modularis</i> (Dunnock)	3/46 (6.5)	3 (1;2;0)	1
<i>Pyrrhula pyrrhula</i> (Eurasian bullfinch)	0/30		
<i>Regulus ignicapilla</i> (Common firecrest)	0/12		
<i>Regulus regulus</i> (Goldcrest)	0/51		
<i>Saxicola rubetra</i> (Whinchat)	0/37		
<i>Scolopax rusticola</i> (Eurasian woodcock)	0/1		
<i>Serinus serinus</i> (European serin)	2/55 (3.6)	2 (1;1;0)	1
<i>Sitta europea</i> (Eurasian nuthatch)	0/22		
<i>Strix aluco</i> (Tawny owl)	0/1		
<i>Sturnus vulgaris</i> (Common starling)	0/1		
<i>Sylvia atricapilla</i> (Eurasian blackcap)	0/22		
<i>Sylvia borin</i> (Garden warbler)	0/13		
<i>Sylvia communis</i> (Common whitethroat)	1/6 (16.7)	2 (0;2;0)	2
<i>Troglodytes troglodytes</i> (Eurasian wren)	5/55 (9.1)	10 (5;5;0)	2
<i>Turdus iliacus</i> (Redwing)	9/14 (64.3)	25 (9;16;0)	2.78
<i>Turdus merula</i> (Common blackbird)	42/82 (51.2)	120 (41;79;0)	2.86
<i>Turdus philomelos</i> (Song thrush)	41/151 (27.2)	79 (35;44;0)	1.93
<i>Turdus pilaris</i> (Fieldfare)	0/7		
<i>Turdus torquatus</i> (Ring ouzel)	0/10		
<i>Turdus viscivorus</i> (Mistle thrush)	2/35 (5.7)	4 (2;2;0)	2
Total	504/4525 (11.1)	1124 (722;401;1)	2.23

21

Bird species	No. birds with infected ticks / No. infested birds (%)	No. tested ticks		No. infected ticks										No. ticks infected with at least 1 pathogen species (%)		
				<i>Borrelia</i> spp.		<i>Rickettsia</i> spp.		<i>A. phago</i>		TBEV		C. N. mikurensis				
				L	N	L	N	L	N	L	N	L	N			L
<i>Certhia familiaris</i>	0/1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	1/1 (100)	3	6	0	1	1	0	0	0	0	0	0	NA	NA	1 (33.3)	1 (16.7)
<i>Erithacus rubecula</i>	3/6 (50)	21	6	2	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	4 (19)	1 (16.7)
<i>Fringilla coelebs</i> *	0/1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Parus major</i>	1/4 (25)	1	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (25)
<i>Turdus merula</i>	2/2 (100)	0	32	0	16	0	8	0	3	0	0	0	0	0	0	23 (71.9)
<i>Turdus philomelos</i>	1/1 (100)	3	3	3	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3 (100)	2 (66.7)
TOTAL	8/16 (50)	28	53	5	20	4	10	0	3	0	0	0	0	0	8 (28.6)	28 (52.8)

22

Bird species	No. birds with infected ticks / No. infested birds (%)	No. tested ticks		No. infected ticks										No. ticks infected with at least 1 pathogen species (%)		
				<i>Borrelia</i> spp.		<i>Rickettsia</i> spp.		<i>A. phago</i>		TBEV		C. N. mikurensis				
				L	N	L	N	L	N	L	N	L	N			L
<i>Alauda arvensis</i>	0/1 (0)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
<i>Anthus trivialis</i>	50/120 (41.7)	243	85	47	14	42	10	0	0	0	0	0	NA	NA	74 (30.5)	21 (24.7)
<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	1/2 (50)	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	1 (50)
<i>Erithacus rubecula</i>	63/221 (28.5)	335	122	14	11	41	12	0	2	2	0	0/49	0/8	56 (16.7)	25 (20.5)	
<i>Fringilla coelebs</i> *	9/37 (24.3)	42	25	1	2	6	1	0	1	0	0	0/42	6/25	6 (14.3)	9 (36)	
<i>Fringilla montifringilla</i>	0/7 (0)	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
<i>Lullula arborea</i>	0/1 (0)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
<i>Nucifraga caryocatactes</i>	0/1 (0)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
<i>Oenanthe oenanthe</i>	0/1 (0)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
<i>Parus major</i>	0/1 (0)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
<i>Phoenicurus ochruros</i>	1/1 (100)	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	1 (100)
<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	0/1 (0)	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
<i>Phylloscopus trochilus</i>	1/5 (20)	2	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	1 (20)
<i>Prunella modularis</i>	1/3 (33.3)	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	0/1	1 (100)	0
<i>Serinus serinus</i>	1/2 (50)	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	NA	NA	1 (100)	0
<i>Sylvia communis</i>	1/1 (100)	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	1 (50)
<i>Troglodytes troglodytes</i>	2/5 (40)	5	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0/1	1/2	1 (20)	1 (20)
<i>Turdus iliacus</i>	7/9 (77.8)	9	16	6	10	0	2	0	0	0	0	0	NA	NA	6 (66.7)	11 (68.7)
<i>Turdus merula</i>	35/42 (83.3)	41	79	27	40	4	6	8	9	0	1	0/5	0/5	29 (70.7)	52 (65.8)	
<i>Turdus philomelos</i>	26/41 (63.4)	35	44	10	21	3	4	0	1	0	0	0/2	0/2	12 (34.3)	23 (52.3)	
<i>Turdus viscivorus</i>	1/2 (50)	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	2 (100)	1 (50)
TOTAL	199/504 (39.5)	722	401	108	102	98	36	8	13	2	1	0/99	7/43	188 (26)	147 (36.7)	

23

Species	No. of tested ticks		No. of infected ticks (%)												No. ticks with mixed infections		
			<i>Borrelia</i> spp.		<i>B. afzelii</i>		<i>B. garinii</i>		<i>B. valaisiana</i>		<i>B. sensu stricto</i>		<i>B. bavariensis</i>			<i>B. miyamotoi</i>	
			L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N		L	N
<i>Certhia familiaris</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	3	6	0	1 (16.7)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Erithacus rubecula</i>	21	6	2 (9.5)	1 (16.7)	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Fringilla coelebs</i> *	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Parus major</i>	1	4	0	1 (25)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Turdus merula</i>	0	32	0	16 (50)	0	0	0	7	0	10	0	1	0	0	0	1	3
<i>Turdus philomelos</i>	3	3	3 (100)	1 (33.3)	0	0	1	1	3	1	0	0	0	0	0	0	2
TOTAL	28	53	5 (17.9)	20 (37.3)	0	0	2	11	4	11	0	1	1	0	0	1	6

24

Bird species	No. of tested ticks		No. of infected ticks (%)												No. ticks with mixed infections (L+N)				
			<i>Borrelia</i> spp.		<i>B. afzelii</i>		<i>B. garinii</i>		<i>B. valaisiana</i>		<i>B. sensu stricto</i>		<i>B. bavariensis</i>			<i>B. miyamotoi</i>		<i>Borrelia</i> sp.	
			L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N		L	N	L	N
<i>Alauda arvensis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Anthus trivialis</i>	243	85	47 (19.3)	14 (16.5)	0	4	31	4	2	0	0	2	5	0	1	0	0		
<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	0	2	0	1 (50)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Erithacus rubecula</i>	335	122	14 (4.2)	11 (9)	0	0	3	7	1	4	0	0	1	2	0	0	0		
<i>Fringilla coelebs</i>	42	25	1 (2.4)	2 (8)	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Fringilla montifringilla</i>	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Lullula arborea</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Nucifraga caryocatactes</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Oenanthe oenanthe</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Parus major</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Phoenicurus ochruros</i>	0	1	0	1 (100)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Phylloscopus trochilus</i>	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Prunella modularis</i>	1	2	1 (100)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
<i>Serinus serinus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Sylvia communis</i>	0	2	0	1 (50)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Troglodytes troglodytes</i>	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Turdus iliacus</i>	9	16	6 (66.7)	10 (62.5)	0	2	3	7	2	1	0	0	0	0	0	1	0		
<i>Turdus merula</i>	41	79	27 (65.9)	40 (50.6)	0	4	6	13	22	28	0	1	1	0	0	2	1		
<i>Turdus philomelos</i>	35	44	10 (28.6)	21 (47.7)	0	2	5	10	5	7	0	0	1	0	0	1	2		
<i>Turdus viscivorus</i>	2	2	2 (100)	1 (50)	0	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0		
TOTAL	722	401	108 (15)	102 (25.4)	1	17	49	42	34	41	0	3	7	1	3	3	24		

25

4 DISCUSSION

Les tiques sont considérées comme le deuxième plus important vecteur d'agents pathogènes humains au monde, juste après les moustiques (Heyman et al. 2010). On estime à plus de 100'000 le nombre de cas cliniques humains dus à des piqûres de tiques dans le monde (de La Fuente et al. 2008). Dans les régions tempérées, ces arthropodes représentent même le premier vecteur d'agents infectieux (Capelli et al. 2012). Parmi la trentaine d'espèces de tiques présentes en Europe, *I. ricinus* est la plus répandue et la plus fréquemment rencontrée. Sa répartition s'étend du Nord de l'Afrique jusqu'en Finlande et du Portugal jusqu'en Russie (Lindquist et Vapalahti 2008). En plus d'être abondante, *I. ricinus* est vecteur de nombreux microorganismes pouvant être infectieux pour l'Homme et les animaux, parmi lesquels des bactéries (*Borrelia* spp., *Anaplasma/Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp., *Coxiella burnettii*), des protozoaires (*Babesia* spp.) et des virus (TBEV et le virus du louping-ill). La plupart des zoonoses causées par ces microorganismes sont actuellement considérées comme émergentes (de La Fuente et al. 2008). Parmi ces microorganismes, on trouve *B. miyamotoi*, *R. monacensis*, *B. venatorum* et *Candidatus* N. mikurensis (Herwaldt et al. 2003, Jado et al. 2007, Fehr et al. 2010, von Loewenich et al. 2010, Welinder-Olsson et al. 2010, Platonov et al. 2011).

A l'image de l'Europe, on assiste, en Suisse, à l'apparition ou à la description de nouveaux agents pathogènes dans les tiques. *R. monacensis*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis*, *B. miyamotoi* et *B. venatorum* ont été récemment identifiés dans les tiques libres de l'espèce *I. ricinus* (Casati et al. 2006b, Boretti et al. 2009, Gern et al. 2010b, Burri et al. 2011a). Conjointement, *Candidatus* N. mikurensis, une bactérie préalablement détectée chez *I. ricinus* aux Pays-Bas (Schouls et al. 1999), a été isolé du sang d'un patient septicémique dans notre pays (Fehr et al. 2010). Malgré la découverte de ce cas clinique, aucune investigation n'a été menée en Suisse afin de mettre en évidence la bactérie dans les tiques et de définir les zones à risque. Parallèlement à l'émergence de nouveaux microorganismes dans les tiques en Suisse, on assiste à la propagation du TBEV vers l'Ouest du pays. Depuis l'apparition du 1^{er} cas d'encéphalite à tiques en 1969 (Krech et al. 1969, Spiess et al. 1969) et jusqu'à 2005, les zones d'endémies étaient confinées dans un périmètre connu et délimité au Nord-Est du pays (Wyler et Matile 1984, de Marval 1994). Ainsi, en 2007, la reconnaissance de nouveaux foyers d'encéphalite à tiques dans l'Ouest de la Suisse (OFSP 2007) fit suite à l'apparition d'une vingtaine de cas humains, entre 2000 et 2007, dans des régions de Suisse occidentale considérées comme indemnes (de Vallière et al. 2006, Schlaefli et al. 2007). Dans cette situation d'émergence et de progression d'agents pathogènes sur le territoire helvétique, l'étude de la relation hôte-vecteur-pathogène constitue un point de départ pour une meilleure compréhension de ces zoonoses. Dans ce but, nous avons recherché la présence de six pathogènes de genres différents dans des tiques

libres, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., *A. phagocytophilum*, *Candidatus* N. mikurensis et le virus TBE, dans la partie occidentale de la Suisse (Figure 15). Tous ont été impliqués dans des cas cliniques chez l'Homme en Europe et pour certains d'entre eux, en Suisse.



Figure 15 : Zone d'étude, située dans la partie ouest du pays.

Tous les pathogènes recherchés ont été identifiés dans la zone d'étude concernée (Lommano et al. 2012a, Lommano et al. 2012b). *Borrelia* était le pathogène le plus fréquemment rencontré dans les tiques (22.5%), suivi de *Rickettsia* (10.2%), *Candidatus* N. mikurensis (6.4%), *Babesia* (1.9%), *A. phagocytophilum* (1.5%) et du TBEV (0.06%). Globalement, 34.2% (505/1'476) des tiques étaient infectées par au moins un des pathogènes (hormis le TBEV), ce qui représente plus d'une tique sur trois (Lommano et al. 2012a). La comparaison de cette prévalence avec celle observée dans d'autres pays européens n'est pas chose aisée car les études recherchant les mêmes microorganismes dans les tiques sont rares. De plus, chaque méthode d'analyse des pathogènes peut engendrer des biais dans les résultats qui rendent difficiles de bonnes comparaisons. A titre d'exemple, en comparant des études européennes, on constate des variations dans la prévalence de *Borrelia* allant de 11% (mise en culture des spirochètes) à 29% (détection d'ADN par PCR) (Hubalek et Halouzka 1998). L'étude de Morán-Cadenas et al. (2007) met également en évidence de telles divergences, mais liées à la méthode utilisée pour extraire l'ADN. Toutefois, une étude réalisée au Luxembourg et recherchant la présence de sept pathogènes dans les tiques dont *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* et le TBEV rapporte une prévalence de tiques infectées (tous pathogènes confondus) de 19.5% (Reye et al. 2010), ce qui est inférieur à la valeur que nous avons observée dans notre zone d'étude (34.2%). De même, une autre étude réalisée en France et investiguant la présence de cinq pathogènes dont *Borrelia* spp., *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. et *A. phagocytophilum* révèle une prévalence de tiques infectées largement inférieure à la nôtre (14.2%) (Reis et al. 2010).

Dans notre étude, 22.5% des tiques étaient infectées par *Borrelia* spp., ce qui est similaire aux fréquences observées précédemment en Suisse : 25.9% (Jouda et al. 2004b), 22.4% (Morán Cadenas et al. 2007) et 26.2% (Casati et al. 2004). En Europe (Italie, Pays-Bas, Norvège, Luxembourg), les prévalences sont généralement plus faibles puisqu'elles sont comprises entre 13% et 16.7% (Schouls et al. 1999, Jenkins et al. 2001, Bertolotti et al. 2006, Reye et al. 2010). On observe toutefois des taux d'infection semblables aux nôtres, en Bulgarie (22.3%, Christova et al. (2001)) et en Allemagne (27%, Hildebrandt et al. (2010b)). Nous pouvons donc affirmer que la Suisse se place parmi les pays avec les plus hauts taux d'infection à *Borrelia*, ce qui avait déjà été relevé par le passé (Rauter et Hartung 2005). Nous avons identifié sept génoespèces de *Borrelia* dans les tiques et leur distribution au sein des zones endémiques variait d'un site à un autre. On constate toutefois que, globalement et comme souvent en Europe, *B. afzelii* et *B. garinii* sont prédominantes alors que *B. valaisiana*, *B. burgdorferi* ss et *B. bavariensis* sont moins fréquentes (Hubalek et Halouzka 1998, Rauter et Hartung 2005). Ce fait a déjà été observé en Suisse par le passé (Casati et al. 2004, Jouda et al. 2004b, Burri et al. 2007, Morán Cadenas et al. 2007). Par ailleurs, dans cette étude, nous avons identifié des espèces relativement rares comme *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* ou encore *B. miyamotoi* (Lommano et al. 2012a). *B. lusitaniae* est fréquemment rencontrée dans le Sud du continent européen et en Afrique du Nord (de Michelis et al. 2000, Younsi et al. 2005, Bertolotti et al. 2006). En Suisse, elle a déjà été identifiée dans la partie ouest du pays, notamment à Neuchâtel (Casati et al. 2004), dans le canton de Vaud (Jouda et al. 2004b), mais également au Sud des Alpes (Jouda et al. 2003). En outre, elle a été mise en évidence dans les tiques d'oiseaux migrateurs capturés en Suisse (Poupon et al. 2006). *B. spielmanii* a été décrite en Allemagne (Rauter et al. 2002, Fingerle et al. 2008, Hildebrandt et al. 2010b), en République Tchèque (Derdakova et al. 2003), en Ukraine (Nefedova et al. 2005) et en France (Richter et al. 2004) avec, semble-t-il une distribution de type focal (Richter et al. 2004, Fingerle et al. 2008). Étonnamment, nous n'avons pas identifié *B. spielmanii* à Neuchâtel, alors même qu'une précédente étude signale cette espèce sur ce site (Gern et al. 2010b). Chose intéressante, *B. spielmanii* a été identifiée dans un mâle *I. ricinus* confirmant ainsi l'observation faite par d'autres auteurs qui la décrivent uniquement chez des adultes *I. ricinus* (Fingerle et al. 2008, Gern et al. 2010b). L'identification de ce pathogène pour la seconde fois dans les tiques dans l'Ouest de la Suisse confirme sa présence dans la région et ajoute un candidat à la liste des espèces pathogènes présentes dans la région. En effet, la pathogénicité de *B. spielmanii* pour l'Homme, tout comme celle de *B. afzelii*, *B. burgdorferi* ss, *B. garinii* et *B. bavariensis*, est clairement établie (Baranton et De Martino 2009). Par contre, les cas de borréliose dus à *B. lusitaniae* et *B. valaisiana* sont encore rares (Rudenko et al. 2011). La détection de *B. miyamotoi*, un spirochète appartenant au groupe des fièvres récurrentes, pour la seconde fois en Suisse confirme sa présence dans le pays (Gern et al. 2010b, Lommano et al. 2012a). Sa répartition géographique semble relativement large, puisque il est

présent dans plus de la moitié des sites investigués, mais sa prévalence est faible (~1%). Etant donné sa pathogénicité pour l'Homme, d'ailleurs récemment décrite par Platonov et al. (2011), sa présence en Suisse ne fait qu'accroître la liste des pathogènes présents dans le pays.

La prévalence de tiques infectées par *Rickettsia* spp. que nous avons observée dans cette étude (10.2%) est en accord avec les précédentes études réalisées en Suisse. Dans les années 90', Beati et al. (1994) observaient déjà une prévalence similaire (11.1% ; moyenne de plusieurs cantons : Tessin, Valais, Fribourg, Berne, Neuchâtel) et en 2009, une étude a montré que la prévalence de tiques infectées par *Rickettsia* spp. dans le Nord du Pays s'élevait à 11.7% (Boretti et al. 2009). Parmi les deux espèces de *Rickettsia* identifiées dans notre travail, *R. helvetica* démontre une large répartition géographique et une prédominance claire alors que *R. monacensis* n'a été détectée que dans deux nymphes provenant de deux cantons différents (Jura et Vaud). La proportion de ces deux espèces reflète également une situation observée précédemment en Suisse où *R. monacensis* n'a été décrite que très sporadiquement et *R. helvetica* fréquemment (Boretti et al. 2009, Burri et al. 2011a). Ces deux espèces ont une histoire récente. Toutes deux ont été isolées pour la première fois à partir de tiques; en 1979 en Suisse pour *R. helvetica* (Burgdorfer et al. 1979) et en 2002 à Munich pour *R. monacensis* (Simser et al. 2002). En Suisse, *R. monacensis* a été décrite pour la première fois en 2009 par Boretti et al. (2009), qui l'ont détectée dans un pool de tiques récoltées au Nord de la Suisse. Par la suite, elle a été identifiée dans le canton de Berne (Suisse centrale) dans une tique *I. ricinus* nourrie sur un rongeur (Burri et al. 2011a). Notre étude a permis de détecter *R. monacensis* pour la première fois dans l'Ouest du pays. Rappelons que sa pathogénicité est avérée. La bactérie a été isolée à partir du sang d'un patient souffrant de fièvres, de maux de tête et de problèmes dermatologiques (Jado et al. 2007). Au total, trois infections humaines dues à cette espèce ont été reportées jusqu'à présent, deux en Espagne (Jado et al. 2007) et une en Italie (Madeddu et al. 2012). Quant à *R. helvetica*, son ADN aurait été identifié à plusieurs reprises chez des patients souffrant de céphalées, méningites, myalgies et de troubles cardiaques voire dans des cas fatals, principalement en France et en Suède (Nilsson et al. 1999a, Fournier et al. 2000, Brouqui et al. 2007, Nilsson et al. 2010). Jusqu'à présent, malgré la prévalence élevée de *R. helvetica* dans les tiques, aucun cas n'a été déclaré dans notre pays.

Nous avons détecté *Candidatus N. mikurensis* pour la première fois dans les tiques libres en Suisse et sa prévalence (6.4%) le place au 3^e rang des pathogènes les plus fréquents dans les tiques en Suisse (Lommano et al. 2012a). Sa première mention en Europe date de 1999, date à laquelle il a été détecté dans les tiques en quête aux Pays-Bas et nommé provisoirement *Ehrlichia*-like « Schotti variant » (Schouls et al. 1999), puis en Russie en 2001 (Alekseev et al. 2001). Il a, par la suite, été

identifié et isolé à partir de rats sauvages en Chine et au Japon (Pan et al. 2003, Kawahara et al. 2004). Les analyses phylogénétiques l'ont alors classé dans un nouveau genre, *Candidatus Neoehrlichia*, appartenant à la famille des *Anaplasmatacea* (Kawahara et al. 2004). Ces dernières années, il a été identifié dans les tiques libres en Europe de plus en plus fréquemment (Schouls et al. 1999, Wielinga et al. 2006, Spitalska et al. 2008, Fertner et al. 2012, Richter et Matuschka 2012). La découverte de *Candidatus N. mikurensis* dans les tiques en quête sur le territoire helvétique n'est pas si surprenante puisque cet organisme a été identifié à plusieurs reprises chez un patient atteint de septicémie et résidant au Nord du pays (Fehr et al. 2010). Ce cas clinique fait partie d'une série de six infections humaines déclarées en Europe entre 2010 et 2011 (von Loewenich et al. 2010, Welinder-Olsson et al. 2010, Pekova et al. 2011). Même si *Candidatus N. mikurensis* n'a pas été investigué dans tous les sites de récolte de tiques, il a été détecté partout où il a été recherché (5/11 sites) (Lommano et al. 2012a). On peut donc supposer qu'il est présent sur toute l'aire de répartition de son vecteur, *I. ricinus*. D'après nos résultats, la prévalence de *Candidatus N. mikurensis* varie localement, de 2.3% à 8.8%. La prévalence moyenne (6.4%) est comparable à celles observées en Europe : 3.5% et 7.4% aux Pays-Bas (Schouls et al. 1999, Wielinga et al. 2006) et 2.9% en Slovaquie (Spitalska et al. 2008), mais elle est supérieure à ce qui est observé en Russie chez *I. persulcatus* (Rar et al. 2010, Rar et al. 2011a). L'analyse génétique des isolats obtenus dans cette étude démontre que les souches de la bactérie circulant dans les tiques en Suisse sont identiques aux souches pathogènes isolées chez des patients infectés en Suisse et en Allemagne (Fehr et al. 2010, von Loewenich et al. 2010, Lommano et al. 2012a). Nos résultats indiquent que *Candidatus N. mikurensis* est bien présent dans l'Ouest de la Suisse, constituant un danger potentiel de contracter une infection due à cette bactérie en cas de piqûre de tique.

Les babésies sont des parasites intra-érythrocytaires connus principalement dans le domaine vétérinaire, mais peuvent toutefois s'avérer pathogènes pour l'Homme, notamment pour des personnes immunodéficientes. En Europe, une quarantaine de cas humains ont été décrits jusqu'à présent, pour la plupart dus à *B. divergens*. Deux autres espèces, *B. microti* et *B. venatorum*, peuvent causer la babésiose humaine (Herwaldt et al. 2003, Meer-Scherrer et al. 2004). En Suisse, toutes trois ont été décrites dans les tiques (Foppa et al. 2002, Casati et al. 2006b, Burri et al. 2011a, Gigandet et al. 2011). La présence de *B. divergens* a été mentionnée pour la première fois en 1975, en Valais et au Tessin (Aeschlimann et al. 1975), puis en 1982 dans le Jura (Gern et al. 1982). Par la suite, *B. microti* a été identifiée en Suisse centrale et orientale (Gern et Aeschlimann 1986, Foppa et al. 2002). Plus récemment, Casati et al. (2006b) ont identifié pour la première fois en Suisse *B. venatorum*, au Tessin et dans le canton de Neuchâtel. Dans cette étude, nous décrivons la présence de deux espèces de Babésies dans les tiques libres en Suisse occidentale, *B. divergens* et *B. venatorum* (Lommano et

al. 2012a). *B. divergens* a une distribution limitée et n'a été identifiée que dans 4 des 11 sites investigués, tous situés dans les cantons de Vaud (Agiez, Montcherand, Chalet-à-Gobet) et Fribourg (Rosé), constituant à notre connaissance la première observation de cette espèce dans ces deux cantons. *B. venatorum* a une distribution nettement plus large et est présente dans tous les sites investigués. Sa présence a, par ailleurs, été confirmée à Neuchâtel, là où Casati et al. (2006b) puis Gigandet et al. (2011) l'avaient signalée précédemment. La faible prévalence de *Babesia* spp. que nous avons observée dans les tiques en quête (1.9%) rejoint les valeurs habituellement observées en Suisse (0.8%, Casati et al. (2006b) et 1.7%, Gigandet et al. (2011)), mais doit malgré tout être prise en considération par des professionnels de la santé publique. Des cas de babésiose humaine ont d'ailleurs déjà été signalés dans le pays (Meer-Scherrer et al. 2004) dont un importé (Loutan et al. 1993).

A l'image de *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* est, en Europe, un pathogène d'importance vétérinaire. Une soixantaine de cas humains ont toutefois été recensés sur ce continent. Dans la nature, la distribution d'*A. phagocytophilum* se superpose à celle de son vecteur, *I. ricinus*. Ainsi, des tiques infectées ont déjà été signalées en Suisse, notamment au centre et à l'Est du pays (Pusterla et al. 1998b, Pusterla et al. 1999, Burri et al. 2011a). Seules deux études se sont intéressées à la présence de la bactérie dans les tiques dans la partie occidentale de la Suisse (Liz et al. 2000, Wicki et al. 2000). Notre étude a donc permis de révéler de nouveaux foyers à *A. phagocytophilum* dans cette région, plus précisément dans les cantons de Neuchâtel, Fribourg et Vaud (Lommano et al. 2012a). La prévalence globale que nous avons observée (1.5%) est similaire à ce qui a été reporté sur le territoire helvétique (Pusterla et al. 1999, Liz et al. 2000, Wicki et al. 2000) et place la bactérie au 5^e rang des pathogènes transmis par les tiques. Comme la distribution d'*A. phagocytophilum* est plutôt de type focale (Pusterla et al. 1999, Severinsson et al. 2010), nous avons observé des prévalences variant de 2.1% à 3.2% entre les quatre différents foyers (Lommano et al. 2012a). De telles valeurs ont déjà été rapportées dans des zones endémiques de Suisse (Pusterla et al. 1999), notamment à Neuchâtel (3.1%) (Wicki et al. 2000). Les analyses génétiques et phylogénétiques du gène 16S et de l'opéron *groESL* de nos isolats placent l'un d'eux, obtenus à partir d'une tique récoltée dans le canton de Fribourg, parmi les variants pathogènes pour l'Homme (Lommano et al. 2012a, Lommano et al. Submitted). Des variants non pathogènes ont été également identifiés sur le même site (Lommano et al. Submitted). Rappelons qu'il est maintenant avéré qu'il existe différents variants d'*A. phagocytophilum* dans la nature, chacun ayant une affinité pour un hôte spécifique et démontrant une pathogénicité différente pour l'Homme et les animaux et qu'il peut y avoir co-circulation de ces variants au sein d'un même foyer (de la Fuente et al. 2005, Scharf et al. 2011, Katargina et al. 2012).

Le TBEV est le pathogène que nous avons le moins fréquemment identifié dans les tiques récoltées dans la partie ouest de la Suisse. Malgré tout, nos résultats ont permis la confirmation d'une zone endémique récemment déclarée comme telle, celle de la Plaine de l'Orbe (VD) (Lommano et al. 2012b). Au sein de cette zone à risque, 0.1% des tiques analysées étaient infectées par le virus. Cette faible prévalence reflète une situation observée dans la plupart des pays frontaliers ou proches : 0.21% en Italie (D'Agaro et al. 2009), 0.23% en Allemagne (Kupca et al. 2010) et 0.47% en Slovénie (Durmisi et al. 2010), tout comme dans des pays plus éloignés comme la Finlande (0.34%, Han et al. (2001)) et la Lituanie (0.2%, Han et al. (2005)). Elle reflète également la situation suisse puisque de récentes études reportent des taux de prévalence de 0.1% à Thun/Belp (Burri et al. 2011b) et 0.46% pour une moyenne nationale effectuée sur 38 foyers (Gäumann et al. 2010). En 2007, la Plaine de l'Orbe avait été déclarée par l'OFSP comme région endémique (OFSP 2007) suite à la déclaration d'une dizaine de cas cliniques entre 2000 et 2006 (de Vallière et al. 2006, Schlaefli et al. 2007). Les descriptions des lieux supposés de piqûres de tiques faites par les patients infectés dans cette région nous ont aidé à définir les sites d'investigation pour la détection du virus dans les tiques. Le TBEV a été identifié dans cinq des 26 sites choisis, avec des taux minimaux d'infection oscillant entre 0.21 et 0.95 (Lommano et al. 2012b). Nous avons constaté que, pour chacun des cinq sites où le TBEV a été détecté (foyer), plus de 450 tiques ont été analysées alors que moins de 300 tiques ont été analysées pour chacun des sites où le virus n'a pas été détecté. De ce fait, nous pensons que le nombre de tiques analysées dans les sites exempts de TBEV était trop faible pour affirmer l'absence du virus. Ainsi, pour de futures investigations et afin de pouvoir effectuer une meilleure évaluation de la prévalence du TBEV dans les tiques en quête, nous suggérons d'analyser au minimum 400-500 tiques par site.

Cette étude a permis, d'une part, de détecter des pathogènes humains rarement décrits dans les tiques libres en Suisse, tels que *R. monacensis*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* et *B. miyamotoi* (Lommano et al. 2012a). D'autre part, elle a mis en évidence la présence de *Candidatus N. mikurensis*, jamais identifié dans les tiques en Suisse mais responsable d'un cas clinique dans le pays (Fehr et al. 2010). D'autres microorganismes, déjà connus dans le pays, ont été identifiés pour la première fois dans certains sites de l'Ouest de la Suisse ; c'est le cas des protozoaires *B. venatorum* et *B. divergens*, de la bactérie *A. phagocytophilum* et du virus TBE (Lommano et al. 2012a, Lommano et al. 2012b). Ces pathogènes sont maintenus dans la nature entre leur vecteur principal, *I. ricinus*, et des hôtes réservoirs spécifiques. Plusieurs pathogènes circulent généralement au sein d'un même site et nous avons même identifié trois sites, dans les cantons de Vaud et Neuchâtel, dans lesquels co-circulent cinq pathogènes de genres différents. D'ailleurs, on peut même supposer que six pathogènes co-circulent dans un de ces sites, dans le canton de Vaud. En effet, *Candidatus N. mikurensis* n'y a pas

été investigué mais sa présence est fortement pressentie puisque, dans notre étude, cette bactérie a été identifiée partout où elle a été recherchée. La co-circulation de plusieurs pathogènes au sein d'une zone géographique restreinte permet l'apparition d'infections multiples (impliquant des pathogènes de même genre : infections mixtes ou de genres différents : co-infections) dans les tiques, dues à des repas infectieux successifs, à des repas pris sur des hôtes pluri-infectés ou, pour certains pathogènes, à la transmission trans-ovarienne. Dans notre étude, 4.7% des tiques en quête et 13.7% des tiques en quête infectées étaient co-infectées par plusieurs pathogènes (Lommano et al. 2012a). *R. helvetica* et *B. afzelii* était l'association la plus souvent observée, ce qui n'est pas surprenant puisqu'elles sont également les espèces les plus fréquemment rencontrées dans les tiques en quête. Par contre, le degré d'implication d'*A. phagocytophilum* dans des co-infections était élevé (0.6%) en comparaison à sa faible prévalence dans les tiques (1.5%). Cela souligne le rôle immunosuppresseur qu'on lui attribue fréquemment et qui faciliterait l'apparition d'une infection secondaire chez l'Homme ou chez les animaux (Brodie et al. 1986, Dumler et al. 2005, Woldehiwet 2008, 2010). Si on inclut les infections mixtes impliquant différentes génoespèces de *Borrelia*, la prévalence d'infection multiple dans notre étude s'élève à 6.7% chez les tiques en quête et à 19.6% chez les tiques en quête infectées. A titre de comparaison, des valeurs de 3.2%, respectivement 16.2% sont observées au Luxembourg (Reye et al. 2010).

Le virus TBE, bien connu en Suisse depuis 1969 (Krech et al. 1969, Spiess et al. 1969), a fait l'objet de nombreuses études éco-épidémiologiques ces dernières années (Wicki et al. 2000, de Vallière et al. 2006, Schlaefli et al. 2007, Gäumann et al. 2010, Burri et al. 2011b) mais seule l'étude de Gäumann et al. (2011) a caractérisé les souches virales circulant dans les tiques libres des zones endémiques du pays. Il apparaît que, bien qu'appartenant toutes au sous-type européen, plusieurs souches différentes circulent très souvent au sein d'un même foyer naturel (Gäumann et al. 2011). Certains foyers apparaissent toutefois plus isolés et maintiennent des populations de virus génétiquement plus proches. Une seule souche provenant de la Plaine de l'Orbe a été caractérisée par Gäumann et al. (2011) et elle semble proche de souches identifiées au Nord-Est de la Suisse. C'est ce que nous avons également observé (Lommano et al. 2012b). Parmi les isolats que nous avons identifiés, trois sont identiques à une souche isolée dans le Nord-Est de la Suisse (Liesberg, BL) alors que le quatrième isolat est génétiquement proche d'une souche circulant dans un foyer du centre du pays (Thun/Belp, BE) (Burri et al. 2011b). Dans tous les cas, tous nos isolats semblent avoir pour origine des foyers situés dans le périmètre décrit par Wyler et Matile (1984), situé au Nord et à l'Est de la Suisse. Les facteurs permettant d'expliquer l'émergence de nouveaux foyers dans la Plaine de l'Orbe ne sont pas connus mais nous suggérons que des oiseaux migrateurs pourraient en être à l'origine. Il est connu que les oiseaux peuvent transporter des tiques infectées par des pathogènes, dont le

TBEV, sur de longues distances et les disperser au gré des migrations (Olsen et al. 1995, Bjoersdorff et al. 2001, Poupon et al. 2006, Waldenström et al. 2007, Ogden et al. 2008). Une tique infectée par le TBEV et transportée dans un nouvel environnement pourrait ainsi participer à l'apparition d'un nouveau foyer de TBEV si toutes les conditions pour le développement et le maintien d'un foyer y sont réunies. Ces conditions comprennent des facteurs biotiques et abiotiques. Les facteurs biotiques comprennent la présence d'un vecteur compétent, en l'occurrence la tique *I. ricinus*, la disponibilité en hôtes réservoirs (*Apodemus* spp., *M. glareolus*) pour permettre l'infection des tiques et la disponibilité en hôtes amplificateurs (cervidés) pour le maintien des populations de tiques. Les facteurs abiotiques, quant à eux, regroupent les paramètres climatiques locaux nécessaires au co-feeding, mécanisme indispensable à l'existence d'un foyer de TBEV (Labuda et Randolph 1999). Pour que le co-feeding ait lieu, les larves et les nymphes doivent quêter simultanément sur la végétation (Labuda et Randolph 1999). Cette synchronicité requiert des conditions microclimatiques particulières comme une rapide augmentation des températures à 10°C au printemps (Randolph et al. 2000) ou des conditions climatiques sèches forçant les nymphes à quêter près du sol, à la même hauteur que les larves (Randolph et al. 1999). Afin de vérifier notre hypothèse sur le rôle des oiseaux dans l'émergence de nouveaux foyers de TBEV, 1124 tiques ont été prélevées sur 4525 oiseaux migrateurs et analysées individuellement pour la présence du TBEV. Nos résultats étaient l'hypothèse de l'émergence de nouveaux foyers de TBEV suite à l'introduction de tiques infectées par des oiseaux en migration puisque nous avons détecté la présence du virus dans des tiques gorgées sur un merle noir (*T. merula*) et deux rouges-gorges (*E. rubecula*) (Lommano et al. Submitted). Ces oiseaux ont été capturés lors de leur migration postnuptiale (en automne) et provenaient du Nord et de l'Est du pays, là d'où nos isolats semblent tirer leur origine. Malheureusement, il ne nous a pas été possible de caractériser et comparer les souches présentes dans ces tiques d'oiseaux avec celles circulant dans les tiques libres. D'autres microorganismes, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum* et *Candidatus* N. mikurensis, ont été retrouvés dans ces mêmes tiques d'oiseaux migrateurs, prouvant l'implication de ces hôtes dans la dissémination de nombreux pathogènes.

Comme nous l'avons évoqué auparavant, la tique *I. ricinus* est vectrice de nombreux microorganismes pathogènes pour l'Homme, dont la plupart ont été décrits récemment. De ce fait, leur cycle de transmission n'est pas totalement élucidé. Le rôle des oiseaux dans leur maintien dans la nature est, pour certains, méconnu voire inexploré. Dans cette étude, nous avons constaté que les oiseaux sont les hôtes principaux des stades immatures d'*I. ricinus* d'une part, et des hôtes non négligeables d'agents pathogènes d'autre part. Certaines espèces de passereaux semblent même être une source d'infections pour les tiques et donc des hôtes réservoirs de ces pathogènes. A l'image du merle noir (Humair et al. 1998, Taragel'ova et al. 2008), de la grive musicienne (*T.*

philomelos) (Taragel'ova et al. 2008) ou du faisan (*P. colchicus*) (Kurtenbach et al. 1998a), le pipit des arbres (*A. trivialis*) semble être un hôte réservoir de *B. garinii* (Lommano et al. Submitted). Le pipit des arbres est un passereau appartenant à la famille des *Motacillidae*, vivant dans les zones boisées et les prairies de bocage, présent sur tout le continent européen et migrant en Afrique tropicale. A notre connaissance, cet oiseau n'a encore jamais été signalé comme hôte réservoir de *B. garinii*. Fait plus surprenant, d'après nos résultats, il semblerait même qu'il puisse être un hôte réservoir de *B. bavariensis*, une génoespèce associée aux rongeurs (Huegli et al. 2002, Margos et al. 2009). Un autre spirochète associé aux rongeurs (Kurtenbach et al. 1998b, Humair et al. 1999), *B. afzelii*, a été identifié dans quelques tiques d'oiseaux avec étonnement. Ce fait peut être corrélé avec les observations de plus en plus fréquentes de cette génoespèce dans des larves et des nymphes gorgées sur des oiseaux (Humair et al. 1998, Poupon et al. 2006, Franke et al. 2010). Nous suggérons donc qu'il est possible que certains variants de *B. afzelii* soient maintenus dans un cycle naturel impliquant des oiseaux comme hôtes réservoirs.

Notre étude a permis la détection de *Rickettsia* spp. pour la première fois dans les tiques d'oiseaux en Suisse, avec une prévalence globale de 12.3% (Lommano et al. Submitted). Cette valeur est semblable à celle que nous avons observée dans les tiques libres (10.3%) (Lommano et al. 2012a), ce qui pourrait indiquer un rôle mineur des oiseaux dans le maintien de *Rickettsia* spp. dans la nature. Toutefois, le merle noir et le pipit des arbres semblent être d'importance dans le cycle de transmission du pathogène, servant de source d'infections pour les tiques. Cette capacité de réservoir a déjà été suggérée par d'autres auteurs, notamment en ce qui concerne les oiseaux appartenant à la famille des *Paridae*, comme la mésange bleue (*Cyanistes caeruleus*) (Elfving et al. 2010, Spitalska et al. 2011). Le rouge-gorge, quant à lui, pourrait héberger une espèce de *Rickettsia* encore inconnue. En effet, nous avons détecté la présence d'une espèce non identifiée de *Rickettsia* dans deux larves nourries sur des rouges-gorges dont la séquence nucléotidique du gène *gltA* était 100% homologue à une autre séquence indéterminée et issue d'une tique gorgée sur un rouge-gorge en République Tchèque (L. Dubska, non publié). De plus, d'après nos résultats, cette espèce d'oiseau semble être l'hôte principal de tiques infectées par une ou des espèces de *Rickettsia* que nous n'avons pas pu déterminer avec la méthode de la Reverse Line Blot, soutenant l'hypothèse de la présence d'une nouvelle espèce potentiellement associée au rouge-gorge.

L'implication des oiseaux dans la circulation d'*A. phagocytophilum* est actuellement sujet de débat. Cette bactérie a déjà été identifiée dans des larves nourries sur des oiseaux ce qui pourrait évoquer un rôle potentiel de réservoir (Daniels et al. 2002). Nous pensons que le merle joue un rôle important dans le maintien d'*A. phagocytophilum* dans la nature et qu'il peut servir de source d'infections pour

les tiques qui se fixent sur lui. A Neuchâtel par exemple, la bactérie a été identifiée dans 2.8% des tiques libres (Lommano et al. 2012a) alors que 9.4% des tiques prélevées sur les merles, dans ce même site, étaient infectées par la bactérie (Lommano et al. Submitted). En outre, l'identification d'un variant particulier d'*A. phagocytophilum* dans une larve nourrie sur un merle suggère que cet hôte pourrait héberger un variant de la bactérie qui lui serait strictement associé. Autre observation étonnante, toutes les larves infectées par *A. phagocytophilum* s'étaient gorgées sur des merles et la quasi-totalité d'entre elles étaient co-infectées par *B. garinii*, *B. valaisiana* ou *R. helvetica*, confirmant le rôle immunosuppresseur de la bactérie invoqué précédemment et observé dans les tiques libres (Lommano et al. 2012a). Cette observation permet de constater, pour la première fois, que cet effet immunosuppresseur est également présent chez les oiseaux et notamment chez le merle.

La contribution des oiseaux dans le cycle naturel du TBEV a été suspectée dès les années 40' par Pavlovsky (Pavlovsky 1940), puis dans les années 60' par bon nombre d'auteurs (Korenberg 1966, Ernek et al. 1968, Hoogstraal 1972, Brummer-Korvenkontio et al. 1973). Malgré l'isolement du TBEV à partir du sang et des organes de certains passereaux, dont le merle (Brummer-Korvenkontio et al. 1973), leur rôle dans le maintien des foyers de TBEV n'a jamais pu être clairement établi. Si nos résultats mentionnés précédemment démontrent la possible implication des oiseaux dans l'émergence de nouveaux foyers TBEV en Suisse, ils n'apportent pas d'évidence du rôle de ces derniers dans le maintien des foyers d'endémie. Le TBEV n'a pas été détecté dans les tiques prélevées sur les oiseaux capturés à Agiez, un des cinq foyers endémiques que nous avons identifié dans la Plaine de l'Orbe (Lommano et al. 2012b, Lommano et al. Submitted). Cette absence est toutefois à prendre avec précaution au vu du petit nombre de tiques prélevées sur les oiseaux capturés à cet endroit et analysées pour le TBEV (N=33) en comparaison avec la faible prévalence du virus au sein de ce foyer (< 1%). Nous avons cependant détecté le TBEV dans deux larves récoltées sur deux rouges-gorges, suggérant un rôle potentiel de ces derniers dans le cycle naturel du TBEV. Le rouge-gorge, conjointement à d'autres passereaux, a déjà été mentionné comme hôte de tiques infectées par le TBEV et notamment de larves (Waldenström et al. 2007).

La bactérie *Candidatus N. mikurensis* n'a été signalée qu'une seule fois dans les tiques d'oiseaux (Spitalska et al. 2006) et de ce fait, il était intéressant de connaître l'implication de ces hôtes vertébrés dans le maintien de ce pathogène dans la nature. D'après nos résultats, les oiseaux ne paraissent pas impliqués dans le cycle naturel de *Candidatus N. mikurensis*, puisqu'il n'a été détecté dans aucune larve et que sa prévalence dans les tiques d'oiseaux (3.3%) était inférieure à celle observée dans les tiques libres (6.4%) (Lommano et al. 2012a, Lommano et al. Submitted). Reste que nous pouvons nous questionner sur le rôle du pinson des arbres (*F. coelebs*), puisqu'il hébergeait la

plupart des nymphes infectées (6/7). De plus, un quart des nymphes qui se sont nourries sur lui était infecté. Il faut tout de même signaler que cette bactérie a été récemment identifiée chez des dindons sauvages (*Meleagris gallopavo*) aux Etats-Unis, avec une prévalence de 58% (Scott et al. 2010), ce qui peut signifier qu'ils peuvent être des hôtes réservoirs.

Si nos résultats suggèrent l'importance des oiseaux dans les cycles de transmission de *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum* voire peut-être de *Candidatus* N. mikurensis et du TBEV, des études supplémentaires sont toutefois encore nécessaires et primordiales pour comprendre le rôle exact de ces hôtes. La méthode de choix permettant d'identifier des hôtes réservoirs est la xénodiagnose. Elle a notamment été effectuée par Humair et al. (1998) pour démontrer la compétence de réservoir du merle noir pour *B. valaisiana* et *B. garinii*. Mais, elle a également été utilisée avec les rongeurs (mulots et campagnols) pour prouver leur rôle de réservoir de *B. garinii* OspA serotype 4 (à présent nommé *B. bavariensis* (Margos et al. 2009)) (Huegli et al. 2002) et de *B. afzelii* (Humair et al. 1999). Dès lors que nos résultats ont permis d'identifier certains sites où circulent les pathogènes précités (Lommano et al. 2012a), des xénodiagnoses sur les oiseaux capturés dans ces endroits permettraient de clarifier leur rôle dans la circulation des pathogènes. De plus, pour évaluer précisément le rôle d'un hôte, en l'occurrence d'une espèce d'oiseau, dans la dynamique locale d'un pathogène, il est nécessaire de connaître l'abondance de cet oiseau à l'échelle locale. Car même si l'oiseau est source d'infections pour les tiques, on peut supposer qu'il ne va jouer qu'un rôle annexe ou mineur s'il n'est pas abondant dans son milieu, ne nourrissant et n'infectant que peu de tiques (Marsot et al. 2012).

D'autres vertébrés, les rongeurs, sont souvent considérés comme des hôtes importants et des réservoirs de nombreux agents pathogènes transmis par les tiques, tels que *Borrelia* spp., *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp. et *Candidatus* N. mikurensis (Telford et al. 1996, Humair et al. 1999, Bown et al. 2003, Duh et al. 2003, Andersson et Raberg 2011). Si leur rôle dans le cycle naturel de ces pathogènes est bien connu ou dans tous les cas mieux connu que celui des oiseaux, c'est que la capture, la manipulation, et le maintien de rongeurs en laboratoire sont moins fastidieux que la capture, la manipulation, et le maintien des oiseaux. Dans certaines études, les rongeurs sont même euthanasiés pour permettre le prélèvement des organes (cerveau, foie, rate, etc.), ce qui facilite grandement les investigations (Golovljova et al. 2004, Jahfari et al. 2012). Selon des études réalisées en Suisse (Burri et al. 2011b, Pérez et al. 2012), jusqu'à 70% des rongeurs peuvent être porteurs de tiques, le plus souvent des stades immatures d'*I. ricinus*. Trois espèces sont fréquemment infestées : le mulot à collier (*A. flavicollis*), le mulot sylvestre (*A. sylvaticus*) et le campagnol roussâtre (*M. glareolus*). Chaque individu héberge en moyenne une dizaine de larves et 0.5 nymphe, et un quart

d'entre eux est infesté par larves et nymphes simultanément (co-feeding) (Burri et al. 2011b, Pérez et al. 2012). Les spirochètes du genre *Borrelia* spp. sont fréquemment identifiés dans les tiques de rongeurs (28.4%) et près de la moitié des rongeurs héberge des tiques infectées (Pérez et al. 2012). Les pathogènes des genres *Rickettsia* spp. (7.3%) et *Babesia* spp. (2.4%) sont plus rarement rencontrés et parallèlement, on observe également moins de rongeurs hébergeant des tiques infectées par *Rickettsia* spp. (26.5%) et *Babesia* spp. (11.4%) (Burri et al. 2011a). *A. phagocytophilum* est lui aussi moins fréquemment identifié dans les tiques de rongeurs ; en Suisse, Liz et al. (2000) signalent que 9.5% des rongeurs sont porteurs de tiques infectées.

Les études portant sur les oiseaux en tant qu'hôtes de tiques et de microorganismes sont plus rares, le rôle des oiseaux est souvent méconnu et sous-estimé. Pourtant, nous avons identifié 22 espèces d'oiseaux pouvant héberger des tiques, pour la plupart des stades immatures d'*I. ricinus*, et 15 espèces hébergeant des tiques infectées par au moins un pathogène (Lommano et al. Submitted). Si l'on considère les oiseaux migrateurs (capturés au Col de Jaman, VD) et les oiseaux locaux (capturés en milieu sylvatique, VD et NE), on observe qu'un faible pourcentage d'entre eux (11.4%) était infesté par, en moyenne, 2.3 tiques (1.4 larve et 0.9 nymphe). En ne considérant que les oiseaux capturés en milieu sylvatique, on constate qu'un individu sur deux était infesté (48.5%) par, en moyenne, 5 tiques (1.75 larve et 3.3 nymphes). Une récente étude signale même des intensités d'infestation de 11.2 tiques (par hôte infesté) (Marsot et al. 2012). Les oiseaux infestés par des tiques que l'on capture le plus en forêt s'exposent aux larves et nymphes en quête en recherchant leur nourriture au sol (« ground foraging birds ») (Humair et al. 1993, Marsot et al. 2012). On rencontre, entre autres, certains membres de la Famille des *Turdidés* (merles et grives), la mésange charbonnière (*Parus major*), le rouge-gorge (*E. rubecula*), le pinson des arbres (*F. coelebs*) et le troglodyte mignon (*Troglodytes troglodytes*) (Humair et al. 1993, Marsot et al. 2012, Lommano et al. Submitted). Dans notre étude, les *Turdidés* sont les oiseaux les plus fréquemment et hautement parasités, fait déjà rapporté par d'autres chercheurs (Humair et al. 1993, Poupon et al. 2006, Marsot et al. 2012). A titre d'exemple, dans notre étude, plus d'un merle sur deux (52.4%) étaient porteurs de tiques et un jeune merle hébergeant 17 nymphes a même été capturé. Un quart des oiseaux était infesté par larves et nymphes simultanément, ce qui est similaire à la proportion de rongeurs co-infestés en Suisse (Burri et al. 2011b, Pérez et al. 2012). La grive musicienne (43%), le merle noir (34%) ainsi que le pipit des arbres (30%) étaient les espèces les plus fréquemment co-infestées par larves et nymphes. Globalement, 44.4% (36/81) des tiques collectées sur des oiseaux forestiers hébergeaient au moins un pathogène et jusqu'à 60% (136/228) des tiques nourries sur les merles et les grives étaient infectées. En milieu sylvatique, *Borrelia* et *Rickettsia* ont infecté 30.9% et 17.3% des tiques d'oiseaux respectivement, et jusqu'à 75% des merles étaient porteurs de tiques infectées par *Borrelia* spp. La bactérie *A. phagocytophilum* a été identifiée relativement fréquemment chez les

nymphes et même les larves nourries sur les merles (13.2%). Nous supposons d'ailleurs que ces derniers peuvent héberger de multiples pathogènes puisque une larve et une nymphe infectées par, respectivement, trois et quatre pathogènes ont été récoltées sur cet hôte. Toutes ces valeurs démontrent l'implication des oiseaux, et particulièrement du merle noir, dans les cycles de transmission de ces agents pathogènes. A l'image des rongeurs, les oiseaux sont des hôtes importants de stades immatures d'*I. ricinus*, le plus important vecteur d'agents pathogènes en Europe. De plus, les oiseaux sont autant infestés par larves et nymphes simultanément que les rongeurs, représentant potentiellement un support adéquat à la transmission de microorganismes par co-feeding. Burri et al. (2011b) ont d'ailleurs récemment démontré que la proportion d'hôtes (rongeurs) avec des tiques en co-feeding serait un des facteurs qui distinguerait un foyer de TBEV d'un non-foyer. Les recherches sur le rôle des oiseaux dans la transmission et le maintien des pathogènes émergents ont longtemps été négligées. Cependant, on assiste depuis quelques années à un regain d'intérêt pour ces hôtes (Vollmer et al. , Elfving et al. 2010, Dubska et al. 2011, Hasle et al. 2011, Scott et al. 2011, Spitalska et al. 2011, Palomar et al. 2012) qui, outre leur implication dans les cycles de transmission de nombreux microorganismes au niveau local, ont la capacité au contraire des rongeurs de disséminer des tiques infectées tout au long de leurs voies migratoires (Olsen et al. 1995, Poupon et al. 2006, Lommano et al. Submitted).

5 CONCLUSION

Cette étude a permis, d'une part, d'avoir une meilleure connaissance des pathogènes circulants et co-circulant dans les tiques en Suisse occidentale. D'autre part, elle a permis de souligner l'importance des oiseaux dans la circulation de ces pathogènes dans la nature.

Nous avons confirmé la présence du TBEV dans les tiques dans la Plaine de l'Orbe, une région récemment déclarée comme étant à risque. Au sein de cette région, nous avons localisé précisément 5 foyers où circule le virus. Dans l'un d'eux, le TBEV a pu être détecté durant deux années consécutives. Mais ce n'a pas été le cas de deux autres foyers qui ont fait l'objet d'investigations durant 4 années consécutives et dont la présence du TBEV n'a été détecté qu'une seule fois. Ainsi, afin de mieux comprendre la dynamique du TBEV dans la nature, il serait intéressant de connaître la stabilité de ces foyers à moyen terme et de mesurer les variations annuelle et saisonnière de la prévalence du TBEV dans les tiques en quête. L'intérêt d'obtenir des données précises sur la prévalence du TBEV dans ces régions endémiques réside dans l'évaluation des risques encourus et en conséquence des mesures préventives à adopter.

Nous avons démontré l'implication des oiseaux dans le transport et la délocalisation de tiques infectées par *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum*, *Candidatus* N. mikurensis et le TBEV mais également dans le maintien de certains de ces pathogènes dans la nature. Des investigations supplémentaires sont toutefois encore nécessaires et primordiales pour comprendre le rôle exact de ces hôtes. Pour vérifier l'implication du merle noir dans le cycle de transmission d'*A. phagocytophilum*, notamment d'un variant particulier qui lui serait inféodé, la caractérisation de nombreux isolats de la bactérie issus de larves nourries sur des merles est nécessaire. Des procédures similaires devraient être réalisées avec les pinsons des arbres et la bactérie *Candidatus* N. mikurensis ainsi qu'avec les rouges-gorges et les Rickettsies. De plus, même s'il semble insignifiant, le rôle exact des oiseaux dans le maintien d'un foyer endémique au TBEV mériterait d'être élucidé.

6 REMERCIEMENTS

C'est remplie de reconnaissance que j'adresse mon plus grand MERCI à Lise Gern qui m'a permis de me lancer dans ce projet, qui m'a fait confiance, m'a encouragée et m'a motivée quand il le fallait. Merci pour ta disponibilité, ton écoute, ton savoir-faire, ton humanisme mais aussi ton humour.

Merci au Prof. Bruno Betschart de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer une thèse au sein du laboratoire de parasitologie de Neuchâtel, merci pour votre disponibilité, votre générosité, mais également votre humour et... votre compréhension. Merci pour la confiance accordée pour les TP d'embryologie.

Merci à Dr. Charles Dvořák, Dr Karen McCoy, Dr Marteen Voordouw et Dr Nathalie Boulanger d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Un merci tout particulier au Dr. Dvořák pour avoir soufflé cette idée de projet, et par la suite de tous vos précieux conseils, de toutes les informations partagées et de votre motivation, votre disponibilité et votre grande amabilité.

Merci au laboratoire de microbiologie de la Chaux-de-Fonds (ADMED) de m'avoir permis d'effectuer mes extractions d'acides nucléiques dans leurs locaux ainsi qu'à toute la sympathique équipe qui y travaille. Un grand merci à Reto Lienhard d'avoir été à l'initiative de la collaboration et merci pour ton aide et tes conseils.

Merci à tous les apprentis du laboratoire de parasitologie, Maude, Milou, Lucia, Angélique, de leur aide et conseils, de leur sourires et camaraderie. Un merci tout particulier à Mégane de ton aide inestimable au laboratoire, pour toutes les PCR, RLB, real-time PCR effectuées avec le sourire, pour toutes les prises de tête quand cela ne fonctionnait pas mais aussi pour les résultats merveilleux, pour ton accent prévotois incroyable mais chaleureux et pour les fous-rire nombreux.

Un chaleureux merci à Pitou, le pilier du labo, qui a été d'une grande gentillesse et disponibilité tout au long de ces 5 années. Merci pour l'aide que tu m'as généreusement apportée, à la glace sèche réservée, à la compagnie au coin café et aux discussions concernant Roger...

Merci à toute l'équipe du Col de Jaman de m'avoir aidé à prélever 1124 tiques sur 4525 oiseaux examinés au Col. Un merci tout particulier à Anatole Gerber, Romain Fuerst, Samuel Progin et Samuel Beuchat, pour l'énorme travail qu'ils ont effectué de jour comme de nuit, pour toutes les tiques prélevées sur les pipits des arbres, mais également pour les agréables moments passés autour d'un bon souper (préparé le plus souvent par des mains expertes), pour les parties de chibre et plein

d'autres moments forts. Merci aussi pour toutes les informations ornithologiques. Merci également à Laurent Vallotton pour sa bonne humeur, sa générosité et son aide.

Merci à Luce et Christèle pour le travail effectué, pour toutes les tiques analysées et pour votre sympathie au quotidien.

Merci à toutes les personnes m'ayant aidé dans des domaines très différents, notamment Mahmoud Bouzelboudjen et Yan pour votre aide en cartographie, Marion pour ton aide en analyses phylogénétiques, Irina Golovljova pour son aide si sympathique en analyses de séquences et Matthieu Dvořák qui m'a grandement aidé dans l'identification des oiseaux capturés à Neuchâtel et à Agiez (VD).

Merci à toutes mes compagnes de labo et amies, Caro, Barbara, Marion pour toutes ces discussions scientifiques et moins scientifiques, merci de votre soutien, de vos rires et sourires, merci d'avoir été à mes côtés.

Merci à tous mes collègues du laboratoire de parasitologie, Francisca, Mirko, Nico, Coralie, Léonore, Liselore, Sandra, David, JC, pour tous ces moments partagés, pour votre amitié, merci à tous les étudiants en Master dont j'ai croisé le chemin et qui ont fait du labo un endroit agréable pour travailler. Merci aux deux Français, Maxou et Jojo la grille, arrivés avec grand bonheur dans notre laboratoire et merci à Luis de ta gentillesse et de ta serviabilité.

Un merci très spécial à ma chère collègue de TPs, Marion, pour tous les bons moments partagés, pour toutes ces présentations powerpoint merveilleusement préparées et pour les petits thés généreusement concoctés.

Merci à notre Véro, qui malgré ses infidélités pour le 3^e étage, a su garder un pied dans le labo du premier. Merci pour tous tes conseils, en biologie moléculaire en particulier.

Merci à tous mes compagnons de forêt et de captures d'oiseaux pour votre aide comme pour votre agréable compagnie. Merci à Ben, Romain Béguelin, Caro, Magali et mon Lolo. Merci à Eva avec qui j'ai partagé des moments mémorables dans la forêt du Bois de l'Hôpital, et un MERCI tout spécial à ma Maman de m'avoir accompagnée dans mes captures, pour les balades et discussions autour d'un café, pour les drapeaux si soigneusement confectionnés, merci d'avoir été là, et merci d'être là.

Un merci très très spécial à ma chère Nina. Merci pour tes encouragements, tes mots justement dosés, ta force et ton soutien inépuisable, surtout dans les moments plus difficiles. Merci également pour tous ces moments de rire et de détente partagés au labo comme à la vie, moments que nous allons encore partager pendant très longtemps. Merci d'être mon amie !

Un ENORME MERCI à mes parents et à ma famille pour leur soutien, leur patience et compréhension. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Pour terminer, MERCI à Laurent de ton soutien au quotidien, ta gentillesse, ta patience sans limite, ta compréhension, ta joie et tes rires... si différents... Merci d'avoir été là et merci d'être là.

7 ANNEXE 1 : MATÉRIEL ET SOLUTIONS

7.1 Extractions d'acides nucléiques totaux

7.1.1 Matériel

Billes 3 mm diamètre. SKF (Göteborg, Suède)

Mixer mill MM 300. Retsch (Arlesheim, Suisse)

NucliSENS® easyMAG™. bioMérieux (France)

7.1.2 Solutions

- **EDTA (500 mM, pH 8.0)**

EDTA	18.6 g
------	--------

ddH ₂ O	40 ml
--------------------	-------

Ajuster pH à 8.0 (NaOH)

H ₂ O nanopure, volume ajusté à	100 ml
--	--------

Autoclaver

- **Tris-Cl (1 M, pH 7.5)**

Tris base	60.57 g
-----------	---------

ddH ₂ O	40 ml
--------------------	-------

Ajuster pH à 7.5 (HCl)

H ₂ O nanopure, volume ajusté à	500 ml
--	--------

- **Tampon Tris-EDTA (pH 8.0)**

Tris-Cl (1 M, pH 7.5)	10 ml
-----------------------	-------

EDTA (500 mM, pH 8.0)	2 ml
-----------------------	------

7.2 Extraction d'ARN au TRIzol®

7.2.1 Matériel

Billes 3 mm diamètre. SKF (Göteborg, Suède)

Mixer mill MM 300. Retsch (Arlesheim, Suisse)

TRIzol®. Invitrogen (Basel, Suisse)

Absolute alcohol 99.8%. Fluka (Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA)

Isopropanol for molecular biology. Acros organics (Geel, Belgique)

Chloroforme for molecular biology. Fluka (Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA)

DEPC (Diethylpyrocarbonate). Fluka (Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA)

H₂O RNase free. Qiagen (Hombrechtikon, Suisse)

Mercury RNase free. LTF Labortechnik GmbH & Co. (Wasserburg, Allemagne)

7.2.2 Solutions

- **1000 ml H₂O traitée au DEPC**

H₂O nanopure 999 ml

DEPC 1 ml

- **EtOH 75%**

EtOH 99.8% 75 ml

H₂O traitée au DEPC 25 ml

7.3 Extraction d'ADN au NH₄OH

NH₄OH (Hydroxyde d'ammonium). Sigma-Aldrich Co. (Missouri, USA)

7.4 Matériel pour les PCR, PCR en temps réel et RT-PCR en temps réel

7.4.1 Produits

Thermocycler Biometra TGradient. Biometra (Göttingen, Allemagne)

iCycler. Biorad (Reinach, Suisse)

Taq DNA polymérase. Qiagen (Hombrechtikon, Suisse)

SuperScript® III Platinum® One-Step Quantitative qRT-PCR System. Invitrogen (LuBioScience GmbH, Lucerne, Suisse)

KAPATaq™ Hotstart DNA polymerase. Kapa Biosystems (Boston, USA)

Amorces et sondes. Microsynth AG (Balgach, Suisse)

dNTPs 100 mM. Promega (Madison, USA)

H₂O RNase free. Qiagen (Hombrechtikon, Suisse)

Random hexamers. Qiagen (Hombrechtikon, Suisse)

Random primers. Promega (Madison, USA)

RNase Out. Invitrogen (LuBioScience GmbH, Lucerne, Suisse)

RNAsin. Promega (Madison, USA)

Superscript II Reverse transcriptase. Invitrogen (LuBioScience GmbH, Suisse)

M-MLV. Promega (Madison, USA)

7.4.2 Matériel

Thermocycler Biometra TGradient. Biometra (Göttingen, Allemagne)

Mini-four à hybridation OV1. Biometra (Göttingen, Allemagne)

Four à hybridation / agitateur. Amersham Biosciences (Grande-Bretagne)

Four à hybridation HB-1000. UVP (Cambridge, Grande-Bretagne)
Miniblotter MN45. Immunetics (Cambridge, Mass., USA)
Biodyne® C Membrane. PALL Europe Ltd. (Royaume-Unis)
ECL Detection Reagents. GE healthcare Europe GmbH (Otelfingen, Suisse)
Foam cushions. Immunetics (Cambridge, Mass., USA)
Streptavidine-POD-conjugate. Boehringer Ingelheim (Mannheim, USA)
Amersham Hyperfilm ECL. GE healthcare Europe GmbH (Otelfingen, Suisse)
UltrPure™ 20x SSPE. Gibco BRL Life Technologie (Zug, Suisse)
EDAC (1-éthyl-3(3-diméthyl-aminopropyle)carbodiimide). Sigma-Aldrich Co. (Missouri, USA)
SDS pur. VWR International Ltd. (Poole, Angleterre)

7.4.3 Solutions

- **EDAC 16%**

EDAC	1.6 g
H ₂ O nanopure	10 ml
- **NaHCO₃ 0.5 M pH 8.4**

NaHCO ₃	10.5 g
H ₂ O nanopure	240 ml
Ajuster pH à 8.4 (NaOH)	
H ₂ O nanopure, volume ajusté à	250 ml
Autoclaver	
- **NaOH 10 M**

NaOH	10 g
H ₂ O nanopure	25 ml
- **SDS 10%**

SDS	10 g
H ₂ O nanopure	100 ml
Chauffer pour dissoudre.	
- **100 ml de NaOH 100mM**

NaOH 10 M	1 ml
H ₂ O nanopure	99 ml
- **100 ml 2x SSPE / 0.1% SDS**

H ₂ O nanopure	89 ml
SSPE 20x	10 ml
SDS 10%	1 ml
- **200 ml 2x SSPE / 0.5% SDS**

H ₂ O nanopure	170 ml
SSPE 20x	20 ml
SDS 10%	1 ml
• 200 ml 2x SSPE	
H ₂ O nanopure	180 ml
SSPE 20x	20 ml
• 200 ml SDS 1%	
H ₂ O nanopure	180 ml
SDS 10%	20 ml
• EDTA 20 mM pH 8.0	
EDTA	7.4 g
H ₂ O nanopure	800 ml
Ajuster le pH à 8.0 (NaOH)	
H ₂ O nanopure, volume ajusté à	1000 ml
Autoclaver	

7.5 Matériel pour les gels d'agarose

Agarose Standard, Molecular Biology Grade. Eurobio (Les Ulis, France)

GelRed Nucleic Acid Stain 0.5 ml. Chemie Brunschwig AG (Bâle, Suisse)

DNA Step Ladder 100pb. Promega (Madison, USA)

7.6 Matériel pour les purifications d'acides nucléiques

Wizard® SV gel and PCR clean-up system. Promega (Madison, USA)

8 ANNEXE 2: SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES PUBLIÉES DANS GENBANK

8.1 Séquences nucléotidiques publiées issues de tiques d'oiseaux

8.1.1 *A. phagocytophilum* groESL

JX082323 : détecté chez une larve *I. ricinus* se gorgeant sur un merle (*Turdus merula*) capturé le 9 octobre 2008 au Col de Jaman (32_1).

JX082324 : détecté chez une nymphe *I. ricinus* se gorgeant sur un pinson des arbres (*Fringilla coelebs*) capturé le 8 octobre 2007 au Col de Jaman (132_8).

JX082325 : détecté chez une nymphe *I. ricinus* se gorgeant sur un rouge-gorge (*Erithacus rubecula*) capturé le 16 octobre 2007 au Col de Jaman (148_4).

8.1.2 *R. monacensis* 23S-5S

JQ838250 : détecté chez une nymphe *I. ricinus* fixée sur une grive musicienne (*Turdus philomelos*) capturée le 16 octobre 2008 au Col de Jaman (70_6).

JQ838251 : détecté chez une larve *I. ricinus* fixée sur un rouge-gorge (*E. rubecula*) capturé le 10 octobre 2007 au Col de Jaman (110_7).

JQ838252 : détecté chez une larve *I. ricinus* fixée sur un serin cini (*Serinus serinus*) capturé le 16 octobre 2007 au Col de Jaman (144_5).

JQ838253 : détecté chez une nymphe *I. ricinus* fixée sur un merle (*T. merula*) capturé le 15 octobre 2007 au Col de Jaman (154_7).

8.1.3 *Rickettsia* sp. gltA

JQ922509 : détecté chez une larve provenant d'un rouge-gorge (*E. rubecula*) capturé le 29.09.2008 au Col de Jaman (38_2).

JQ922510 : détecté chez une larve provenant d'un rouge-gorge (*E. rubecula*) capturé le 29.09.2008 au Col de Jaman (39_2).

8.2 Séquences nucléotidiques publiées issues de tiques libres

8.2.1 *A. phagocytophilum* groESL

JX133175 : détecté chez une femelle *I. ricinus* récoltée à Chalet-à-Gobet (VD) en 2010 (7F1).

JX133176 : détecté chez une femelle *I. ricinus* récoltée à Belfaux (FR) le 18 avril 2010 (F6Bel).

JX133177 : détecté chez une nymphe *I. ricinus* récoltée à Belfaux (FR) le 18 avril 2010 (N6Bel).

JX133178 : détecté chez une nymphe *I. ricinus* récoltée à Belfaux (FR) le 9 août 2009 (N47Bel).

8.2.2 *A. phagocytophilum* 16S

JQ277467 : détecté chez une femelle *I. ricinus* récoltée à Belfaux (FR) le 18 avril 2010 (F6Bel).

8.2.3 *R. monacensis* 23S-5S

JQ670878 : détecté chez une nymphe *I. ricinus* récoltée à Agiez (VD) le 17 juillet 2009 (N27).

8.2.4 *Candidatus N. mikurensis* 16S

JQ014620 : détecté chez une nymphe *I. ricinus* récoltée à Mormont (JU) en 2009 (JU_N7VI).

JQ014621 : détecté chez une nymphe *I. ricinus* récoltée à Chalet-à-Gobet le 14 juin 2010 (VD_N99I)

JQ014622 : détecté chez une nymphe *I. ricinus* récoltée au Bois de l'Hôpital (NE) le 22 avril 2009 (NE_N15S1).

8.2.5 Virus TBE NS5

HQ883374 : détecté dans un pool de 10 femelles *I. ricinus* récoltées à Agiez (VD) le 10 juillet 2008 (NETBE9).

HQ883375 : détecté dans un pool de 10 nymphes *I. ricinus* récoltées à Agiez (VD) le 16 juillet 2009 (NETBE10).

HQ883376 : détecté dans un pool de 11 nymphes *I. ricinus* récoltées à Montcherand (VD) le 8 juin 2010 (NETBE11).

9 BIBLIOGRAPHIE

- Aeschlimann, A., M. Brossard, and G. Quenet. 1975. [Contribution to the knowledge of Swiss piroplasmas]. *Acta Trop* 32: 281-289.
- Ai, C. X., R. J. Hu, K. E. Hyland, Y. X. Wen, Y. G. Zhang, Q. C. Qiu, D. Y. Li, X. D. Liu, Z. X. Shi, J. H. Zhao, and et al. 1990. Epidemiological and aetiological evidence for transmission of Lyme disease by adult *Ixodes persulcatus* in an endemic area in China. *Int J Epidemiol* 19: 1061-1065.
- Alekseev, A. N., and S. P. Chunikhin. 1990. [The exchange of the tick-borne encephalitis virus between ixodid ticks feeding jointly on animals with a subthreshold level of viremia]. *Med Parazitol (Mosk)*: 48-50.
- Alekseev, A. N., H. V. Dubinina, I. Van De Pol, and L. M. Schouls. 2001. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. *J Clin Microbiol* 39: 2237-2242.
- Andersson, M., and L. Raberg. 2011. Wild Rodents and Novel Human Pathogen Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*, Southern Sweden. *Emerg Infect Dis* 17: 1716-1718.
- Avsic-Zupanc, T., M. Poljak, M. Maticic, A. Radsel-Medvescek, J. W. LeDuc, K. Stiasny, C. Kunz, and F. X. Heinz. 1995. Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains. *Clin Diagn Virol* 4: 51-59.
- Baranton, G., and S. J. De Martino. 2009. *Borrelia burgdorferi* sensu lato diversity and its influence on pathogenicity in humans. *Curr Probl Dermatol* 37: 1-17.
- Baranton, G., D. Postic, I. Saint Girons, P. Boerlin, J. C. Piffaretti, M. Assous, and P. A. Grimont. 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* 42: 378-383.
- Barbour, A. G., and S. F. Hayes. 1986. Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* 50: 381-400.
- Barker, S. C., and A. Murrell. 2004. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology* 129 Suppl: S15-36.
- Beati, L., P. F. Humair, A. Aeschlimann, and D. Raoult. 1994. Identification of spotted fever group rickettsiae isolated from *Dermacentor marginatus* and *Ixodes ricinus* ticks collected in Switzerland. *Am J Trop Med Hyg* 51: 138-148.
- Beati, L., O. Peter, W. Burgdorfer, A. Aeschlimann, and D. Raoult. 1993. Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp. nov. is a distinct species of the spotted fever group of rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol* 43: 521-526.
- Beck, R., L. Vojta, S. Curkovic, V. Mrljak, J. Margaletic, and B. Habrun. 2011. Molecular survey of *Babesia microti* in wild rodents in central Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 81-83.
- Becker, C. A., A. Bouju-Albert, M. Jouglin, A. Chauvin, and L. Malandrin. 2009. Natural transmission of Zoonotic *Babesia* spp. by *Ixodes ricinus* ticks. *Emerg Infect Dis* 15: 320-322.
- Bekker, C. P., S. de Vos, A. Taoufik, O. A. Sparagano, and F. Jongejan. 2002. Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. *Vet Microbiol* 89: 223-238.
- Bellet-Edimo, O. R., B. Betschart, and L. Gern. 2005. Frequency and efficiency of transovarial and subsequent transstadial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks. *Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles* 128: 117-125.
- Belongia, E. A. 2002. Epidemiology and impact of coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2: 265-273.
- Beninati, T., G. Piccolo, A. Rizzoli, C. Genchi, and C. Bandi. 2006. Anaplasmatataceae in wild rodents and roe deer from Trento Province (northern Italy). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25: 677-678.
- Bernasconi, M. V., S. Casati, O. Peter, and J. C. Piffaretti. 2002. *Rhipicephalus* ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino). *Infect Genet Evol* 2: 111-120.
- Bertolotti, L., L. Tomassone, C. Tramuta, E. Grego, G. Amore, C. Ambrogi, P. Nebbia, and A. Mannelli. 2006. *Borrelia lusitaniae* and spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Tuscany, central Italy. *J Med Entomol* 43: 159-165.
- Bjoersdorff, A., J. Berglund, B. E. Kristiansen, C. Soderstrom, and I. Eliasson. 1999. [Varying clinical picture and course of human granulocytic ehrlichiosis. Twelve Scandinavian cases of the new tick-borne zoonosis are presented]. *Lakartidningen* 96: 4200-4204.

- Bjoersdorff, A., S. Bergstrom, R. F. Massung, P. D. Haemig, and B. Olsen. 2001.** Ehrlichia-infected ticks on migrating birds. *Emerg Infect Dis* 7: 877-879.
- Blaschitz, M., M. Narodoslavsky-Gfoller, M. Kanzler, J. Walochnik, and G. Stanek. 2008a.** First detection of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8: 561-563.
- Blaschitz, M., M. Narodoslavsky-Gfoller, M. Kanzler, G. Stanek, and J. Walochnik. 2008b.** Babesia species occurring in Austrian *Ixodes ricinus* ticks. *Appl Environ Microbiol* 74: 4841-4846.
- Bonnet, S., M. Jouglin, M. L'Hostis, and A. Chauvin. 2007.** Babesia sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis* 13: 1208-1210.
- Boretti, F. S., A. Perreten, M. L. Meli, V. Cattori, B. Willi, N. Wengi, S. Hornok, H. Honegger, D. Hegglin, R. Woelfel, C. E. Reusch, H. Lutz, and R. Hofmann-Lehmann. 2009.** Molecular Investigations of *Rickettsia helvetica* infection in dogs, foxes, humans, and *Ixodes* ticks. *Appl Environ Microbiol* 75: 3230-3237.
- Bown, K. J., M. Begon, M. Bennett, Z. Woldehiwet, and N. H. Ogden. 2003.** Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 9: 63-70.
- Bown, K. J., X. Lambin, G. Telford, D. Heyder-Bruckner, N. H. Ogden, and R. J. Birtles. 2011.** The common shrew (*Sorex araneus*): a neglected host of tick-borne infections? *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 947-953.
- Bown, K. J., X. Lambin, G. R. Telford, N. H. Ogden, S. Telfer, Z. Woldehiwet, and R. J. Birtles. 2008.** Relative importance of *Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps* as vectors for *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in field vole (*Microtus agrestis*) populations. *Appl Environ Microbiol* 74: 7118-7125.
- Bown, K. J., X. Lambin, N. H. Ogden, M. Begon, G. Telford, Z. Woldehiwet, and R. J. Birtles. 2009.** Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles. *Emerg Infect Dis* 15: 1948-1954.
- Brodie, T. A., P. H. Holmes, and G. M. Urquhart. 1986.** Some aspects of tick-borne diseases of British sheep. *Vet Rec* 118: 415-418.
- Brouqui, P., P. Parola, P. E. Fournier, and D. Raoult. 2007.** Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. *FEMS Immunol Med Microbiol* 49: 2-12.
- Brouqui, P., Y. O. Sanogo, G. Caruso, F. Merola, and D. Raoult. 2003.** Candidatus Ehrlichia walkerii: a new Ehrlichia detected in *Ixodes ricinus* tick collected from asymptomatic humans in Northern Italy. *Ann N Y Acad Sci* 990: 134-140.
- Brummer-Korvenkontio, M., P. Saikku, P. Korhonen, and N. Oker-Blom. 1973.** Arboviruses in Finland. I. Isolation of tick-borne encephalitis (TBE) virus from arthropods, vertebrates, and patients. *Am J Trop Med Hyg* 22: 382-389.
- Burgdorfer, W., A. Aeschlimann, O. Peter, S. F. Hayes, and R. N. Philip. 1979.** *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Trop* 36: 357-367.
- Burgdorfer, W., A. G. Barbour, S. F. Hayes, J. L. Benach, E. Grunwaldt, and J. P. Davis. 1982.** Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science* 216: 1317-1319.
- Burri, C., C. Dupasquier, V. Bastic, and L. Gern. 2011a.** Pathogens of Emerging Tick-Borne Diseases, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., and *Babesia* spp., in *Ixodes* Ticks Collected from Rodents at Four Sites in Switzerland (Canton of Bern). *Vector Borne Zoonotic Dis* 11.
- Burri, C., F. Moran Cadenas, V. Douet, J. Moret, and L. Gern. 2007.** *Ixodes ricinus* density and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* along a North-facing altitudinal gradient in the Rhone Valley (Switzerland). *Vector Borne Zoonotic Dis* 7: 50-58.
- Burri, C., V. Bastic, G. Maeder, E. Patalas, and L. Gern. 2011b.** Microclimate and the zoonotic cycle of tick-borne encephalitis virus in Switzerland. *J Med Entomol* 48: 615-627.
- Calisher, C. H., and E. A. Gould. 2003.** Taxonomy of the virus family Flaviviridae. *Adv Virus Res* 59: 1-19.
- Canica, M. M., F. Nato, L. du Merle, J. C. Mazie, G. Baranton, and D. Postic. 1993.** Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis* 25: 441-448.
- Capelli, G., S. Ravagnan, F. Montarsi, S. Ciocchetta, S. Cazzin, E. Porcellato, A. M. Babiker, R. Cassini, A. Salviato, G. Cattoli, and D. Otranto. 2012.** Occurrence and identification of risk areas of *Ixodes ricinus*-borne pathogens: a cost-effectiveness analysis in north-eastern Italy. *Parasit Vectors* 5: 61.

- Casati, S., L. Gern, and J. C. Piffaretti. 2006a.** Diversity of the population of Tick-borne encephalitis virus infecting *Ixodes ricinus* ticks in an endemic area of central Switzerland (Canton Bern). *J Gen Virol* 87: 2235-2241.
- Casati, S., M. V. Bernasconi, L. Gern, and J. C. Piffaretti. 2004.** Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by recA gene sequence. *FEMS Microbiol Lett* 238: 115-123.
- Casati, S., H. Sager, L. Gern, and J. C. Piffaretti. 2006b.** Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann Agric Environ Med* 13: 65-70.
- Casjens, S. R., C. M. Fraser-Liggett, E. F. Mongodin, W. G. Qiu, J. J. Dunn, B. J. Luft, and S. E. Schutzer. 2011.** Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. *J Bacteriol* 193: 1489-1490.
- Chambers, T. J., C. S. Hahn, R. Galler, and C. M. Rice. 1990.** Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual review of microbiology* 44: 649-688.
- Charrel, R. N., H. Attoui, A. M. Butenko, J. C. Clegg, V. Deubel, T. V. Frolova, E. A. Gould, T. S. Gritsun, F. X. Heinz, M. Labuda, V. A. Lashkevich, V. Loktev, A. Lundkvist, D. V. Lvov, C. W. Mandl, M. Niedrig, A. Papa, V. S. Petrov, A. Plyusnin, S. Randolph, J. Suss, V. I. Zlobin, and X. de Lamballerie. 2004.** Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect* 10: 1040-1055.
- Chen, S. M., J. S. Dumler, J. S. Bakken, and D. H. Walker. 1994.** Identification of a Granulocytotropic Ehrlichia Species as the Etiologic Agent of Human-Disease. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 589-595.
- Christova, I., L. Schouls, I. van De Pol, J. Park, S. Panayotov, V. Lefterova, T. Kantardjiev, and J. S. Dumler. 2001.** High prevalence of granulocytic Ehrlichiae and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Bulgaria. *J Clin Microbiol* 39: 4172-4174.
- Chu, C. Y., W. Liu, B. G. Jiang, D. M. Wang, W. J. Jiang, Q. M. Zhao, P. H. Zhang, Z. X. Wang, G. P. Tang, H. Yang, and W. C. Cao. 2008.** Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. *J Clin Microbiol* 46: 3130-3133.
- Cotty, A. 1985.** Clé de détermination des Ixodidae et Amblyomidae de Suisse. Université de Neuchâtel Neuchâtel.
- Cotty, A., A. Aeschlimann, and S. Schneeberger. 1986.** Distribution et fluctuation de populations d'*Ixodes ricinus* (L.), *Haemaphysalis punctata* (Can. & Fanz) et *Dermacentor marginatus* (Sulzer) (Acarina, Ixodoidea) en Suisse. *Bull Soc Entomol Suisse* 59: 139-150.
- Courtney, J. W., L. M. Kostelnik, N. S. Zeidner, and R. F. Massung. 2004.** Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 42: 3164-3168.
- D'Agaro, P., E. Martinelli, P. Burgnich, F. Nazzi, S. Del Fabbro, A. Iob, M. Ruscio, P. Pischiutti, and C. Campello. 2009.** Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* from a novel endemic area of North Eastern Italy. *J Med Virol* 81: 309-316.
- Danielova, V., and J. Holubova. 1991.** Transovarial transmission rates of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. In: Dusbabek, F, Bukva, V, eds. *Modern acarology*. Vol 2, Prague, Czech Republic: SPB Academic Publishing.: 7-10.
- Danielova, V., J. Holubova, and M. Daniel. 2002.** Tick-borne encephalitis virus prevalence in *Ixodes ricinus* ticks collected in high risk habitats of the south-Bohemian region of the Czech Republic. *Exp Appl Acarol* 26: 145-151.
- Daniels, T. J., G. R. Battaly, D. Liveris, R. C. Falco, and I. Schwartz. 2002.** Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis? *Emerg Infect Dis* 8: 1524-1525.
- de La Fuente, J., A. Estrada-Pena, J. M. Venzal, K. Kocan, and D. E. Sonenshine. 2008.** Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci* 13: 6938-6946.
- de la Fuente, J., R. F. Massung, S. J. Wong, F. K. Chu, H. Lutz, M. Meli, F. D. von Loewenich, A. Grzeszczuk, A. Torina, S. Caracappa, A. J. Mangold, V. Naranjo, S. Stuen, and K. M. Kocan. 2005.** Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *J Clin Microbiol* 43: 1309-1317.
- de Marval, F. 1994.** Etude séroépidémiologique de l'encéphalite à tiques et de la borréliose de Lyme en Suisse Université de Neuchâtel, Suisse Neuchâtel.
- de Michelis, S., H. S. Sewell, M. Collares-Pereira, M. Santos-Reis, L. Schouls, V. Benes, E. C. Holmes, and K. Kurtenbach. 2000.** Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from Mainland Portugal. *J Clin Microbiol* 38: 2128-2133.
- de Vallière, S., A. Cometta, H. Zimmermann, B. Vaudaux, and P. Meylan. 2006.** [Evidence of new foci of tick-borne encephalitis in the French speaking part of Switzerland]. *Rev Med Suisse* 2: 2189, 2191-2184.

- Derdakova, M., L. Beati, B. Pet'ko, M. Stanko, and D. Fish. 2003.** Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the rrfA-rrlB intergenic spacer in ixodes ricinus ticks from the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 69: 509-516.
- Des Vignes, F., and D. Fish. 1997.** Transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by host-seeking *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in southern New York state. *J Med Entomol* 34: 379-382.
- Diniz, P. P., B. S. Schulz, K. Hartmann, and E. B. Breitschwerdt. 2011.** "Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*" infection in a dog from Germany. *J Clin Microbiol* 49: 2059-2062.
- Dobler, G., and R. Wölfel. 2009.** Typhus and other Rickettsioses. *Dtsch Arztebl Int* 106: 348-354.
- Dubska, L., I. Literak, E. Kocianova, V. Taragelova, V. Sverakova, O. Sychra, and M. Hromadko. 2011.** Synanthropic birds influence the distribution of *Borrelia* species: analysis of *Ixodes ricinus* ticks feeding on passerine birds. *Appl Environ Microbiol* 77: 1115-1117.
- Duh, D., M. Petrovec, and T. Avsic-Zupanc. 2001.** Diversity of *Babesia* Infecting European sheep ticks (*Ixodes ricinus*). *J Clin Microbiol* 39: 3395-3397.
- Duh, D., M. Petrovec, T. Trilar, and T. Avsic-Zupanc. 2003.** The molecular evidence of *Babesia microti* infection in small mammals collected in Slovenia. *Parasitology* 126: 113-117.
- Duh, D., M. Petrovec, A. Bidovec, and T. Avsic-Zupanc. 2005.** Cervids as *Babesia* hosts, Slovenia. *Emerg Infect Dis* 11: 1121-1123.
- Dumler, J. S. 1997.** Is human granulocytic ehrlichiosis a new Lyme disease? Review and comparison of clinical, laboratory, epidemiological, and some biological features. *Clin Infect Dis* 25 Suppl 1: S43-47.
- Dumler, J. S., A. F. Barbet, C. P. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa, and F. R. Rurangirwa. 2001.** Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 2145-2165.
- Dumler, J. S., K. S. Choi, J. C. Garcia-Garcia, N. S. Barat, D. G. Scorpio, J. W. Garyu, D. J. Grab, and J. S. Bakken. 2005.** Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis* 11: 1828-1834.
- Dumpis, U., D. Crook, and J. Oksi. 1999.** Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis* 28: 882-890.
- Durmisi, E., N. Knap, A. Saksida, T. Trilar, D. Duh, and T. Avsic-Zupanc. 2010.** Prevalence and Molecular Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus in *Ixodes ricinus* Ticks Collected in Slovenia. *Vector Borne Zoonotic Dis*.
- Ecker, M., S. L. Allison, T. Meixner, and F. X. Heinz. 1999.** Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *Journal of General Virology* 80: 179-185.
- Elfving, K., B. Olsen, S. Bergstrom, J. Waldenstrom, A. Lundkvist, A. Sjostedt, H. Mejlom, and K. Nilsson. 2010.** Dissemination of spotted Fever rickettsia agents in europe by migrating birds. *PLoS ONE* 5: e8572.
- Ernek, E., O. Kozuch, M. Lichard, and J. Nosek. 1968.** The role of birds in the circulation of tick-borne encephalitis virus in the Tribec region. *Acta Virol* 12: 468-470.
- Fehr, J. S., G. V. Bloembergen, C. Ritter, M. Hombach, T. F. Luscher, R. Weber, and P. M. Keller. 2010.** Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Emerg Infect Dis* 16: 1127-1129.
- Felsenstein, J. 1993.** PHYLIP: phylogeny inference package. University of Washington, Seattle, WA.
- Fertner, M. E., L. Molbak, T. P. Boye Pihl, A. Fomsgaard, and R. Bodker. 2012.** First detection of tick-borne "Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*" in Denmark 2011. *Euro Surveill* 17.
- Fingerle, V., U. C. Schulte-Spechtel, E. Ruzic-Sabljic, S. Leonhard, H. Hofmann, K. Weber, K. Pfister, F. Strle, and B. Wilske. 2008.** Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int J Med Microbiol* 298: 279-290.
- Foppa, I. M., P. J. Krause, A. Spielman, H. Goethert, L. Gern, B. Brand, and S. R. Telford, 3rd. 2002.** Entomologic and serologic evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti*, eastern Switzerland. *Emerg Infect Dis* 8: 722-726.
- Fournier, P. E., F. Grunnenberger, B. Jaulhac, G. Gastinger, and D. Raoult. 2000.** Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerg Infect Dis* 6: 389-392.

- Fournier, P. E., C. Allombert, Y. Supputamongkol, G. Caruso, P. Brouqui, and D. Raoult. 2004.** Aneruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. *J Clin Microbiol* 42: 816-818.
- Fraenkel, C. J., U. Garpmo, and J. Berglund. 2002.** Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 40: 3308-3312.
- Franke, J., A. Moldenhauer, A. Hildebrandt, and W. Dorn. 2010.** Are birds reservoir hosts for *Borrelia afzelii*? *Ticks and Tick-borne Diseases* 1: 109-112.
- Fukunaga, M., A. Hamase, K. Okada, and M. Nakao. 1996.** *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol Immunol* 40: 877-881.
- Fukunaga, M., Y. Takahashi, Y. Tsuruta, O. Matsushita, D. Ralph, M. McClelland, and M. Nakao. 1995.** Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int J Syst Bacteriol* 45: 804-810.
- Gäumann, R., K. Muhlemann, M. Strasser, and C. M. Beuret. 2010.** High-throughput procedure for tick surveys of tick-borne encephalitis virus and its application in a national surveillance study in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 76: 4241-4249.
- Gäumann, R., D. Ruzek, K. Muhlemann, M. Strasser, and C. M. Beuret. 2011.** Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis virus field isolates from Switzerland. *J Med Virol* 83: 853-863.
- Georges, K., G. R. Loria, S. Riili, A. Greco, S. Caracappa, F. Jongejan, and O. Sparagano. 2001.** Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet Parasitol* 99: 273-286.
- Gern, L. 2004.** Tiques et Borréiose de Lyme en Suisse occidentale. *Bull Société Neuch Sciences Nat* 127: 5-21.
- Gern, L., and A. Aeschlimann. 1986.** Etude séroépidémiologique de 2 foyers à babésie de micromammifères en Suisse. *Schweiz Arch Tierheilkd* 128: 587-600.
- Gern, L., and O. Rais. 1996.** Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 33: 189-192.
- Gern, L., and P. F. Humair. 2002.** Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In: J Gray, O. Kahl, RS Lane, et al. eds. *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*. Wallingford, Oxon, UK: CABI International: 149-174.
- Gern, L., R. Lienhard, and O. Peter. 2010a.** [Diseases and pathogenic agents transmitted by ticks in Switzerland]. *Rev Med Suisse* 6: 1906-1909.
- Gern, L., E. Rouvinez, L. N. Toutoungi, and E. Godfroid. 1997.** Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland. *Folia Parasitol* 44: 309-314.
- Gern, L., V. Douet, Z. López, O. Rais, and F. Morán Cadenas. 2010b.** Diversity of *Borrelia* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in a Lyme borreliosis endemic area in Switzerland identified by using new probes for reverse line blotting. *Ticks and Tick-borne Diseases* 1: 23-29.
- Gern, L., M. Brossard, A. Aeschlimann, C. A. Broquet, G. Quenet, J. P. Stucki, and J. Ackermann. 1982.** [Bovine piroplasmiasis in the Clos-du-Doubs (Jura, Switzerland): preliminary observations]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 124: 549-556.
- Gerth, H. J., D. Grimshandl, B. Stage, G. Doller, and C. Kunz. 1995.** Roe deer as sentinels for endemicity of tick-borne encephalitis virus. *Epidemiol Infect* 115: 355-365.
- Gigandet, L., E. Stauffer, V. Douet, O. Rais, J. Moret, and L. Gern. 2011.** Prevalence of Three Zoonotic *Babesia* Species in *Ixodes ricinus* (Linne, 1758) Nymphs in a Suburban Forest in Switzerland. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 363-366.
- Goethert, H. K., and S. R. Telford, 3rd. 2003.** What is *Babesia microti*? *Parasitology* 127: 301-309.
- Golovljova, I., S. Vene, K. B. Sjolander, V. Vasilenko, A. Plyusnin, and A. Lundkvist. 2004.** Characterization of tick-borne encephalitis virus from Estonia. *J Med Virol* 74: 580-588.
- Gorenflot, A., K. Moubri, E. Precigout, B. Carcy, and T. P. Schettters. 1998.** Human babesiosis. *Ann Trop Med Parasitol* 92: 489-501.
- Grard, G., G. Moureau, R. N. Charrel, J. J. Lemasson, J. P. Gonzalez, P. Gallian, T. S. Gritsun, E. C. Holmes, E. A. Gould, and X. de Lamballerie. 2007.** Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology* 361: 80-92.
- Gray, J. 1991.** The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Rev Med Vet Entomol* 79: 323-333.

- Gray, J., A. Zintl, A. Hildebrandt, K. P. Hunfeld, and L. Weiss. 2010. Zoonotic babesiosis: Overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks and Tick-borne Disease* 1: 3-10.
- Gray, J. S., O. Kahl, J. N. Robertson, M. Daniel, A. Estrada-Pena, G. Gettinby, T. G. Jaenson, P. Jensen, F. Jongejan, E. Korenberg, K. Kurtenbach, and P. Zeman. 1998. Lyme borreliosis habitat assessment. *Zentralbl Bakteriol* 287: 211-228.
- Gritsun, T. S., P. A. Nuttall, and E. A. Gould. 2003a. Tick-borne flaviviruses. *Adv Virus Res* 61: 317-371.
- Gritsun, T. S., V. A. Lashkevich, and E. A. Gould. 2003b. Tick-borne encephalitis. *Antiviral research* 57: 129-146.
- Guglielmone, A. A., R. G. Robbins, D. A. Apanaskevich, T. N. Petney, A. Estrada-Pena, I. G. Horak, R. Shao, and S. C. Barker. 2010. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa* 2528: 1-28.
- Guy, E. C., and G. Stanek. 1991. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 44: 610-611.
- Haglund, M., and G. Gunther. 2003. Tick-borne encephalitis--pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine* 21 Suppl 1: S11-18.
- Halos, L., T. Jamal, R. Maillard, F. Beugnet, A. Le Menach, H. J. Boulouis, and M. Vayssier-Taussat. 2005. Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp. *Vet Res* 36: 79-87.
- Han, X., M. Aho, S. Vene, M. Peltomaa, A. Vaheri, and O. Vapalahti. 2001. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in Finland. *J Med Virol* 64: 21-28.
- Han, X., A. Juceviciene, N. Y. Uzcategui, H. Brummer-Korvenkontio, M. Zygutiene, A. Jaaskelainen, P. Leinikki, and O. Vapalahti. 2005. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in Lithuania. *J Med Virol* 77: 249-256.
- Hartelt, K., R. Oehme, H. Frank, S. O. Brockmann, D. Hassler, and P. Kimmig. 2004. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37: 86-92.
- Haselbarth, K., A. M. Tenter, V. Brade, G. Krieger, and K. P. Hunfeld. 2007. First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int J Med Microbiol* 297: 197-204.
- Hasle, G., H. P. Leinaas, K. H. Roed, and O. Oines. 2011. Transport of *Babesia venatorum*-infected *Ixodes ricinus* to Norway by northward migrating passerine birds. *Acta Vet Scand* 53: 41.
- Hayasaka, D., L. I. Ivanov, G. N. Leonova, A. Goto, K. Yoshii, T. Mizutani, H. Kariwa, and I. Takashima. 2001. Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia. *Journal of General Virology* 82: 1319-1328.
- Hayes, S. F., W. Burgdorfer, and A. Aeschlimann. 1980. Sexual transmission of spotted fever group rickettsiae by infected male ticks: detection of rickettsiae in immature spermatozoa of *Ixodes ricinus*. *Infect Immun* 27: 638-642.
- Herwaldt, B. L., S. Caccio, F. Gherlinzoni, H. Aspöck, S. B. Slemenda, P. Piccaluga, G. Martinelli, R. Edelhofer, U. Hollenstein, G. Poletti, S. Pampiglione, K. Loschenberger, S. Tura, and N. J. Pieniazek. 2003. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis* 9: 942-948.
- Heyman, P., C. Cochez, A. Hofhuis, J. van der Giessen, H. Sprong, S. R. Porter, B. Losson, C. Saegerman, O. Donoso-Mantke, M. Niedrig, and A. Papa. 2010. A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8: 33-50.
- Hildebrandt, A., A. Krämer, S. Sachse, and E. Straube. 2010a. Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). *Ticks and Tick-borne Diseases* 1: 52-56.
- Hildebrandt, A., K. Pauliks, S. Sachse, and E. Straube. 2010b. Coexistence of *Borrelia* spp. and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* Ticks in Middle Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10.
- Hildebrandt, A., K. H. Schmidt, V. Fingerle, B. Wilske, and E. Straube. 2002. Prevalence of granulocytic *Ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany (Thuringia) detected by PCR and sequencing of a 16S ribosomal DNA fragment. *FEMS Microbiol Lett* 211: 225-230.
- Hildebrandt, A., K. P. Hunfeld, M. Baier, A. Krumbholz, S. Sachse, T. Lorenzen, M. Kiehntopf, H. J. Fricke, and E. Straube. 2007. First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26: 595-601.

- Hilpertshausen, H., P. Deplazes, M. Schnyder, L. Gern, and A. Mathis. 2006. Babesia spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in southern Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 72: 6503-6507.
- Holzmann, H., S. W. Aberle, K. Stiasny, P. Werner, A. Mischak, B. Zainer, M. Netzer, S. Koppi, E. Bechter, and F. X. Heinz. 2009. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerg Infect Dis* 15: 1671-1673.
- Homer, M. J., I. Aguilar-Delfin, S. R. Telford, 3rd, P. J. Krause, and D. H. Persing. 2000. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev* 13: 451-469.
- Hoogstraal, H. 1972. Birds as tick hosts and as reservoirs and disseminators of tickborne infectious agents. *Wiad Parazytol* 18: 703-706.
- Hoogstraal, H., and A. Aeschlimann. 1982. Tick-host specificity. *Bull Soc Entomol Suisse* 55.
- Hou, Z., F. Heinz, M. Ecker, D. Zi, R. Liu, and Y. Yu. 1997. The nucleotide and deduced amino acid sequence of protein E of HLJ-1 strain of tick-borne encephalitis virus from northeastern China. *Chin J Virol* 13: 47-53.
- Hubalek, Z., and J. Halouzka. 1998. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitol Res* 84: 167-172.
- Huegli, D., C. M. Hu, P. F. Humair, B. Wilske, and L. Gern. 2002. Apodemus species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland. *J Clin Microbiol* 40: 4735-4737.
- Humair, P. F., and L. Gern. 1998. Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Trop* 69: 213-227.
- Humair, P. F., O. Rais, and L. Gern. 1999. Transmission of *Borrelia afzelii* from Apodemus mice and *Clethrionomys voles* to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitology* 118 (Pt 1): 33-42.
- Humair, P. F., N. Turrian, A. Aeschlimann, and L. Gern. 1993. *Ixodes ricinus* immatures on birds in a focus of Lyme borreliosis. *Folia Parasitol (Praha)* 40: 237-242.
- Humair, P. F., D. Postic, R. Wallich, and L. Gern. 1998. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. *Zentralbl Bakteriologie* 287: 521-538.
- Hunfeld, K. P., A. Hildebrandt, and J. S. Gray. 2008. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *Int J Parasitol* 38: 1219-1237.
- Hunfeld, K. P., A. Lambert, H. Kampen, S. Albert, C. Epe, V. Brade, and A. M. Tenter. 2002. Seroprevalence of Babesia infections in humans exposed to ticks in midwestern Germany. *J Clin Microbiol* 40: 2431-2436.
- Jaaskelainen, A., T. Tikkakoski, U. N., A. N. Alekseev, A. Vaheri, and O. Vapalahti. 2006. Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland. *Emerg Infect Dis* 12: 1568-1571.
- Jaaskelainen, A. E., E. Tonteri, T. Sironen, L. Pakarinen, A. Vaheri, and O. Vapalahti. 2011. European Subtype Tick-borne Encephalitis Virus in *Ixodes persulcatus* Ticks. *Emerg Infect Dis* 17: 323-325.
- Jado, I., R. Escudero, H. Gil, M. I. Jimenez-Alonso, R. Sousa, A. L. Garcia-Perez, M. Rodriguez-Vargas, B. Lobo, and P. Anda. 2006. Molecular method for identification of Rickettsia species in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol* 44: 4572-4576.
- Jado, I., J. A. Oteo, M. Aldamiz, H. Gil, R. Escudero, V. Ibarra, J. Portu, A. Portillo, M. J. Lezaun, C. Garcia-Amil, I. Rodriguez-Moreno, and P. Anda. 2007. Rickettsia monacensis and human disease, Spain. *Emerg Infect Dis* 13: 1405-1407.
- Jahfari, S., M. Fonville, P. Hengeveld, C. Reusken, E. J. Scholte, W. Takken, P. Heyman, J. Medlock, D. Heylen, J. Kleve, and H. Sprong. 2012. Prevalence of Neorhlichia mikurensis in ticks and rodents from North-west Europe. *Parasit Vectors* 5: 74.
- Jenkins, A., B. E. Kristiansen, A. G. Allum, R. K. Aakre, L. Strand, E. J. Kleveland, I. van de Pol, and L. Schouls. 2001. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Ehrlichia spp. in *Ixodes* ticks from southern Norway. *J Clin Microbiol* 39: 3666-3671.
- Jones, L. D., C. R. Davies, G. M. Steele, and P. A. Nuttall. 1987. A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviremic host. *Science* 237: 775-777.
- Jouda, F., J. L. Perret, and L. Gern. 2004a. *Ixodes ricinus* density, and distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient. *J Med Entomol* 41: 162-169.
- Jouda, F., J. L. Perret, and L. Gern. 2004b. Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale. *Vector Borne Zoonotic Dis* 4: 23-32.

- Jouda, F., M. Crippa, J. L. Perret, and L. Gern. 2003. Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of canton Ticino (Switzerland). *Eur J Epidemiol* 18: 907-912.
- Kahl, O., L. Gern, L. Eisen, and R. S. Lane. 2002. Ecological research on *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Terminology and some methodological pitfalls, pp. 29-46. In J. Gray, O. Kahl, R. S. Lane and G. Stanek (eds.), *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*. CABI Publishing.
- Katargina, O., J. Geller, V. Vasilenko, T. Kuznetsova, L. Jarvekulg, S. Vene, A. Lundkvist, and I. Golovljova. 2011. Detection and Characterization of *Babesia* Species in *Ixodes* Ticks in Estonia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*
- Katargina, O., J. Geller, A. Alekseev, H. Dubinina, G. Efremova, N. Mishaeva, V. Vasilenko, T. Kuznetsova, L. Jarvekulg, S. Vene, A. Lundkvist, and I. Golovljova. 2012. Identification of *Anaplasma phagocytophilum* in tick populations in Estonia, the European part of Russia and Belarus. *Clin Microbiol Infect* 18: 40-46.
- Kawabata, H., T. Masuzawa, and Y. Yanagihara. 1993. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol* 37: 843-848.
- Kawahara, M., Y. Rikihisa, E. Isogai, M. Takahashi, H. Misumi, C. Suto, S. Shibata, C. Zhang, and M. Tsuji. 2004. Ultrastructure and phylogenetic analysis of 'Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*' in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1837-1843.
- Kim, S. Y., Y. E. Jeong, S. M. Yun, I. Y. Lee, M. G. Han, and Y. R. Ju. 2009. Molecular evidence for tick-borne encephalitis virus in ticks in South Korea. *Med Vet Entomol* 23: 15-20.
- Kjemtrup, A. M., and P. A. Conrad. 2000. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *Int J Parasitol* 30: 1323-1337.
- Korenberg, E. 1966. Birds and the problem of natural foci of tick-borne encephalitis. *Zool Zh* 45.
- Korenberg, E. I., L. Y. Gorban, Y. V. Kovalevskii, V. I. Frizen, and A. S. Karavanov. 2001. Risk for human tick-borne encephalitis, borrelioses, and double infection in the pre-Ural region of Russia. *Emerg Infect Dis* 7: 459-462.
- Koutaro, M., A. S. Santos, J. S. Dumler, and P. Brouqui. 2005. Distribution of '*Ehrlichia walkeri*' in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) from the northern part of Italy. *J Med Entomol* 42: 82-85.
- Kozuch, O., M. Gresikova, J. Nosek, M. Lichard, and M. Sekeyova. 1967. The role of small rodents and hedgehogs in a natural focus of tick-borne encephalitis. *Bull World Health Organ* 36 Suppl: 61-66.
- Krech, U., F. Jung, and M. Jung. 1969. [Central European tick-borne encephalitis in Switzerland]. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* 99: 282-285.
- Kupca, A., S. Essbauer, G. Zoeller, P. G. de Mendonça, R. Brey, M. Rinder, K. Pfister, M. Spiegel, B. Doerrbecker, M. Pfeffer, and G. Dobler. 2010. Isolation and molecular characterization of a tick-borne encephalitis virus strain from a new tick-borne encephalitis focus with severe cases in Bavaria, Germany. *Ticks and Tick-borne Diseases* 1: 44-51.
- Kurtenbach, K., D. Carey, A. N. Hoodless, P. A. Nuttall, and S. E. Randolph. 1998a. Competence of pheasants as reservoirs for Lyme disease spirochetes. *J Med Entomol* 35: 77-81.
- Kurtenbach, K., M. Peacey, S. G. Rijpkema, A. N. Hoodless, P. A. Nuttall, and S. E. Randolph. 1998b. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl Environ Microbiol* 64: 1169-1174.
- Kurtenbach, K., S. De Michelis, S. Etti, S. M. Schafer, H. S. Sewell, V. Brade, and P. Kraiczy. 2002a. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato—the key role of host complement. *Trends in microbiology* 10: 74-79.
- Kurtenbach, K., S. M. Schafer, H. S. Sewell, M. Peacey, A. Hoodless, P. A. Nuttall, and S. E. Randolph. 2002b. Differential survival of Lyme borreliosis spirochetes in ticks that feed on birds. *Infect Immun* 70: 5893-5895.
- Labuda, M., and S. E. Randolph. 1999. Survival strategy of tick-borne encephalitis virus: cellular basis and environmental determinants. *Zentralbl Bakteriol* 289: 513-524.
- Labuda, M., P. A. Nuttall, O. Kozuch, E. Eleckova, T. Williams, E. Zuffova, and A. Sabo. 1993. Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia* 49: 802-805.
- Le Fleche, A., D. Postic, K. Girardet, O. Peter, and G. Baranton. 1997. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* 47: 921-925.

- Lempereur, L., M. Lebrun, P. Cuvelier, G. Sepult, Y. Caron, C. Saegerman, B. Shiels, and B. Losson. 2011. Longitudinal field study on bovine *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* infections during a grazing season in Belgium. *Parasitol Res.*
- Levin, M. L., and D. Fish. 2000. Immunity reduces reservoir host competence of *Peromyscus leucopus* for *Ehrlichia phagocytophila*. *Infect Immun* 68: 1514-1518.
- Lindgren, E., L. Talleklint, and T. Polfeldt. 2000. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ Health Perspect* 108: 119-123.
- Lindquist, L., and O. Vapalahti. 2008. Tick-borne encephalitis. *Lancet* 371: 1861-1871.
- Liz, J. S., J. W. Sumner, K. Pfister, and M. Brossard. 2002. PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). *J Clin Microbiol* 40: 892-897.
- Liz, J. S., L. Anderes, J. W. Sumner, R. F. Massung, L. Gern, B. Rutti, and M. Brossard. 2000. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J Clin Microbiol* 38: 1002-1007.
- Lommano, E., L. Bertaiola, C. Dupasquier, and L. Gern. 2012a. Infections and co-infections of questing *Ixodes ricinus* ticks by emerging zoonotic pathogens in Western Switzerland. *Appl Environ Microbiol*.
- Lommano, E., C. Dvorák, L. Vallotton, L. Jenni, and L. Gern. Submitted. Tick-borne pathogens in ticks collected from local and migratory birds in Switzerland.
- Lommano, E., C. Burri, G. Maeder, M. Guerne, V. Bastic, E. Patalas, and L. Gern. 2012b. Prevalence and genotyping of tick-borne encephalitis virus in questing *Ixodes ricinus* ticks in a new endemic area in western Switzerland. *J Med Entomol* 49: 156-164.
- Loutan, L., J. Rossier, G. Zufferey, D. Cuenod, C. Hatz, H. P. Marti, and L. Gern. 1993. Imported babesiosis diagnosed as malaria. *Lancet* 342: 749.
- Lundkvist, k., S. Vene, I. Golovljova, V. Mavtchoutko, M. Forsgren, V. Kalnina, and A. Plyusnin. 2001. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Latvia: evidence for co-circulation of three distinct subtypes. *J Med Virol* 65: 730-735.
- MacLeod, J. 1936. Studies on tick-borne fever of sheep II. Experiment on transmission and distribution of the disease. *Parasitology* 28: 320-329.
- Madeddu, G., F. Mancini, A. Caddeo, A. Ciervo, S. Babudieri, I. Maida, M. L. Fiori, G. Rezza, and M. S. Mura. 2012. *Rickettsia monacensis* as cause of Mediterranean spotted fever-like illness, Italy. *Emerg Infect Dis* 18: 702-704.
- Madewell, B. R., and D. H. Gribble. 1982. Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. *J Am Vet Med Assoc* 180: 512-514.
- Mandl, C. W., M. Ecker, H. Holzmann, C. Kunz, and F. X. Heinz. 1997. Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr. *J Gen Virol* 78 (Pt 5): 1049-1057.
- Marconi, R. T., D. Liveris, and I. Schwartz. 1995. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J Clin Microbiol* 33: 2427-2434.
- Margos, G., A. Hojgaard, R. S. Lane, M. Cornet, V. Fingerle, N. Rudenko, N. Ogden, D. M. Aanensen, D. Fish, and J. Piesman. 2010. Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. *Ticks Tick Borne Dis* 1: 151-158.
- Margos, G., S. A. Vollmer, M. Cornet, M. Garnier, V. Fingerle, B. Wilske, A. Bormane, L. Vitorino, M. Collares-Pereira, M. Drancourt, and K. Kurtenbach. 2009. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl Environ Microbiol* 75: 5410-5416.
- Marsot, M., P. Y. Henry, G. Vourc'h, P. Gasqui, E. Ferquel, J. Laignel, M. Grysan, and J. L. Chapuis. 2012. Which forest bird species are the main hosts of the tick, *Ixodes ricinus*, the vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, during the breeding season? *Int J Parasitol*.
- Martinot, M., M. M. Zadeh, Y. Hansmann, I. Grawey, D. Christmann, S. Aguillon, M. Jouglin, A. Chauvin, and D. De Briel. 2011. Babesiosis in immunocompetent patients, Europe. *Emerg Infect Dis* 17: 114-116.

- Masuzawa, T., N. Takada, M. Kudeken, T. Fukui, Y. Yano, F. Ishiguro, Y. Kawamura, Y. Imai, and T. Ezaki. 2001.** *Borrelia sinica* sp. nov., a lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1817-1824.
- Matile, H. 1982.** Etudes virologiques et épidémiologiques sur l'encéphalite à tiques en Suisse. Université de Neuchâtel Neuchâtel, Suisse.
- Matuschka, F. R., and A. Spielman. 1992.** Loss of Lyme disease spirochetes from *Ixodes ricinus* ticks feeding on European blackbirds. *Exp Parasitol* 74: 151-158.
- Meer-Scherrer, L., M. Adelson, E. Mordechai, B. Lottaz, and R. Tilton. 2004.** *Babesia microti* infection in Europe. *Curr Microbiol* 48: 435-437.
- Mejlon, H. A., and T. G. Jaenson. 1997.** Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: *Ixodidae*). *Exp Appl Acarol* 21: 747-754.
- Morán-Cadenas, F., H. Schneider, E. Lommano, C. Burri, J. Moret, and L. Gern. 2007.** A comparison of two DNA extraction approaches in the detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from live *Ixodes ricinus* ticks by PCR and reverse line blotting. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7: 555-561.
- Morán Cadenas, F., O. Rais, F. Jouda, V. Douet, P. F. Humair, J. Moret, and L. Gern. 2007.** Phenology of *Ixodes ricinus* and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a north- and south-facing altitudinal gradient on Chaumont Mountain, Switzerland. *J Med Entomol* 44: 683-693.
- Nefedova, V. V., E. I. Korenberg, V. Andreichuk lu, N. B. Gorelova, A. V. Markov, I. A. Fadeeva, and I. L. Evstaf'ev. 2005.** [Genetic characterization of pathogenic *Borrelia*, group A14S, isolated in Ukraine]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*: 23-27.
- Nicholson, W. L., M. B. Castro, V. L. Kramer, J. W. Sumner, and J. E. Childs. 1999.** Dusky-footed wood rats (*Neotoma fuscipes*) as reservoirs of granulocytic Ehrlichiae (Rickettsiales: Ehrlichieae) in northern California. *J Clin Microbiol* 37: 3323-3327.
- Nilsson, K., O. Lindquist, and C. Pahlson. 1999a.** Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet* 354: 1169-1173.
- Nilsson, K., K. Elfving, and C. Pahlson. 2010.** *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006. *Emerg Infect Dis* 16: 490-492.
- Nilsson, K., O. Lindquist, A. J. Liu, T. G. Jaenson, G. Friman, and C. Pahlson. 1999b.** *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. *J Clin Microbiol* 37: 400-403.
- Nilsson, K., C. Pahlson, A. Lukinius, L. Eriksson, L. Nilsson, and O. Lindquist. 2002.** Presence of *Rickettsia helvetica* in granulomatous tissue from patients with sarcoidosis. *J Infect Dis* 185: 1128-1138.
- Nuttall, P. A., and M. Labuda. 2003.** Dynamics of infection in tick vectors and at the tick-host interface. *Adv Virus Res* 60: 233-272.
- OFSP. 2007.** Encéphalite à tiques: nouvelles augmentations du nombre de cas rapportés en 2006, pp. 57-60, Bull OFSP 2007.
- Ogden, N. H., K. Bown, B. K. Horrocks, Z. Woldehiwet, and M. Bennett. 1998.** Granulocytic Ehrlichia infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Med Vet Entomol* 12: 423-429.
- Ogden, N. H., L. R. Lindsay, K. Hanincova, I. K. Barker, M. Bigras-Poulin, D. F. Charron, A. Heagy, C. M. Francis, C. J. O'Callaghan, I. Schwartz, and R. A. Thompson. 2008.** Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. *Appl Environ Microbiol* 74: 1780-1790.
- Oliver, J. H., Jr. 1989.** Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annu Rev Ecol Syst* 20: 397-430.
- Olsen, B., T. G. Jaenson, and S. Bergstrom. 1995.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Appl Environ Microbiol* 61: 3082-3087.
- Page, R. D. 1996.** TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12: 357-358.
- Palomar, A. M., P. Santibanez, D. Mazuelas, L. Roncero, S. Santibanez, A. Portillo, and J. A. Oteo. 2012.** Role of Birds in Dispersal of Etiologic Agents of Tick-borne Zoonoses, Spain, 2009. *Emerg Infect Dis* 18: 1188-1191.
- Pan, H., S. Liu, Y. Ma, S. Tong, and Y. Sun. 2003.** Ehrlichia-like organism gene found in small mammals in the suburban district of Guangzhou of China. *Ann N Y Acad Sci* 990: 107-111.
- Parola, P., and D. Raoult. 2001.** Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clin Microbiol Infect* 7: 80-83.

- Parola, P., C. D. Paddock, and D. Raoult. 2005.** Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev* 18: 719-756.
- Pavlovsky, E. N. 1940.** Probable importance of birds in epidemiology of tick-borne encephalitis. *Dokl Akad Nauk SSSR* 28: 186-188.
- Pavlovsky, E. N. 1947.** Tick and tick-borne encephalitis (in Russian). *Parazitologia Dalnego Vostoka Leningrad* 5: 212-264.
- Pavlovsky, E. N. 1964.** Natural focality of transmissible diseases in relation to the landscape. in: Pavlovskii E. N., editor. *Epidemiology of anthroozoonoses*. Moscow: Nauka.: 1-211.
- Pekova, S., J. Vydra, H. Kabickova, S. Frankova, R. Haugvicova, O. Mazal, R. Cmejla, D. W. Hardekopf, T. Jancuskova, and T. Kozak. 2011.** Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* infection identified in 2 hematooncologic patients: benefit of molecular techniques for rare pathogen detection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 69: 266-270.
- Pérez, D., Y. Kneubuhler, O. Rais, and L. Gern. 2012.** Seasonality of *Ixodes ricinus* Ticks on Vegetation and on Rodents and *Borrelia burgdorferi sensu lato* Genospecies Diversity in Two Lyme Borreliosis-Endemic Areas in Switzerland. *Vector Borne Zoonotic Dis*.
- Petrovec, M., S. Lotric Furlan, T. A. Zupanc, F. Strle, P. Brouqui, V. Roux, and J. S. Dumler. 1997.** Human disease in Europe caused by a granulocytic Ehrlichia species. *J Clin Microbiol* 35: 1556-1559.
- Petrovec, M., W. Sixl, R. Schweiger, S. Mikulasek, L. Elke, G. Wust, E. Marth, K. Strasek, D. Stunzner, and T. Avsic-Zupanc. 2003.** Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophila* in Austria and the Czech Republic. *Ann N Y Acad Sci* 990: 103-106.
- Pfeffer, M., and G. Dobler. 2010.** Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasit Vectors* 3: 35.
- Pfister, K., A. Roesti, P. H. Boss, and B. Balsiger. 1987.** [Ehrlichia phagocytophila as the agent of grazing fever in the Berne highlands]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 129: 343-347.
- Philip, C. B. 1959.** Some epidemiological considerations in Rocky Mountain spotted fever. *Public Health Rep* 74: 595-600.
- Piccolin, G., G. Benedetti, C. Doglioni, C. Lorenzato, S. Mancuso, N. Papa, L. Pitton, M. C. Ramon, C. Zasio, and G. Bertiato. 2006.** A study of the presence of *B. burgdorferi*, *Anaplasma* (previously Ehrlichia) phagocytophilum, *Rickettsia*, and *Babesia* in *Ixodes ricinus* collected within the territory of Belluno, Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 6: 24-31.
- Piesman, J., and L. Gern. 2004.** Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology* 129: 191-220.
- Platonov, A. E., L. S. Karan, N. M. Kolyasnikova, N. A. Makhneva, M. G. Toporkova, V. V. Maleev, D. Fish, and P. J. Krause. 2011.** Humans Infected with Relapsing Fever Spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg Infect Dis* 17: 1816-1823.
- Polin, H., P. Hufnagl, R. Haunschmid, F. Gruber, and G. Ladurner. 2004.** Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria. *J Clin Microbiol* 42: 2285-2286.
- Postic, D., M. Garnier, and G. Baranton. 2007.** Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolates--description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *Int J Med Microbiol* 297: 263-271.
- Postic, D., N. M. Ras, R. S. Lane, M. Hendson, and G. Baranton. 1998.** Expanded diversity among Californian borrelia isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J Clin Microbiol* 36: 3497-3504.
- Poupon, M. A., E. Lommano, P. F. Humair, V. Douet, O. Rais, M. Schaad, L. Jenni, and L. Gern. 2006.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 72: 976-979.
- Puchhammer-Stockl, E., C. Kunz, C. W. Mandl, and F. X. Heinz. 1995.** Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clin Diagn Virol* 4: 321-326.
- Pusterla, N., J. B. Huder, K. Feige, and H. Lutz. 1998a.** Identification of a granulocytic Ehrlichia strain isolated from a horse in Switzerland and comparison with other rickettsiae of the Ehrlichia phagocytophila genogroup. *J Clin Microbiol* 36: 2035-2037.
- Pusterla, N., J. B. Huder, H. Lutz, and U. Braun. 1998b.** Detection of Ehrlichia phagocytophila DNA in *Ixodes ricinus* ticks from areas in Switzerland where tick-borne fever is endemic. *J Clin Microbiol* 36: 2735-2736.

- Pusterla, N., C. M. Leutenegger, J. B. Huder, R. Weber, U. Braun, and H. Lutz. 1999.** Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. *J Clin Microbiol* 37: 1332-1334.
- Pusterla, N., R. Weber, C. Wolfensberger, G. Schar, R. Zbinden, W. Fierz, J. E. Madigan, J. S. Dumler, and H. Lutz. 1998c.** Serological evidence of human granulocytic ehrlichiosis in Switzerland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17: 207-209.
- Randolph, S., and L. Gern. 2003.** Co-feeding transmission and its contribution to the perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia afzelii*. *Emerg Infect Dis* 9: 893-894; author reply 895-896.
- Randolph, S. E. 1995.** Quantifying parameters in the transmission of *Babesia microti* by the tick *Ixodes trianguliceps* amongst voles (*Clethrionomys glareolus*). *Parasitology* 110 (Pt 3): 287-295.
- Randolph, S. E., and D. J. Rogers. 2000.** Fragile transmission cycles of tick-borne encephalitis virus may be disrupted by predicted climate change. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 267: 1741-1744.
- Randolph, S. E., L. Gern, and P. A. Nuttall. 1996.** Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology today* 12: 472-479.
- Randolph, S. E., R. M. Green, M. F. Peacey, and D. J. Rogers. 2000.** Seasonal synchrony: the key to tick-borne encephalitis foci identified by satellite data. *Parasitology* 121 (Pt 1): 15-23.
- Randolph, S. E., D. Miklisova, J. Lysy, D. J. Rogers, and M. Labuda. 1999.** Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus. *Parasitology* 118 (Pt 2): 177-186.
- Randolph, S. E., L. Asokliene, T. Avsic-Zupanc, A. Bormane, C. Burri, L. Gern, I. Golovljova, Z. Hubalek, N. Knap, M. Kondrusik, A. Kupca, M. Pejcoch, V. Vasilenko, and M. Zygutiene. 2008.** Variable spikes in tick-borne encephalitis incidence in 2006 independent of variable tick abundance but related to weather. *Parasit Vectors* 1: 44.
- Raoult, D., and V. Roux. 1997.** Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 10: 694-719.
- Rar, V., and I. Golovljova. 2011.** Anaplasma, Ehrlichia, and "Candidatus Neoehrlichia" bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect Genet Evol* 11: 1842-1861.
- Rar, V. A., N. N. Livanova, V. V. Panov, E. K. Doroschenko, N. M. Pukhovskaya, N. P. Vysochina, and L. I. Ivanov. 2010.** Genetic diversity of Anaplasma and Ehrlichia in the Asian part of Russia. *Ticks Tick Borne Dis* 1: 57-65.
- Rar, V. A., N. V. Fomenko, A. K. Dobrotvorsky, N. N. Livanova, S. A. Rudakova, E. G. Fedorov, V. B. Astanin, and O. V. Morozova. 2005.** Tickborne pathogen detection, Western Siberia, Russia. *Emerg Infect Dis* 11: 1708-1715.
- Rar, V. A., T. I. Epikhina, N. N. Livanova, V. V. Panov, E. K. Doroshenko, N. M. Pukhovskaia, N. P. Vysochina, and L. I. Ivanov. 2011a.** [Study of the heterogeneity of 16s rRNA gene and groESL operone in the dna samples of Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia muris, and "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" determined in the Ixodes persulcatus ticks in the area of Urals, Siberia, and far east of Russia]. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*: 17-23.
- Rar, V. A., T. I. Epikhina, N. N. Livanova, V. V. Panov, E. K. Doroschenko, N. M. Pukhovskaya, N. P. Vysochina, and L. I. Ivanov. 2011b.** Genetic Variability of Anaplasma phagocytophilum in *Ixodes persulcatus* Ticks and Small Mammals in the Asian Part of Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis*.
- Rauter, C., and T. Hartung. 2005.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol* 71: 7203-7216.
- Rauter, C., R. Oehme, I. Diterich, M. Engele, and T. Hartung. 2002.** Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. *J Clin Microbiol* 40: 36-43.
- Ravyn, M. D., C. B. Kodner, S. E. Carter, J. L. Jarnefeld, and R. C. Johnson. 2001.** Isolation of the etiologic agent of human granulocytic ehrlichiosis from the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). *J Clin Microbiol* 39: 335-338.
- Reis, C., M. Cote, R. E. Paul, and S. Bonnet. 2010.** Questing Ticks in Suburban Forest Are Infected by at Least Six Tick-Borne Pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis*.
- Reye, A. L., J. M. Hubschen, A. Sausy, and C. P. Muller. 2010.** Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl Environ Microbiol* 76: 2923-2931.
- Richter, D., and F. R. Matuschka. 2006.** Perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia lusitaniae* by lizards. *Appl Environ Microbiol* 72: 4627-4632.

- Richter, D., and F. R. Matuschka. 2012. "Candidatus Neoehrlichia mikurensis," *Anaplasma phagocytophilum*, and Lyme disease spirochetes in questing European vector ticks and in feeding ticks removed from people. *J Clin Microbiol* 50: 943-947.
- Richter, D., D. B. Schlee, R. Allgower, and F. R. Matuschka. 2004. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Appl Environ Microbiol* 70: 6414-6419.
- Richter, D., D. Postic, N. Sertour, I. Livey, F. R. Matuschka, and G. Baranton. 2006. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 873-881.
- Richter, P. J., Jr., R. B. Kimsey, J. E. Madigan, J. E. Barlough, J. S. Dumler, and D. L. Brooks. 1996. *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) as a vector of *Ehrlichia equi* (Rickettsiales: Ehrlichieae). *J Med Entomol* 33: 1-5.
- Ricketts, H. 1906. The transmission of Rocky Mountain spotted fever by the bite of the wood-tick (*Dermacentor occidentalis*). *JAMA* 47: 358.
- Rijpkema, S. G., M. J. Molkenboer, L. M. Schouls, F. Jongejan, and J. F. Schellekens. 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J Clin Microbiol* 33: 3091-3095.
- Rosef, O., A. Paulauskas, and J. Radzijeuskaja. 2009. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks in relation to the density of wild cervids. *Acta Vet Scand* 51: 47.
- Roux, V., and D. Raoult. 2000. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 4: 1449-1455.
- Roux, V., M. Drancourt, and D. Raoult. 1992. Determination of genome sizes of *Rickettsia* spp. within the spotted fever group, using pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol* 174: 7455-7457.
- Rudenko, N., M. Golovchenko, L. Grubhoffer, and J. H. Oliver, Jr. 2009a. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato complex from the southeastern region of the United States. *J Clin Microbiol* 47: 134-141.
- Rudenko, N., M. Golovchenko, L. Grubhoffer, and J. H. Oliver, Jr. 2011. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis* 2: 123-128.
- Rudenko, N., M. Golovchenko, T. Lin, L. Gao, L. Grubhoffer, and J. H. Oliver, Jr. 2009b. Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Complex, *Borrelia americana* sp. nov. *J Clin Microbiol* 47: 3875-3880.
- Scharf, W., S. Schauer, F. Freyburger, M. Petrovec, D. Schaarschmidt-Kiener, G. Liebis, M. Runge, M. Ganter, A. Kehl, J. S. Dumler, A. L. Garcia-Perez, J. Jensen, V. Fingerle, M. L. Meli, A. Ensser, S. Stuenkel, and F. D. von Loewenich. 2011. Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum* ankA gene clusters. *J Clin Microbiol* 49: 790-796.
- Schex, S., G. Dobler, J. Riehm, J. Muller, and S. Essbauer. 2011. *Rickettsia* spp. in wild small mammals in Lower Bavaria, South-Eastern Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 493-502.
- Schlaefli, R., D. Randin, P. Wyss, S. de Vallière, P. Meylan, and A. Cometta. 2007. Méningo-encéphalite verno-estivale dans le Nord vaudois. *Rev Med Suisse* 3: 2609-2613.
- Schneider, H. 1931. Über epidemische akute Meningitis serosa. *Wien Klin Wochenschr* 44: 350-352.
- Schorn, S., K. Pfister, H. Reulen, M. Mahling, and C. Silaghi. 2011a. Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasit Vectors* 4: 135.
- Schorn, S., K. Pfister, H. Reulen, M. Mahling, J. Manitz, C. Thiel, and C. Silaghi. 2011b. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Ticks Tick Borne Dis* 2: 196-203.
- Schouls, L. M., I. Van De Pol, S. G. Rijpkema, and C. S. Schot. 1999. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 37: 2215-2222.
- Schwaiger, M., and P. Cassinotti. 2003. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol* 27: 136-145.
- Schwaiger, M., O. Peter, and P. Cassinotti. 2001. Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. *Clin Microbiol Infect* 7: 461-469.

- Scott, J. D., J. F. Anderson, and L. A. Durden. 2011.** Widespread dispersal of *Borrelia burgdorferi*-infected ticks collected from songbirds across Canada. *J Parasitol*.
- Scott, M. C., M. E. Rosen, S. A. Hamer, E. Baker, H. Edwards, C. Crowder, J. I. Tsao, and G. J. Hickling. 2010.** High-prevalence *Borrelia miyamotoi* infection among [corrected] wild turkeys (*Meleagris gallopavo*) in Tennessee. *J Med Entomol* 47: 1238-1242.
- Severinsson, K., T. G. Jaenson, J. Pettersson, K. Falk, and K. Nilsson. 2010.** Detection and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in seven study areas in Sweden. *Parasit Vectors* 3.
- Silaghi, C., J. Gilles, M. Hohle, V. Fingerle, F. T. Just, and K. Pfister. 2008a.** *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. *Emerg Infect Dis* 14: 972-974.
- Silaghi, C., J. Gilles, M. Höhle, I. Pradel, F. T. Just, V. Fingerle, H. Küchenhoff, and K. Pfister. 2008b.** Prevalence of Spotted Fever Group *Rickettsiae* in *Ixodes ricinus* (Acari: ixodidae) in Southern Germany. *J Med Entomol* 45: 948-955.
- Simser, J. A., A. T. Palmer, V. Fingerle, B. Wilske, T. J. Kurtti, and U. G. Munderloh. 2002.** *Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia*, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park. *Appl Environ Microbiol* 68: 4559-4566.
- Skotarczak, B., and A. Cichocka. 2001.** Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of *Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland. *Ann Agric Environ Med* 8: 187-189.
- Skrabalo, Z., and Z. Deanovic. 1957.** Piroplasmosis in man; report of a case. *Documenta de medicina geographica et tropica* 9: 11-16.
- Smorodintsev, A. A. 1958.** Tick-borne spring-summer encephalitis. *Prog Med Virol* 1: 210-247.
- Sonenshine, D. E. 1991.** Biology of ticks. New York: Oxford University Press 1.
- Spielman, A. 1976.** Human babesiosis on Nantucket Island: transmission by nymphal *Ixodes* ticks. *Am J Trop Med Hyg* 25: 784-787.
- Spiess, H., M. Mumenthaler, S. Burkhardt, and H. Keller. 1969.** [Central European encephalitis ("tick-borne encephalitis") in Switzerland]. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* 99: 277-282.
- Spitalska, E., I. Literak, E. Kocianova, and V. Taragel'ova. 2011.** The importance of *Ixodes arboricola* in transmission of *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the Czech Republic, Central Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 1235-1241.
- Spitalska, E., I. Literak, O. A. Sparagano, M. Golovchenko, and E. Kocianova. 2006.** Ticks (Ixodidae) from passerine birds in the Carpathian region. *Wien Klin Wochenschr* 118: 759-764.
- Spitalska, E., V. Boldis, Z. Kostanova, E. Kocianova, and K. Stefanidesova. 2008.** Incidence of various tick-borne microorganisms in rodents and ticks of central Slovakia. *Acta Virol* 52: 175-179.
- Sroka, J., J. Szymanska, and A. Wojcik-Fatla. 2009.** The occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from east Poland with the use of pcr. *Ann Agric Environ Med* 16: 313-319.
- Stanek, G. 2009.** [Pandora's Box: pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in Central Europe]. *Wien Klin Wochenschr* 121: 673-683.
- Steere, A. C. 1989.** Lyme disease. *N Engl J Med* 321: 586-596.
- Steere, A. C., S. E. Malawista, D. R. Snyderman, R. E. Shope, W. A. Andiman, M. R. Ross, and F. M. Steele. 1977.** Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum* 20: 7-17.
- Strube, C., S. Schicht, and T. Schnieder. 2011.** *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Rickettsia* spp. infections in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the region of Hanover (Germany). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 124: 512-517.
- Sumner, J. W., W. L. Nicholson, and R. F. Massung. 1997.** PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heat shock operon of Ehrlichia species. *J Clin Microbiol* 35: 2087-2092.
- Süss, J. 2003.** Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine* 21 Suppl 1: 19-35.
- Süss, J. 2008.** Tick-borne encephalitis in Europe and beyond--the epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill* 13.
- Süss, J., O. Kahl, H. Aspöck, K. Hartelt, A. Vaheri, R. Oehme, G. Hasle, H. Dautel, C. Kunz, N. Kupreviciene, S. Randolph, H. Zimmermann, B. Atkinson, G. Dobler, K. Kutsar, F. Heinz, and R. Steffen. 2010.** Tick-borne encephalitis in the age of general mobility. *Wien Med Wochenschr* 160: 94-100.

- Svendsen, C. B., K. A. Krogfelt, and P. M. Jensen. 2009.** Detection of *Rickettsia* spp. in Danish ticks (*Acari: Ixodes ricinus*) using real-time PCR. *Scand J Infect Dis* 41: 70-72.
- Takashima, I., K. Morita, M. Chiba, D. Hayasaka, T. Sato, C. Takezawa, A. Igarashi, H. Kariwa, K. Yoshimatsu, J. Arikawa, and N. Hashimoto. 1997.** A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus. *J Clin Microbiol* 35: 1943-1947.
- Taragel'ova, V., J. Koci, K. Hanincova, K. Kurtenbach, M. Derdakova, N. H. Ogden, I. Literak, E. Kocianova, and M. Labuda. 2008.** Blackbirds and song thrushes constitute a key reservoir of *Borrelia garinii*, the causative agent of borreliosis in Central Europe. *Appl Environ Microbiol* 74: 1289-1293.
- Tate, C. M., D. G. Mead, M. P. Luttrell, E. W. Howerth, V. G. Dugan, U. G. Munderloh, and W. R. Davidson. 2005.** Experimental infection of white-tailed deer with *Anaplasma phagocytophilum*, etiologic agent of human granulocytic anaplasmosis. *J Clin Microbiol* 43: 3595-3601.
- Telford, S. R., 3rd, and H. K. Goethert. 2004.** Emerging tick-borne infections: rediscovered and better characterized, or truly 'new' ? *Parasitology* 129 Suppl: S301-327.
- Telford, S. R., 3rd, J. E. Dawson, P. Katavolos, C. K. Warner, C. P. Kolbert, and D. H. Persing. 1996.** Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6209-6214.
- Thill, C., P. B. Backenson, M. A. Prusinski, S. J. Kogut, J. H. Lee, and J. L. Coleman. 2005.** Detection of *Babesia microti* DNA in *Ixodes scapularis* (*Acari: Ixodidae*) by use of Chelex 100 resin and polymerase chain reaction. *J Med Entomol* 42: 694-696.
- Thomas, R. J., J. S. Dumler, and J. A. Carlyon. 2009.** Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7: 709-722.
- Tijssen-Klasen, E., L. J. Jameson, M. Fonville, S. Leach, H. Sprong, and J. M. Medlock. 2011.** First detection of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in the UK. *Epidemiol Infect* 139: 524-529.
- Toledo, A., A. S. Olmeda, R. Escudero, I. Jado, F. Valcarcel, M. A. Casado-Nistal, M. Rodriguez-Vargas, H. Gil, and P. Anda. 2009.** Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. *Am J Trop Med Hyg* 81: 67-74.
- Tomanovic, S., Z. Radulovic, T. Masuzawa, and M. Milutinovic. 2010.** Coexistence of emerging bacterial pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in Serbia. *Parasite* 17: 211-217.
- Tonetti, N., M. Berggoetz, C. Rühle, A. M. Pretorius, and L. Gern. 2009.** Ticks and tick-borne pathogens from wildlife in the Free State Province, South Africa. *J Wildl Dis* 45: 437-446.
- Tonteri, E., A. E. Jaaskelainen, T. Tikkakoski, L. Voutilainen, J. Niemimaa, H. Henttonen, A. Vaheri, and O. Vapalahti. 2011.** Tick-borne encephalitis virus in wild rodents in winter, Finland, 2008-2009. *Emerg Infect Dis* 17: 72-75.
- van Overbeek, L., F. Gassner, C. L. van der Plas, P. Kastelein, U. Nunes-da Rocha, and W. Takken. 2008.** Diversity of *Ixodes ricinus* tick-associated bacterial communities from different forests. *FEMS Microbiol Ecol* 66: 72-84.
- Vitorino, L., I. M. Chelo, F. Bacellar, and L. Ze-Ze. 2007.** Rickettsiae phylogeny: a multigenic approach. *Microbiology* 153: 160-168.
- Vollmer, S. A., A. Bormane, R. E. Dinnis, F. Seelig, A. D. Dobson, D. M. Aanensen, M. C. James, M. Donaghy, S. E. Randolph, E. J. Feil, K. Kurtenbach, and G. Margos. 2009.** Host migration impacts on the phylogeography of Lyme Borreliosis spirochaete species in Europe. *Environ Microbiol* 13: 184-192.
- von Loewenich, F. D., B. U. Baumgarten, K. Schroppel, W. Geissdorfer, M. Rollinghoff, and C. Bogdan. 2003.** High diversity of *ankA* sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. *J Clin Microbiol* 41: 5033-5040.
- von Loewenich, F. D., W. Geissdorfer, C. Disque, J. Matten, G. Schett, S. G. Sakka, and C. Bogdan. 2010.** Detection of "Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*" in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. *J Clin Microbiol* 48: 2630-2635.
- Waldenström, J., A. Lundkvist, K. I. Falk, U. Garpmo, S. Bergstrom, G. Lindegren, A. Sjostedt, H. Mejlon, T. Fransson, P. D. Haemig, and B. Olsen. 2007.** Migrating birds and tickborne encephalitis virus. *Emerg Infect Dis* 13: 1215-1218.
- Wang, G., A. P. van Dam, I. Schwartz, and J. Dankert. 1999.** Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 12: 633-653.

- Wang, G., A. P. van Dam, A. Le Fleche, D. Postic, O. Peter, G. Baranton, R. de Boer, L. Spanjaard, and J. Dankert. 1997.** Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int J Syst Bacteriol* 47: 926-932.
- Welinder-Olsson, C., E. Kjellin, K. Vaht, S. Jacobsson, and C. Wenneras. 2010.** First case of human "Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*" infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Microbiol* 48: 1956-1959.
- Wicki, R., P. Sauter, C. Mettler, A. Natsch, T.ENZLER, N. Pusterla, P. Kuhnert, G. Egli, M. Bernasconi, R. Lienhard, H. Lutz, and C. M. Leutenegger. 2000.** Swiss Army Survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and tick-borne encephalitis virus in ticks. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19: 427-432.
- Wielinga, P. R., M. Fonville, H. Sprong, C. Gaasenbeek, F. Borgsteede, and J. Van der Giessen. 2009.** Persistent detection of *Babesia* EU1 and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* in The Netherlands during a 5-year surveillance: 2003-2007. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9: 119-121.
- Wielinga, P. R., C. Gaasenbeek, M. Fonville, A. de Boer, A. de Vries, W. Dimmers, G. Akkerhuis Op Jagers, L. M. Schouls, F. Borgsteede, and J. W. van der Giessen. 2006.** Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 72: 7594-7601.
- Wojcik-Fatla, A., E. Cisak, V. Zajac, J. Zwolinski, and J. Dutkiewicz. 2011.** Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks collected from the Lublin region (eastern Poland). *Ticks Tick Borne Dis* 2: 16-19.
- Woldehiwet, Z. 2008.** Immune evasion and immunosuppression by *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis. *Vet J* 175: 37-44.
- Woldehiwet, Z. 2010.** The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol* 167: 108-122.
- Wyler, R., and H. Matile. 1984.** [Tick-borne encephalitis in Switzerland. 1. Clinical course and epidemiology]. *Schweizerische Rundschau fur Medizin Praxis = Revue suisse de medecine Praxis* 73: 601-612.
- Younsi, H., M. Sarih, F. Jouda, E. Godfroid, L. Gern, A. Bouattour, G. Baranton, and D. Postic. 2005.** Characterization of *Borrelia lusitaniae* isolates collected in Tunisia and Morocco. *J Clin Microbiol* 43: 1587-1593.
- Zeman, P. 1997.** Objective assessment of risk maps of tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis based on spatial patterns of located cases. *Int J Epidemiol* 26: 1121-1129.
- Zilber, L. A. 1939.** Spring-summer tick-borne encephalitis (in Russian). *Arkhiv Biol Nauk* 56: 255-261.
- Zintl, A., G. Mulcahy, H. E. Skerrett, S. M. Taylor, and J. S. Gray. 2003.** *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clin Microbiol Rev* 16: 622-636.