

*Encéphalite à tiques en Suisse : suivi de
foyers établis dans le canton de Berne et
prospection de nouveaux foyers en Suisse
romande*

Thèse 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

Caroline Burri Cordonier

Acceptée sur proposition du jury :

Dr Lise Gern, directrice de thèse
Prof. Michel Brossard (Université de Neuchâtel, Suisse), rapporteur
Prof. Kurt Pfister (Ludwig-Maximilians-Universität, München), rapporteur
Dr Hanspeter Zimmermann (Office fédéral de la santé publique, Suisse),
rapporteur

Soutenue le 30 mai 2011
Présentée publiquement le 17 juin 2011

IMPRIMATUR POUR LA THESE

**Encéphalite à tiques en Suisse: suivi de foyers
établis dans le canton de Berne et prospection de
nouveaux foyers en Suisse romande**

Caroline BURRI CORDONIER

UNIVERSITE DE NEUCHATEL


FACULTE DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury

Mme Lise Gern (directrice de thèse), M. Brossard,
K. Pfister (Ludwig Maximilians Universität, München, D)
et H.-P. Zimmermann (OFSP, Berne)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 16 juin 2011


Le doyen
P. Kropf

*La pierre n'a point d'espoir d'être autre
chose que pierre. Mais de collaborer, elle
s'assemble et devient temple.*

Antoine de Saint-Exupéry

1. Résumé	IX
2. Introduction	1
2.1 Définition et systématique du virus de l'encéphalite à tiques (TBEV)	2
2.2 Vecteurs	5
2.2.1 Morphologie du genre <i>Ixodes</i>	6
2.2.2 Cycle de vie des <i>Ixodes</i>	7
2.2.3 Ecologie d' <i>Ixodes ricinus</i>	8
2.3 Hôtes vertébrés	10
2.4 Mécanismes d'infection des tiques	11
2.5 Manifestations cliniques chez l'homme	13
2.6 Distribution du TBEV	14
2.7 Autres pathogènes transmis par les <i>Ixodes</i>	16
2.7.1 Rickettsies	16
2.7.1.1 Généralités	16
2.7.1.2 Mécanismes d'infection des tiques	18
2.7.1.3 Manifestations cliniques et traitement	18
2.7.2 <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	19
2.7.2.1 Généralités	19
2.7.2.2 Mécanismes d'infection des tiques	20
2.7.2.3 Manifestations cliniques et traitement	20
2.7.3 Babésies	21
2.7.3.1 Généralités	21
2.7.3.2 Mécanismes d'infection des tiques	22
2.7.3.3 Manifestations cliniques et traitement	22
2.8 Objectifs de l'étude	22
3. Matériel et méthodes	25
3.1 Zones d'étude	25
3.2 Plaine de l'Orbe	25
3.2.1 Récolte de tiques <i>I. ricinus</i> en quête	27
3.2.2 Isolement et détection du TBEV chez les tiques en quête	27
3.3 Canton de Berne	27
3.3.1 Récolte de tiques <i>I. ricinus</i> en quête	28
3.3.2 Prises de données météorologiques	29
3.3.3 Capture de rongeurs et récolte de tiques gorgées	29
3.3.4 Détection d'anticorps contre le TBEV dans le sérum de rongeurs	30
3.3.5 Détection du TBEV chez les tiques en quête et les tiques de rongeurs	31
3.4 TBEV dans les tiques	33
3.4.1 Extraction ARN	33
3.4.2 PCR en temps réel (real-time RT-PCR)	33
3.4.3 Confirmation des échantillons positifs	34
3.4.4 Séquençage	34
3.5 Détection de pathogènes (<i>A. phagocytophilum</i> , <i>Rickettsia</i> spp., et <i>Babesia</i> spp.) chez les tiques de rongeurs du canton de Berne	35
3.5.1 Extraction ADN des pathogènes	35
3.5.2 Amplification ADN des pathogènes	35
3.5.3 Reverse Line Blot (RLB)	36
3.6 Détection et identification de l'ADN de l'hôte dans la tique <i>I. ricinus</i>	37
3.6.1 Extraction ADN de l'hôte	37
3.6.2 Amplification de l'ADN de l'hôte	37
3.6.3 Détection et identification de l'ADN de l'hôte	37

4. Résultats	39
4.1 Publication 1	41
4.2 Publication 2	63
4.3 Publication 3	97
4.4 Publication 4	111
4.5 Publication 5	131
5. Discussion et conclusions	153
6. Bibliographie	165
7. Remerciements	185
8. Annexe 1	187
8.1 Isolation ADN/ARN	187
8.1.1 Extraction ARN au TRIzol® selon Chomcynski et Sacchi (1987)	187
8.1.2 Extraction ADN d'hôtes à l'hydroxyde d'ammonium selon Guy et Stanek (1991) et Rijpkema et al. (1996)	188
8.2 Amplification et détection de l'ARN ou l'ADN	189
8.2.1 PCR en temps réel pour la détection du TBEV selon Schwaiger et Cassinotti (2003)	189
8.2.2 PCR en temps réel pour la détection d' <i>A. phagocytophilum</i> selon Courtney et al. (2004)	190
8.2.3 PCR et Nested PCR pour la détection du TBEV selon Saksida et al. (2005)	191
8.2.3.1 RT-PCR pour la transformation de l'ARN en ADNc	191
8.2.3.2 PCR et Nested PCR	192
8.2.4 PCR pour la détection de <i>Babesia</i> spp. selon Georges et al. (2001)	193
8.2.5 PCR pour la détection de <i>Rickettsia</i> spp. selon Jado et al. (2006)	194
8.2.6 PCR pour la détection d'hôtes selon Humair et al. (2007)	195
8.2.7 RLB	196
8.2.7.1 Activation de la membrane	196
8.2.7.2 Hybridation de la membrane	197
8.2.7.3 Déshybridation de la membrane	198
8.3 Amorces utilisées	198
8.4 Sondes utilisées	199
8.5 Purification du produit amplifié par PCR, préparation au séquençage	200
9. Annexe 2	201
9.1 Matériel et solutions pour l'extraction d'ARN	201
9.1.1 Matériel	201
9.1.2 Solutions	201
9.2 Matériel l'extraction d'ADN	201
9.3 Matériel pour PCR et PCR en temps réel pour la détection du TBEV	202
9.4 Matériel pour la RT-PCR de l'ARN en ADNc	202
9.4.1 Solutions pour gel d'agarose 2%	202
9.4.2 Matériel pour la purification	202
9.5 Matériel et solutions pour la RLB	203
9.5.1 Matériel	203
9.5.2 Solutions	203
10. Annexe 3	205
10.1 Génome du TBEV avec les différentes amorces utilisées	205
11. Annexe 4	207
11.1 Relevé floristique dans les sites du canton de Berne	207
11.2 Récoltes de tiques supplémentaires dans le canton de Berne	209

Mots clés : virus de l'encéphalite à tiques, *Ixodes*, Suisse, « co-feeding », micromammifères, microclimat, anticorps anti-TBEV, séquences TBEV, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia spp.*, *Rickettsia spp.*, prévalence.

Keywords : tick-borne encephalitis, *Ixodes*, Switzerland, co-feeding, small mammals, microclimate, serology, TBEV sequences, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia spp.*, *Rickettsia spp.*, prevalence.

1. Résumé

L'encéphalite à tiques (TBE) est une maladie qui touche le système nerveux central causée par un virus (TBEV) qui est principalement transmis par des tiques du genre *Ixodes*. Présent uniquement sur le continent eurasiatique, la particularité du TBEV est de se localiser sous forme de foyers. En Suisse, on parle de foyer lorsqu'au minimum 3 cas cliniques ont été déclarés auprès de l'Office fédéral de la santé publique dans un rayon de 10 à 15 Km et/ou si des tiques infectées par le TBEV sont détectées. De 1969 à 2005, tous les foyers de TBEV étaient regroupés dans le nord et l'est de la Suisse. Cependant, en 2006, de nouveaux foyers ont émergé à l'ouest du pays avec l'apparition de cas sporadiques, notamment dans la Plaine de l'Orbe/VD. Cette étude a permis de confirmer l'endémicité de cette région par la détection du TBEV chez les tiques en quête dans 5 (Agiez, Vugelles, l'Abergement et deux sites à Montcherand) des 26 sites investigués avec une prévalence de 0.1% (6/6120) variant de 0.29-0.59% selon les sites. La diversité génétique des virus infectant les tiques dans la Plaine de l'Orbe laisse penser que les oiseaux migrateurs pourraient avoir un rôle dans la dissémination de tiques infectées dans des biotopes favorables à la survie du TBEV.

Parallèlement, on a observé une augmentation du nombre de cas de TBE principalement en 2006, phénomène également rencontré dans d'autres pays européens. Les raisons de cette augmentation ont tout d'abord été attribuées aux changements climatiques qui auraient favorisé la survie de la tique *Ixodes ricinus*. Néanmoins, notre étude a montré que cette augmentation n'était pas directement liée à un réchauffement climatique mais semblait plutôt liée à un changement du comportement humain. En réponse à une augmentation des températures observées en 2006, l'être humain aurait augmenté les contacts avec des tiques infectées en se rendant plus fréquemment en forêt.

On sait cependant que le climat peut exercer une influence sur le comportement des tiques et favoriser le principal mode de transmission du TBEV, le « co-feeding » : le TBEV est transmis à des larves par des nymphes infectées. Néanmoins, en raison des conditions microclimatiques extrêmes observées au printemps 2007 dans certains sites étudiés du canton

1. Résumé

de Berne (Belp, Kiesen, Trimstein), une partie de la population de nymphes en quête a souffert de dessiccation. Ceci a eu pour conséquence de diminuer la proportion de rongeurs infestés par des larves et des nymphes réduisant ainsi les chances de transmission par « co-feeding ». Des printemps chauds à répétition pourraient donc faire disparaître des foyers de TBEV à certains endroits comme l'avait prédit Randolph (2001).

Nous avons également recherché la présence du TBEV dans le canton de Berne par l'analyse de tiques en quête et de tiques nourries sur des rongeurs. Dans deux sites connus pour héberger le TBEV (Thun et Belp), la prévalence du TBEV chez les tiques en quête était de 0.14%-0.2%, respectivement. Concernant les deux autres sites dont le statut de foyer était inconnu, le TBEV a pu être mis en évidence pour la première fois chez des tiques en quête à Kiesen avec une prévalence de 0.04% contrairement à Trimstein où sa présence n'a pas pu être démontrée. Tous les foyers identifiés ont par ailleurs été confirmés par la présence d'anticorps anti-TBEV dans le sérum de micromammifères. Pour la première fois, nous avons pu analyser individuellement des tiques nourries sur un rongeur (*Apodemus flavicollis*) et avons observé une prévalence de 11.9%.

Enfin, nous avons détecté des pathogènes émergents chez des tiques de micromammifères capturés dans les 4 sites du canton de Berne avec une prévalence de 9.7%. Nous avons identifié *Rickettsia helvetica* (7.1%), *R. monacensis* (0.2%), *Babesia microti* (1.7%) et *B. venatorum* (0.5%). *Anaplasma phagocytophilum* n'a pu être identifié que chez des tiques en quête (2%) à Kiesen. La présence de ces pathogènes montre qu'il existe un risque potentiel pour l'être humain de se faire infecter d'où l'intérêt d'attirer l'attention du corps médical sur les risques qui y sont associés.

2. Introduction

Avant d'entreprendre cette étude, la Suisse faisait face à deux problèmes concernant le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) : le premier était l'augmentation subite du nombre de cas d'encéphalite à tiques (TBE) à partir de 2004 jusqu'en 2006, le deuxième portait sur l'émergence de nouveaux foyers. Nous nous sommes donc intéressés à ces deux problèmes.

L'augmentation du nombre de cas de TBE qui a aussi été observée dans le reste de l'Europe a tout d'abord été attribuée aux changements climatiques (Lindgren et Gustafson 2001). En effet, suite à un climat plus doux, Lindgren et al. (2000) ont décrit en Suède une augmentation de la densité de tiques et un déplacement d'*Ixodes ricinus* aux frontières nord de l'Europe. D'autres études ont néanmoins montré que cette augmentation pouvait aussi être liée à d'autres facteurs tels que des changements sociaux politico-culturels (Randolph 2001), ou encore des changements dans la structure du paysage (Rizzoli et al. 2009).

Sumilo et Randolph (2004) ont émis l'hypothèse qu'une rapide augmentation des températures au printemps favorisait la synchronisation des larves et des nymphes en quête. Cette simultanéité des larves et des nymphes permettrait le maintien du cycle du TBEV grâce à la transmission par « co-feeding ». Cette transmission qui implique qu'une nymphe infectée transmette le virus à une larve non infectée au moment d'un repas simultané (co-repas) sur un même hôte (Labuda et al. 1993, Randolph et al. 1999) nécessite que les nymphes quêtent à la même hauteur que les larves afin d'infester la même gamme d'hôtes. Ce dernier point étant facilité lorsque les conditions climatiques sont plus sèches (Storey and Randolph, 1999). Nous avons donc choisi d'étudier l'impact des conditions microclimatiques sur la densité des tiques en quête et sur le co-repas entre larves et nymphes qui infestent les micromammifères dans 4 sites du canton de Berne (Thun, Belp, Kiesen, Trimstein) afin d'établir les conséquences pour le maintien d'un foyer de TBEV.

En Suisse, les premiers foyers de TBEV ont été découverts par Wyler et Matile (1984). Au nombre de 12, ces foyers ont été détectés soit par l'isolement du virus à partir des tiques soit par des cas cliniques répétés dans une même région. Ainsi, le TBEV se distribuait dans un périmètre englobant le nord-est de la Suisse avec Ins/BE comme limite ouest (Wyler et Matile 1984, de Marval 1994), région dans laquelle Matile avait isolé le virus à partir de tiques (Matile 1982). Plus tard, de Marval (1994) a recherché la présence du virus dans plusieurs régions de Suisse localisées à l'intérieur et à l'extérieur du périmètre connu du TBEV. Mais ses investigations n'ont pas montré une extension des foyers vers l'ouest. Depuis la déclaration obligatoire de cette

maladie en 1984, l'Office Fédérale de la Santé Publique (OFSP) se base sur deux critères pour établir les foyers. Le premier critère s'appuie sur la déclaration d'un minimum de 3 cas cliniques dans un périmètre de 10 à 15 Km. Ce critère pose cependant un problème pour les endroits localisés en-dehors du périmètre habituel de distribution du TBEV comme c'est le cas dans l'ouest de la Suisse depuis 2006. En effet, seuls des cas sporadiques (1-2 cas) ont été répertoriés dans cette région. Mais ces quelques cas suffisent-ils pour déclarer une région comme étant endémique ? La réponse à cette question pourrait aider à mieux cibler les recommandations de vaccination. C'est pourquoi, dans cette étude, nous nous sommes intéressés à rechercher la présence du TBEV dans les tiques récoltées dans une zone nouvellement jugée comme endémique, la Plaine de l'Orbe/VD, afin d'en confirmer son endémicité.

Ces dernières années, en Europe, nous avons également assisté à l'apparition de cas cliniques causés par d'autres pathogènes transmis par la tique *I. ricinus* (Hildebrandt et al. 2010a, b). Ainsi, des microorganismes tels qu'*Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. et *Babesia* spp. sont considérés comme pathogènes émergents (Hildebrandt et al. 2010a). En Suisse, *A. phagocytophilum* est pour le moment connu comme un pathogène d'importance vétérinaire seulement (Pfister et al. 1987, Pusterla et al. 1997, Pusterla et al. 1998a). Des études sérologiques ont cependant montré la présence de ce pathogène chez des personnes résidant en Suisse (Pusterla et al. 1999). *A. phagocytophilum* a également été décrit en Suisse dans des tiques en quête (Pusterla et al. 1998b), des tiques nourries sur des micromammifères ainsi que chez des micromammifères (Liz et al. 2000). Concernant les rickettsies, aucun cas local n'a été confirmé en Suisse. Cependant, *R. helvetica* a été détecté chez des *I. ricinus* en quête sur la végétation (Beati et al. 1994) et des études sérologiques ont aussi montré sa présence chez des mammifères sauvages et domestiques (Péter et al. 1981, Péter 1985). Quant aux espèces de *Babesia*, trois d'entre elles, *B. microti*, *B. divergens* et *B. venatorum*, ont été détectées en Suisse chez *I. ricinus* (Foppa et al. 2002, Casati et al. 2006, Hilpertshausen et al. 2006). Un seul cas humain causé par *B. microti* a été déclaré en Suisse (Meer-Scherrer et al. 2004), bien qu'aux Grisons, des anticorps anti-Babesia aient été détectés chez des résidents de ce canton (Foppa et al. 2002). Nous avons donc voulu compléter nos connaissances sur ces pathogènes en analysant une partie des tiques nourries sur des micromammifères capturés dans le canton de Berne.

2.1 Définition et systématique du virus de l'encéphalite à tiques (TBEV)

L'encéphalite à tiques a plusieurs appellations pour un même terme qui à l'origine désigne une entité clinique qui touche le système nerveux. Dans la littérature, on la surnomme le plus

2. Introduction

souvent: MEVE (Méningo-encéphalite verno-estivale), FSME (FrühSommer-Meningo Enzephalitis), TBE (Tick-Borne Encephalitis), RSSE (Russian Spring Summer Encephalitis), maladie de Schneider, ou encore CEE (Central European Encephalitis) (Haller 1992). Dans cette étude, nous allons utiliser le terme anglais, TBE.

Le TBE qui est une arbovirose due à son mode de transmission (Labuda et Nuttall 2004, Grard et al. 2007), est connu depuis les années 20 en Europe mais a été décrit cliniquement pour la première fois en Autriche par Schneider en 1931 (Schneider 1931). C'est seulement six ans plus tard que Zilber montre que le vecteur est, dans l'est de la Russie, la tique *I. persulcatus* (Labuda et Nuttall 2004), et en Europe occidentale, *I. ricinus*. En 1939, Pavlovsky montre que la maladie est liée aux mammifères (Pavlovsky 1947). Il faudra attendre 1948 pour que le virus puisse être isolé pour la première fois en Tchécoslovaquie (Zimmermann et Koch 2005). Cet arbovirus appartient à la famille des *Flaviviridae* qui comprend 3 genres : les *Flavivirus*, les *Hepacivirus* et les *Pestivirus* (Calisher et Gould 2003). Le virus du TBE (TBEV) fait partie du genre des *Flavivirus* et se divise en trois groupes classés selon leur vecteur (tiques, moustiques, vecteurs inconnus) (Labuda et Nuttall 2004, Grard et al. 2007). Les maladies les plus connues dues au virus appartenant à ce genre sont la fièvre jaune, le virus du Nil occidental, la dengue et l'encéphalite japonaise. Les virus responsables de ces dernières sont transmis aux vertébrés par des moustiques (Labuda et Nuttall 2004). Les *Flavivirus* ayant les tiques comme vecteurs sont scindés en deux groupes, celui des mammifères et celui des oiseaux de mer. Ainsi, neuf groupes faisant intervenir les tiques comme vecteurs appartiennent à ce genre dont celui du complexe du TBE (Calisher et al. 1989, Grard et al. 2007) (Tableau 1).

Groupe de <i>Flavivirus</i> transmis par les tiques aux mammifères	Groupe de <i>Flavivirus</i> transmis par les tiques aux oiseaux de mer
Encéphalite à tiques (a)	Virus Tyuleniy
Louping ill (a)	Virus Saumarez reef
Fièvre hémorragique d'Omsk (a)	Virus Meaban
Virus Langat (a)	
Maladie de la forêt de Kyasanur (a)	
Virus Powassan (a)	
Virus Royal farm	
Virus Karshi	
Virus Gadgets Gully	

Tableau 1: Groupes de *Flavivirus* transmis par les tiques aux mammifères et aux oiseaux de mer selon Gritsun et al. (2003a), Grard et al. (2007). (a) pathogènes pour l'homme.

2. Introduction

Depuis l'an 2000, selon le Septième rapport du comité international pour la taxonomie des virus (Heinz et al. 2000), le virus du TBE comprend trois sous-types respectivement : Européen, abrégé W-TBEV, Extrême-Orient dit FE-TBEV et Sibérien, abrégé S-TBEV. Ils ont été établis selon la distribution géographique, les différences génétiques et les propriétés antigéniques des virus (Gritsun et al. 1997). Ils sont néanmoins proches antigéniquement et phylogénétiquement (Ecker et al. 1999, Gritsun et al. 2003b). Le virion des *Flavivirus* est de forme sphérique et mesure 50 nm de diamètre. Il se compose d'une enveloppe protéique (C) de forme icosaédrique et d'un noyau contenant le génome qui est constitué d'un simple brin d'ARN à polarité positive d'une longueur d'environ 11'000 nucléotides. La capsid (C) est entourée d'une double couche lipidique dérivée des membranes de l'hôte, une membrane protéinique (M) et une enveloppe protéinique plus grande (E) (Heinz et Mandl 1993) (Figure 1).

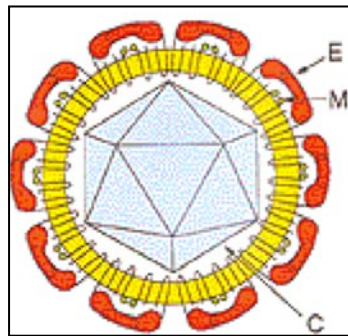


Figure 1: Schéma d'un virion mature selon F.X Heinz (<http://www.maladies-a-tiques.com/Les-viroses.htm>).

Cette protéine E est impliquée dans l'immunogénicité et l'identification du virus (Haller 1992). Le génome est formé de deux régions 5' et 3' non codantes (RNC) et code pour un seul cadre de lecture (ORF) respectivement pour une polyprotéine composée de trois protéines de structures (C, M et E) et 7 protéines non-structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) (Chambers et al. 1990, Gresikova et Kaluza 1997, Gritsun et al. 2003b) (Figure 2).

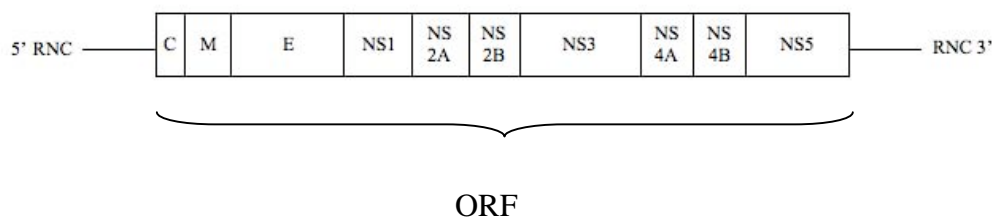


Figure 2: Organisation du génome selon Heinz et Mandl (1993).

La réplication de l'ARN viral a lieu dans la région périnucléaire de la cellule hôte (Coia et al. 1988, Heinz et Mandl 1993).

2.2 Vecteurs

Les tiques sont des ectoparasites hématophages obligatoires appartenant à la classe des *Chelicerata*, à l'ordre des *Acari* et au sous-ordre des *Ixodida* (*Metastigmata*). Ce dernier comprend trois familles : *Ixodidae*, *Argasidae*, *Nuttalliellidae*.

Les membres de la famille des *Ixodidae* sont les plus nombreux avec 12 genres et 683 espèces. Le genre *Ixodes* comptant à lui seul 241 espèces (Horak et al. 2002).

Les tiques appartenant à la famille des *Ixodidae* peuvent transmettre plusieurs agents pathogènes responsables de maladies d'importance vétérinaire et humaine. En Europe, *I. ricinus* est le vecteur de nombreux pathogènes dont: le TBEV, des bactéries comme *Borrelia burgdorferi*, des *Anaplasma*, certaines Rickettsies, et des protozoaires comme *Babesia*. Une autre espèce, *I. trianguliceps*, semble elle aussi impliquée dans la circulation de certains pathogènes comme certaines *Borrelia* (Gorelova et al. 1996) et *B. microti* (Randolph 1995). Son rôle dans le maintien du TBEV au sein d'une population de rongeurs a aussi été suggéré (Aeschlimann et al. 1979). La particularité d'*I. trianguliceps* est d'être endophile c'est-à-dire qu'en dehors des stades parasitaires, elle vit dans les nids et les galeries de ses hôtes, que sont les rongeurs et les insectivores (Aeschlimann et al. 1970, Randolph 1975). Par conséquent, son développement dépend essentiellement de ses hôtes spécifiques (monotrope) (Aeschlimann et al. 1970) et non des conditions climatiques externes. Cependant, les travaux de Randolph (1975) ont montré que la température pouvait influencer son développement car plus la température (<25°C) baisse, plus son développement ralentit. L'activité des nymphes et des adultes semble biannuelle avec l'apparition d'un pic au printemps et en automne tandis que les larves sont actives toute l'année (Aeschlimann et al. 1970, Cotton et Watts 1967). Les biotopes dans lesquels on peut la trouver ont comme caractéristiques d'avoir une humidité élevée (Aeschlimann et al. 1970). Pourtant une étude menée en Suisse a montré que, malgré une distribution allant de la plaine en altitude (dès 1500 m) dans des biotopes adéquats avec des hôtes adéquats, sa répartition au sein d'un même biotope n'était pas régulière (Aeschlimann et al. 1970).

2.2.1 Morphologie du genre *Ixodes*

A jeun, la taille des *Ixodes* varie selon leur stade de développement (larve-nymphe-adulte). Par exemple, *I. ricinus* mesure moins d'1 mm au stade de larve et mesure jusqu'à près de 4 mm au stade adulte et plus précisément chez les femelles (Gern 2004).

2. Introduction

Le corps des *Ixodes* est segmenté en deux parties : le gnathostome ou capitulum (tête en latin) à l'avant et l'idiosome qui est formé d'une cuticule souple à l'arrière permettant d'augmenter le volume lors de la réplétion (Wall et Schearer 2001).

Le capitulum est composé d'une *basis capituli* portant les pièces buccales (ou rostre). On distingue latéralement les pédipalpes (rôle sensoriel), au centre, l'hypostome garni de dents et servant à l'ancrage de l'hôte et une paire de chélicères rétractiles dans une gaine protectrice terminés par des dents pour percer la peau (Wall et Schearer 2001).

L'idiosome est composé d'une plaque dorsale sclérifiée (scutum) qui caractérise ces arthropodes et leur vaut l'appellation de « tiques dures ». Chez le mâle, le scutum recouvre entièrement la surface dorsale du corps tandis que chez la larve, la nymphe et la femelle, cette plaque ne recouvre que la partie antérieure du corps. Les pattes sont formées de six segments : coxa, trochanter-fémur, patelle, tibia, tarse terminé par une ventouse et deux griffes. La larve est hexapode tandis que la nymphe, la femelle et le mâle ont une paire de pattes supplémentaire. La première paire de pattes est pourvue de l'organe de Haller, organe olfactif qui permet à la tique de repérer notamment ses proies, et de poils qui sont sensibles aux vibrations et aux variations de température. Le pore génital s'ouvre sur la partie ventrale antérieure de l'idiosome tandis que le pore anal se situe sur la partie postérieure (Wall et Schearer 2001).

Les caractéristiques morphologiques permettent de différencier les espèces. Par exemple, la position du « sillon anal » (antérieur ou postérieur à l'anus) différencie la famille des *Ixodes* des autres tiques dures. *I. ricinus* et *I. trianguliceps* se distinguent essentiellement par l'identification des pièces buccales et des premières coxae. Chez *I. ricinus*, la taille du rostre est plus grande que chez *I. trianguliceps* avec une absence d'une épine coxale chez *I. trianguliceps*. De plus, on observe un prolongement dorsal et ventral de l'article 1 du pédipalpe chez *I. trianguliceps* (Cotty 1985).

La tique du genre *Ixodes* passe la majorité de sa vie à attendre le passage d'un hôte. Une fois qu'elle le trouve, elle va se gorger de son sang jusqu'à ingurgiter un volume d'environ 100 fois supérieur à son poids à jeun (Süss 2003). Ainsi, on comprend pourquoi son système digestif occupe tout l'espace de son corps. Formé en majorité de diverticules (caeca) dans la partie médiane, la partie antérieure comprend le pharynx et l'œsophage et la partie postérieure comprend l'ampoule rectale et l'anus. Les glandes salivaires qui se trouvent par paire en positions latérales de la partie antérieure du corps de la tique sont sous forme de grappes. Celles-ci sont constituées de trois types d'acini ayant des fonctions propres comme la production de ciment qui sert à l'ancrage des pièces buccales, de substances vasodilatatrices et autres substances immunosuppressives pour agir sur le système immunitaire de l'hôte (Parola et Raoult

2. Introduction

2001, Brossard et Wikel 1997). C'est aussi dans les glandes salivaires que les agents pathogènes transitent avant d'être injectés dans l'hôte. Tous les organes et les tissus baignent dans l'hémolymphe (système circulatoire). Le système respiratoire est, quant à lui, composé de trachées, le système excréteur de tubes de Malpighi, et le système nerveux du synganglion qui est traversé par l'œsophage.

2.2.2 Cycle de vie des *Ixodes*

Le cycle de vie du genre *Ixodes* se déroule en trois stades (larve-nymphe-adulte) (Gern 2004). À chaque phase, la tique doit attendre le passage d'un hôte vertébré. Le sang de ce dernier pourra alors contribuer à son développement. La larve, une fois sortie de l'œuf, va se poster à l'affût sur la végétation pour son premier repas de sang. Une fois gorgée après 2 à 3 jours, la larve se laisse tomber au sol pour ainsi commencer la digestion du sang ingéré et muer au stade suivant, celui de nymphe. Celle-ci va reproduire le même schéma qu'à l'état de larve mais avec un repas sanguin qui dure un peu plus longtemps, de 5 à 6 jours, pour finalement muer en adulte (Gern 2004). À ce stade du développement, le dimorphisme sexuel devient alors évident. Tandis que le mâle ne se nourrit pas ou très peu, la femelle se nourrit entièrement une dernière fois pendant 7 à 10 jours du sang d'un hôte pour assurer la production des œufs (Gern 2004). L'accouplement a lieu soit au sol, soit sur l'hôte lors du repas sanguin de la femelle, et l'oviposition de milliers d'œufs aura lieu après huit à 30 jours, suivie de la mort de la femelle après la ponte (Figure 3).

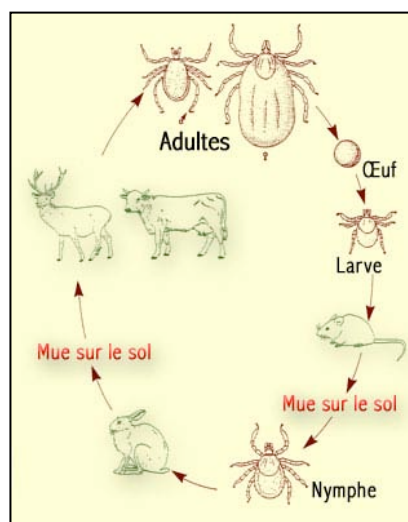


Figure 3: Cycle de vie d'une tique (ici, *I. ricinus*) selon www.domenicus.malleotus.free.fr.

Bien que le cycle pourrait se boucler en une année, la disponibilité des hôtes et les conditions environnementales (température, humidité relative, photopériode) font qu'en général un seul stade peut être accompli en une année. Le cycle de vie peut ainsi varier entre deux et six ans (Anderson 1991, Gray 1991).

2.2.3 Ecologie d'*Ixodes ricinus*

I. ricinus est la tique qu'on retrouve le plus fréquemment en Europe. On la rencontre de l'Afrique du Nord jusqu'en Scandinavie et de l'Irlande au centre de la Russie (Lindgren et al. 2000) à l'exception de l'Islande (Hubalek et Halouska 1997). Pourtant, malgré une large répartition, *I. ricinus* ne colonise que certains biotopes. En effet, sujette à la dessiccation par sa petite taille, une humidité relative inférieure à 80% peut lui être fatale (Gray 1991). *I. ricinus* a donc besoin d'un apport suffisant en humidité pour assurer son développement. Ainsi, on la trouve dans des milieux avec un couvert végétal dense et une litière humide riche en feuilles mortes. Les forêts mixtes ou les forêts de feuillus, et les régions boisées offrent des conditions favorables à la survie de cette espèce. On la rencontre aussi dans les pâturages d'Irlande (Gray et al. 1995) mais en général les milieux ouverts exposés au soleil et au vent ne lui sont pas propices (Gern et Humair 2002, Burri et al. 2007). En Suisse, la tique *I. ricinus* a été retrouvée dans les forêts mixtes, les forêts riches en sous-bois, les hêtraies, les chênaies et les bordures de chemins forestiers (Gern et Humair 2002). Par contre, on ne la rencontre plus au-delà de 1450 m d'altitude (Cotty 1985).

I. ricinus se nourrit sur une gamme d'hôtes assez large incluant les petits comme les grands mammifères, les oiseaux et même les reptiles (Aeschlimann 1972, Humair et al. 1993). L'homme compte aussi parmi ses hôtes, mais n'intervenant qu'accidentellement dans son cycle, on dit de lui que c'est un hôte accidentel. Les stades immatures (larves et nymphes) infestent plutôt des mammifères de petite et moyenne taille tandis que les adultes préfèrent les hôtes de moyenne et grande taille (Tälleklint et Jaenson 1994, Gern et Humair 2002). Comme *I. ricinus* est exophile (Cotty et al. 1986), elle attend son hôte au sommet de la végétation (Lees et Milne 1951) à différentes hauteurs selon son stade de développement pour augmenter ses chances de rencontrer un hôte potentiel (Mejlon et Jaenson 1997, Gigon 1985). Lorsqu'elle est à la recherche d'un hôte, on dit qu'elle est active ou qu'elle quête. En Suisse, son activité s'étend en général de février à novembre avec un pic d'activité au printemps avec parfois un second pic en automne (Gern et Humair 2002). Cette évolution de densité de tiques en quête varie non seulement selon l'année (Jouda et al. 2004a, Morán Cadenas et al. 2007a), mais aussi selon sa distribution géographique (Gray 1991, Korenberg 2000) car cette évolution saisonnière qu'on

2. Introduction

désigne souvent par le terme de phénologie implique une notion de climat. En effet, les variations climatiques expliquent ces différences observées dans l'activité saisonnière d'*I. ricinus* (Perret et al. 2004, Randolph et al. 2002, Perret et al. 2000). Plusieurs facteurs climatiques influencent son activité de quête. Le début de son activité au printemps est lié à la température (Perret et al. 2000). La nymphe ne pourra débuter son activité qu'au moment où la température maximale journalière aura atteint 7°C pendant cinq jours (Perret et al. 2000). Les larves, quant à elles, sont actives dès 10°C (Randolph 2004). Ainsi, la température pendant les premiers mois de l'année déterminera le début de l'activité des tiques mais aussi la date du pic printanier (Perret 2003). Quant au pic d'automne qui est, lui aussi, influencé par les températures du mois de mars à juin, il est soit la résultante des larves qui se sont gorgées au printemps et qui ont pu muer en nymphes la même année, soit dû à la réémergence des nymphes qui n'ont pas trouvé d'hôtes au printemps (Morán Cadenas et al. 2007). Avec l'arrivée des basses températures, *I. ricinus* se réfugie dans la litière du sol et diminue son activité métabolique (diapause) pour passer l'hiver.

L'humidité relative est aussi un important facteur. *I. ricinus* requiert entre 86 et 96% d'humidité relative pour assurer sa balance hydrique et continuer son activité (Knülle et Rudolph 1982). Ainsi, ses réserves en eau lui permettent de contrer les variations climatiques sur une courte période sans devoir en subir les conséquences (Perret et al. 2004). Mais, passé un certain seuil, *I. ricinus* cesse son activité de quête pour descendre se réhydrater au sol (Lees 1946, Lees et Milne 1951). Plus sensibles à la dessiccation, les immatures quêtent dans les strates les plus basses de la végétation, là où l'humidité relative est la plus élevée tandis que les adultes attendent leur hôte au sommet des hautes herbes.

Le déficit de saturation (DS), combinaison entre la température et l'humidité relative, est une mesure du pouvoir desséchant de l'air et est un des facteurs expliquant le mieux la proportion de tiques en quête. En effet, Perret et al. (2000) a démontré que le déclin abrupt de l'activité de quête des nymphes est lié à un DS élevé. Les adultes étant plus résistants à la dessiccation étaient moins affectés que les nymphes. Quant aux larves, elles deviennent quiescentes (phase de repos) sous des conditions sèches (5-10mmHg), tandis que les nymphes continuent de quêter mais à un niveau plus bas dans la végétation (Randolph et Storey 1999). Lorsque les conditions sont à nouveau optimales, larves et nymphes reprennent leur poste à leur hauteur respective. Sensible à la dessiccation, *I. ricinus* redescend régulièrement le long de son support vers le sol puis y remonte lorsqu'elle est hydratée. Cependant, une longue période de conditions microclimatiques trop desséchantes (>10mmHg) oblige les tiques à redescendre plus fréquemment vers la végétation. Ces mouvements d'aller-retour le long de son support entraînent ainsi une perte des

ressources d'énergie considérable. La résultante est que l'activité de quête est réduite et peut mener à la mort des tiques, principalement celle des nymphes (Perret et al. 2004). Des valeurs de DS élevées au printemps contribueraient à augmenter la mortalité chez les tiques ce qui réduirait fortement l'activité de quête se traduisant par une diminution du pic au printemps. Mais l'observation d'une diminution de la densité des tiques en quête peut aussi s'expliquer par le fait qu'elles ont déjà trouvé leurs hôtes (Randolph 2004).

2.3 Hôtes vertébrés

Un foyer de TBE peut exister grâce à la présence d'une population de tiques stable maintenue par des vertébrés qui permettent d'une part la circulation du virus et d'autre part qui renouvellent la population de tiques (Nosek et Grülich 1967). Mais tous les vertébrés n'ont pas la même compétence pour la circulation du virus. Les ongulés par exemple ne sont pas compétents pour transmettre le virus aux tiques (Labuda et al. 2002). Un hôte est considéré comme réservoir si le taux de réplication du virus dans le sang (virémie) est suffisamment élevé pour pouvoir le transmettre aux tiques. Cependant, si la virémie est trop faible ou au contraire trop importante, ce qui peut entraîner la mort de l'hôte comme il a été montré chez *Pitymys subterraneus* (Labuda et Randolph 1999), la transmission n'a pas lieu. Les grands mammifères ont un titre de virus très bas ce qui fait d'eux des hôtes non compétents (Gerth et al. 1995). Ils sont néanmoins des hôtes indispensables car ils contribuent à maintenir la population de tiques et c'est pourquoi on les appelle des hôtes d'amplification (Chemini et al. 1997, Hudson et al. 2001, Labuda et al. 2002, Charrel et al. 2004).

Un large éventail d'hôtes vertébrés qui inclut des insectivores (*Talpa europea*, *Sorex araneus*) et au moins 10 espèces de rongeurs sont considérées comme hôtes réservoirs pour le TBEV (voir dans Labuda et al. 1993a, Kozuch et al. 1967). Le TBEV a pu être isolé ou détecté par sérologie chez plusieurs espèces d'oiseaux tels que les Anatidés et les Gallinacées (Hubálek 1994). Cependant, le rôle des oiseaux en tant que réservoirs pour le TBEV est peu connu. Ainsi, les hôtes réservoirs les plus importants sont *Apodemus flavicollis*, *A. sylvaticus* et *Myodes glareolus* car ce sont eux qui abondent le plus dans les foyers de TBE et qui sont les plus infestés par les stades immatures de l'espèce *I. ricinus* (Labuda et al. 1993a, Moshkin et al. 2009). Malgré le fait que la virémie ne dure que 2 à 3 jours (Kozuch et al. 1981) chez les rongeurs, ces derniers permettent néanmoins une transmission par « co-feeding » ne nécessitant donc pas de virémie chez l'hôte (cf. 2.4).

Les tiques sont aussi considérées comme des réservoirs car elles ont la capacité de maintenir le virus tout au long de leur vie. Les tiques peuvent aussi transmettre le virus à leur descendance

(Danielová et Holubová 1991) (cf. 2.4). Il a été démontré que parmi les quelques 850 espèces de tiques connues dans le monde, 14 espèces, dont 8 (*I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. hexagonus*, *I. arboricola*, *Haemaphysalis punctata*, *H. concinna*, *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*) se trouvent en Europe, pouvaient transmettre le virus en laboratoire mais celles responsables de la transmission à l'homme sont principalement *I. ricinus* et *I. persulcatus* (Süss 2003).

2.4 Mécanisme d'infection des tiques

Chez la tique, il existe plusieurs voies possibles pour que le TBEV puisse être transmis. La tique peut s'infecter lors d'un repas sanguin sur un hôte virémique. Le TBEV entre dans le lumen de l'intestin, se réplique dans l'intestin et infecte les glandes salivaires. Ainsi, la tique peut s'infecter à chaque stade de son développement lors de chaque repas pris sur un hôte infecté. Elle peut aussi s'infecter par voie transovarienne mais avec un faible pourcentage de transmission pour le TBEV avec 0.2-0.8% de larves infectées (Danielová et Holubová 1991). Lorsqu'une tique infectée se nourrit sur un hôte non infecté, le TBEV peut être transmis par voie transstadiale (Binn 1987) et par voie sexuelle (Gerlinskaya et al. 1997). Le TBEV peut aussi se transmettre d'une tique infectée à une tique non infectée par le biais de cellules migratoires qui se trouvent dans la peau du vertébré en l'absence de virémie (Jones et al. 1987, Labuda et al. 1993a). Lorsqu'une tique infectée pique son hôte, ce dernier active son système immunitaire en recrutant ses cellules de défense (neutrophiles, monocytes/macrophages, cellules de Langerhans) présentes dans la peau et le sang au site d'inoculation (Urban et al. 2006). Le virus utilise ces cellules pour se répliquer au site de la piqûre. Il utilise aussi ces cellules comme moyen de transport pour se diriger et se répliquer vers les autres sites de piqûres induites par d'autres tiques non infectées (Labuda et al. 1996). Certains facteurs présents dans la salive de la tique qu'on dénomme « Saliva Activated Transmission (SAT) factors » semblent faciliter la transmission du virus comme l'ont démontré Jones et al. (1987) pour le virus du Thogoto et Labuda et al. (1993b, c) pour le TBEV. Le facteur SAT est une protéine synthétisée dans les glandes salivaires de la tique lors du repas sanguin qui facilite le repas et module le site d'attachement de la tique. Cette transmission qu'on appelle aussi « co-feeding » a lieu lorsqu'une ou plusieurs nymphes infectées se nourrissent sur un hôte réservoir non virémique au même moment que des larves non infectées (Figure 4).

2. Introduction



Figure 4: Transmission du virus par « co-feeding ».

Mais tous les vertébrés ne répondent pas à ce type de transmission, c'est le cas chez les hérissons (*Erinaceus europaeus*), les faisans (*Phasianus colchicus*), les merles (*Turdus merula*) et les chèvres (Labuda et Randolph 1999) car les cellules immunocompétentes nécessaires à la réplication du virus ne sont pas présentes au site d'inoculation chez ces mammifères (Labuda et Randolph 1999). D'autre part, le succès de gorgement des tiques est différent selon la réponse immunitaire de l'hôte. Ainsi, les espèces telles qu'*Apodemus* et *M. glareolus* ont une meilleure chance de transmission avec un succès de gorgement des tiques allant de 44% pour *M. glareolus* à 77% pour les *Apodemus* (Labuda et al. 1993a).

La condition *sine qua non* pour que la transmission par « co-feeding » ait lieu est d'avoir une synchronisation des larves et des nymphes lorsqu'elles sont en recherche d'un hôte. Cette simultanéité ne peut se faire que sous certaines conditions climatiques. La première est d'atteindre rapidement le seuil de 10°C au printemps afin de permettre aux larves d'être actives au même moment que les nymphes, celles-ci étant en quête dès 7°C (Perret et al. 2000, Randolph 2004). Mais comme *I. ricinus* requiert un minimum de 80% d'humidité relative pour vivre (Gern et Humair 2002), ce facteur doit aussi être pris en considération. Les larves, plus sensibles à la dessiccation que les nymphes, quêtent plus proche du sol occupant ainsi des strates de végétation différentes de celles des nymphes (Mejlon et Jaenson 1997). La conséquence est que larves et nymphes attrapent une gamme d'hôtes différente lorsque l'humidité relative est élevée. On retrouve fréquemment les nymphes sur des hôtes de plus grande taille comme les chevreuils alors que les petits mammifères sont principalement infestés par des larves (Tälleklint et Jaenson 1994). Des conditions climatiques plus sèches peuvent alors favoriser l'infestation simultanée des rongeurs par des larves et nymphes. Une étude menée en laboratoire par Randolph et Storey (1999) a montré que les nymphes redescendaient vers le sol lorsque le déficit de saturation (DS), variable qui intègre à la fois la température et l'humidité relative, était élevé (DS compris entre 5 et 10 mmHg en moyenne) c'est-à-dire lorsqu'il fait chaud et sec. Ainsi, les nymphes pouvaient

quêter à la même hauteur que les larves, infester les mêmes hôtes pour finalement se nourrir ensemble (co-repas). Température et humidité sont donc des facteurs importants pour permettre l'infestation des hôtes par les larves et les nymphes et favoriser le co-repas pour ainsi permettre la transmission du TBEV par « co-feeding ».

Récemment, une autre voie de transmission a été mise en évidence. Bakhvalova et al. (2009) ont montré que le S-TBEV pouvait persister sans l'implication du vecteur en montrant une transmission du virus chez la descendance de *M. rutilus*. En ce qui concerne le maintien du virus, Bakhvalova et al. (2006) et Tonteri et al. (2011) ont montré une persistance du virus chez des rongeurs pendant au moins deux hivers.

2.5 Manifestations cliniques chez l'homme

L'incubation peut varier de 2 à 28 jours. L'infection passe inaperçue chez 70 à 98% des personnes infectées. Au début le virus se multiplie au site d'inoculation et se propage dans le système lymphatique. L'état fébrile correspond à la phase primaire (virémie) puis se propage dans le système nerveux central (SNC) dans la phase secondaire. Tandis que la maladie due au S-TBEV évolue en une phase; seul un syndrome grippal (maux de tête, fièvre, douleurs musculaires et fatigue) se déclare durant la virémie, les deux autres sous-types provoquent une forme biphasique de la maladie qui se déclare de 7 à 14 jours après la piqûre de tique par des symptômes grippaux avec de la fièvre allant de 37.5°C à 39°C dans la phase primaire puis peut évoluer dans 30% des cas en méningoencéphalite accompagnée d'une fièvre plus intense (Dumpis et al. 1999). Des symptômes neurologiques et neuropsychiatriques, des paralysies et des troubles sensoriels peuvent apparaître comme séquelles suite à cette maladie et persister quelques jours voire plusieurs années (Charrel et al. 2004). L'évolution de la maladie est fatale dans environ 1% des cas pour le W-TBEV, 20-40% pour le FE-TBEV et 6-8% pour le S-TBEV (Gritsun et al. 2003c).

Chez l'homme, le virus a deux possibilités d'entrer dans le corps : soit par piqûre d'une tique infectée par le virus ou par ingestion de lait cru infecté. Aucun traitement n'existe contre le TBEV. Cependant une immunoprophylaxie est possible et est recommandée en Suisse pour les personnes (adultes et enfants à partir de 6 ans) qui côtoient fréquemment les forêts endémiques. Le vaccin comprend trois injections intramusculaires aux périodes 0, 1 à 3 et 9 à 12 mois (Encepur[®]) ou 5 à 12 mois (FSME-Immun CC[®]). Le rappel est recommandé tous les 10 ans selon l'OFSP (Bulletin OFSP 13/2006). Il est à noter cependant que cette recommandation dépend de

chaque organe de santé national. En Allemagne par exemple, ce rappel est recommandé tous les 5 ans.

2.6 Distribution du TBEV

Le TBE est endémique depuis l'est de la France (Alsace et Lorraine) en passant par le centre et l'est de l'Europe, la Russie et l'Extrême-Orient mais aucun cas n'a été déclaré dans la Péninsule Ibérique, les Etats du Benelux, au Royaume-Uni et en Irlande. C'est en Russie, en Lituanie, en Estonie, et en Lettonie qu'il y a le plus de cas recensés (Süss 2003). En résumé, le TBEV est présent dans 27 pays d'Europe et trois pays d'Asie (Chine, Japon et Mongolie) (Figure 5).

Pourtant, malgré une répartition étendue, sa présence n'est pas uniforme au sein même d'une forêt. On définit alors la forêt comme étant une zone d'endémie dans laquelle se localisent des foyers. La notion de foyer a été introduite par Pavlosky (1947) et désigne une région avec des caractères géographiques et écologiques distincts où il y a des interrelations entre espèces. Une définition internationale concernant une région endémique devient alors difficile à établir (Kattler 2004).

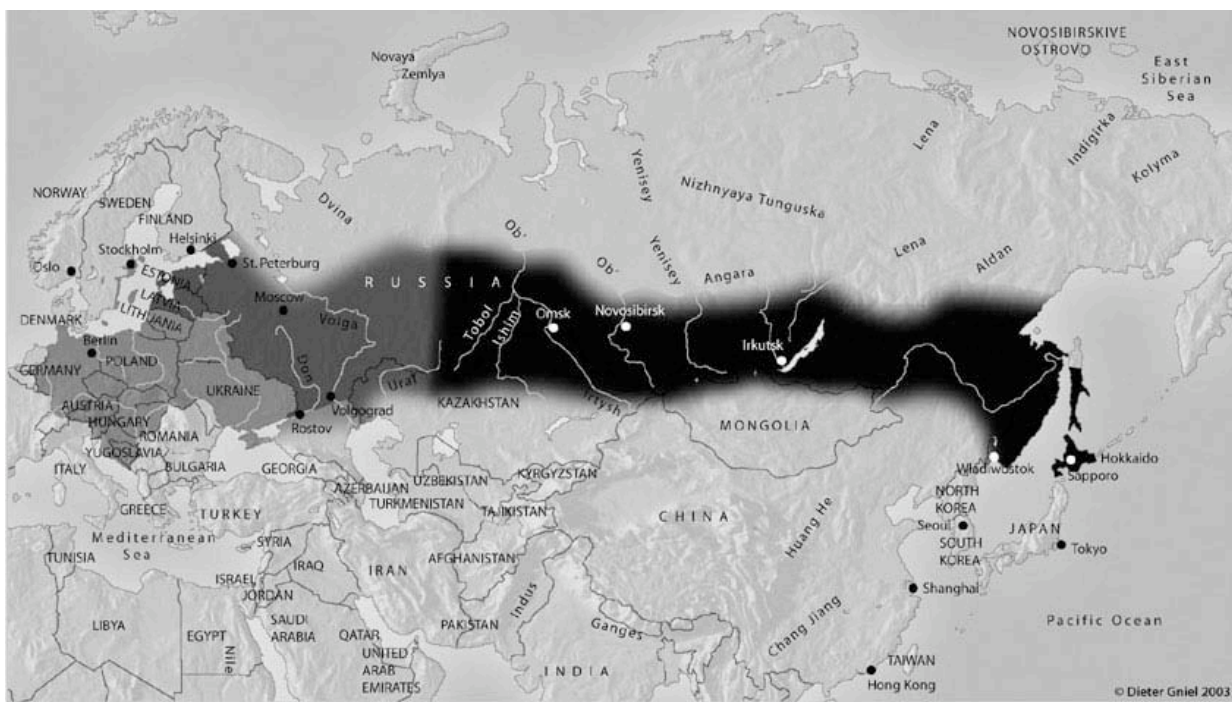


Figure 5: Distribution du TBEV selon J Travel Med © 2004 International Society of Travel Medicine.

En Allemagne par exemple, une région est considérée comme endémique au niveau du « Landkreis » lorsque cinq cas sont déclarés sur une période de cinq ans, ou deux cas dans la

2. Introduction

même année (Kattler 2004).

En Suisse, l'OFSP parle de régions endémiques ou de foyers lorsque, au minimum, trois cas humains sont déclarés dans une même région dans un rayon de 10-15 Km et/ou si une région abrite des tiques infectées par le virus. Ce nombre est déclaré d'une part, par les laboratoires aux médecins cantonaux puis des médecins cantonaux à l'OFSP, et d'autre part, par les médecins auprès du médecin cantonal (Stürchler 2000). Les premiers cas de TBE en Suisse remontent à 1969 avec la mise en évidence d'anticorps spécifiques chez deux personnes dont le système nerveux central était atteint (Spiess et Mumenthaler 1969, Krech et al. 1969). Dans les années 70, entre 7 et 74 cas par année ont été recensés puis, dès 1984, date à laquelle le système de déclaration a été rendu obligatoire, on assiste à une augmentation des cas puis à une stabilisation atteignant une centaine de cas par année (Zimmermann et Koch 2005). Cependant, en 2005 et 2006, on observe une nette augmentation des cas déclarés passant d'une centaine de cas pour la période 1999-2004 à plus de 200 (Figure 6) (Bulletin OFSP 4/2007).

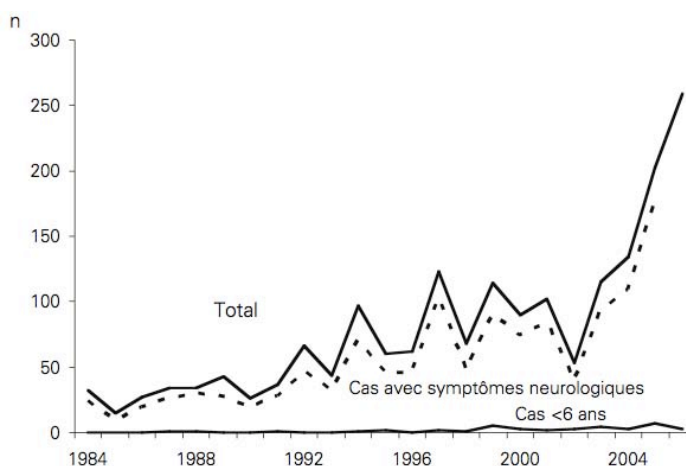


Figure 6: Nombre de cas en Suisse selon l'OFSP (de 1984 à 2006).

À cette même période, on assiste à un autre phénomène : une extension des zones d'endémies. Depuis la localisation du premier foyer de TBE en 1972, dans la région de Schaffhouse (Wyler et al. 1973), les foyers sont restés cantonnés dans le Nord et l'Est du pays: Horgen/ZH, Eglisau/ZH, Glattfelden/ZH, Hallau/SH, Osterfingen/SH, Stein am Rhein/SH, Rheinau/SH, Grusch-Seewis-Landquart/GR, Thun/BE, Spiez/BE, Steffisburg/BE et Ins/BE (Wyler et Matile 1984). Ins/BE étant le foyer de TBEV situé le plus à l'ouest du pays (Wyler et Matile 1984, de Marval 1994). Ces foyers ont été détectés soit par l'isolement du virus dans les tiques comme par exemple à Ins/BE, soit par des cas cliniques répétés (Matile 1982). De Marval (1994) a recherché la présence du virus dans plusieurs régions de Suisse localisées à l'intérieur et à

l'extérieur du périmètre connu du TBEV. Cependant ses investigations n'ont pas montré la présence du TBEV en-dehors du périmètre de distribution déjà connu. Mais à partir de 2006, on assiste à l'apparition de cas sporadiques qui suggèrent une extension des foyers en Suisse romande. Quelques cas sont reportés sur la rive sud du lac de Neuchâtel, et dans l'ouest du pays, la Plaine de l'Orbe, (Bulletin OFSP 13/2006, de Vallières 2006). L'émergence de ces nouveaux foyers pourrait être liée à l'importation de tiques infectées par les oiseaux (Ernek et al. 1968).

Quant à la prévalence de TBEV dans les tiques, elle varie selon les foyers. Des études ont montré des prévalences qui oscillent entre 0.36 et 0.64% dans les cantons de Zürich et Berne respectivement (Wicki et al. 2000) avec un maximum observé de 14.3% dans la région de Belp (Berne) (Casati et al. 2006a). En Europe, l'infection des tiques dans les foyers a une faible prévalence variant de 0.1 à 5% (Randolph 2001). Au sein même d'un foyer, la formation de micro-foyers peut augmenter ce pourcentage jusqu'à 10% de tiques infectées par le virus (Blaskovic et Nosek 1972) voire 14.3% (Labuda et al. 2002, Casati et al. 2006a).

2.7 Autres pathogènes transmis par les *Ixodes*

Les tiques ont la particularité d'avoir un long cycle de vie ce qui leur confère des avantages pour transmettre une grande diversité de pathogènes pour l'homme comme des virus, des bactéries comme les spirochètes ou les rickettsies, des protozoaires, des champignons ou des nématodes.

2.7.1 Rickettsies

2.7.1.1 Généralités

Les rickettsies sont des bactéries intracellulaires obligatoires à coloration Gram négative. Elles ont une forme de bâtonnets de longueur de 0.8-2 μm et de diamètre de 0.3-0.5 μm qui se multiplient par division binaire (Renvoisé et Raoult 2009) et leur génome qui varie de 1-1.6 Mb consiste en un seul chromosome circulaire (Roux et al. 1992). Elles appartiennent à la famille des *Rickettsiaceae* au sein de l'ordre des *Rickettsiales*. Pendant longtemps on a classé dans cet ordre toutes les bactéries qui se coloraient en rouge avec la coloration de Gimenez (Renvoisé et Raoult 2009). Mais avec l'arrivée des outils moléculaires, la classification de ces bactéries a subi de nombreux changements. Ainsi, toute la famille des *Bartonellaceae* ainsi que *Coxiella burnetti* ont été enlevés de l'ordre des *Rickettsiales* et sont maintenant inclus dans celui des *Rhizobiales* et des *Legionellales*, respectivement (Hechemy et al. 2003). La famille des *Rickettsiaceae* se divise en plusieurs groupes : le groupe typhus des broussailles représenté par le genre *Orientia*

2. Introduction

dont le vecteur est un acarien thrombiculidé ; le groupe typhus avec *R. prowazeckii* dont le vecteur est le pou du corps, *R. typhi* transmis par les puces et *R. canadensis* ; un groupe non classifié comprenant une espèce, *R. bellii* ; un groupe qui comprend 11 espèces de *Candidatus* dont la pathogénicité est encore inconnue excepté pour *Candidatus Rickettsia hoogstraalii* qui provoque une fièvre boutonneuse; et le groupe boutonneux (Spotted Fever Group, SFG) dont les membres sont les plus nombreux et sont pour la plupart associés aux tiques (*Ixodidae*) mais aussi aux puces comme *R. felis* et aux acariens comme *R. akari* (Renvoisé et Raoult 2009). Le SFG est lui-même divisé en cinq groupes comprenant une vingtaine d'espèces reconnues comme pathogènes ou potentiellement pathogènes pour l'homme: le groupe *R. rickettsii*, le groupe *R. massiliae*, le groupe *R. helvetica*, le groupe *R. akari* et le groupe ancestral (Parola et al. 2005).

R. rickettsii, l'agent responsable de la fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses (USA) découverte par T. H. Ricketts en 1906, a été pendant longtemps la seule espèce de rickettsies associée aux tiques. Puis, du côté européen, on se rend compte que l'agent responsable de la fièvre boutonneuse Méditerranéenne, *R. conorii conorii* est aussi transmis par une tique, *Rhipicephalus sanguineus*. En Europe, on connaît à présent plus d'une dizaine d'espèces de rickettsies pathogènes pour l'homme dont les vecteurs sont des tiques du genre *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, et *Hyalomma*. Les espèces *R. helvetica* et *R. monacensis* sont associées au genre *Ixodes* (Parola et al. 2005).

En Suisse, quatre espèces de rickettsies (*R. conorii*, *R. slovaca*, *R. helvetica*, *R. monacensis*) pathogènes pour l'homme ont été identifiées (Chamot et al. 1987, Clavel et al. 1992, Burgdorfer et al. 1979, Beati et al. 1994, Boretti et al. 2009). Cependant, seuls des cas cliniques causés par *R. conorii* ont été rapportés (Chamot et al. 1987, Clavel et al. 1992). Concernant les trois autres espèces, elles ont été identifiées chez des tiques du genre *Dermacentor* (*R. slovaca*) (Burgdorfer et al. 1979, Beati et al. 1994) et *Ixodes* (*R. helvetica* et *R. monacensis*) et représentent donc un risque potentiel d'infection pour l'homme (Boretti et al. 2009).

R. helvetica est une espèce qui a été identifiée pour la première fois chez des tiques *I. ricinus* et c'est en Suisse que l'on a fait cette découverte (Burgdorfer et al. 1979). Depuis, on l'a retrouvée chez *I. ricinus* dans toute l'Europe (Floris et al. 2008, Sprong et al. 2009, Radulovic et al. 2010, Severinsson et al. 2010). Des études montrent aussi sa présence dans le sang de micromammifères, de chevreuils et de sangliers (Sprong et al. 2009). Ce même auteur rapporte aussi cette espèce chez des puces récoltées sur des rongeurs (Sprong et al. 2009). En Suisse, on l'a détectée chez des *I. ricinus* en quête et s'étant nourries sur des chats, des chiens et des chevaux (Burgdorfer et al. 1979, Boretti et al. 2009). Ce n'est que récemment que des cas

cliniques ont été décrits en Suède (Nilsson et al. 1999, 2006, 2009), en France (Fournier et al. 2000), et en Italie du Nord (Fournier et al. 2004).

Quant à *R. monacensis*, cette espèce a aussi été détectée chez son vecteur, *I. ricinus*, en Allemagne (Simser et al. 2002) avant d'être reconnue chez l'homme en Espagne (Jado et al. 2006). Depuis, plusieurs études ont montré sa présence chez *I. ricinus* en Serbie, Italie, Slovénie, Suisse (Radulovic et al. 2010, Floris et al. 2008, Beninati et al. 2002, Boretti et al. 2009).

Des études récentes ont montré la présence de *R. helvetica* et *R. monacensis* dans les tiques nourries sur des oiseaux migrateurs en Suède, au nord ouest de la Russie et dans une île de la mer Baltique (Elfving et al. 2010, Franke et al. 2010, Movila et al. 2011).

2.7.1.2 Mécanisme d'infection des tiques

Les tiques jouent à la fois un rôle de vecteurs mais aussi de réservoirs. Quant aux vertébrés, ils peuvent aussi être des réservoirs sous certaines conditions: ils doivent être des hôtes habituels du vecteur, et développer une rickettsiémie assez longue (Brouqui et al. 2007).

Les rickettsies peuvent infecter et se multiplier dans tous les organes de la tique (Brouqui et al. 2007). Si les ovaires ou les oocytes d'une femelle sont infectés, alors il y a la possibilité d'une transmission transovarienne pour une partie de sa descendance mais le pourcentage peut varier selon certains facteurs qu'il reste à élucider. La transmission transstadiale est aussi possible pour chaque stade. Comme les rickettsies infectent les glandes salivaires, elles peuvent donc être transmises par la salive lors du repas de la tique. Enfin, une transmission sexuelle est aussi possible et a été démontrée chez *I. ricinus* et *D. andersoni* (Hayes et al. 1980).

2.7.1.3 Manifestations cliniques et traitement

Les manifestations cliniques dues aux rickettsies des fièvres boutonneuses sont en général: une fièvre brutale après 5 à 10 jours d'incubation asymptomatique, un rash cutané et une escarre noirâtre au point d'inoculation. Cependant, ces signes varient en fonction de l'espèce de rickettsie impliquée. Le traitement utilisé est la prescription d'antibiotiques (doxycycline) (Brouqui et al. 2007).

2.7.2 *Anaplasma phagocytophilum*

2.7.2.1 Généralités

A. phagocytophilum est une bactérie Gram négative intracellulaire obligatoire qui parasite les granulocytes des mammifères (Dumler et al. 2001). Cet organisme polymorphe (forme coccoïde ou ellipsoïdale) dont le génome est circulaire (1.5 Mb) mesure jusqu'à 2µm de diamètre et fait partie de la famille des *Anaplasmatatacae* au sein de l'ordre des *Rickettsiales*. En 2001, Dumler et al. (2001) réorganisent cet ordre en s'appuyant sur l'analyse des séquences des ARNr 16S, l'analyse des gènes des opérons *groESL* et l'analyse des gènes codant pour des protéines de surface. Ainsi, les espèces comme *Ehrlichia phagocytophila* (*A. phagocytophylum*) et *E. equi* tous deux responsables de maladies d'importance vétérinaire (Ewing et al. 1971, Gribble et al. 1969, Hulinska et al. 2004), et l'agent responsable de la granulocytose humaine (HGE) (Chen et al. 1994) sont regroupés en un seul et même taxon, celui de *A. phagocytophila* corrigé par la suite en *A. phagocytophilum*. Cependant, des différences au niveau moléculaire et biologiques (gamme d'hôtes, répartition géographique et pathogénicité) incitent Dumler et al. (2001) à ajouter des variants pour chaque espèce regroupée au sein de ce nouveau taxon. Par exemple, certains variants qu'on retrouve chez des tiques (*Ixodes scapularis*), des cervidés (*Odocoileus virginianus*), des chevaux et des ruminants diffèrent de plusieurs paires de bases de la séquence de l'agent HGE et ne sont pas pathogènes pour l'homme (Dawson et al. 1996, Massung et al. 1998, Massung et al. 2002). Cette bactérie d'abord connue comme agent infectieux pour le bétail en 1932 a été reconnue comme pathogène pour l'homme en 1990 aux USA. Dès lors, les cas d'anaplasmose n'ont cessé de croître et les premiers cas en Europe ont été signalés (Dumler et al. 2005). Jusqu'à présent, 66 cas ont été répertoriés en Europe, soit en Suède, en Slovénie, aux Pays-Bas, en Pologne et en Autriche (Hildebrandt et al. 2010a).

En Suisse, aucun cas clinique d'infection par *A. phagocytophilum* chez l'homme n'a été certifié (Gern et al. 2010) bien que des études sérologiques ont montré la présence de ce pathogène chez des personnes résidant en Suisse (Liz et al. 1997, Pusterla et al. 1999).

Cette bactérie est hébergée par une large gamme d'hôtes allant des animaux domestiques (vaches, moutons, chats, chiens, chevaux) (Pfister et al. 1987, Liz 1994, Pusterla et al. 1997, 1998a, Jensen et al. 2007, Kohn et al. 2008, 2010 Heikkilä et al. 2010), aux mammifères sauvages comme les chevreuils (Liz et al. 2002, Polin et al. 2004, Massung et al. 2005), les chamois (Liz et al. 2002), les sangliers (Petrovec et al. 2002), les renards (Petrovec et al. 2003),

et les micromammifères (*A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *M. glareolus* et *S. araneus*) (Liz et al. 2000, Bown et al. 2003).

En Europe, les vecteurs d'*A. phagocytophilum* sont *I. ricinus* et *I. trianguliceps* (Bown et al. 2003), aux Etats-Unis ce sont *I. scapularis* et *I. pacificus*, et en Asie, *I. persulcatus*. En Suisse, on trouve *A. phagocytophilum* chez des tiques infestant le bétail et chez des tiques en quête (Pusterla et al. 1999). Contrairement aux Etats-Unis où la prévalence d'infection chez les tiques peut aller jusqu'à 53%, en Europe, elle est faible et varie de 0.25% à 6.6% avec un record enregistré au centre de l'Italie de 24.4% (Cinco et al. 1997). En Suisse, Liz et al. (2000) a trouvé des prévalences de 0.8% et 1.3% dans des tiques en quête.

2.7.2.2 Mécanisme d'infection des tiques

Chez la tique, la transmission transovarienne de la bactérie n'a pas été prouvée. Par contre, la transmission transstadiale est possible (Telford et al. 1996) mais semble plus efficace de nymphe à adulte que de larve à nymphe (Ogden et al. 2002).

Une étude menée sur des souris immunes a montré qu'*E. phagocytophila* pouvait se transmettre par des tiques qui se nourrissent en co-repas (Levin et Fish 2000). Par ailleurs, selon une étude faite par Ogden et al. (2002), l'efficacité de transmission de l'hôte (mouton) aux tiques immatures (*I. ricinus*) dépend du nombre d'adultes qui se nourrissent sur l'hôte. Cette étude a aussi montré que l'intensité d'infection chez les tiques gorgées immatures varie selon le nombre d'adultes qui se nourrissent sur l'hôte (co-repas).

2.7.2.3 Manifestations cliniques et traitement

Les manifestations cliniques des anaplasmoses humaines sont non spécifiques et se traduisent par une fièvre, une sensation de malaise général, des courbatures, des nausées, des myalgies, des arthralgies, des céphalées, une leucopénie, une thrombocytopénie et une augmentation des enzymes hépatiques (Gern et al. 2010). Le traitement se fait par antibiotiques (tétracycline). En revanche, aucun vaccin n'est disponible, seules des mesures prophylactiques contre les tiques servent de mesure de protection.

2.7.3 Babésies

2.7.3.1 Généralités

Les babésies font partie du phylum des *Apicomplexa* (*Sporozoa*), dans l'ordre des *Piroplasmida* et dans la famille des *Babesiidae* (Homer et al. 2000). Depuis leur découverte chez des bovins en 1888 plus de 100 espèces ont été décrites (Homer et al. 2000). On distingue les petites (1-2.5µm) et les grandes babésies (2.5-5µm) classées d'après leur caractère morphologique. Cette classification est en accord avec les analyses phylogénétiques sauf pour *B. divergens* qui ressemble morphologiquement à une petite babésie mais génétiquement appartient aux grandes babésies (Homer et al. 2000). Ces protozoaires responsables de la babésiose (ou piroplasmose) parasitent les globules rouges des petits mammifères, du bétail et de l'homme en prenant un aspect piriforme. Aux Etats-Unis, la babésiose humaine est relativement commune dans certaines régions où le vecteur est présent et est causée principalement par *B. microti*, mais ces dix dernières années de nouvelles espèces de babésies ont fait leur apparition WA1-type (WA1 à WA3, CA1 à CA6) (Conrad et al. 2006). En Europe, depuis le premier cas de babésiose chez l'homme décrit en 1957 (Skrabalo et Deanovi 1957), une septantaine de cas ont été répertoriés dont 40 ont été observés chez des patients splénectomisés ou immunodéficients (Gern et al. 2010). La majorité des cas (70%) sont causés par *B. divergens* (Genchi 2007, Vannier et Krause 2009), une espèce qui parasite les tiques (Nijhof et al. 2007) et les bovins (Gorenflot et al. 1998). *B. microti* est aussi présente en Europe (Gray et al. 2002) mais les cas cliniques sont rares. Seuls deux cas d'infection chez l'homme ont été identifiés : un en Suisse, et un en Allemagne (Meerscherrer 2004, Hildebrandt et al. 2007). Pourtant, plusieurs études ont montré la présence de *B. microti* dans le vecteur notamment en Suisse chez *I. ricinus* (Foppa et al. 2002, Casati et al. 2006b) et *I. trianguliceps* (Gern et Aeschlimann 1986). *B. microti* a déjà été décrit chez les micromammifères comme *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *M. glareolus*, *M. agrestis* (Aeschlimann et al. 1975, Gern et al. 1986, Foppa et al. 2002, Duh et al. 2003, Beck et al. 2010). Une nouvelle espèce nommée *B. venatorum* (EU1) et récemment isolée chez deux personnes infectées en Autriche et en Italie (Herwaldt et al. 2003, Häselbarth et al. 2007) augmente la liste des espèces de babésies pathogènes pour l'homme. Par la suite, *B. venatorum* a aussi été identifiée chez des chevreuils en Slovénie (Duh et al. 2005), Italie (Tampieri et al 2008), France (Bonnet et al. 2007a) ainsi que dans des tiques en quête (Casati et al. 2006b, Becker et al. 2009, Wielinga et al. 2009), et des tiques infestant des moutons et des chèvres dans plusieurs pays européens dont la Suisse (Casati et al. 2006b, Hilperthausser et al. 2006).

2.7.3.2 Mécanisme d'infection des tiques

Pour *B. divergens* et *B. venatorum*, deux voies de transmissions sont possibles (Bonnet et al. 2007a, b, Zintl et al. 2003) : une transmission transovarienne et transstadiale chez *I. ricinus*. Hilperthausser et al. 2006 montrent aussi que la transmission transstadiale est possible par l'identification de *B. venatorum* chez un mâle *I. ricinus*.

En revanche, chez *B. microti*, seule une transmission transstadiale est possible chez *I. ricinus*. Quant à la transmission transovarienne elle n'est pas connue (Gray et al. 2002).

2.7.3.3 Manifestations cliniques et traitement

La babésiose chez l'homme est une maladie qui ressemble à la malaria et touche en particulier les individus splénectomisés ou immunodéprimés. L'infection peut être asymptomatique et la plupart des babésioses guérissent spontanément mais elles peuvent aussi être fatales. Aux Etats-Unis, les cas dus à *B. microti* ont un taux de mortalité qui varie de 5-9% (Vannier et Krause 2009) alors qu'en Europe, même si peu de cas sont répertoriés, le taux de mortalité s'élève à 40% avec *B. divergens* (Gorenflot et al. 1998). Les symptômes, relativement peu spécifiques, surviennent 1 à 3 semaines après la piqûre de tique et se traduisent par une forte fièvre avec une sévère hémolyse intravasculaire conduisant à une hémoglobinurie. Fièvre, frissons, sueurs, fatigue, maux de tête, myalgie, sont des symptômes communs (Gorenflot et al. 1998, Vannier et Krause 2009). Le traitement est la prescription d'antibiotiques dont la dose est variable selon l'espèce de babésiose et la sévérité de la maladie (Vannier et Krause 2009). Aucun vaccin ne peut être administré, seules des mesures contre les piqûres de tiques peuvent être prises en compte comme mode de prévention.

2.8 Objectifs de l'étude

Dès la fin des années 80, on observe une augmentation des cas de TBE en Europe Centrale et dans les Pays baltes (Randolph 2001, 2004) ainsi qu'une émergence de nouveaux foyers de TBE (Randolph 2008). En 2006, certains pays d'Europe dont la Suisse subissent une nette augmentation des cas de TBE pour décroître ensuite en 2007. Un changement climatique pourrait être lié à cette augmentation selon Lindgren et Gustafson (2001). À partir de ces observations, nous avons essayé de savoir dans un premier temps dans quelle mesure le climat a eu un impact sur cette subite croissance des cas observés en 2006. Dans un deuxième temps,

2. Introduction

nous avons voulu étudier les facteurs qui déterminent la présence ou l'absence d'un foyer de TBE. Pour cela, nous avons donc choisi d'étudier, dans le canton de Berne, dans deux foyers naturels de TBE (Thun et Belp) et deux autres sites non connus pour être des foyers (Kiesen et Trimstein):

- L'influence de certains facteurs climatiques (température, humidité relative et déficit de saturation) sur l'évolution saisonnière de la population d'*I. ricinus* en quête et son impact sur la transmission du virus par « co-feeding » en examinant l'infestation des larves et des nymphes *I. ricinus* sur les micromammifères (*A. flavicollis*, *A. sylvaticus* et *M. glareolus*).
- La faune présente dans chaque site par l'identification du repas sanguin rémanent chez les nymphes en quête.
- La prévalence du TBEV chez les tiques en quête et chez celles (*I. ricinus* et *I. trianguliceps*) infestant les micromammifères en les analysant par real-time RT-PCR (Schwaiger et Cassinotti 2003).

Le troisième volet a été d'analyser la sérologie des micromammifères (*A. flavicollis*, *A. sylvaticus* et *M. glareolus*) pour confirmer la présence du virus dans les 4 sites d'étude du canton de Berne.

Le quatrième volet de cette étude a été d'acquérir des informations supplémentaires sur d'autres pathogènes responsables de maladies émergentes (*A. phagocytophilum*, *Babesia spp.* *Rickettsia spp.*). Nous avons investigué la présence de ces pathogènes chez des tiques (*I. ricinus* et *I. trianguliceps*) infestant les micromammifères (*A. flavicollis*, *A. sylvaticus* et *M. glareolus*) par le biais d'outils moléculaires (real-time PCR et PCR).

Enfin, le dernier chapitre a été dédié à l'étude du TBEV chez les tiques en quête dans la Plaine de l'Orbe, une région située à l'ouest de la Suisse (canton de Vaud). Depuis 2006, on assiste à l'émergence de nouveaux foyers dans cette région avec quelques cas sporadiques répertoriés qui sont au nombre de sept (de Vallière et al. 2006). L'objectif, ici, était d'analyser la prévalence du TBEV chez des tiques en quête sur la végétation dans plusieurs forêts de la Plaine de l'Orbe où des cas humains ont été répertoriés afin de confirmer la présence du virus, d'observer sa distribution dans cette zone et sa diversité génétique.

3. Matériel & Méthodes

3.1 Zones d'étude

Deux zones ont été choisies pour cette étude: une située dans le canton de Vaud (VD), la Plaine de l'Orbe et l'autre dans le canton de Berne (BE) (Figure 7). L'une a été choisie pour confirmer la présence de nouveaux foyers et l'autre pour suivre l'évolution de foyers de TBEV dans le temps en relation avec le climat et également pour détecter la présence de pathogènes émergents (*A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. et *Babesia* spp.).



Figure 7: Zones d'études dans deux cantons de Suisse, Vaud (VD) et Berne (BE)
(http://www.favoriteway.com/images/carte_Suisse.jpg)

3.2 Plaine de l'Orbe

Les différents sites de la Plaine de l'Orbe ont été choisis selon le témoignage de patients atteints du TBE qui ont séjourné dans cette région et qui se rappellent du lieu de la piqûre de tique (de Vallière et al. 2006, Schlaefli et al. 2007) (Figure 8 et Tableaux 2 et 3).

3. Matériel et Méthodes

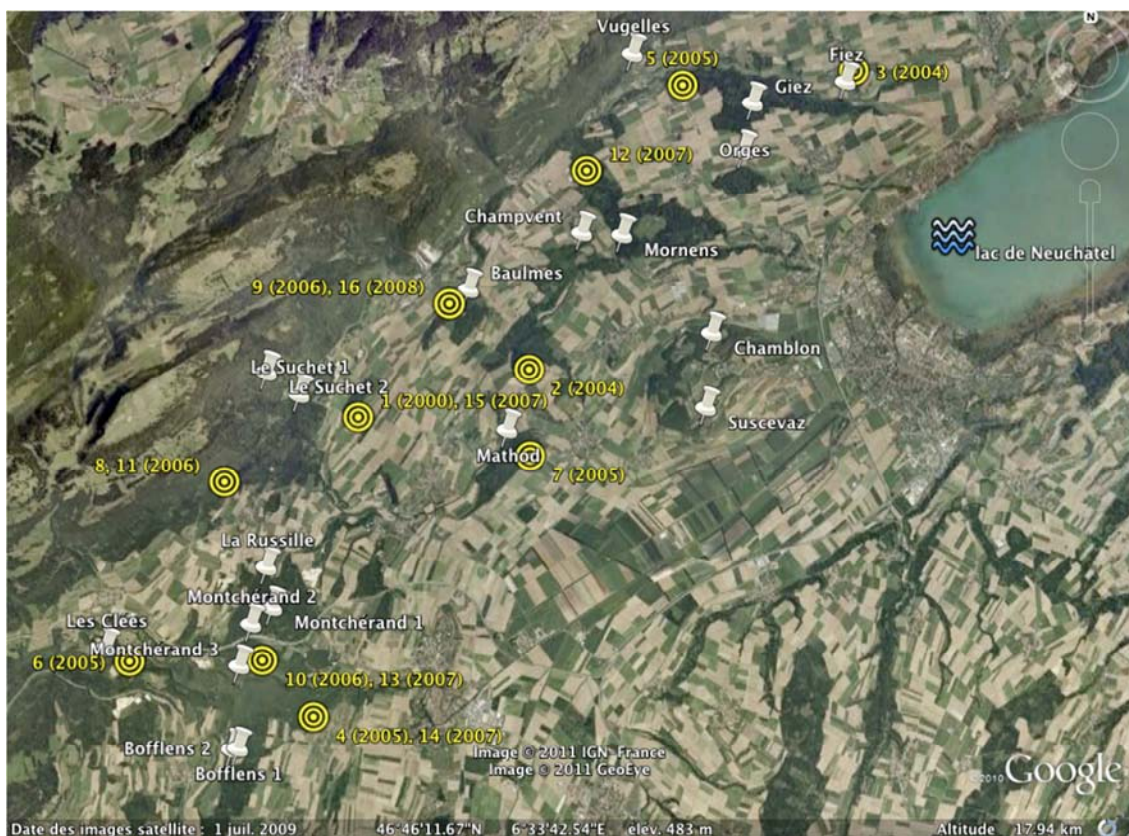


Figure 8 : En blanc, les sites de récolte dans la Plaine de l'Orbe. En jaune, les lieux et années d'exposition des patients atteints du virus d'après Schlaefli et al. (2007) et de Vallière et al. (2006).

Année d'exposition	Lieu d'exposition	Nb de cas
2000	Rances/Le Suchet	1
2004	Champvent/Rances	1
2004	Fiez	1
2005	Forêt ouest d'Orbe	1
2005	Vugelles, place de tir	1
2005	Les Clées	1
2005	Method	1
2006	l'Abergement	1
2006	Baulmes	2
2006	Montcherand	1
2006	l'Abergement	2
2007	Vuiteboeuf	1
2007	Montcherand	1
2007	Bofflens	1
2007	Rances	1
2008	Baulmes	1

Tableau 2: Cas de TBE acquis dans la Plaine de l'Orbe de 2000 à 2008 selon Schlaefli et al. (2007), de Vallière et al. (2006) et l'OFSP.

Zones de récolte	Coordonnées suisses	Année(s)
Method	527591 180560	2007
Les Clées	524748 175708	2007
Le Suchet	528123 180180	2007
Suscevaz	535330 180143	2007
Fiez	537094 185879	2007
Montcherand1	527652 176450	2007-2008
Montcherand2	527318 176310	2007-2008
Montcherand3	527129 175567	2007-2008
Vugelles	534023 186359	2007-2008
Chamblon	535406 181473	2008
Momens	533853 183203	2008
Giez	536111 185419	2008
La Russille	527634.35 177308.05	2008
Baulmes	531121.09 182198.75	2008
Orges	535968 184711	2008
Bofflens 1	527157 174145	2008
Bofflens 2	526984 174156	2008
Champvent	533099 183144	2008

Tableau 3: Sites d'études de la Plaine de l'Orbe avec leurs coordonnées suisses, et l'année de récolte des tiques.

3.2.1 Récolte de tiques *I. ricinus* en quête

Dans la Plaine de l'Orbe, les tiques en quête ont été récoltées à l'aide d'un linge éponge blanc d'un mètre carré. Un maximum de tiques a été collecté durant les mois de mai et juin de deux années consécutives (2007 et 2008). Les tiques ont été récoltées sur une distance variant de 20 à 500 m².

3.2.2 Isolement et détection du TBEV chez les tiques en quête

Les tiques en quête vivantes ont été congelées à -20°C par pools de 1 à 25 nymphes, 1 à 12 mâles ou femelles. Ces pools ont été analysés dans l'année qui a suivi leur congélation en suivant le point 3.4.

3.3 Canton de Berne

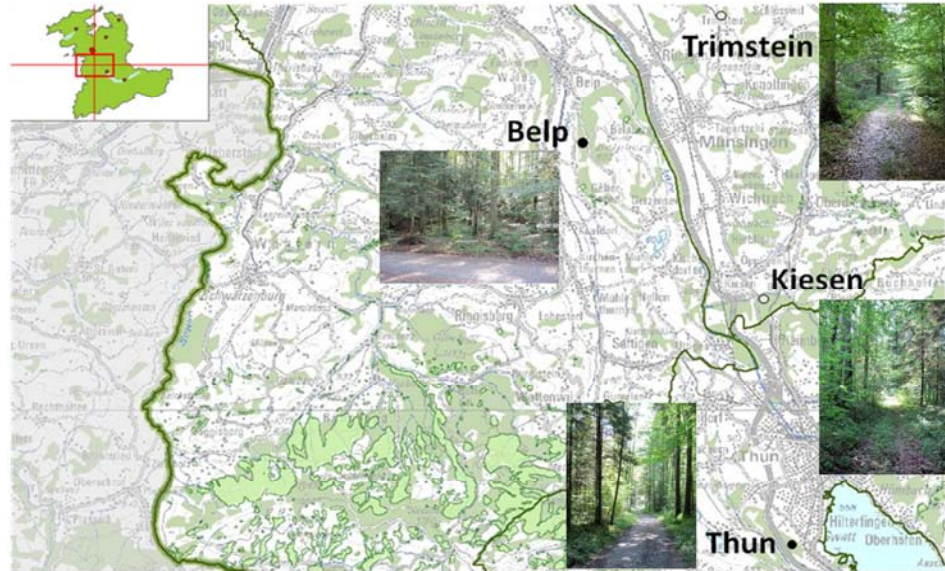
La zone d'étude dans le canton de Berne comprend quatre sites principaux. On les nommera Thun, Belp, Kiesen et Trimstein. Tous ces sites sont localisés dans une hêtraie mésophile de basse altitude (Tableau 4). Néanmoins, le site de Thun présente certaines espèces végétales plus thermophiles telles que *Carex alba*, *Ligustrum vulgare* et *Epipactis atrorubens* (cf. Tableaux 4 et Annexe 4, au point 11.1).

Sites d'étude	Forêts	Coordonnées suisses	Altitude (m)	Végétation
Thun	Burgerwald	613124 174399	642	hêtraie mésophile de basse altitude avec conditions plus thermophiles
Belp	Belpberg	605395 190642	687	hêtraie mésophile de basse altitude
Kiesen	Chiesewald	610984 184169	566	hêtraie mésophile de basse altitude
Trimstein	Buechwald	610233 193496	620	hêtraie mésophile de basse altitude

Tableau 4 : Sites d'études du canton de Berne avec leurs caractéristiques (forêts, coordonnées suisses, altitude (m) et végétation).

Le site de Thun se situe à Cheibenau dans le Burgerwald, lui-même situé dans le Glütschbachtal (Figure 9). C'est la zone la plus proche des Préalpes en comparaison avec les autres sites étudiés. Quant au site de Belp (Figure 9), il se localise sur la colline du Belpberg avec une exposition ouest-sud. Le site de Trimstein est une petite parcelle de forêt, qu'on nomme Buechwald, située entre des champs (Figure 9). Quant au site de Kiesen, il est situé dans le Chiesewald (Figure 9).

Les forêts de Thun et Belp sont reconnues pour être des foyers d'encéphalite à tiques (Matile 1982, de Marval 1994). En revanche, les sites de Kiesen et Trimstein, qui se localisent entre les deux zones d'endémie, ne sont pas connus pour être des foyers d'encéphalite à tiques (Figure 9).



Echelle 1 :133270

Figure 9 : Localisation des sites d'étude dans le canton de Berne. Les points noirs représentent les foyers de TBE connus tandis que les points blancs représentent les sites non reconnus comme foyers de TBE.

3.3.1 Récolte de tiques *I. ricinus* en quête

Les tiques en quête ont été attrapées à l'aide d'un linge éponge blanc d'un mètre carré à Belp, Thun, Kiesen et Trimstein. Chaque zone d'étude comprenait un périmètre défini de 900 mètres dans lequel la récolte s'exécutait aléatoirement sur une distance de 100 mètres selon le protocole EDEN (http://www.eden-fp6project.net/emerging_diseases/tick_borne). La période de récolte s'est étendue de mars 2006 à avril 2009, pour les sites de Belp et Thun et les sites de Kiesen et Trimstein ont été étudiés dès juin 2006 à avril 2009. Les récoltes ont eu lieu une à 2 fois par mois. En outre, nous avons récolté des tiques en quête supplémentaires dans plusieurs sites localisés à l'intérieur de chaque forêt de la zone d'étude du canton de Berne afin d'augmenter le nombre de tiques (cf. Annexe 4, au point 11.2). Les zones de récoltes qui variaient en général de 10 à 200 m² avec des extrêmes allant de 4 jusqu'à 500 m² ont été ponctuellement parcourues dès octobre 2006 jusqu'en avril 2009 (cf. Annexe 4 au point 11.2).

3.3.2 Prise de données météorologiques

La température au sol et à 60 cm (T) au-dessus du sol ainsi que l'humidité relative (HR) ont été relevées avec un thermo-hygromètre (Testo 615) lors de chaque récolte de tiques en quête aux zones d'étude de Belp, Thun, Kiesen et Trimstein.

Les températures moyennes, maximales et minimales ainsi que l'humidité relative moyenne ont été également obtenues par Agrométéo (<http://www.agrometeo.ch/>). Ces données ont été fournies par les stations météorologiques de Nofeln dans le canton de Berne.

Nous avons combiné les facteurs de température à 60 cm au-dessus du sol et d'humidité relative pour calculer le déficit de saturation (DS) (Randolph et Storey 1999, Perret et al. 2000), une mesure du pouvoir desséchant de l'air donnée en mmHg, selon la formule :

$$DS = (1-HR/100) * 4.9463e^{0.0621T}$$

3.3.3 Capture de rongeurs et récolte de tiques gorgées

Une fois par mois, à partir de mai 2007 à avril 2009, cinquante pièges « tchèques » en bois à ouverture latérale métallique ont été posés la veille en fin d'après-midi toujours dans le même périmètre de 900 m à chaque site de capture (Belp, Thun, Kiesen, Trimstein). Le lendemain, au lever du jour, les pièges ont été relevés et chaque rongeur attrapé a été amené au laboratoire, déterminé (Hausser et al. 1995, Marchesi et al. 2008) et sexé puis mis dans une cage qui a été déposée au fond d'un bac rempli avec un centimètre d'eau. Une fois rassasiées de leur hôte, les tiques se laissaient choir, et pour éviter la déshydratation, rejoignaient l'eau. Une semaine après la capture des rongeurs, les tiques ont été retirées du bac d'eau, comptées puis déterminées à la loupe selon Cotty (1985) et Cordas et al. (1993). Puis les tiques *I. ricinus* ont été mises dans un tube avec quelques mues et stockées dans un récipient qui laisse passer l'air et qui contient un mini bac d'eau permettant ainsi de maintenir l'humidité à 98%. Environ deux mois après la mue, les tiques *I. ricinus* ont été lavées à l'éthanol 70% puis rincées à l'eau distillée, séchées et mises par pool (cf. chapitre 3.3.5) et stockées à -20°C. Les animaux quant à eux ont été relâchés après 1 mois au même lieu de capture.

En ce qui concerne les tiques *I. trianguliceps*, comme il est difficile de les maintenir en vie, elles ont été directement stockées à -20°C après leur repas sanguin sur l'hôte.

3.3.4 Détection d'anticorps contre le TBEV dans le sérum de rongeurs

Afin de confirmer la présence du virus du TBE dans les sites du canton de Berne, nous avons testé les anticorps contre le virus dans le sérum de rongeurs. Après une semaine de captivité, les rongeurs capturés entre mai 2006 et septembre 2007 ont été anesthésiés intra musculairement avec 0.03 ml d'une solution contenant un myorelaxant (Xylasol[®], GRAEUB, Bern, Switzerland) (0.02 ml) et un anesthésiant (Ketasol-100[®], GRAEUB, Bern, Switzerland) (0.01 ml). Puis, une prise de sang dans le sinus retro-orbitale a été effectuée à l'aide d'une pipette Pasteur (diamètre de 1.1 mm). Afin de permettre la coagulation, le sang a d'abord été stocké pendant une heure à température ambiante dans un microtube de 0.4 ml, puis a été centrifugé deux fois pendant 10 minutes à 0.8g (rcf). Le surnageant (sérum) ainsi collecté (maximum 200 µl) a été stocké à -20°C jusqu'à son utilisation. La détection d'anticorps contre le TBEV dans le sérum de rongeurs a été effectuée par un test d'immunofluorescence indirecte (IFA) qui a été mis au point dans le laboratoire d'Avšič-Županc à l'institut de microbiologie et d'immunologie à la faculté de médecine de Ljubljana, Slovénie. Cette méthode consiste à utiliser deux anticorps : le premier (l'anticorps primaire) reconnaît l'antigène et s'y lie, et le second (l'anticorps secondaire), qui porte le fluorophore, reconnaît l'anticorps primaire et s'y lie.

La préparation de l'antigène a été faite à partir de cellules (Vero E6) infectées par le TBEV (souche utilisée : Ljubljana I, U27494). Cette lignée de cellules a été incubée à 37°C et 5% de CO₂. Sept jours après, lorsqu'il y a apparition de changement dans la morphologie cellulaire (effet cytopathogène), les cellules ont été détachées de l'erlenmeyer en utilisant des billes de verres et en centrifugeant 10 minutes à 720g à 4°C. Le sédiment cellulaire a été ensuite aliquoté dans des cryotubes et un tube a été utilisé pour préparer des lames. Le sédiment a été resuspendu dans 3 ml de NaCl filtré avec 5% de sérum fœtal de bovin (GIBCO, Invitrogen, cat. no. 16415) puis 7µl de la suspension ont été déposés sur des lames (Biomedicals, cat. no. 096041505). Une fois l'antigène séché, les lames ont été fixées avec de l'acétone et stockées à -20°C.

Avant de procéder à l'IFA, les lames avec les « spot » d'antigènes ont été sorties du congélateur pendant 10 minutes. Dans le même temps, le sérum de rongeur (anticorps primaire) a été dilué à 1:10 puis on a déposé 7µl sur un « spot » d'antigène. Les lames ont été incubées dans une chambre humide pendant 30 minutes à température ambiante. Après incubation, les lames ont été lavées avec du PBS (phosphate buffer saline) (pH 7) pendant 15 minutes. Le conjugué anti-souris IgG (anticorps secondaire) (A 7506 ; Sigma, St-Louis, USA) a été utilisé à une dilution de 1:128 puis les lames ont à nouveau été incubées dans une chambre humide pendant 30 minutes à

température ambiante. Après un deuxième lavage, dans le PBS pendant 15 minutes (pH 7.4), les lames ont été examinées avec un microscope à fluorescence (Nikon, eclipse 80i, 400x). Lorsque les caractéristiques de fluorescence cytoplasmique du TBEV étaient observées alors le sérum était considéré comme positif. Les contrôles positifs et négatifs consistaient respectivement en un sérum d'un rongeur précédemment testé comme positif et du PBS (pH 7.4).

Les sérums des rongeurs séropositifs ont par la suite été testés dans deux séries de dilutions de 1 :10 jusqu'à 1 :2560 afin d'établir les titres d'anticorps. Un test d'avidité IFA qui mesure la force de liaison anticorps-antigène a également été accompli afin de déterminer si l'infection était récente ou ancienne. Ce test a été fait sur des lames en duplicata. Toutes les lames ont d'abord été incubées dans une chambre humide pendant 30 minutes et lavées avec du PBS (pH 7.4) pendant 15 minutes. Le conjugué anti-souris IgG (A 7506 ; Sigma ; St-Louis, USA) a été dilué 1 :128 et les lames ont été incubées à nouveau pendant 30 minutes à température ambiante. Après l'incubation, un set de lames a été lavé dans du PBS (pH 7.4) et l'autre set a été lavé dans du PBS (pH 7.4) contenant de l'urée (8M) qui décroche les anticorps peu affins. Toutes les lames ont ensuite été incubées dans du PBS (pH 7.4) avec de l'urée pendant 5 minutes puis rincées à l'eau distillée. L'indice d'avidité des IgG a été calculé comme étant le rapport du titre obtenu des lames lavées au PBS seulement avec le titre obtenu des lames lavées au PBS et à l'urée. Un rapport supérieur à 32 indique une faible avidité des IgG, ce qui indique une infection récente (moins d'un mois). Au contraire, un rapport d'anticorps inférieur ou égal à 4 indique une forte avidité d'IgG ce qui montre que l'infection est ancienne (plus d'un mois). Les tests immunologiques ont été effectués par Misa Korva dans le laboratoire d'Avšič-Županc à l'institut de microbiologie et d'immunologie à la faculté de médecine de Ljubljana, Slovénie.

Les sérums de rongeurs qui présentaient des anticorps contre le TBEV (200µl) ont été testés pour la détection d'une éventuelle virémie en isolant l'ARN avec du TRIzol® (Invitrogen, Suisse) (Chomczynski et Sacchi 1987) et en l'amplifiant par PCR en temps réel en suivant les points 3.4.1 et 3.4.2.

3.3.5 Détection du TBEV chez les tiques en quête et les tiques de rongeurs

Pour la recherche du TBEV dans les tiques en quête dans les sites de Thun, Kiesen, Trimstein et Belp, celles-ci ont été analysées par pools de 1 à 10 nymphes et 1 à 6 mâles ou femelles pour tous les sites excepté pour celui de Kiesen où les pools variaient de 1 à 20 nymphes. Les tiques

3. Matériel et Méthodes

provenant de récoltes supplémentaires ont été mises par pools de 1 à 20 nymphes (avec des exceptions allant jusqu'à 24 nymphes), et de 1 à 6 mâles ou femelles.

Les tiques de rongeurs ont été placées par pools de 1 à 10 nymphes pour tous les sites sauf pour Kiesen où les pools variaient de 1 à 20 nymphes (avec des exceptions allant jusqu'à 22 nymphes).

Toutes les tiques vivantes ont été congelées à -20°C et les pools ont été analysés dans l'année qui a suivi leur congélation (cf. chapitre 3.4).

3.4 TBEV dans les tiques

3.4.1 Extraction ARN

Afin de détecter le virus dans les tiques nous avons procédé à l'isolement de l'ARN du virus avec du TRIzol® (Invitrogen, Suisse) (Chomczynski et Sacchi 1987) selon le protocole fourni par EDEN et l'institut de virologie de Bratislava (Slovaquie), qui, lui-même, a été élaboré à partir de celui du fabricant (Invitrogen). Le détail du protocole se trouve en Annexe 1, au point 8.1.1. Le matériel et les solutions sont décrits dans l'Annexe 2, au point 9.1.

3.4.2 PCR en temps réel (real-time RT-PCR)

Cette méthode repose sur la détection et la quantification directe d'un émetteur fluorescent dont l'émission est proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la PCR. Cette technique se base sur deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents qui se lient à l'ADN double brin comme le bromure d'éthidium et les sondes fluorescentes. Ce sont ces dernières que nous avons utilisées pour détecter le virus de l'encéphalite à tiques (Figure 10).

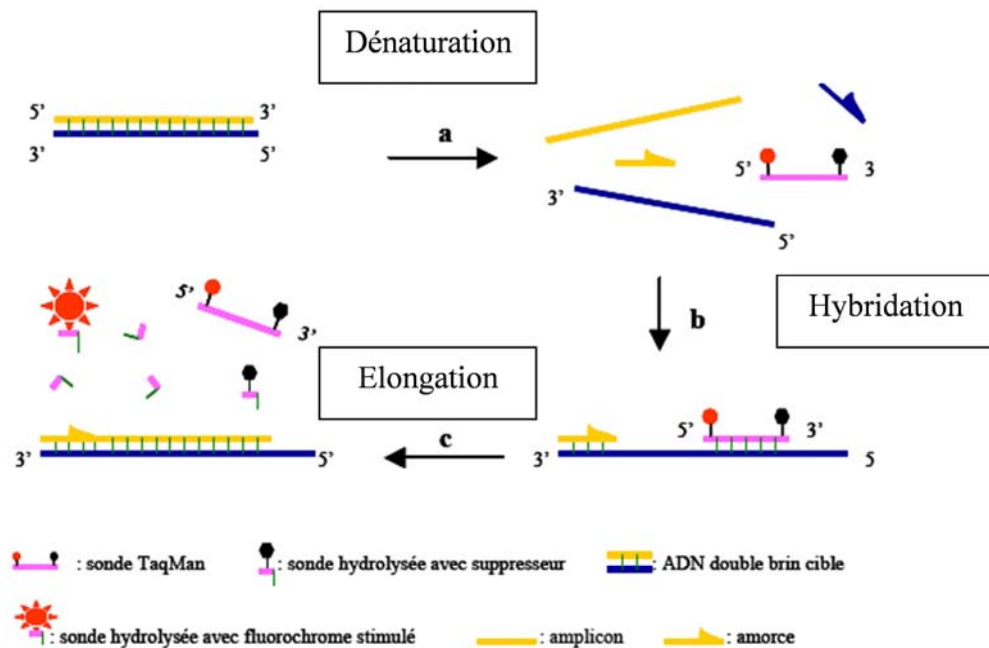


Figure 10: Schéma de la PCR en temps réel avec une sonde Taqman selon Poitras et Houde (2002).

Le système employé se base sur l'hydrolyse de sonde, ici on utilise la sonde Taqman, petit nucléotide qui contient un fluorochrome émetteur en 5' (ici le FAM: 6 carboxy-fluorescein) et un fluorochrome suppresseur en 3' (TAMRA: 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine). Lors de

l'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. Puis vient l'élongation, et l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase déplace et hydrolyse la sonde qui va libérer le fluorochrome émetteur du fluorochrome suppresseur et ainsi libérer la fluorescence qui augmente proportionnellement avec le taux d'hydrolyse de la sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon (Epsy et al. 2006, Figure 10).

Le protocole utilisé dans cette étude a été élaboré dans le cadre du projet européen EDEN. Le détail du protocole se trouve à l'Annexe 1, au point 8.2.1 et le matériel à employer pour cette méthode est décrit dans l'Annexe 2, au point 9.3. Les amorces (cf. Annexe 1, point 8.3) et les sondes (cf. Annexe 1, point 8.4) sont les mêmes que celles utilisées dans Schwaiger et Cassinotti (2003) et amplifient 68 pb de la région non codante du génome située en 3'. Leur localisation au sein du génome de la souche Neudoerfl (U27495) est décrite en Annexe 3, au point 10.1.

3.4.3 Confirmation des échantillons positifs

Les échantillons détectés avec du virus lors de la PCR en temps réel ont été confirmés en amplifiant une partie d'une autre région du génome. On a choisi pour cela une région qui code pour la protéine non structurale NS5 (nt7767-8016) (D'Agaro et al. 2009). Cette région avec le NS3 sont connues pour coder les protéines les plus conservées des flavivirus (Mandl et al. 1989). Ces échantillons ont d'abord été transcrits en ADN complémentaire en faisant une RT-PCR dont le protocole est décrit à l'Annexe 1 au point 8.2.3.1. L'ADN complémentaire a ensuite été amplifié une première fois par PCR, puis une seconde fois avec une nested PCR, toutes deux modifiées à partir de Saksida et al. 2005 dont les protocoles sont décrits à l'Annexe 1 au point 8.2.3.2 et 8.2.3.3). Les amorces qui ont été utilisées pour la PCR (FSM1, FSM2) et la nested PCR (FSM1i et FSM2i) sont celles utilisées dans Puchhammer-Stockl et al. (1995) et sont décrites dans l'Annexe 1 au point 8.3 et leur localisation sur le gène est décrite dans l'Annexe 3 au point 10.1. Les fragments amplifiés ont été visualisés avec un gel d'agarose 2% (cf. Annexe 2, point 9.4.1).

Les échantillons amplifiés avec la nested PCR ont été ensuite purifiés à l'aide d'un kit (Promega) dont on retrouve le protocole détaillé à l'Annexe 1 au point 8.5. Une fois purifiés les fragments d'ADN ont été séquencés. Le matériel à utiliser est décrit à l'Annexe 2 au point 9.4.2.

3.4.4 Séquençage

Le séquençage a été fait par Microsynth (www.microsynth.ch) dans le sens « forward » et « reverse ». Le volume final à envoyer est de 10µl, en comptant 20pmoles/µl pour les amorces et 15ng par 100 bases. Il faut donc savoir combien de bases ont été amplifiées (ici on a amplifié

252pb) et mesurer au spectrophotomètre (NanoDrop, ND-1000 v.1.2.3) la quantité d'ADN présente dans l'échantillon. Une fois le résultat du séquençage obtenu, on utilise un programme de lecture comme DNASTAR Lasergene 7, SeqMan puis dans PubMed (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), on fait un blast (acronyme de basic local alignment search tool) sur les séquences pour voir à quelles souches elles correspondent.

3.5 Détection de pathogènes (*A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. et *Babesia* spp.) chez les tiques de rongeurs du canton de Berne

Nous avons recherché des pathogènes considérés comme émergents en Europe et pouvant atteindre la santé humaine (*A. phagocytophilum*, *Babesia* spp. et *Rickettsia* spp.) chez des nymphes *I. ricinus* nourries en tant que larves sur des rongeurs sauvages.

3.5.1 Extraction ADN des pathogènes

Nous avons procédé à l'extraction d'ADN de pathogènes à partir des tiques de rongeurs du canton de Berne, analysées individuellement, qui n'ont pas servi pour la détection du virus du TBE. Pour cela, nous avons utilisé le kit « Qiasymphony virus et bactéries » (Qiagen, Suisse) selon le protocole fourni par le fabricant avec le robot Qiasymphony (Qiagen, Suisse). Cette extraction a eu lieu dans les laboratoires de Spiez. Ce système se base sur des billes magnétiques qui permettent à l'ADN et l'ARN de s'y coller. On obtient un volume final de 85 µl. Les échantillons ont été ensuite aliquotés dans des plaques de 96 puits et stockés à -80°C.

3.5.2 Amplification ADN des pathogènes

La recherche de *Babesia* spp. et *Rickettsia* spp. et l'identification des espèces se sont faites par Reverse Line Blot (RLB) (cf. chapitre 3.5.3). Pour *A. phagocytophilum* nous avons utilisé la real-time PCR dont le principe de base est expliqué au chapitre 3.4.2.

Différents gènes ont été utilisés pour amplifier ces différents pathogènes et les amorces utilisées sont toutes décrites dans l'Annexe 1 au point 8.3.

Pour *A. phagocytophilum*, ce sont 77 pb du gène msp2 qui ont été amplifiées selon Courtney et al. (2004). La méthode est décrite dans l'Annexe 1 au point 8.2.2.

Les amorces utilisées pour l'amplification des *Babesia* sont celles utilisées par Georges et al. (2001) et elles amplifient environ 450 pb du gène 18S. La méthode d'amplification d'après Bekker et al. (2002) est une touchdown PCR décrite dans l'Annexe 1 au point 8.2.4.

Pour *Rickettsia* spp., ce sont 345 pb de l'espace intergénique du gène 23S-5S qui ont été amplifiées selon Jado et al. (2006) et la méthode est décrite dans l'Annexe 1 au point 8.2.5. Les positifs qui ont été utilisés étaient soit *A. phagocytophilum* souche Webster¹, *R. conorii*² ou *B. divergens*².

3.5.3 Reverse Line Blot (RLB)

Cette méthode repose sur l'hybridation de matériel amplifié, dont un des brins est biotiné en 5', avec des oligonucléotides spécifiques (sondes) fixés à une membrane de nylon par un groupe amine et dont la détection se fait par chimiluminescence (complexe streptavidine-peroxydase) selon la figure 11. Toute la procédure est décrite dans l'Annexe 1, au point 8.2.7 et tout le matériel ainsi que les solutions à utiliser dans cette méthode se trouvent à l'Annexe 2, au point 9.5.

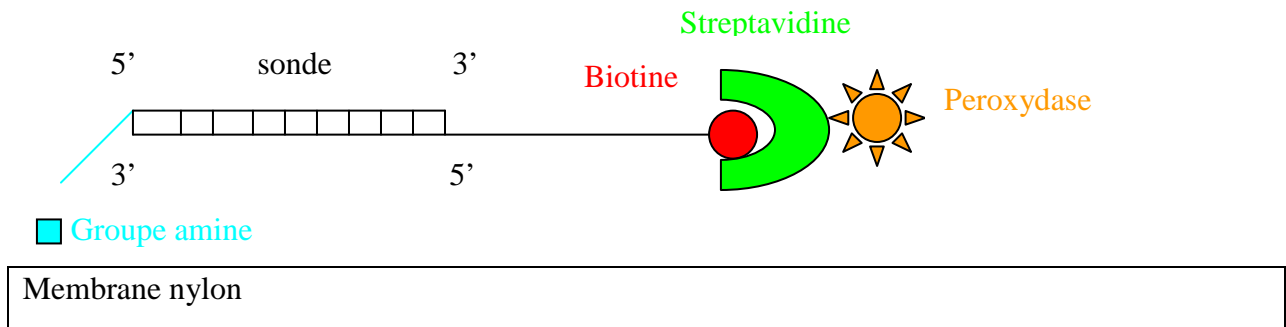


Figure 11 : Schéma représentant le principe de la RLB élaboré à partir du modèle de F. Morán (2007).

La première étape de cette méthode consiste à activer une membrane de nylon en appliquant des sondes spécifiques à la cible désirée. Les sondes sont toutes synthétisées avec un groupe amine (NH₂) en 5', permettant une liaison covalente avec une membrane de nylon, biodyne[®] C. La marche à suivre est décrite dans l'Annexe 1, au point 8.2.7.1.

La seconde étape, décrite au point 8.2.7.2, consiste à hybrider le matériel amplifié.

Afin d'utiliser à nouveau la membrane, on enlève les produits amplifiés de cette dernière en suivant le point 8.2.7.3.

¹ Obtenu par le Dr Ana Sofia Santos, Centro de Estudos de Vectores e Doenças infecciosas, Instituto Nacional de Saude Dr Ricardo Jorge. Edificio LEMES, Lisboa, Portugal.

² Obtenu par le Dr Simona Casati, Institut Cantonal de Microbiologie, Bellinzzone, Suisse.

3.6 Détection et identification de l'ADN de l'hôte dans la tique *I. ricinus*

Afin d'identifier les hôtes sur lesquels les tiques se sont nourries lors de leur premier gorgement, nous avons d'abord isolé l'ADN de l'hôte présent dans l'intestin de la tique. Nous avons ensuite amplifié le gène 12SrDNA mitochondrial (Humair et al. 2007, Moràn Cadenas et al. 2007b) et l'ADN d'hôte a été détecté et identifié par RLB.

3.6.1 Extraction ADN de l'hôte

Nous avons utilisé de l'hydroxyde d'ammonium 0.7M (méthode modifiée à partir de Guy et Stanek (1991) et de Rijpkema et al. (1996)) sur des nymphes en quête provenant de Thun, Belp, Kiesen, et Trimstein récoltées en 2006 et 2008 que l'on a préalablement congelées à -20°C.

La marche à suivre est décrite à l'Annexe 1, au point 8.1.2.

3.6.2 Amplification ADN de l'hôte

Nous avons amplifié un fragment de 148 pb du gène 12S avec des amorces (12S6F et B-12S-9R) dessinées par Humair et al. 2007 qui sont décrites dans l'Annexe 1, au point 8.3. La marche à suivre est décrite dans l'Annexe 1, au point 8.2.6. Les témoins positifs qui ont été utilisés étaient de l'ADN de *Mustela putorius* ou *Meles meles*.

3.6.3 Détection et identification de l'ADN de l'hôte

La RLB, méthode décrite à l'Annexe 1 au point 8.2.7, a permis la détection et l'identification des hôtes en utilisant des sondes permettant l'identification de 31 hôtes différents (Humair et al. 2007) qui sont décrites dans le Tableau 7 de l'Annexe 1, au point 8.4.

4. Résultats

4.1 Publication 1

Variable spikes in tick-borne encephalitis incidence in 2006 independent of variable tick abundance but related to weather.

Parasites and Vectors. 2008. 1 :44. Pages 1-18.

4.2 Publication 2

Microclimate and the zoonotic cycle of tick-borne encephalitis virus in Switzerland.

Journal of Medical Entomology. 2011. 48:3. Pages 615-627.

This article is the copyright property of the Entomological Society of America and may not be used for any commercial or private purpose without specific written permission of the Entomological Society of America.

4.3 Publication 3

Serological evidence of tick-borne encephalitis virus infection in rodents captured at four sites in Switzerland

Journal of Medical Entomology. *Submitted*.

4.4 Publication 4

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 and zoonotic diseases. 2011. [Epub ahead of print].

4.5 Publication 5

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

Journal of Medical Entomology. *Submitted*.

4.1 Publication 1

Variable spikes in tick-borne encephalitis incidence in 2006 independent of variable tick abundance but related to weather.

Parasites and Vectors. 2008. 1 :44. Pages 1-18.

Variable spikes in tick-borne encephalitis incidence in 2006 independent of variable tick abundance but related to weather.

Sarah E Randolph¹, Loreta Asokliene^{2,3}, Tatjana Avsic-Zupanc⁴, Antra Bormane⁵, Caroline Burri⁶, Lise Gern⁶, Irina Golovljova⁷, Zdenek Hubalek⁸, Natasa Knap⁴, Maceij Kondrusik⁹, Anne Kupca¹⁰, Milan Pejcoch⁸, Veera Vasilenko⁷ and Milda Žygutienė²

Parasites and Vectors. 2008. 1: 44. Pages 1-18.

¹ Department of Zoology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford, OX1 3PS, UK

² Centre for Communicable Diseases Prevention and Control, Vilnius, Lithuania

³ Ministry of Health of the Republic of Lithuania, Vilnius, Lithuania

⁴ Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Ljubljana, Slovenia

⁵ State Agency "Public Health Agency", Riga, Latvia

⁶ Institut de Parasitologie, Université de Neuchâtel, Switzerland

⁷ National Institute for Health Development, Tallinn, Estonia

⁸ Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences, Brno, Czech Republic

⁹ Department of Infectious Diseases, Medical Academy, Bialystok, Poland

¹⁰ Department of Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany

Research

Open Access

Variable spikes in tick-borne encephalitis incidence in 2006 independent of variable tick abundance but related to weather

Sarah E Randolph*¹, Loreta Asokliene^{2,3}, Tatjana Avsic-Zupanc⁴, Antra Bormane⁵, Caroline Burri⁶, Lise Gern⁶, Irina Golovljova⁷, Zdenek Hubalek⁸, Natasa Knap⁴, Maceij Kondrusik⁹, Anne Kupca¹⁰, Milan Pejcoch⁸, Veera Vasilenko⁷ and Milda Žygutienė²

Address: ¹Department of Zoology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford, OX1 3PS, UK, ²Centre for Communicable Diseases Prevention and Control, Vilnius, Lithuania, ³Ministry of Health of the Republic of Lithuania, Vilnius, Lithuania, ⁴Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Ljubljana, Slovenia, ⁵State Agency "Public Health Agency", Riga, Latvia, ⁶Institut de Parasitologie, Université de Neuchâtel, Switzerland, ⁷National Institute for Health Development, Tallinn, Estonia, ⁸Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences, Brno, Czech Republic, ⁹Department of Infectious Diseases, Medical Academy, Bialystok, Poland and ¹⁰Department of Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany

Email: Sarah E Randolph* - sarah.randolph@zoo.ox.ac.uk; Loreta Asokliene - loreta.asokliene@sam.lt; Tatjana Avsic-Zupanc - tatjana.avsic@mf.uni-lj.si; Antra Bormane - antra.bormane@sva.lv; Caroline Burri - caroline.burri@unine.ch; Lise Gern - lise.gern@unine.ch; Irina Golovljova - irina.golovljova@tai.ee; Zdenek Hubalek - zhubalek@brno.cas.cz; Natasa Knap - natasa.knap@mf.uni-lj.si; Maceij Kondrusik - mkondrusik@poczta.onet.pl; Anne Kupca - anne.kupca@gmx.de; Milan Pejcoch - mpejcoch@brno.cas.cz; Veera Vasilenko - veera.vasilenko@tai.ee; Milda Žygutienė - m.zygutienė@ulpkc.lt

* Corresponding author

Published: 9 December 2008

Received: 3 October 2008

Parasites & Vectors 2008, 1:44 doi:10.1186/1756-3305-1-44

Accepted: 9 December 2008

This article is available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/1/1/44>

© 2008 Randolph et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: The incidence of tick-borne encephalitis showed a dramatic spike in several countries in Europe in 2006, a year that was unusually cold in winter but unusually warm and dry in summer and autumn. In this study we examine the possible causes of the sudden increase in disease: more abundant infected ticks and/or increased exposure due to human behaviour, both in response to the weather.

Methods: For eight countries across Europe, field data on tick abundance for 2005–2007, collected monthly from a total of 41 sites, were analysed in relation to total annual and seasonal TBE incidence and temperature and rainfall conditions.

Results: The weather in 2006–2007 was exceptional compared with the previous two decades, but neither the very cold start to 2006, nor the very hot period from summer 2006 to late spring 2007 had any consistent impact on tick abundance. Nor was the TBE spike in 2006 related to changes in tick abundance. Countries varied in the degree of TBE spike despite similar weather patterns, and also in the degree to which seasonal variation in TBE incidence matched seasonal tick activity.

Conclusion: The data suggest that the TBE spike was not due to weather-induced variation in tick population dynamics. An alternative explanation, supported by qualitative reports and some data, involves human behavioural responses to weather favourable for outdoor recreational activities, including wild mushroom and berry harvest, differentially influenced by national cultural practices and economic constraints.

Background

The epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Europe is characterized by marked variability in space and time on both large and small scales. One recent event currently generating much speculation is the dramatic spike in incidence that occurred in 2006 in several countries: in Switzerland, Germany, Slovenia and Czechland (i.e. Czech Republic), incidence exceeded average levels for the previous decade by 79–183%, and was markedly higher than for any previous single year (Table 1). In Poland, Lithuania, Slovakia, Italy and France, TBE incidence was also high, but did not exceed that seen in some other recent years. In 2007, incidence reverted to average or below average levels in all these countries, while in Sweden and Norway a steady upward trend continued. In Estonia, Latvia, Finland and Hungary, there was very little change over the past three years, with incidence lower than average for the past decade.

So far, the best explanation for this TBE spike in Czechland has centred around the unusual weather conditions of 2006 (described below), that are suggested to have improved tick survival over winter, accelerated the increase in spring questing activity by ticks, and encouraged more recreational activity by humans in tick-infested forests, particularly as conditions were especially favourable for good mushroom crops [1,2]. In some respects, this seems intuitively plausible. *Ixodes ricinus* ticks that transmit the TBE virus inhabit forests, where each life stage (larva, nymph, adult) spends one period of a few days feeding on a vertebrate host from a wide range of species; after each meal they spend seasonally variable periods of about 3–12 months in the leaf litter developing to the next stage, and then up to about two months on the vegetation questing for their next host [3,4]. The rate of devel-

opment is temperature-dependent, and all ticks are highly sensitive to moisture stress [5-7]. Meanwhile, people obviously adjust their opportunistic recreational activities according to the weather. On the other hand, ticks of this species are highly cold-adapted, as witnessed by their distribution through northern Europe as far north as c.65°N in Sweden and northern Russia as far east as the Ural mountains, with no evidence that they actually suffer lower natural mortality rates leading to higher TBE incidence in warmer winter conditions [2]; the TBE spike actually followed an exceptionally cold winter (see below). Indeed, repeated freeze-thaw may be more harmful than persistent sub-zero temperatures, but there is no statistically significant relationship between the incidence of TBE or Lyme borreliosis over 1998–2004 and the number of days of thaw during the previous winter in western Czechland [2]. Ticks also undergo diapause over winter [8] with no development and only very occasional questing activity at temperatures below about 7°C [4,9-13], thereby minimizing the biological significance of increases in temperatures below this threshold level.

Here we test the impact of the variable weather conditions of 2005–07 on a) the timing of tick seasonal activity, b) the abundance of ticks, c) the seasonal distribution of TBE cases and d) the occurrence of a spike in TBE incidence in 2006, amongst eight European countries: Switzerland, Germany, Slovenia, Czechland, Poland, Lithuania, Estonia and Latvia.

Methods and data

Data on monthly cases of TBE were acquired from national public health agencies or their web sites. TBE is a notifiable disease in each country considered.

Daily maximum temperature (°C) and daily precipitation (mm) were downloaded from the European Climate Assessment web site [[14], available at <http://eca.knmi.nl>] for the years 1970–2007 for a representative site in each of eight countries (locations shown in Figures 1 and 2). Those for the site in Switzerland were provided by Professor Martine Rebetez (Swiss Federal Research Institute WSL, Lausanne). Given the very high degree of similarity in the weather patterns within any one country, and even between neighbouring countries, each site is taken as representative of the relative conditions in each year in each country, or, in larger countries, the part matched by tick sampling sites and TBE data. Over the course of a year, limiting conditions may possibly switch from minimum temperatures in the winter to maximum temperatures in the summer, but as these two daily measures are closely correlated the consistent use of maximum temperatures is adequate for inter-annual comparisons, which is the purpose of this study. Mean monthly values of each variable for each year were plotted against each other to give visual

Table 1: Annual TBE cases 2005–07, compared with means over the previous decade.

	Annual TBE cases 1995–04 mean ± 1 st dev	2005	2006	2007
Switzerland	92 ± 29	208	245	111
Germany	193 ± 72	432	546	238
Slovenia	231 ± 81	297	445	196
Czechland	574 ± 115	643	1029	546
Poland	214 ± 71	174	316	233
Lithuania	416 ± 194	242	462	234
Slovakia	75 ± 15	50	91	46
Italy	14 ± 9	19	30	17
France	3 ± 3	0	6	0
Sweden	94 ± 39	130	163	190
Norway	2 ± 1	0	5	12
Estonia	233 ± 98	164	171	140
Latvia	593 ± 388	142	170	171
Finland	24 ± 11	17	18	20
Hungary	117 ± 71	52	56	62

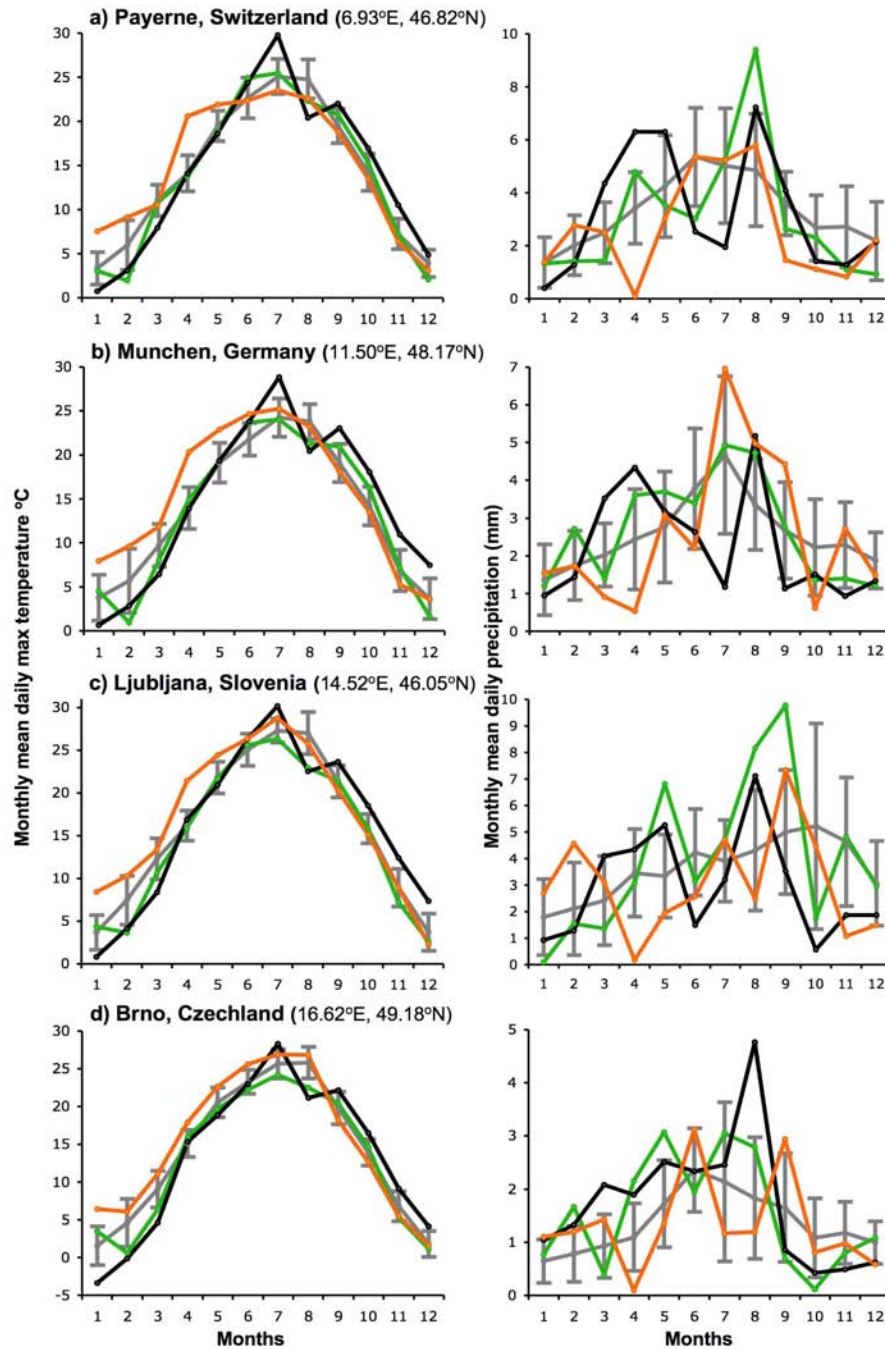
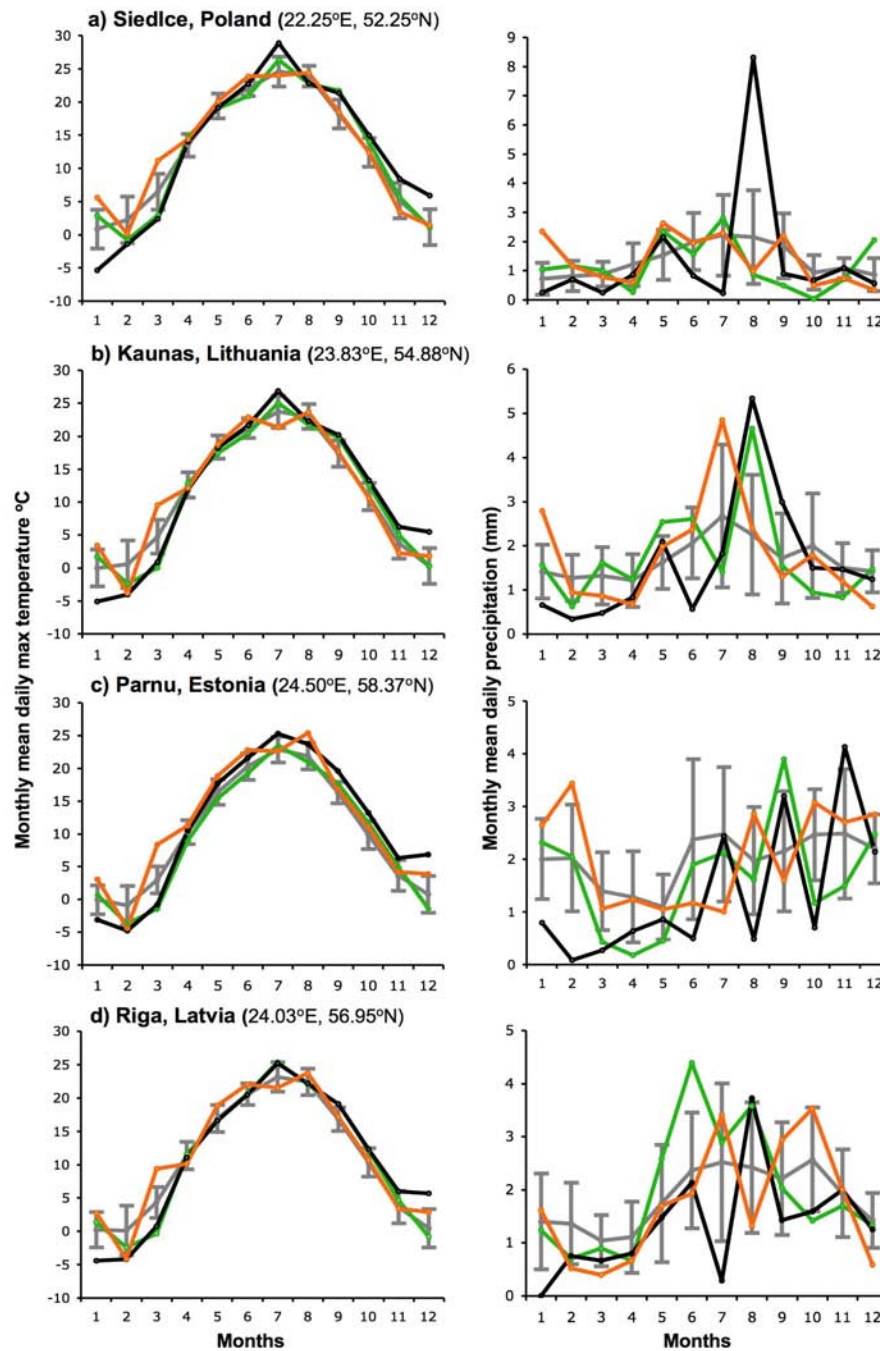


Figure 1
Monthly means of daily maximum temperature (left column) and daily precipitation (right column) in 1989–07 at four locations across Europe. Conditions in 2005 (green), 2006 (black) and 2007 (gold) are shown relative to means \pm 1 st dev for the whole period 1989–07 (grey). Payerne, Munchen and Brno are close to tick sampling sites within particular parts of these countries. Ljubljana is taken as representative of each country across which tick sampling sites were scattered.

**Figure 2**

Monthly means of daily maximum temperature (left column) and daily precipitation (right column) in 1989–07 at four locations across Europe. Conditions in 2005 (green), 2006 (black) and 2007 (gold) are shown relative to means \pm 1st dev for the whole period 1989–07 (grey). Siedlce is close to tick sampling sites within NE Poland. Kaunas, Parnu and Riga are taken as representative of each country across which tick sampling sites were scattered.

impressions of the temperature and moisture conditions for 2005, 2006 and 2007 relative to the full range of these conditions over 1970–2007 (Figures 3 and 4). As a significant step increase in temperatures occurred in 1989 throughout Europe [15], conditions for the past three years were compared statistically with the means (± 1 standard deviation) for 1989–2007.

Questing ticks of all stages were counted monthly through 2005 (only in Slovenia), 2006 and 2007 at 4–8 sites per country, using 20×5 m standardized drags of 1 m² blankets (sites listed in Table 2). Ticks were sampled in specific parts of Switzerland (Bern), Germany (Bavaria), Czechland (NE and SE Moravia) and Poland (Podlaskie) and related to temporal variation in TBE incidence in the same part of the country. Tick sampling sites were scattered throughout the other four relatively small countries, so national TBE incidence data were used. There is, however, a fundamental epistemological gap between tick data, meteorological data and TBE case data because of the different spatial scales at which the causal processes of each operate and the data are recorded. Ticks respond to micro-climate, but macro-climate records give reasonable estimates of the gross seasonal and annual differences experienced by ticks and show high degrees of spatial correlation. Macro-climate records from sites close to, or within the geographical limits of, the tick sampling sites are therefore sufficient for this analysis. Tick abundance in any one place cannot be related to local TBE incidence because the place of infection is commonly not known and cases are recorded on a scale that encompasses different sites where tick densities vary. Furthermore, stochasticity and statistical non-significance arise from the small number of TBE cases on small spatial scales. Nevertheless, temporal trends in tick abundance (but not absolute abundance) monitored at a number of sites can be compared with trends in TBE incidence to test for consistent correlations.

Blankets are relatively inefficient at picking up ticks and yield only approximate indices of true tick density. Comparisons of absolute tick densities in different places are inappropriate due to the differential sampling biases between operators and the small number, but high heterogeneity, of sites. Given standardized methods, however, blanket-dragging routes within tens of metres of each other throughout the 2–3 years and the equal efforts by the same operators throughout each year in this study, the indices can reveal crude comparisons of monthly and annual abundance from year to year. Here we use the measured indices of nymphal density to make inter-annual comparisons at each site of the timing and abundance of the tick stage that is sampled most reliably and also most likely to infect humans. Note that the total number of observations for each factor varies because not

all sites gave unequivocal measures of each factor presented in the Results (if, for example, ticks were already active at the first sampling date in 2006, or showed equal high abundance over more than one month).

It is incorrect to look for formal correlations between the abundance of ticks and environmental factors, because such factors do not drive abundance but rather the rates of the underlying causal demographic processes. *I. ricinus* experiences rates of mortality and development from previous stages determined by a number of factors each acting at different times before the appearance of ticks in the questing population. The common perception that warmer weather in winter and spring will result in higher tick numbers and therefore higher TBE incidence is tested simply by comparing the relative measures of these variables associated with the TBE spike in 2006.

Results

Exceptional weather conditions 2006–2007

In the countries considered here, the salient features of the monthly means of daily maximum temperature and daily precipitation with respect to the present investigation (Figures 1, 2, 3 and 4) are as follows. In 2006, after an exceptionally cold ($- > 1$ st dev) period from January to March, each month from July to December was exceptionally warm ($+ > 1$ st dev) compared with the 1989–2007 average, and almost all were also drier than average, except for August that was atypically cool and wet. The unusually warm summer started as early as June in Switzerland, Bavaria (Germany) and Slovenia (Figure 3); it was least marked in Latvia (Figure 4), where only September and December were exceptionally warm, and the reversal in August was least marked in Latvia, Lithuania and NE Poland (wet but average temperatures), and Estonia (warm and dry).

Exceptionally warm conditions persisted from December 2006 through the first half of 2007, until as late as June in Bavaria, SE Czechland and Estonia, but this was least consistent in NE Poland, Lithuania and Latvia, where February was also particularly cold and spring was average. In all countries, parts of the summer and autumn were commonly much wetter in 2007 than 2006, but there was no consistent pattern.

The significant point is not that all these individual months were extreme relative to the past, but that there was an exceptional combination of far-from-average weather over a long period from mid 2006 to mid 2007 in most, but not all, of these eight countries.

Timing of tick questing activity in relation to weather

As expected from the temperature-dependence of tick activity, in 2007 questing nymphs were recorded up to 1–

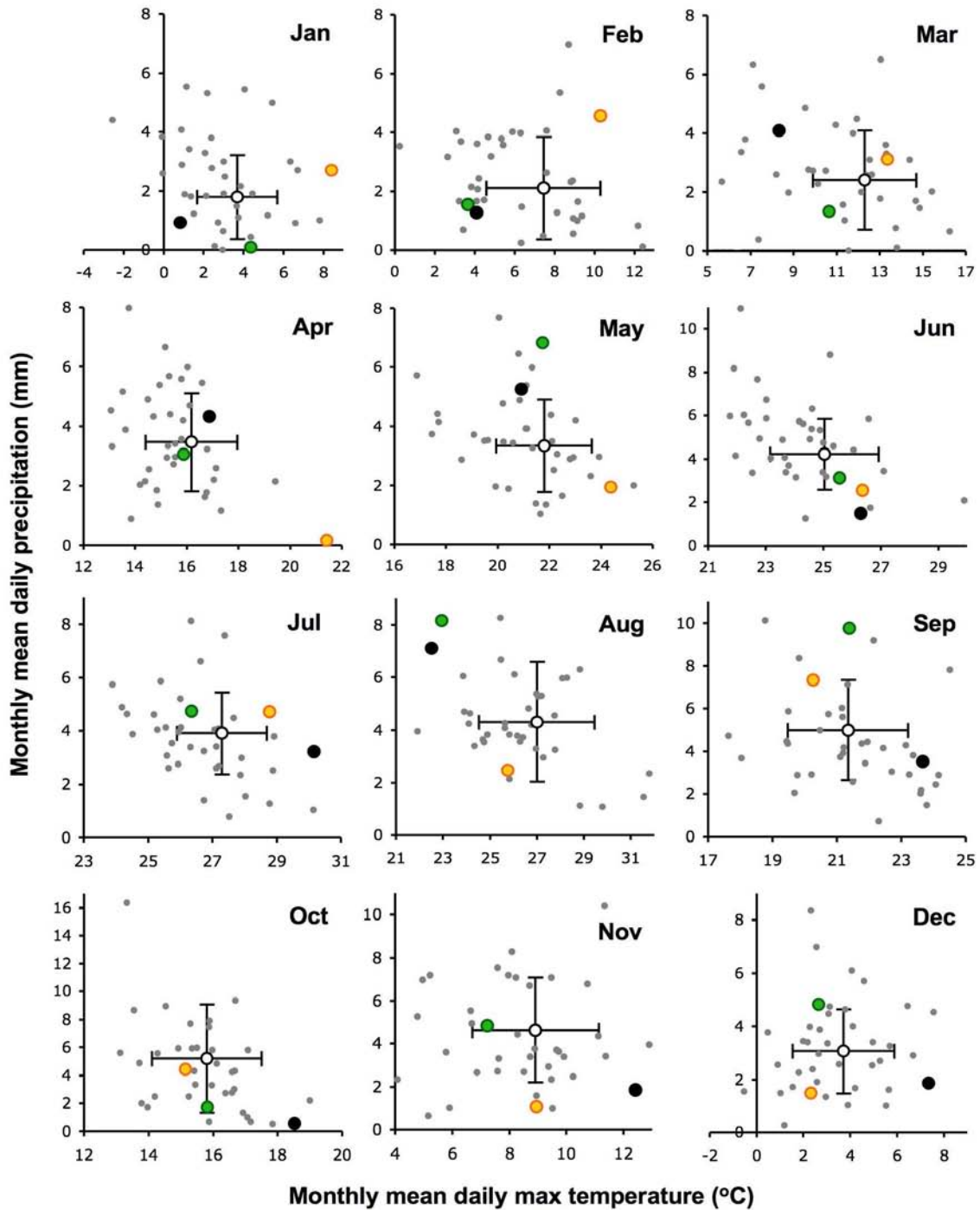


Figure 3
Scattergrams of monthly mean daily precipitation and daily maximum temperature for each year for Ljubljana, Slovenia. 1970–2004 (grey dots), 2005 (green), 2006 (black) and 2007 (gold). Mean \pm 1 st dev for the period 1989–2007 (open circle and bars).

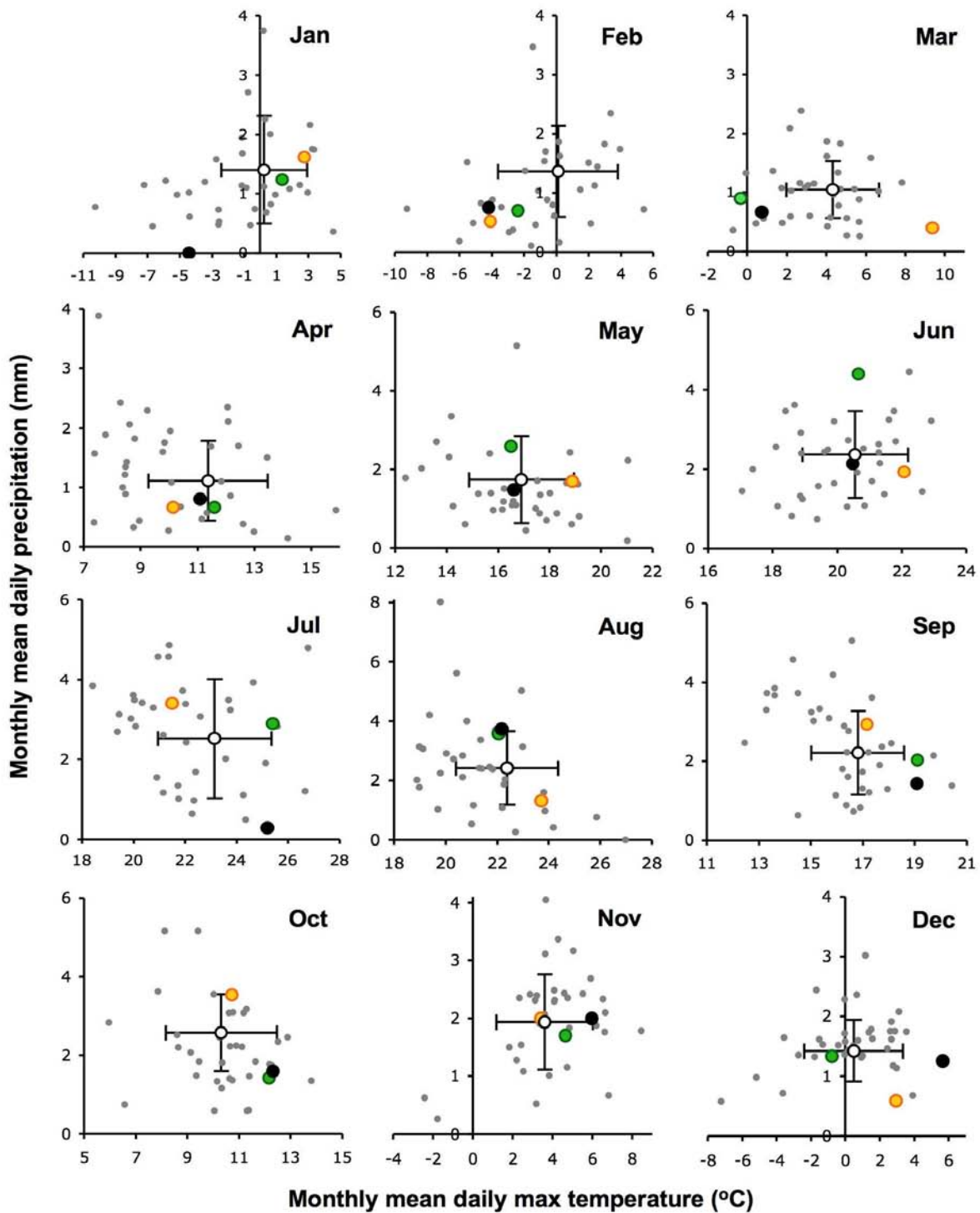


Figure 4
Scattergrams of monthly mean daily precipitation and daily maximum temperature for each year for Riga, Latvia, 1970–2004 (grey dots), 2005 (green), 2006 (black) and 2007 (gold). Mean \pm 1 st dev for the period 1989–2007 (open circle and bars).

Table 2: Characteristics of tick seasonal dynamics and abundance and TBE incidence.

Tick sampling sites			Nymphs peak month		Nymphs annual total		TBE cases	
	long	lat	2006	2007	2006	2007	2006	2007
Switzerland								
Belp, Bern	7.5	46.9	6	6	403	126	42	5
Trimstein, Bern	7.6	46.9	6	6	381*	90		
Kiesen, Bern	7.6	46.8	6	4	321*	300		
Thoune, Bern	7.6	46.7	6	6	52	116		
Germany (Bavaria)								
Dachau, Bavaria	11.3	48.3	6	5	76	132	188	109
Munchen, Bavaria	11.6	48.2	5	4	38	36	0	2
Amberg, Bavaria	11.8	49.5	5	5	76	177	1	1
Rosenheim, Bavaria	12.1	47.9	5	5	51	184	8	3
Passau, Bavaria	13.3	48.7	6	5	273	483	7	1
Slovenia								
Žrni kal, Koper	13.9	45.5	4	3	350	295	5	1
Osolnik, Ljubljana	14.3	46.1	6	5	221	173	120	60
Rakovnik, Ljubljana	14.4	46.1	6	5	338	326		
Štefanja gora, Ljubljana	14.5	46.3	6	5	473	326		
Kamniška Bistrica, Ljubljana	14.6	46.3	5	5	327	146		
Sodrazica, Ljubljana	14.7	45.8	4	5	219	347		
Mozirje, Celje	15.0	46.3	4	5	368	424	44	31
Czech Republic								
Krnov, Bruntál district	17.7	50.1	5	4	268	287	18	8
Vranovska, Znojmo district	15.8	48.9	4	5	375	362	7	6
Obora, Brno-mesto district	16.5	49.3	5	3	185	195	44	18
Valtice, Bøeclav district	16.8	48.8	5	3	83	61	3	2
Poland								
Kolno, Podlaskie	21.9	52.4	6	6	58	87	155	97
Grajewo-Ruda, Podlaskie	22.5	54.0	6	6	186	92		
Siemiatycze, Podlaskie	22.9	52.4	5	6	26	41		
Suwalki, Podlaskie	23.0	54.1	6	5	70	91		
Bialystok, Podlaskie	23.2	53.1	6	4	81	122		
Hajnowka, Podlaskie	23.9	54.7	6	4	92	54		
Lithuania								
Klaipeda, Klaipeda	21.1	55.8	5	5	145	128	5	3
Radviliskis, Siauliai	23.6	55.8	6	5	73	77	17	5
Kedainiai, Kedainiu	24.0	55.3	7	5	126	144	32	10
Utena, Utenos	25.5	55.6	6	4	34	28	4	2
Estonia								
Puhtu, Laanemaa	23.6	58.6	5	5	636	197	2	2
Are, Parnumaa	24.5	58.5	-	5	163	128	23	21
Kilingi-Nomme, Parnumaa	24.9	58.2	6	5	61	50		
Andineeme, Harjumaa	25.5	59.5	6	5	88	76	19	23
Latvia								
Vergale, Liepaja district	21.2	56.7	5	4	73	66	10	11
Blidene, Saldu district	22.8	56.6	7	5	37	20	1	1
Lapmezciems, Tukuma district	23.5	57.0	5	5	146	172	7	12
Tireli, Riga district	23.8	56.8	4	4	61	182	47	48
Mezaparks, Riga city	24.2	57.0	4	6	62	32		
Ozolnieki, Jelgava district	23.8	56.7	5	4	86	85	3	0
Kombull, Kraslava district	27.1	56.0	5	5	20	11	1	0

Bold, > 20% difference. Nymphal *Ixodes ricinus* sampled monthly in 2006 and 2007 at 41 sites in 8 countries. *Slight underestimates for 2006 because ticks initially (Mar-May) sampled at a site at 200 m higher altitude. TBE cases refer to numbers registered in each administrative region encompassing the tick sampling sites.

2 months earlier than in 2006 at 27 out of the 33 sites at which this could be reliably scored, generally appearing in large numbers in March or April (even in January at the site near the Adriatic coast of SW Slovenia) once the monthly mean daily maximum temperature had exceeded c.7°C (Figure 5). Correspondingly, the seasonal peak was reached 1–2 months earlier in 2007 (typically in May, but as early as March) at 22 out of 40 sites, in the same month at 13 sites and later at 5 sites (Table 2 and Figures 6 and 7). Then, from June or July onwards until the end of the summer, tick numbers were lower in 2007 than in 2006 (except in Bavaria), most likely because the questing tick population was depleted through natural mortality and as ticks found hosts earlier, and was not replenished by new recruits until the autumn (see discussion).

Abundance of ticks in relation to weather

The abundance of questing ticks in any year is determined by mortality rates during development from the previous life stage over the past 3–12 months (i.e. usually including the winter period), contemporary weather conditions that determine tick activity, and also the density of wildlife hosts that remove ticks from the questing population. There is no evidence from simple comparisons of tick abundance in 2006 and 2007 from 41 sites in eight countries that the unusually warm conditions from July 2006 to June 2007 allowed better tick survival, greater activity levels and therefore greater abundance. Conversely, the very cold late winter of 2006 evidently did not adversely affect tick abundance. In 2007, the annual totals of monthly nymphal tick counts were lower (< 80% of 2006 levels) at 13 sites, higher (> 120% of 2006 levels) at 11 sites and differed by < 20% at the remaining sites (Table 2). Likewise, the seasonal peak numbers of nymphs were lower in 2007 at 16 sites, higher at 11 sites and < 20% different at the remaining sites (mean monthly densities per country shown in Figures 6 and 7 are influenced by certain sites where ticks were most abundant). Tick numbers were most consistently higher in 2007 in Bavaria (4 out of 5 sites), changed least in Lithuania (all 4 sites) and Czechland (4 out of 5 sites), and showed strongly inconsistent patterns elsewhere.

Likewise, data available only from Slovenia indicate that the much greater abundance of ticks in 2006 than in 2005 at all seven monitoring sites (Figure 6c) followed 18 months (January 2005 to June 2006) of temperature and rainfall conditions that were very close to the long-term average (Figures 1c and 3), apart from February and August 2005 and January–March 2006 that were exceptionally cold.

Occurrence of TBE spike in 2006 in relation to weather

The spike in TBE incidence in 2006 in Switzerland (166% above the average for 1995–2004), Germany (183%),

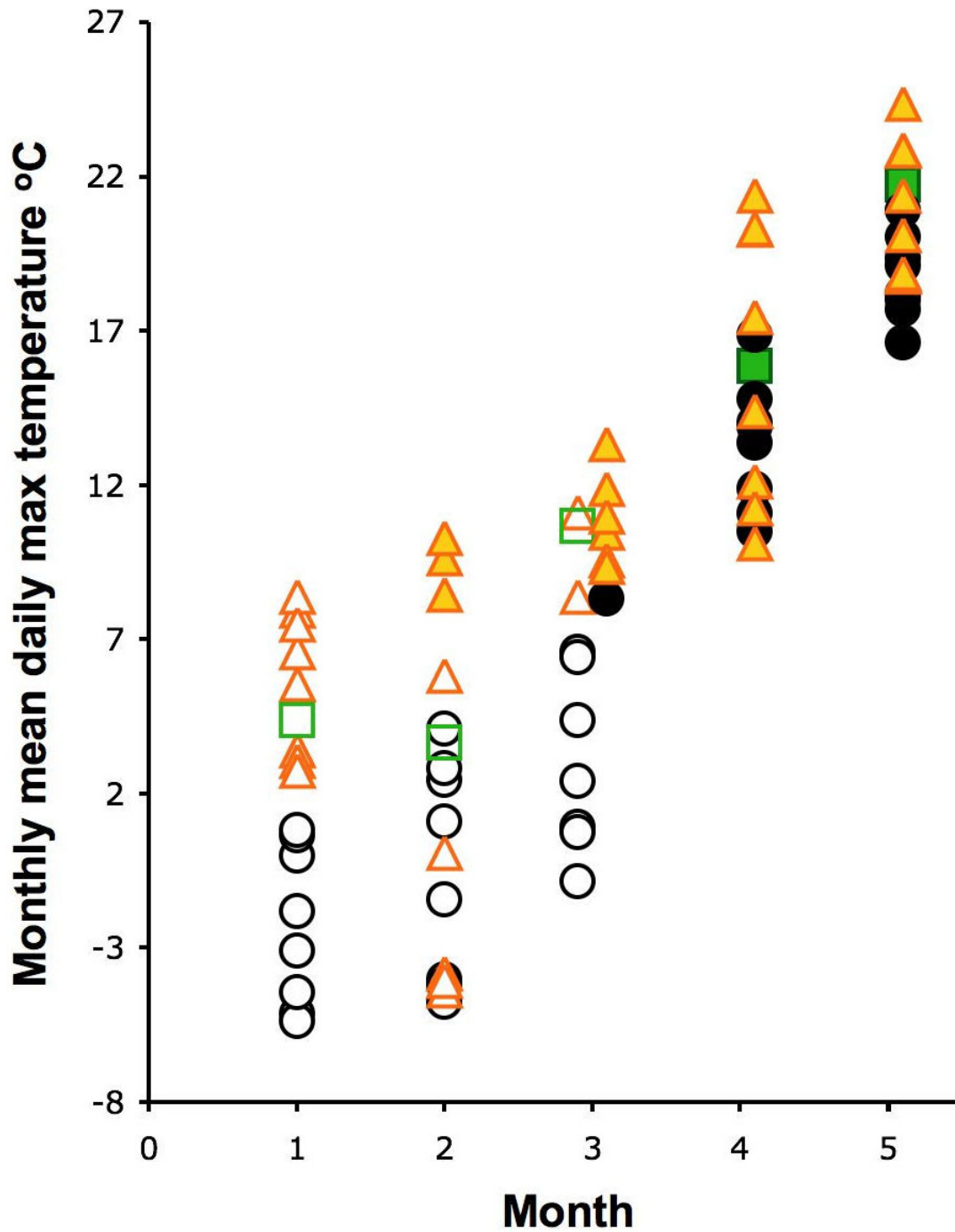
Slovenia (93%) and Czechland (79%) (Table 1) coincided with the extreme weather of June–December that year. On the other hand, in 2005 TBE incidence was also c.125% above average in both Switzerland (but not the canton of Bern) and Germany (including Bavaria) despite unexceptional weather. Likewise, in Poland (2006 incidence 48% above the 1995–2004 average) and Lithuania (11%) the incidence was as high or higher in several other years of the past decade (see <http://www.tbe-info.com>) in the absence of unusual weather patterns; although in the highest year, 2003, NE Poland experienced hot dry weather from May to September (including August) similar to 2006, Lithuania did not. In Latvia and Estonia, TBE incidence was no higher in 2006 than in other years, but while the 2006 summer–autumn weather was less extreme in Latvia, in Estonia it was as extreme as elsewhere except without the cool wet August. Thus it is clear that the association between exceptionally high annual TBE incidence and unusual weather patterns of the sort seen in 2006 is not consistent between countries, indicating that other factors act differentially in each country.

Relationship between tick abundance and TBE incidence

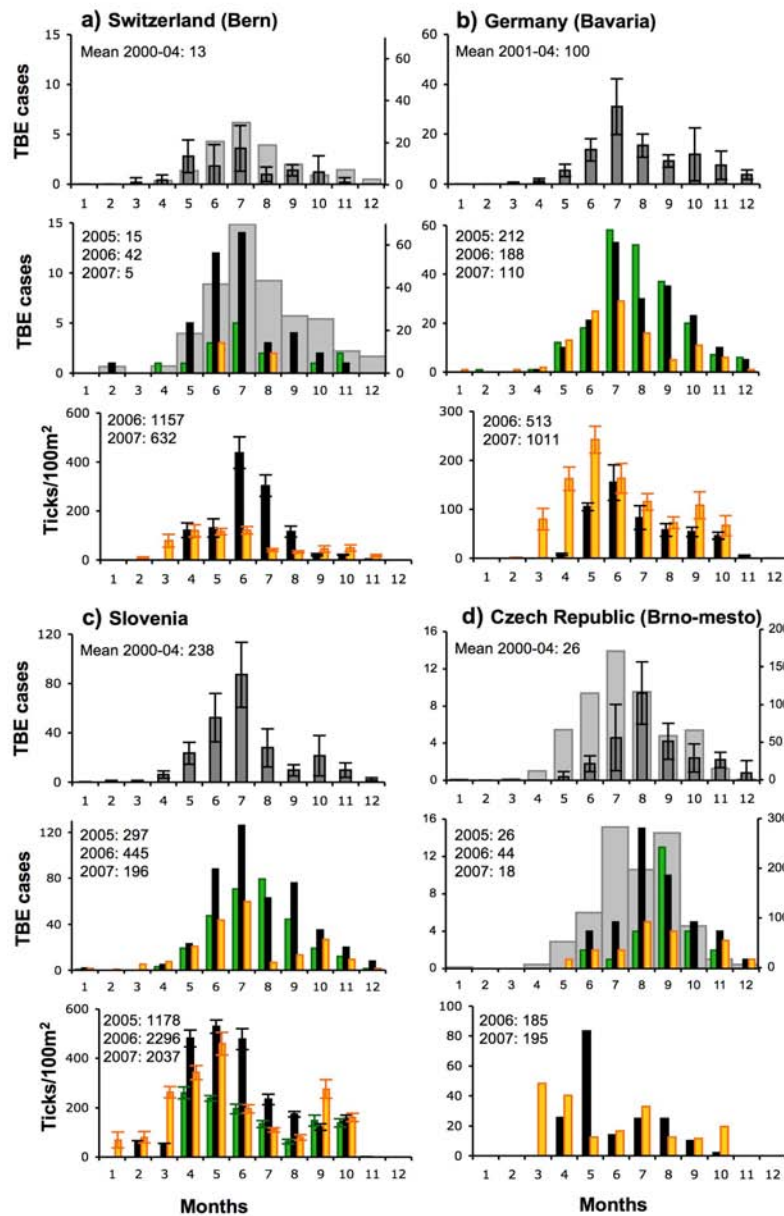
As a major determinant of infection risk to humans (as distinct from human exposure to that risk) is the abundance of infected ticks, and as this is determined more by tick density than the relatively uniform infection prevalence of TBE virus that rarely exceeds 1%, TBE incidence might be expected to vary directly with tick abundance. This, however, is not the case. In the six countries that showed a TBE spike in 2006, markedly fewer (average 49 ± 25% fewer) TBE cases were recorded in 2007 than in 2006 in each of the regions where ticks were monitored, despite the higher or similar abundance of ticks at 22 out of the 30 sample sites (Table 2). In Estonia and Latvia, moreover, similar TBE incidences were recorded in each year despite markedly higher (27–223%) tick abundance in 2006 at 5 out of the 11 monitoring sites (similar abundance at 5 of the other sites). For reasons mentioned above (see Methods) relative tick densities recorded at the sample sites cannot be taken as representative of the relative risk of infection in each region, and are therefore not expected to be correlated with spatial variation in TBE incidence (as indeed they are not). Nevertheless, these broad inter-annual comparisons indicate that factors other than tick density determine temporal variation in human infections, and specifically the spike in 2006.

Variable mis-matches between tick and TBE seasonality

Clues to interpreting the variable association between unusually high TBE incidence and exceptional weather, and the underlying causes, can be gleaned from examining variation in the degree to which seasonal patterns of TBE cases match those of tick abundance and whether this changed in 2006 (Figures 6, 7 and 8). Given the incuba-

**Figure 5**

Month of onset of activity by *Ixodes ricinus* nymphs in relation to monthly mean daily maximum temperature. Averages for 4–7 tick-monitoring sites in each of Switzerland, Germany, Slovenia, Czechland, Poland, Lithuania, Estonia and Latvia. Temperature recorded at locations near to, or within the geographical limits of, tick sampling sites (see text and Figures 2 and 4 legends). Inactive ticks (open symbols) or active ticks (closed symbols) for 2005 (green square), 2006 (black circle) and 2007 (gold triangle).

**Figure 6**

Monthly distributions of cases of TBE and monthly densities of ticks. a) Bern, Switzerland, b) Bavaria, SE Germany, c) Slovenia, d) Brno-mesto, SE Czechland. Upper and middle histograms for each country: means (± 1 st dev) over 2000–04 (grey), 2005 (green), 2006 (black) and 2007 (gold). In a) TBE case numbers for all Switzerland for 2000–04 (mean annual total 101) and for 2006 (total 259) are shown as pale grey bars and on the right-hand y-axis, behind the data for Bern; in d) TBE case numbers for all Czechland for 2000–04 (mean annual total 623) and for 2006 (total 1029) are shown in the same way. Lower histogram for each country, mean (± 1 st dev) monthly densities of ticks at 4–7 sampling sites matched to the above TBE incidence areas (locations given in Table 2) over 2005 (green), 2006 (black) and 2007 (gold). The tick data are advanced by one month in relation to the TBE data, to account for the approximate delay between tick bite and TBE registration. Annual total numbers of TBE cases and counted ticks for each year are shown.

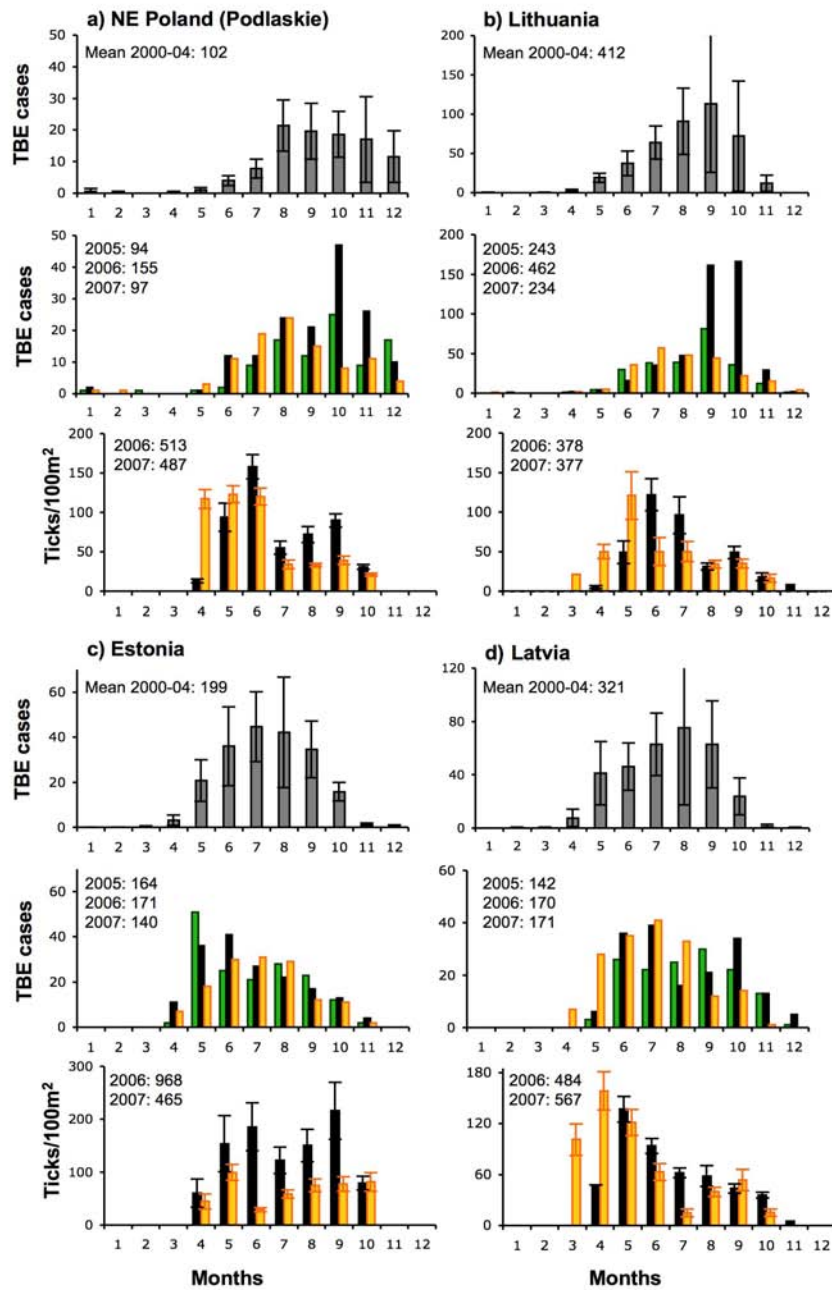


Figure 7
Monthly distributions of cases of TBE and monthly densities of ticks. a) Podlaskie, NE Poland, b) Lithuania, c) Estonia and d) Latvia. Upper and middle histograms for each country: means (± 1 st dev) over 2000–04 (grey), 2005 (green), 2006 (black) and 2007 (gold). Lower histogram for each country, mean (± 1 st dev) monthly densities of ticks at 4–7 sampling sites matched to the above TBE incidence areas (locations given in Table 2) over 2005 (green), 2006 (black) and 2007 (gold). The tick data are advanced by one month in relation to the TBE data, to account for the approximate delay between tick bite and TBE registration. Annual total numbers of TBE cases and counted ticks for each year are shown.

tion period between infection and recognisable symptoms during the second phase of the biphasic illness (average 16–25 days, but sometimes much longer [16]), and the delay during diagnosis and reporting, the seasonal variation in TBE cases is expected to follow the seasonal variation in tick abundance by approximately one month (as shown by the offset x-axes in Figures 6 and 7). In Bern (Switzerland) over 2000–07, TBE was actually recorded in the month following the tick bite in 52% of 48 cases where the latter was known.

This expected match in seasonality is more or less met in Switzerland (Bern), Germany (Bavaria) and Slovenia (Figures 6a, b, c); TBE case numbers typically peak in June–August, decreasing during the autumn once ticks are less abundant. Compared with the baseline mean seasonal TBE pattern over 2000–04, and also the situation in 2007, the excess of TBE cases in 2006 (and to a lesser extent in 2005) in Bavaria, Switzerland and Slovenia started in June or July and continued to follow an elevated version of the typical seasonal curve until the end of the year. Disproportionate monthly increases occurred in August and September in Bavaria and Slovenia and in October in Switzerland as a whole (pale grey bars, Figure 6a), but not in Bern, even though seasonal tick numbers were relatively low by then. This is reflected in the typical, but not invariable, significant correlation between mean tick numbers counted in month n and TBE cases in month $n+1$ (Figures 8a, b, c), but the higher elevation of the slopes for 2006 again emphasize the spike in 2006 independent of greater tick abundance.

In SE Czechland (Brno-mesto district, Jihomoravský administrative region) (Figure 6d) and also the northeast (Bruntal district, Moravskoslezský region – data not shown), the seasonal peak in TBE incidence typically occurs in August, one month later than the mean for Czechland as a whole [1] (pale grey bars, Figure 6d) or for West Bohemia [17], despite the relatively early peak in tick abundance (March–May). In 2006, TBE cases were higher throughout the normal season, but there was a disproportionate increase in the autumn when ticks were at low levels. Monthly TBE incidence was not correlated with mean tick abundance in either 2006 or 2007 (Figure 8d). Curiously, in 2005 the seasonal peak shifted to September, with fewer cases than usual in July and August.

A similar mis-match between tick and TBE seasonality is also seen in Latvia, Lithuania and NE Poland, to increasing degrees in that order (Figures 7a, b and 7d and 8a, b and 8d), where large numbers of TBE cases occur much later in the year relative to peak tick numbers than in the above countries. In Lithuania and Poland, TBE incidence is particularly low in spring and early summer. The excess in TBE cases in 2006 was limited to, but very extreme in,

September and October in Lithuania and October and November in NE Poland. Estonia showed an unusual pattern, particularly marked in 2006, in that although tick abundance remained high until the autumn, TBE incidence declined after the summer (Figure 7c) so again, there was no correlation between the two (Figure 8g).

Human outdoor activities

Data on seasonal and annual variation in numbers of visitors to the Logarska dolina national park in the Logar valley of Slovenia provide some indication of the increase in outdoor recreational activities in response to the clement weather in the second half of 2006. This park, close to the tick sampling site at Mozirje in the north of Slovenia (Table 2), is one of the larger parks in the country in which the timing and relative volume of human activity reflects that in the country as a whole. Relative numbers of monthly visitors for 2003–07 (Figure 9) were monitored by collection of entrance fees daily between 08.00 and 18.00 hrs from April to November. This underestimates total visitor numbers by not fully recording those who arrive on foot, cycle or public transport, and motorcyclists with season tickets or who do not use the main entrance. Nevertheless, it is clear from this index that there were more visitors than average during the unusually warm weather in July, September and October 2006, and in April (but not May) and July 2007, with fewer visitors during the cool weather in August in both 2005 and 2006 (Figure 1c).

Discussion

Impact of weather on (seasonal) tick abundance

There is no doubt that ticks are highly sensitive to abiotic conditions, with development rates driven by temperature and mortality rates determined principally by moisture stress. It is these spatially variable factors operating consistently over long periods that apparently set the limits to the focal distribution of TBE across Europe [18,19]. Nevertheless, that does not mean that annual variation in the weather, well within the existing range of both ticks and TBE, necessarily results in significant contemporary changes in tick abundance. The data presented here reveal that unusually high temperatures from June or July of 2006 through to May or June of 2007, sometimes accompanied by lower than average rainfall, did not result in an increase in tick abundance in 2007 at 30 out of the 41 sites, while increased tick numbers from 2005 to 2006 at all 7 sites in Slovenia followed an exceptionally cold winter in the middle of more than a year of average weather conditions. The earlier onset of tick activity in 2007, as temperatures exceeded the threshold level (c.7°C) one or two months earlier, merely resulted in an earlier decline after the peak, usually to lower levels from July to October in 2007 than in 2006. This is in accord with existing understanding of tick life cycle dynamics, that new

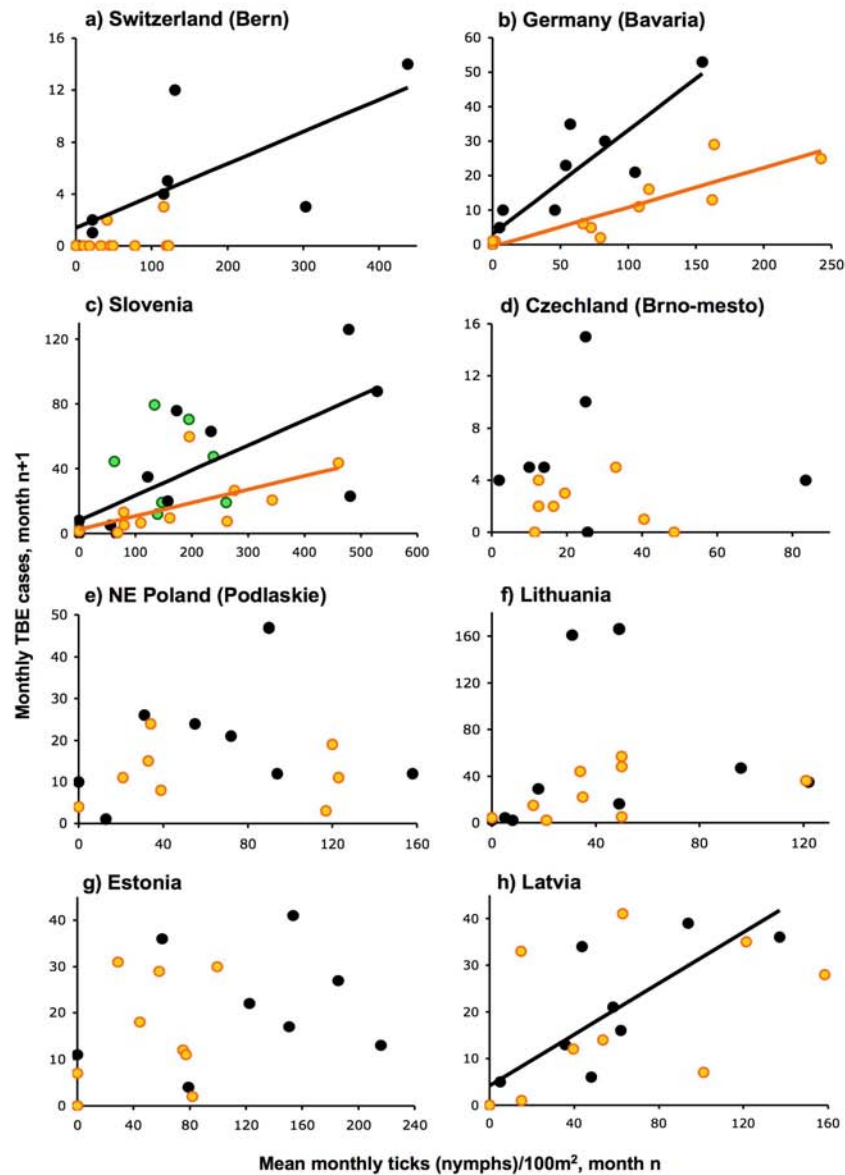
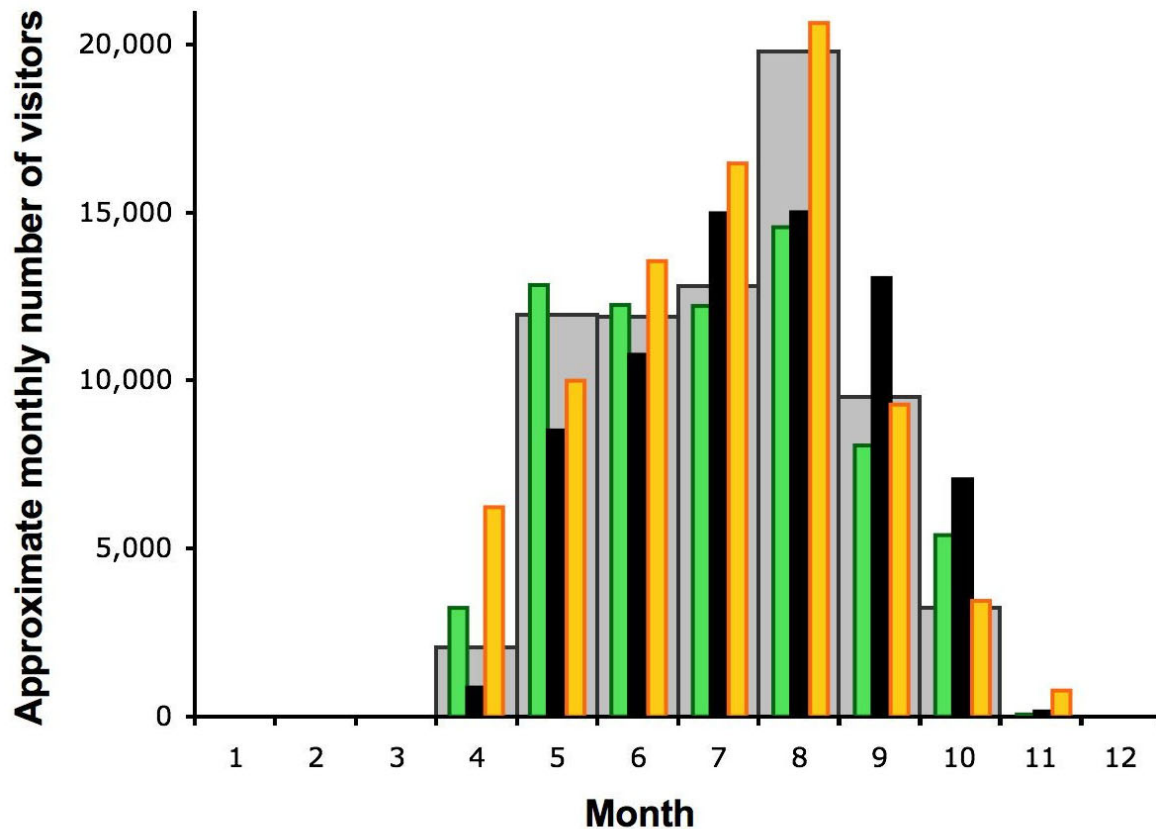


Figure 8

Relationships between monthly TBE cases in month n+1 and mean tick abundance in month n for all tick sampling sites within the region from which TBE cases are counted, for 2005 (green), 2006 (black) and 2007 (gold).

Only the following show statistically significant correlations: a) Bern, Switzerland 2006, $R^2 = 0.531$, $n = 9$, $p < 0.05$ (correlation between TBE and ticks in concurrent months is stronger, $R^2 = 0.781$, $n = 10$, $p < 0.01$); b) Bavaria, Germany 2006, $R^2 = 0.820$, $n = 11$, $p < 0.001$; 2007, $R^2 = 0.784$, $n = 11$, $p < 0.001$; c) Slovenia 2006, $R^2 = 0.532$, $n = 11$, $p < 0.05$; 2007, $R^2 = 0.369$, $n = 11$, $p < 0.05$; h) Latvia 2006, $R^2 = 0.639$, $n = 9$, $p < 0.01$.

**Figure 9**

Relative numbers of monthly visitors for the years 2003–04 (grey), 2005 (green), 2006 (black) and 2007 (gold) to the Logarska dolina national park in the Logar valley of Slovenia, close to the tick sampling site at Mozirje.

cohorts of each unfed tick life stage are recruited each autumn when development from the previous stage is completed more or less synchronously irrespective of the time of feeding; the majority then enter diapause over winter and emerge the following spring [11]. Only in Estonia and NE Poland were (presumed) newly recruited nymphs more abundant in the autumn of 2006 than 2007. If this was due to faster development from engorged larvae during the warm summer of 2006, it was not an effect evident everywhere.

Clearly, although warmer temperatures may shift the seasonal pattern of tick questing activity through direct behavioural responses (Figure 5) or accelerated development rates [20], there is no simple consistent association between warmer weather and higher tick abundance as

has been claimed [21,22]. In the absence of the ideal long-term monitoring of all tick life stages and their hosts in a wide variety of places, a tick population model would help to determine precisely which abiotic factors drive the variable abundance from year to year. This is distinct from the short-term response of ticks to moisture stress that temporarily inhibits their questing activity [7,10,23]. Interestingly, rainfall in summer and autumn of 2006 was below average in many months (apart from August), which, if anything, would have decreased tick activity, just at the time when the increase in TBE incidence occurred.

Variable impact of weather on TBE incidence

The variable degree of mis-match between the tick and TBE seasonality in all years shown here might simply reflect the differential delay by each national or local pub-

lic health service in registering TBE infections. Alternatively it indicates that even at their autumnal low levels, ticks are sufficiently abundant in nature to pose a significant risk of infection with TBE virus, and that the seasonality of TBE is driven by factors other than tick abundance. The two most obvious of these are variable prevalence of TBE virus infection in ticks that would alter the level of risk from the environment, and human behaviour that brings people into contact with ticks and determines the realised infection incidence in humans. Infection prevalence in questing nymphal ticks is generally very low, up to c.2%, and in any one year is determined by the degree of virus transmission from infected nymphs to infectible larvae while co-feeding on rodent hosts [24], which occurs principally during the preceding year or the spring and early summer of the year in question [11]. The force of this transmission route is positively related to the degree of synchrony in feeding by larvae and nymphs, in turn determined by the rate at which temperatures rise in the spring [18,19,25]. Temperature records indicate that spring temperatures may have been unusually favourable for TBE virus transmission in 2004–06 in Switzerland, Germany and Czechland (detailed analysis to be published separately), but not in any of the other countries considered here. Investigation of any resulting higher infection prevalence in ticks is under weigh, particularly with respect to any seasonal patterns sufficient to offset the low tick abundance in the autumn that could account for the excess TBE cases in that part of 2006.

Data on numbers of visitors to a national park in Slovenia, although limited, support the speculation that, not surprisingly, human recreational behaviour changed in response to the unusual weather of 2006 in a way that could have increased the contact between people and ticks. Furthermore, there was no consistent direct relationship between tick abundance and the TBE spike in 2006, on either an annual or seasonal basis, as much of the excess incidence occurred in the autumn after the seasonal decline in tick activity. This suggests that this spike could also have been driven by changes in human activities rather than in tick biology. In Czechland, there were many media reports of increased hiking and mushroom harvesting in 2006 at the expense of other outdoor activities, continuing to early November [1,2].

Taken together, all the data presented here indicate that variation in the weather has a marked impact on TBE incidence, not by affecting the abundance of ticks, but possibly by enhancing infection prevalence in ticks (no supporting data yet) and most likely by altering human activities (supported by some data). Why, though, was there a much more pronounced TBE spike in Switzerland, Germany, Slovenia and Czechland than in NE Poland or Lithuania, and no spike in Estonia (and Latvia), given the

similar pattern of remarkably warm weather from mid-2006 to mid-2007, accompanied by below average rainfall for much of the summer and autumn of 2006, in all these eight countries except Latvia?

The answer may lie in the precise pattern of the spring temperature increase and therefore the virus transmission potential (but this does not apply to Slovenia), or in the purpose of people's outdoor activities in each country. In Switzerland, Germany, Slovenia and Czechland, apart from forest workers, most people visit forests for recreation, which would be expected to increase opportunistically in response to fine weather, as indeed the data for Slovenia support. This is the explanation offered for the high number of tick bites reported in the Neuchâtel region of Switzerland in June 2003, and ongoing tick bites during the autumn of 2004 and 2005 after the tick population was declining [26]. Furthermore, peak numbers of tick bites reported to the Public Health Agency in Riga, Latvia were independent of the variable local tick activity, but coincided with warm dry weekends suitable for human recreation in forests following wet weather likely to have promoted the growth of mushrooms [Figure 5 in [27]]. When conditions also favour the late summer and autumnal growth of mushrooms (and forest berries), as would high rainfall in August, good crops of these wild foods would be harvestable throughout the warm dry autumn. The great emphasis placed on recreational mushroom picking in Czechland [1] would account for a later peak in TBE seasonality relative to ticks even in years with average weather. Evidence for an increase in these activities in 2006 right through to November is available for Czechland [1], and evidence that such activities increase the risk of exposure to ticks and therefore TBE virus is available from survey data for Latvia [27].

Mushroom gathering is also important in NE Poland and Lithuania, from where large quantities of wild edible fungi are exported to Western Europe [28]; activities upon which people depend for their livelihood are likely to vary less by drawing in opportunistic recreational foragers in good years, although TBE cases were disproportionately high in the autumn in 2006. Indeed, in years when the crop is poor, additional efforts may be needed to secure a good harvest. This may explain why the TBE spike in 2006 was no higher than that in some other years in NE Poland (2003) and Lithuania (2000, 2003 and 2004), when the excess cases also occurred in the autumn. During 2000–07, only 8% of annual TBE cases in NE Poland and 13% in Lithuania were recorded before July, and 38–48% before September, suggesting very little human activity in forests before the mushroom season.

Although Estonia and Latvia have traditions of local mushroom and berry use, they are only minor exporters

[28]. In both countries, relatively large proportions of the populations post-independence were employed in agriculture or subsistence activities likely to bring them into contact with ticks in forests and rough land [29], although this has declined over recent years. Neither nation, however, is renowned for the sort of sportive recreational activities that might increase opportunistically in favourable weather. The weather in Latvia was, in any case, less extreme in 2006.

Conclusion

The data presented here all highlight the importance of investigating both ends of the biological spectrum, human behaviour and virus transmission dynamics, when searching for epidemiological explanations. To date there are reasons to consider the potential importance of human activity, rather than tick activity, in response to an unusual combination of weather over the second half of 2006 as the driving cause for the unusually high annual incidence of TBE in that year. This conclusion could be tested by exploring for any country-specific changes in the socio-demographic profiles of human TBE cases. That is not to say that ticks do not respond to weather conditions, but not apparently in ways that can account for these recent major events of TBE epidemiology. The sampling methods, however, would not have detected whether the same number of ticks prolonged the duration of their daily questing, thereby increasing risk. Tick numbers were noticeably high in September 2007 in Bavaria (Germany), Slovenia and NE (but not SE) Czechland (data not shown), when rainfall was also very high in these places, but the causal link between tick numbers and rainfall at this time of the year is unknown.

There remain several puzzles apparent in the data for which this broad-brush analysis has not found answers. In parts of Switzerland and Germany, for example, TBE incidence was also high in 2005 when the weather resembled that of 2006 (but in a less extreme way) only in June and August to October. TBE incidence plummeted in 2007 despite favourable conditions (warm and dry) for outdoor activities in the spring of that year during the season of peak tick abundance. Had conditions prior to this become less favourable for TBE virus transmission between co-feeding ticks resulting in lower infection prevalence in ticks? Were people responding to publicity about the risk of TBE following the spike in 2006, increasing their vaccination or avoiding tick-infested forests, as apparently happened from 1999 after the highest known levels of TBE incidence in Latvia [27]? Finally, no explanation has yet been found for the varying abundance of ticks in each year.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SER conceived the study, carried out all the data analysis and wrote the manuscript. All other authors supervised or carried out tick sampling, and contributed data on TBE epidemiology, and made suggestions for the final manuscript.

Acknowledgements

It is a pleasure to acknowledge the invaluable contributions to our general understanding of the epidemiology of tick-borne diseases in Europe made by all partners within the tick-borne diseases sub-project of the EU-Fr6 EDEN project. The following people also contributed to tick sampling: Czechland: Dr J. Halouzka, Dr V. Hönig, Dr Z. Juoicová, Dr I. Rudolf, Dr S. Šikutová, P. Klapušová, J. Peško, H. Zachova; Germany: Dr de Mendoca, S. Pfalzer, J. Raczynski; Latvia: I. Vilcane, T. Klemjacionoka. We are most grateful to Prof M. Rebetz for supplying meteorological data for Payerne and to Dr Hans Peter Zimmerman for the TBE data for Bern, both in Switzerland. This work was supported by the EU grant GOCE-2003-010284 EDEN; it is catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN0112 <http://www.eden-fp6project.net/>. The contents are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. The results from Switzerland form part of a PhD thesis supported by grant FN 320 000-113936/1.

References

- Daniel M, Kriz B, Danielova V, Benes C: **Sudden increase in tick-borne encephalitis cases in the Czech Republic, 2006.** *Int J Med Microbiol* 2008, **298(S1)**:81-87.
- Daniel M, Kriz B, Valter J, Kott I, Danielova V: **The influence of meteorological conditions of the preceding winter on the incidence of tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in the Czech Republic.** *Int J Med Microbiol* 2008, **298(S1)**:60-67.
- Lees AD, Milne A: **The seasonal and diurnal activities of individual sheep ticks (*Ixodes ricinus*).** *Parasitology* 1951, **41(3-4)**:189-208.
- Randolph SE: **Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors.** *Parasitology* 2004, **129**:S37-66.
- Knulle W, Rudolph D: **Humidity relationships and water balance of ticks.** In *Physiology of Ticks* Edited by: Obenchain FD, Galun R. Oxford, UK: Pergamon Press; 1982:43-70.
- Needham GR, Teel PD: **Off-host physiological ecology of ixodid ticks.** *Annu Rev Entomol* 1991, **36**:659-681.
- Randolph SE, Storey K: **Impact of microclimate on immature tick-rodent interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission.** *J Med Entomol* 1999, **36**:741-748.
- Belozero VN: **Diapause and biological rhythms in ticks.** In *Physiology of Ticks* Edited by: Obenchain FD, Galun R. Oxford: Pergamon Press; 1982:469-500.
- Macleod J: ***Ixodes ricinus* in relation to its physical environment. IV. An analysis of the ecological complexes controlling distribution and activities.** *Parasitology* 1936, **28**:295-319.
- Perret J-L, Guigoz E, Rais O, Gern L: **Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland).** *Parasitol Res* 2000, **86**:554-557.
- Randolph SE, Green RM, Hoodless AN, Peacey MF: **An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*.** *Int J Parasitol* 2002, **32**:979-989.
- Hubálek Z, Halouzka J, Juoicová Z: **Host-seeking activity of ixodid ticks in relation to weather variables.** *J Vector Ecol* 2003, **28**:159-165.
- Dautel H, Dippel C, Kämmer D, Werkhausen A, Kahl O: **Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest.** *Int J Med Microbiol* 2008, **298(S1)**:50-54.
- Klein Tank AMG, Coauthors : **Daily dataset of 20th-century surface air temperature and precipitation series for the European Climate Assessment.** *Int J Climatol* 2002, **22**:1441-1453.

15. Šumilo D, Asokliene L, Bormane A, Vasilenko V, Golovljova I, Randolph SE: **Climate change cannot explain the upsurge of tick-borne encephalitis in the Baltics.** *PLoS ONE* 2007, **2**:e500.
16. Donoso Mantke O, Schadler R, Niedrig M: **A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries.** *Euro Surveill* 2008, **13(17)**: pii = 18848
17. Pazdiora P, Benesova J, Bohmova Z, Kralikova J, Kubatova A, Menclova I, Moravkova I, Pruchova J, Prechova M, Spacilova M, Vodrazkova ZVS, Svecova M: **The prevalence of tick-borne encephalitis in the region of West Bohemia (Czech Republic) between 1960–2005.** *Wien Med Wochenschr* 2008, **158**:91-97.
18. Randolph SE: **Ticks and tick-borne disease systems in space and from space.** *Adv Parasitol* 2000, **47**:217-243.
19. Randolph SE, Green RM, Peacey MF, Rogers DJ: **Seasonal synchrony: the key to tick-borne encephalitis foci identified by satellite data.** *Parasitology* 2000, **121**:15-23.
20. Gray JS: **Ixodes ricinus seasonal activity: implications of global warming indicated by revisiting tick and weather data.** *Int J Med Microbiol* 2008, **298(S1)**:19-24.
21. Suss J: **Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – the epidemiological situation as of 2007.** *Eurosurveillance* 2008, **13**: pii = 18916
22. Suss J, Klaus C, Gerstengarbe F-W, Werner PC: **What makes ticks tick? Climate change, ticks and tick-borne diseases.** *J Travel Med* 2008, **15**:39-45.
23. Perret J-L, Rais O, Gern L: **Influence of climate on the proportion of Ixodes ricinus nymphs and adults questing in a tick population.** *J Med Entomol* 2004, **41**:361-365.
24. Randolph SE, Miklisová D, Lysy J, Rogers DJ, Labuda M: **Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus.** *Parasitology* 1999, **118**:177-186.
25. Randolph SE, Šumilo D: **Tick-borne encephalitis in Europe: dynamics of changing risk.** In *Emerging Pests and Vector-borne Disease in Europe* Edited by: Takken W, Knols BGJ. Wageningen Academic Publishers; 2007:187-206.
26. Hugli D, Moret J, Rais O, Moosman Y, Erard P, Malinverni R, Gern L: **Tick bites in a Lyme borreliosis highly endemic area in Switzerland.** *Int J Med Microbiol* 2008 in press.
27. Šumilo D, Asokliene L, Avsic-Zupanc T, Bormane A, Vasilenko V, Lucenko I, Golovljova I, Randolph SE: **Behavioural responses to perceived risk of tick-borne encephalitis: vaccination and avoidance in the Baltics and Slovenia.** *Vaccine* 2008, **26**:2580-2588.
28. Boa E: **Wild edible fungi. A global overview of their use and importance to people.** In *Non-wood Forest Products* Rome: Food and Agriculture Organisation of the United Nations; 2004.
29. Šumilo D, Bormane A, Asokliene L, Vasilenko V, Golovljova I, Avsic-Zupanc T, Hubalek Z, Randolph SE: **Socio-economic factors in the differential upsurge of tick-borne encephalitis in Central and Eastern Europe.** *Rev Med Virol* 2008, **18**:81-95.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



4.2 Publication 2

Microclimate and the zoonotic cycle of tick-borne encephalitis virus in Switzerland.

Journal of Medical Entomology. 2011. 48:3. Pages 615-627.

Microclimate and the zoonotic cycle of tick-borne encephalitis virus in Switzerland

C. Burri, V. Bastic, G. Maeder, E. Patalas and L. Gern¹

Journal of Medical Entomology. 2011. 48 :3. Pages: 615-27.

¹Institute of Biology, Laboratory of Eco-Epidemiology of Parasites, University of Neuchâtel, Emile-Argand 11, 2000 Neuchâtel, Switzerland

Abstract

The focal distribution of tick-borne encephalitis virus (*Flaviviridae*, *Flavivirus*, TBEV) appears to depend mainly on co-feeding transmission between infected *Ixodes ricinus* L. nymphs and uninfected larvae. To better understand the role of co-feeding ticks in the transmission of TBEV, we investigated tick infestation of rodents and the influence of microclimate on the seasonality of questing *I. ricinus* ticks. A 3-year study was carried out at four sites, including two confirmed TBEV foci. Free-living ticks and rodents were collected monthly and microclimatic data recorded. A decrease in questing nymph density was observed in 2007, associated with low relative humidity and high temperatures in spring. One site, Thun, did not show this decrease, probably due to microclimatic conditions in spring that favored the questing nymph population. During the same year, the proportion of rodents carrying co-feeding ticks was lower at sites where the questing nymph density decreased, although the proportion of infested hosts was similar among years. TBEV was detected in 0.1% of questing ticks, and in 8.6% and 50.0% of larval ticks feeding on two rodents. TBEV was detected at all but one site where the proportion of hosts with co-feeding ticks was the lowest. The proportion of hosts with co-feeding ticks seemed to be one of the factors that distinguished a TBEV focus from a non-TBEV focus. The enzootic cycle of TBEV might be disrupted when dry and hot springs occur during consecutive years.

Key words: tick-borne encephalitis virus, *Ixodes* ticks, co-feeding, small mammals, microclimate

Introduction

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is a flavivirus affecting the human central nervous system (Dumpis et al. 1999) and is distributed from France through Eastern Europe, Russia and Far East (Süss 2003). It was first clinically described by Schneider (1931) before it was known that *Ixodes persulcatus* Schulze (in the East of Russia) and *I. ricinus* L. (in Western Europe) were the vectors of TBEV (Zilber 1939). Later, Pavlovsky (1947) proved zoonotic transmission involving small mammals such as field mice, *Apodemus* spp., and the bank vole, *Myodes glareolus*. These rodents are now known to be the main reservoirs for TBEV (Labuda et al. 1993b), but develop a short viremia and acquire antibodies against TBEV after approximately 2 days (Kozuch et al. 1981). Immune hosts are generally considered to be non-infectious for ticks (Labuda et al. 1997), resulting in a low probability of transmission from rodents to ticks. The key to TBEV maintenance in nature is co-feeding non-viremic transmission of TBEV between infected nymphs and uninfected larvae on rodents as proposed by Labuda and Randolph (1999). Only rodents are known to support non-viremic transmission (Labuda and Randolph 1999). However, because larvae usually feed on small mammals and nymphs on medium sized hosts (Tälleklint and Jaenson 1994), specific conditions seem to be required to allow larvae and nymphs to feed together on rodents. One of these conditions is the simultaneous questing of larvae and nymphs (Labuda and Randolph 1999) that is favored at the beginning of the year when temperatures rapidly exceed 10°C, the minimal threshold for larvae to quest (Randolph 2004); nymphs become active at 7°C (MacLeod 1939). Another condition that improves the simultaneous feeding of larvae and nymphs (co-feeding) on rodents is dry climatic conditions, because low humidity forces nymphs to quest at lower levels in the vegetation than usual, bringing them to the same level as questing larvae (Randolph and Storey 1999) and thereby enabling them to exploit the same hosts.

The current study examines abiotic [(temperature, relative humidity (RH) and saturation deficit (SD)] and biotic (host range and host density) factors in a region in Switzerland where TBE cases have been reported to better understand focal TBEV maintenance and the importance of co-feeding transmission of TBEV under natural conditions.

Materials and methods

Our study was carried out at four sites, with similar beech grove mesophytic lowland vegetation located in the canton of Bern, Switzerland. Two of them were known TBE foci [Thun (46°43'N, 7°36'E, 642 m a.s.l) and Belp (46°52'N, 7°30'E, 687 m a.s.l)] and two, located in between, were not known as TBE foci [Kiesen (46°48'N, 7°34'E, 566 m a.s.l) and Trimstein (46°53'N, 7°34'E, 620 m a.s.l)]. Each site was 11 km to 18 km apart. In Switzerland an area is considered as a TBE focus if either three human cases have been reported to the Federal Office of Public Health or if TBEV has been detected in ticks.

Questing *Ixodes ricinus* ticks and microclimatic conditions. Questing ticks were collected with a 1 m² white flag that was inspected for the presence of ticks at intervals of 5 m over a distance of 100 m within a 900 m perimeter. Tick collections took place once to twice a month from March (Thun and Belp) or June 2006 (Kiesen and Trimstein) to April 2009. All questing nymphs and adults were washed in 70% ethanol, dried, pooled from 1-10 nymphs and 1-6 males or females, and stored at -20°C until tested for TBEV. Microclimatic data (air temperature at 60 cm and RH) were taken with a thermo-hygrometer (Testo 615, S.A Lonay, Switzerland) when ticks were collected. Data from air temperature at 60 cm and RH were used to calculate saturation deficit (SD) according to Randolph and Storey (1999) and Perret et al. (2000). We obtained additional data on macroclimate (monthly mean temperature and RH) from Nofeln, a site close to the study area (<http://www.agrometeo.ch/>), to relate these data to microclimatic data recorded at the study sites.

To gain more information on the presence of TBEV in questing ticks, additional questing ticks were collected outside the delimited perimeter (see above) from October 2006 to April 2009. Tick pools consisted of 1-20 nymphs and 1-6 males or females. Ticks were processed as described above.

Ticks on rodents. Once a month from May 2006 in Belp and Thun and from June 2006 in Kiesen and Trimstein to April 2009, 50 wooden box traps (Czech trap model, <http://members.vienna.at/shrew/trapping.html>), were spaced at 5 m intervals inside each 900 m perimeter and were baited with seed and a piece of apple. The Department of Agriculture and Nature from Canton Bern approved the capture of rodents. For maintenance and all experimental procedures, the Department of Economy of Canton Neuchâtel delivered the authorizations No. 1/2003 and No. 1/2006. Traps were set at sunset and checked early the following morning. Captured rodents were brought into the laboratory identified, sexed, and

caged individually over a pan of water until the feeding ticks dropped off. Rodents were then released at the exact trapping site. Engorged ticks were collected from the water, dried, identified and stored. Because *I. trianguliceps* ticks are difficult to maintain in the laboratory, they were stored as engorged ticks at -20°C while *I. ricinus* ticks were kept in tubes at 98% relative humidity and room temperature until molt. Two months after their molt live *I. ricinus* ticks were washed in 70% ethanol and stored at -20°C until processed for TBEV detection. All *I. ricinus* ticks from rodents were analyzed by pools (one pool per tick stage per host) of 1-10 nymphs and 1-6 males or females for all sites except for Kiesen where pools varied from 1-20 nymphs.

TBE virus detection. Ticks were tested for TBEV by real-time RT-PCR. To extract and purify RNA, pools of nymphal and adult ticks were crushed for 3 or 5 min, respectively, in vials containing 300 µl of TRIzol® (Invitrogen Life Technologies™, Basel, Switzerland) and a 3 mm ball using a mixer mill MM 300 (Retsch, Arlesheim, Switzerland). RNA from *I. ricinus* was isolated according to the Invitrogen protocol (Chomczynski and Sacchi 1987) with some modifications. Incubation time was 10 min for chloroform and isopropanol, and centrifugation time was 15 min for isopropanol and 6 min for ethanol. Samples were dried for 30-40 min, eluted in 30 µl of water RNase free, stored at -20°C and analyzed by real-time RT-PCR. RNA from *I. trianguliceps* was isolated with the kit “virus and bacteria” (QIAGEN, Düsseldorf, Germany) with a robot QIASymphony® SP system (QIAGEN) according to manufacture (analyzed in Spiez Laboratory, Switzerland).

RNA (5 µl) was amplified in a 25 µl real-time RT-PCR mixture according to Schwaiger and Cassinotti (2003) using an iCycler (Biorad, Reinach, BL, Switzerland) and consisting in 12.5 µl of reaction mix containing dNTP's (0.04 mM each), 0.5µl Superscript III Platinum Taq (Invitrogen, Basel, Switzerland, Superscript III Platinum One-step quantitative system), 3 µM of primer F-TBE1, 0.6 µM of R-TBE1 and 0.8 µM for probe TBE-WT. Strain Ljubljana II (kindly provided by P. de Mendonça, Institut für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, München, Germany) was used as positive control, and distilled water was used as a negative control.

Sequencing of NS5 protein gene of TBEV. Samples positive by real-time RT-PCR were confirmed by amplifying the non-structural NS5 portion of the genome using primers described in Puchhammer-Stockl et al. (1995). Reaction mix for amplification was modified from Saksida et al (2005). Prior to amplification 10 µl 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 10X, 200 μ M of each dNTP, 0.2 μ M of each primer FSM-1 and FSM-2 (Puchhammer-Stockl et al. 1995), 1.5 U per test of DNA Taq polymerase from QIAGEN and 10 μ l of cDNA. Amplification was performed in 40 cycles of amplification (94°C, 30 s; 40°C, 30 s; 72°C, 30 s) and 72°C, 5 min for the final elongation. The nested PCR was performed in a total volume of 50 μ l with 2 μ l of the amplified DNA as template and 0.2 μ M of each inner primers FSM-1i and FSM-2i (Puchhammer-Stockl et al. 1995) (buffer, Taq polymerase and dNTP as described above). The nested PCR conditions were the same as described above except for the hybridization temperature performed at 53°C for 30 s. Amplified products were visualized on a 2% agarose gel stained with GelRed™ and visualized under UV light. The amplified TBEV products were processed with a purification kit (Promega AG, Dübendorf, Switzerland) and sent for sequencing to Microsynth (Balgach, Switzerland).

Host DNA detection. To identify hosts on which nymphs had fed as larvae, additional questing *I. ricinus* nymphs were collected at the four sites during spring and summer in 2006 and 2008 (only 2008 for Thun). Host DNA was determined by PCR followed by Reverse Line Blotting (RLB) according to Humair et al. (2007). Prior to PCR, ticks were washed in 70% ethanol, dried and stored at -20°C. To isolate host DNA, nymphs were washed in DNA Zap™ (Ambion, AB, Rotkreuz, Switzerland) for 3 min, then rinsed in distilled water and processed as described in Burri et al. (2007). Amplified host DNA was identified using the oligonucleotide probes described in Morán Cadenas et al. (2007b).

Statistical analyses. All statistical analyses were calculated with S-Plus 7.0 and TIBCO Spotfire S+ for Windows (Insightful, Seattle, WA). Descriptive statistics were used to follow questing tick phenology as shown in Perret et al. (2003). Questing tick density was expressed as the number of ticks per 100 m² and was calculated as an annual value called the cumulative tick density (CTD) (Eisen et al. 2003). This value was calculated by integrating the linearly interpolated curve of questing tick density over one year for 100 m² (Jouda et al. 2004, Burri et al. 2007, Morán Cadenas et al. 2007b). To test mean infestation of rodents, we used a Mann-Whitney U test. A T-test was used to test mean of rodents trapped/night by years and sites. The difference in the prevalence of rodents infested by ticks was tested by using a Fisher's exact test or a Pearson Chi-square test (χ^2). To test correlation between the number of *I. ricinus* larvae and nymphs infesting rodents, we used a Spearman rank correlation. The TBEV infection prevalence in ticks was expressed as the minimum infection rate per 100

tested (MIR) based on the assumption that at least one tick was positive within a positive pool.

Results

Seasonal phenology of questing ticks.

Overall, questing tick activity was observed on vegetation from February to November, displaying a unimodal pattern with nymphs and adults questing simultaneously (Fig. 1). Although larvae were observed questing during these months, they were only collected sporadically (Kiesen), or not at all, (Thun), because the flagging collection procedure did not penetrate the vegetative canopy above their questing sites (Fig. 1).

In Switzerland, the winter 2006-2007 was the hottest recorded since 1864 and was followed by a hot spring (http://www.meteosuisse.admin.ch/web/fr/meteo/actualite_meteo/printemps_2007_extremement0.html). The mean temperature in March, April and May was 1°C warmer than in 2003 (previously the hottest spring since 1864). April had the warmest mean temperature, reaching 16°C, with a maximum at 23°C. In the study areas, the winter of 2006-2007 was mild, and the spring of 2007 (April) was particularly dry and hot compared to 2006, 2008 and 2009 (Fig. 2). In 2007, temperatures at 60 cm above soil reached 7°C, the threshold temperature for nymphal activity, earlier than the other years (at some sites already at the end of January) (Fig. 3), allowing an earlier onset of nymphal questing activity (Fig. 1). Later, in April, temperature increased rapidly and remained between 20 to 25°C until August-September 2007 (Fig. 3). SD reached values above 10 mmHg (maximum value 16.7 mmHg) for almost two months (April and May) at three out of four sites (except at Thun) (Fig. 3). At these three sites, April-May was usually the period when questing activity of nymphs was the highest (Fig. 1); however, in 2007, the lowest peak tick density (PTD) and CTD were recorded when high SD values were observed (Table 1).

At Thun, although 2007 also was characterized by a hot and dry spring, in contrast to the other sites, temperatures never exceeded 23°C and were cooler compared to 2006 and 2008 (Fig. 3). SD reached high values (not higher than 12 mmHg in 2007) for a shorter period than observed at the other sites (three weeks in May), but was lower than in 2006 (18.2 mmHg) (Fig. 3), which may explain why in 2007, Thun, in contrast to the three other sites, had higher PTD and CTD values for nymphs (Table 1).

Ticks on rodents. During the whole study, 819 rodents were captured: *Apodemus flavicollis* (n=160), *A. sylvaticus* (n=225), *Apodemus* spp. (n=2) and *Myodes glareolus* (n=432). Overall, the most rodents were trapped at Kiesen (0.14 rodent/trap/night), followed by Trimstein (0.1 rodent/trap/night), Thun (0.08 rodent/trap/night) and Belp (0.07 rodent/trap/night) but the difference was not significant (T-test, $P > 0.05$). Trapping sessions were more successful in 2007 (0.2 rodents/trap/night) compared to 2008 (0.1 rodents/trap/night) and 2006 (0.06 rodents/trap/night) (T-test, 2006/2007, $P < 0.001$, 2007/2008, $P = 0.001$).

Overall, a total of 7,718 *I. ricinus* ticks were collected from rodents (7,306 larvae and 412 nymphs). *I. trianguliceps* was observed at all sites (11 larvae, 1 nymph and 6 females) infesting 11 *M. glareolus* and three *A. sylvaticus*. The percentage of infested rodents that carried at least one tick was 71.7% (587/819) (Table 2), with the highest percentage at Kiesen (74.9%, 221/295) followed by Thun (74.6%, 126/169), Belp (69.1%, 103/149) and Trimstein (63.4%, 130/205) (χ^2 , $P > 0.05$).

The seasonal infestation pattern of rodents by larvae and nymphs did not match the seasonal questing activity of adult and nymphal ticks (Fig. 1 and 4). Larvae were observed on rodents from February-March to November, sometimes without interruption during the winter months, e.g., Kiesen during winter 2006-2007, when questing ticks were not active on vegetation.

The prevalence of rodents infested by ticks at each study site did not differ significantly between 2007 and 2008, except at Thun where more rodents were infested by ticks in 2007 than 2008 ($\chi^2 = 3.9$, $df = 1$, $P = 0.04$) (Table 3). However, the intensity of tick infestation (mean number of ticks per infested host) during April to July (the months with the highest prevalence of infested rodents) was lower in 2007 than in 2008 at all sites except at Thun (Mann-Whitney U test for larvae and nymphs together, $P = 0.006$ for Kiesen; $P < 0.001$ for Trimstein; $P = 0.01$ for Belp) and was more pronounced for larvae than for nymphs (Table 4). Although more rodents were captured in 2007 (0.2 rodent/trap/night; n=470) compared to 2008 (0.11 rodents/trap/night; n=241) (T-test, $P = 0.001$), the total number of feeding nymphs collected was lower in 2007 (n=116) than in 2008 (n=188).

There was a significant positive correlation between the number of *I. ricinus* larvae and nymphs infesting rodents ($r_s = 0.472$, $P < 0.01$; n=819) (Fig. 4). Overall all sites, 20% of rodents were infested by nymphs: 9.3% (76/819) carried only one nymph and 9.4% (77/819)

4. Résultats

carried more than one nymph. Among sites, 13-27% most heavily infested hosts (>15 larvae) fed 52-84% of nymphs and 58-81% of larvae, the lowest value always corresponding to Trimstein and the highest to Kiesen (Fig. 5). Co-feeding ticks on rodents were usually observed from March to October (once observed in November), with a higher frequency from April to July (Fig. 4). During April to July 2007, a significantly lower proportion of hosts with co-feeding ticks was observed among infested hosts compared to the same period in 2008 at Belp and Kiesen (Table 4).

At Trimstein, tick infestation of rodents was different from the other sites. The proportion of rodents with co-feeding ticks among infested rodents was the lowest (13.5%, 18/133) (Table 2). At Trimstein, only 15% (20/133) of infested rodents carried nymphs compared to 26.7% at Thun (34/127), 19% at Belp (20/103) and 35% at Kiesen (79/224) (Trimstein/Thun, $\chi^2=4.74$, $df=1$, $P=0.02$, Trimstein/Belp, $\chi^2=0.5$, $df=1$, $P=0.47$, Trimstein/Kiesen, $\chi^2=16.04$, $df=1$, $P<0.001$). Nymphs represented only 2.4% (14/576) of the total of ticks feeding on rodents from April to July 2007-2008, whereas they represented 4% (28/703) at Belp, 5% (38/762) at Thun, and 6.9% (162/2336) at Kiesen. As a consequence, Trimstein showed the lowest ratio of nymphs/larvae on total hosts captured in 2007 and 2008 (1/60 and 1/34.5 respectively), whereas this ratio was 1/22.8 and 1/10.9 at Kiesen, 1/25.8 and 1/14.6 at Thun and 1/44 and 1/17.6 at Belp in 2007 and in 2008, respectively.

Molting success of blood fed larval and nymphal ticks in the laboratory varied by year, with the lowest observed in 2007 (53%, 1,566/2,969), followed by 2006 (70%, 1,078/1,532) and 2008 (77%, 2,081/2,692) ($\chi^2=396$, $df=2$, $P < 0.001$ for years). In 2007, reduction in molting success was more evident for larvae (48.7%, 1,508/3,098) than for nymphs (62%, 70/113) ($\chi^2=7.16$, $df=1$, $P = 0.007$). Molting was more frequent for *Ixodes* larvae (69%, 2,325/3,393) and nymphs (63%, 102/161) collected from *Apodemus* spp. than from *M. glareolus* (larvae: 65%, 2,286/3,525; nymphs: 49%, 112/227) ($\chi^2=10.3$, $df=1$, $P= 0.001$ and $\chi^2=6.9$, $df=1$, $P=0.009$, respectively).

Detection of TBEV in ticks. A MIR of 0.1 positive ticks per 100 tested (95% CI: 0.04-0.22) was observed for 6,683 questing *I. ricinus* ticks tested for TBEV (4,833 nymphs in 514 pools and 1,850 adults in 536 pools). TBEV was detected in ticks collected at the two known endemic sites, Thun and Belp, but also at Kiesen (Table 5). The only site where no TBEV was detected was Trimstein.

4. Résultats

A MIR of 0.1 per 100 (95% CI: 0.03-0.31) was detected in 3,303 *I. ricinus* ticks (3,090 larvae in 510 pools and 213 nymphs in 132 pools) that detached from 435 rodents. TBEV was detected in ticks feeding on two males from Thun captured in April 2007 and 2008: one *A. flavicollis* was infested with five nymphs and 128 larvae, and one *M. glareolus* carried two nymphs and 14 larvae. TBEV was detected in 8.6% (3/35 [95% CI: 1.8; 23.06]) of larvae feeding on *A. flavicollis* and in 50% (1/2 [95% CI: 1.26; 98.74]) of larvae from the vole. Additional larvae feeding on the mouse were analyzed individually (as nymphs) and showed an infection rate of 11.9% (5/42). No *I. trianguliceps* (n=13) were infected.

Sequencing NS5 protein gene of TBEV. The NS5 gene amplified from cDNA of two infected larvae feeding on two rodents collected at Thun (GenBank accession numbers HM450140, HM450141) and the cDNA of four pools of questing adults from Thun (n=2), from Belp (n=1) and from Kiesen (n=1) (GenBank accession numbers HM450136, HM450137, HM450138, HM450139, respectively) were sequenced. Target fragments from TBEV-infected questing ticks and from ticks feeding on rodents at Thun were 100% identical. The sequence obtained from the sample collected at Belp shared 99% of homology with those from Thun, but showed 98% homology with the one from Kiesen. The target fragments from ticks collected at Thun and Kiesen shared 99% of homology. All sequences were 99% homologous with the Western subtype, TBEV of Slovenia NS5 sequence (GenBank accession number EU057641.1).

Detection and identification of host DNA in questing nymphs. Overall, host DNA was amplified from 38.5% (274/712) questing nymphs. Of these, artiodactyls were identified as the main hosts for larval ticks (34-53%) at each site (Table 6). Bird DNA also was frequently detected in ticks from Belp (35%, 26/74) and Trimstein (35%, 25/72). Surprisingly, few small mammals were found to be important hosts for larvae, with 22% of detected DNA at Kiesen, 14.9% at Belp and only 5.6% at Trimstein (Fisher test, $P=0.006$ for Kiesen, not significant for Belp) positive for small mammals. At Trimstein, larvae fed more frequently on birds (35%, 25/72) and artiodactyls (46%, 33/72) than on small mammals (5.6%, 4/72) (Fisher test, $P<0.001$). Small mammal DNA was less frequently detected in ticks in 2008 compared to 2006 at most sites (Table 6) (Fisher test, $P=0.037$) whereas the opposite was observed for bird DNA (Fisher test, $P=0.002$).

Discussion

Influence of microclimatic conditions on questing tick activity. During the study period, unusual microclimatic conditions were observed. Winter 2006-2007 was very mild and spring 2007 was hot and dry. This influenced questing tick phenology. Exceptionally mild temperatures during winter 2006-2007 allowed nymphs quest earlier (February) on vegetation. In Switzerland, studies on tick phenology showed that questing tick activity is usually the highest in spring (Jouda et al. 2004, Burri et al. 2007, Morán Cadenas et al. 2007b). However, in spring 2007 the questing nymph density was reduced at three sites (Belp, Trimstein and Kiesen) but not at Thun. A possible explanation would be that nymphs had completed questing at these three sites and were blood-feeding on hosts. However, in our case, the decrease in the questing nymph population paralleled the decrease in nymphs feeding on rodents, meaning that the absence of questing nymphs was not due to the attachment of ticks on rodents. An alternative explanation would be that nymphs may have been forced to interrupt their questing behavior to avoid desiccation and moved towards close to the soil to rehydrate as expected from the low RH and high SD values (Lees and Milne 1951, Perret et al. 2003, 2004). In such a case, nymphs that did not quest in spring would quest later in the year when microclimatic conditions were favorable. However, questing nymph density never increased and the CTD for nymphs remained low, indicating that the tick population may have suffered desiccation related mortality due to the long-lasting high SD values during spring 2007 (Perret et al. 2000, 2004, Burri et al. 2007, Morán Cadenas et al. 2007b). Conversely, at Thun, questing nymph density was not altered during 2007. Microclimatic conditions in 2007 were more favorable for ticks at this site and tick population did not appear to suffer from desiccation related mortality.

Ticks on rodents. The seasonal infestation pattern of rodents by larvae and nymphs did not match the seasonal questing activity of ticks. Larvae, and to a lesser extend nymphs, were observed on rodents almost each month from February-March to November, sometimes even during the winter months, while no ticks were collected by flagging. The fact that ticks were active on rodents during months without questing activity detected for ticks on vegetation questioned the risk assessment of tick bites on the human population primarily based on questing tick activity.

Because the coincident seasonal questing activity of *I. ricinus* larvae and nymphs is necessary to allow co-feeding transmission and maintain a TBEV focus (Labuda et al. 1993a,

1996, 1997, Randolph et al. 1996, 1999), we investigated rodent infestation to better understand the role of co-feeding in TBEV maintenance. As mentioned above, exceptionally mild temperatures in winter 2006-2007 allowed an earlier questing of nymphs on vegetation, however, the co-feeding of larvae and nymphs on rodents did not appear early in 2007, probably because in January and February the RH was high enough to allow nymphs quest on the upper parts of the vegetation and attach to medium sized hosts rather than to rodents (Perret et al. 2004).

Although the percentage of rodents infested by ticks was generally stable over years, in 2007 we recorded not only a small number of nymphs on rodents, but also a decrease in larval infestation intensity and in the proportion of hosts with co-feeding ticks at Belp, Trimstein and Kiesen, but not at Thun. The observed decrease in questing tick density due to dry microclimatic conditions at these three sites in spring 2007 may have influenced contacts between ticks and rodents. Furthermore, the increased abundance of rodents in 2007 probably also contributed to lower tick intensity on hosts (Nosek and Grulich 1967, Rosà et al. 2007). In addition, it appeared that in 2007 larvae fed more frequently on birds than on rodents according to the blood meal analysis of nymphs collected in 2008. The reason for this apparent shift in host selection remains unknown but mild temperatures at the beginning of 2007 may have favored contacts between birds and larvae. The proportion of hosts identified was not very high in this study, because most nymphs were collected in spring. In fact in a similar study, host identification success was higher among ticks collected in autumn than in spring (Morán Cadenas et al. 2007a). At Thun the situation was different, in that not only questing nymph density, but also infestation intensity and the proportion of hosts with co-feeding ticks were not altered during 2007. At this site, microclimatic conditions were less harsh in spring 2007 than at the other sites but nevertheless dryer. Therefore tick populations did not suffer desiccation related mortality and nymphs quested lower on vegetation as expected when microclimatic conditions are dry (Randolph and Storey 1999) and were caught by rodents. In fact proportion of rodents infested by ticks and by co-feeding ticks as well as the intensity of tick infestation did not decrease in 2007 at Thun.

Interestingly, molting success of ticks that detached from rodents was the lowest in 2007, especially for larvae. Although the reasons for this are unknown, we suggest that due to unfavorable microclimatic conditions in spring 2007, ticks spent more energy to avoid desiccation and encountered physiological difficulties processing the blood meal leading to a reduction in molting success.

TBEV in ticks. The presence of TBEV was confirmed at the two sites that were recognized as TBE foci before our study began. At Thun, TBEV was detected in 0.14% of questing adults. Previous studies reported infection rates of 0.65%- 0.8% (Matile 1984), 2.1% (de Marval 1994) and 0.32% (Wicki et al. 2000), showing the continuous presence of the virus. At Belp, prevalences of TBEV in questing ticks (0.13-0.38%) were similar to that reported by de Marval (1994), 0.56%, but were much lower than what was observed by Casati et al. (2006) (14.3%) close to our collection site. Labuda et al. (2002) also reported high prevalence (14%) in questing ticks in Slovakia and suggested that some specific geographic areas have high TBEV activity. Nevertheless, the overall TBEV prevalence observed here (0.04-0.2%) fits with European and Swiss data ranging from 0.1 to 5% (Süss et al. 2003, Gäumann et al. 2010).

No human TBE cases have been reported from Kiesen and Trimstein, but we detected TBEV in questing ticks at Kiesen. This site appeared to be favorable for the maintenance of a TBEV focus. In agreement, nymphs represented 6.9% of the ticks feeding on rodents and this area had the highest ratio nymphs/larvae on rodents. In addition, Kiesen displayed the highest proportion of hosts with co-feeding ticks and the highest mean intensity of ticks feeding on rodents, both enabling the enzootic transmission and maintenance of TBEV.

TBEV was not detected at Trimstein. Compared to a TBEV focus such as Thun, Trimstein showed a higher questing nymph density, indicating that TBEV maintenance does not seem to be related to tick abundance. The ratio of nymphs/larvae on rodents was the lowest (1:60 in 2007 and 1:34.5 in 2008), but this alone did not explain the absence of TBEV, because an even lower ratio (1:100) was reported in Alsace (France) (see Randolph and Storey 1999) and TBEV is nevertheless maintained in that region. At Trimstein, the percentage of rodents infested by at least one tick-stage was low and only 15% of rodents carried nymphs. The proportion of rodents with co-feeding ticks was the lowest recorded (13.5%) (Kiesen: 33%; Thun: 26%; Belp: 19%), although there was no significant difference between Trimstein and Belp, probably because at Belp microclimatic conditions in 2007 significantly reduced the proportion of hosts with co-feeding ticks compared to 2008. In addition, blood meal analysis results revealed that larvae rarely fed on rodents at this site (5.6%) but preferred to feed on birds and artiodactyls. These hosts are not considered as reservoirs for TBEV and are not known to support co-feeding transmission (Labuda and Randolph 1999). These factors may have contributed to the absence of TBEV activity detected at this site.

In the present study, ticks that detached from rodents were also screened for TBEV. The virus was detected in larvae, but not in nymphs, infesting two rodents from Thun. Two explanations can be offered: either larvae had been transovarially infected or co-feeding transmission occurred between infected nymphs that had dropped off from rodents before their capture. Because one rodent was infested by a large number of larvae, some ticks could be analyzed individually. For the first time, we report on TBEV infection in larvae (11.9%) feeding on rodents under natural conditions and tested individually.

Conclusion. Focal warm and dry microclimatic conditions reduced questing tick density, the proportion of hosts with co-feeding larval and nymphal ticks, and therefore enzootic TBEV transmission efficiency. Indeed if sustained high temperature and low RH persist for consecutive springs, a focal maintenance of TBEV could be disrupted in the absence of co-feeding non-viremic transmission, as predicted by Randolph (2001). In agreement, our only study site without TBEV detected was the site where the proportion of rodent hosts with co-feeding ticks was lowest.

Acknowledgment

We are thankful to Jacqueline Moret (University of Neuchâtel, Switzerland) and Guillaume Cailleau (Faculty of Geosciences and Environment, University of Lausanne, Switzerland) for their great help in statistics and drawing of graphics, Francisca Morán Cadenas, Véronique Douet (Institute of Biology, University of Neuchâtel, Switzerland), Nataša Knap (Institute of Microbiology and immunology, University of Ljubljana, Slovenija), Katarína Ustaníková and Elena Elečková (Institute of Virology, University of Bratislava, Slovakia) for their precious advises and help, and Philippe de Mendonça (Institut für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, München, Germany) for the positive control. We also address special thanks to Olivier Rais, Maude Sunier and Lucia García for their technical assistance.

This work is part of the PhD thesis of Caroline Burri and is catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN0240 (www.eden-fp6project.net) and was financed by the Swiss National Science Foundation (FN n°320000-113936).

The contents are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

References cited

- Burri, C., F. Morán 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: 50-8.
- Casati, S., L. Gern, and J. C. Piffaretti. 2006.** 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: 2235-41.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-9.
- de Marval, F. 1994.** Etude séroépidémiologique de l'encéphalite à tiques et de la borréliose de Lyme en Suisse. Thesis. University of Neuchâtel, Switzerland.
- Dumpis, U., D. Crook, and J. Oksi. 1999.** Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis* 28: 882-90.
- Eisen, R., J. Eisen, M. C. Castro, and R. S. Lane. 2003.** Environmentally related variability in risk of exposure to Lyme disease spirochetes in northern California: Effect of climatic conditions and habitat type. *Environm. Entomol* 32: 1010-1018.
- Gäumann, R., K. Mühlemann, M. Strasser, and C. 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.
- Humair, P. F., V. Douet, F. M. Cadenas, L. M. Schouls, I. Van De Pol, and L. Gern. 2007.** Molecular identification of bloodmeal source in *Ixodes ricinus* ticks using 12S rDNA as a genetic marker. *J Med Entomol* 44: 869-80.
- Jouda, F., J. L. Perret, and L. Gern. 2004.** *Ixodes ricinus* density, and distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient. *J Med Entomol* 41: 162-9.
- Kozuch, O., S. P. Chunikhin, M. Gresikova, J. Nosek, V. B. Kurenkov, and J. Lysy. 1981.** Experimental characteristics of viraemia caused by two strains of tick-borne encephalitis virus in small rodents. *Acta Virol* 25: 219-24.

- Labuda, M., and S. E. Randolph. 1999.** Survival strategy of tick-borne encephalitis virus: cellular basis and environmental determinants. *Zentralbl Bakteriologie* 289: 513-24.
- Labuda, M., E. Eleckova, M. Lickova, and A. Sabo. 2002.** Tick-borne encephalitis virus foci in Slovakia. *Int J Med Microbiol* 291 Suppl 33: 43-7.
- Labuda, M., L. D. Jones, T. Williams, and P. A. Nuttall. 1993a.** Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Med Vet Entomol* 7: 193-6.
- Labuda, M., O. Kozuch, E. Zuffova, E. Eleckova, R. S. Hails, and P. A. Nuttall. 1997.** Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks co-feeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology* 235: 138-43.
- Labuda, M., P. A. Nuttall, O. Kozuch, E. Eleckova, T. Williams, E. Zuffova, and A. Sabo. 1993b.** Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia* 49: 802-5.
- Labuda, M., J. M. Austyn, E. Zuffova, O. Kozuch, N. Fuchsberger, J. Lysy, and P. A. Nuttall. 1996.** Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 219: 357-66.
- Lees, A. D., and A. D. Milne. 1951.** The seasonal and diurnal activities of individual sheep ticks (*Ixodes ricinus* L.). *Parasitology* 41: 189-208.
- MacLeod. 1939.** The seasonal and annual incidence of the sheep tick, *Ixodes ricinus*, in Britain *Bulletin of entomological research* 30: 103-118.
- Matile, H. 1984.** Etude virologique et épidémiologique sur l'encéphalite à tiques en Suisse. Thesis. University of Neuchâtel, Switzerland.
- Morán Cadenas, F., O. Rais, P. F. Humair, V. Douet, J. Moret, and L. Gern. 2007a.** Identification of host bloodmeal source and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in Chaumont (Switzerland). *J Med Entomol* 44: 1109-1117.

- Morán Cadenas, F., O. Rais, F. Jouda, V. Douet, P. F. Humair, J. Moret, and L. Gern. 2007b.** 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: 683-93.
- Nosek, J., and I. Grulich. 1967.** The relationship between the tick-borne encephalitis virus and the ticks and mammals of the Tribec mountain range. *Bull World Health Organ* 36: Suppl 1:31-47.
- Pavlovsky, E. 1947.** Ticks and tick-borne encephalitis (in Russian). *Parazitologia Dalnego Vostoka Leningrad* 5: 212-64.
- Perret, J. L., O. Rais, and L. Gern. 2004.** Influence of climate on the proportion of *Ixodes ricinus* nymphs and adults questing in a tick population. *J Med Entomol* 41: 361-5.
- Perret, J. L., E. Guigoz, O. Rais, and L. Gern. 2000.** Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitol Res* 86: 554-7.
- Perret, J. L., P. M. Guerin, P. A. Diehl, M. Vlimant, and L. Gern. 2003.** Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *J Exp Biol* 206: 1809-15.
- 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: 321-6.
- Randolph, S. E. 2001.** The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356: 1045-56.
- Randolph, S. E. 2004.** Evidence that climate change has caused 'emergence' of tick-borne diseases in Europe? *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37: 5-15.
- Randolph, S. E., and K. Storey. 1999.** Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *J Med Entomol* 36: 741-8.

- Randolph, S. E., L. Gern, and P. A. Nuttall. 1996.** Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol Today* 12: 472-9.
- 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): 177-86.
- Rosà, R., A. Pugliese, M. Ghosh, S. E. Perkins, and A. Rizzoli. 2007.** Temporal variation of *Ixodes ricinus* intensity on the rodent host *Apodemus flavicollis* in relation to local climate and host dynamics. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7: 285-95.
- Saksida, A., D. Duh, S. Lotric-Furlan, 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: 331-5.
- Schneider, H. 1931.** Über epidemische akute Meningitis serosa. *Wiener Klin Wschr* 44: 350-2.
- 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: 136-45.
- Süss, J. 2003.** Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine* 21 Suppl 1: S19-35.
- Tälleklint, L., and T. G. Jaenson. 1994.** Transmission of *Borrelia burgdorferi* s.l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in Sweden. *J Med Entomol* 31: 880-6.
- 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: 427-32.
- Zilber, L. A. 1939.** Spring-summer tick-borne encephalitis (in Russian). *Arkhiv Biol Nauk* 56: 255-61.

Table 1. Cumulative tick density (CTD) and peak tick density (PTD) for nymphs and adults at the four study sites per year

^a Data collected from March.

^b Data collected from June.

Study sites	CTD nymphs			CTD adults			PTD nymphs			PTD adults		
	2006	2007	2008	2006	2007	2008	2006	2007	2008	2006	2007	2008
Thun	1463 ^a	3562	2000	749 ^a	482	1032	21 ^a	53	27	14 ^a	6	14
Belp	12335 ^a	3720	6234	1794 ^a	1534	1416	109 ^a	31	59	31 ^a	10	10
Kiesen	18566 ^b	8264	12255	3760 ^b	2911	2752	159 ^b	67	123	24 ^b	25	22
Trimstein	20754 ^b	2627	4994	1444 ^b	632	667	157 ^b	21	33	10 ^b	8	7

Table 2. Prevalence of rodents infested by ticks and by co-feeding ticks at the four study sites (2006-2009)

An asterisk indicates significant results ($P < 0.05$) when compared with results from Trimstein (Pearson Chi-Square test).

	Thun	p-value	Belp	p-value	Kiesen	p-value	Trimstein	Total
Infested /total rodents (%)	127/169 (75.1)	0.03*	103/149 (69.1)	0.43	224/295 (75.9)	0.007*	133/206 (64.5)	587/819 (71.7)
Infested with co-feeding ticks / total infested rodents (%)	33/127 (26)	0.017*	20/103 (19)	0.3	74/223 (33)	<0.001*	18/133 (13.5)	145/586 (24.7)

4. Résultats

Year	Number of infested/captured rodents (%)			
	Thun	Belp	Kiesen	Trimstein
2007	83/95 (87)	68/92 (74)	122/154 (79)	71/103 (69)
2008	27/38 (71)	29/41 (71)	66/92 (72)	46/70 (66)

Table 3. Prevalence of rodents infested by ticks according to years and sites

Table 4. Prevalence of infested hosts and mean number of larvae and nymphs per infested hosts at the four study sites (April to July 2007 and 2008)

An asterisk indicates significant results ($P < 0.05$) when medians (U Mann-Whitney test) or prevalences (Fisher test) were compared.

	Thun			Belp			Kiesen			Trimstein		
	2007	2008	p-value	2007	2008	p-value	2007	2008	p-value	2007	2008	p-value
Mean of larvae (\pm SD) per host infested by larvae	13 (21)	15 (12.4)		8 (13.5)	19 (31.5)		19 (26.7)	27 (24.85)		5 (9.3)	16 (9.6)	
Median of larvae per host infested by larvae	9	14	0.38	3	11	0.016*	7	20	0.011*	2	16	0*
Mean of nymphs (\pm SD) per host infested by nymphs	2	3 (0.57)		1 (0.55)	2 (2.55)		2 (1.5)	5 (4.4)		1 (0.58)	2 (1)	
Median of nymphs per host infested by nymphs	1	3	0.05	1	2	0.502	2	3	0.103	1	1	0.758
Infested hosts/total hosts (%)	48/50 (96)	7/7 (100)	1	38/46 (83)	20/20 (100)	0.094	61/67 (91)	40/41 (98)	0.249	30/35 (86)	27/27 (100)	0.062
Infested hosts with co-feeding ticks	17 (35)	3 (43)	0.696	5 (13)	9 (45)	0.01*	19 (31)	25 (63)	0.002*	2 (7)	6 (22)	0.132

4. Résultats

Site	Year	Number of infected/ analyzed ticks ^a								
		Nymphs		95% CI	Adults		95% CI	Total	95% CI	
Thun	2006	0 / 74	(0)	0 - 4.86	0 / 42	(0)	0 - 8.41	0 / 116	(0)	0 - 3.13
	2007	0 / 390	(0)	0 - 0.94	2 / 156	(1.3)	0.16 - 4.55	2 / 546	(0.36)	0.04 - 1.32
	2008	0 / 449	(0)	0 - 0.82	0 / 182	(0)	0 - 2.01	0 / 631	(0)	0 - 0.59
	2009	0 / 99	(0)	0 - 3.66	0 / 41	(0)	0 - 8.6	0 / 140	(0)	0 - 2.6
	2006-2009	0 / 1,012	(0)	0 - 0.36	0 / 421	(0)	0 - 0.87	2 / 1,433	(0.14)	0.02 - 0.5
Belp	2006	2 / 445	(0.45)	0.05 - 1.61	0 / 75	(0)	0 - 4.8	2 / 520	(0.38)	0.05 - 1.38
	2007	1 / 242	(0.4)	0.01 - 2.28	0 / 241	(0)	0 - 1.52	1 / 483	(0.2)	0.01 - 1.17
	2008	0 / 610	(0)	0 - 0.6	1 / 160	(0.6)	0.02 - 3.44	1 / 770	(0.13)	0.01 - 0.72
	2009	0 / 22	(0)	0 - 15.43	0 / 8	(0)	0 - 36.94	0 / 30	(0)	0 - 11.57
	2006-2009	3 / 1,319	(0.23)	0.05 - 0.67	1 / 484	(0.21)	0.01 - 1.14	4 / 1,803	(0.2)	0.06 - 0.57
Kiesen	2006	0 / 297	(0)	0 - 1.24	0 / 97	(0)	0 - 3.73	0 / 394	(0)	0 - 0.93
	2007	0 / 567	(0)	0 - 0.65	0 / 318	(0)	0 - 1.15	0 / 885	(0)	0 - 0.42
	2008	0 / 539	(0)	0 - 0.68	0 / 203	(0)	0 - 1.8	0 / 742	(0)	0 - 0.5
	2009	0 / 186	(0)	0 - 1.97	1 / 118	(0.8)	0.02 - 4.63	1 / 304	(0.33)	0.01 - 1.82
	2006-2009	0 / 1,589	(0)	0 - 0.23	1 / 736	(0.14)	0.01 - 0.76	1 / 2,325	(0.04)	0 - 0.24
Trimstein	2006	0 / 349	(0)	0 - 1.05	0 / 37	(0)	0 - 9.49	0 / 386	(0)	0 - 0.95
	2007	0 / 185	(0)	0 - 1.97	0 / 55	(0)	0 - 6.49	0 / 240	(0)	0 - 1.52
	2008	0 / 296	(0)	0 - 1.24	0 / 40	(0)	0 - 8.81	0 / 336	(0)	0 - 1.09
	2009	0 / 83	(0)	0 - 4.35	0 / 77	(0)	0 - 4.68	0 / 160	(0)	0 - 2.28
	2006-2009	0 / 913	(0)	0 - 0.4	0 / 209	(0)	0 - 1.75	0 / 1122	(0)	0 - 0.33

Table 5. Prevalence of TBEV in questing ticks at the four study sites

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

TBEV infected ticks are shown in bold.

Table 6. Detection and identification of host DNA in *I. ricinus* questing nymphs at the four study sites

Host DNA	Thun		Belp		Kiesen		Trimstein	
	2008 (%)	2006 (%)	2008 (%)	2006 (%)	2006 (%)	2008 (%)	2006 (%)	2008 (%)
Artiodactyls	25 (42)	12 (34)	15 (38)	8 (42)	26 (53)	9 (43)	24 (47)	
Small mammals	3 (5)	9 (26)	2 (5)	7 (37)	8 (16)	0 (0)	4 (8)	
Birds	6 (10)	9 (26)	17 (44)	0 (0)	10 (20)	3 (14)	22 (43)	
Sciurus	9 (15)	2 (6)	2 (5)	1 (5)	1 (2)	7 (33)	0 (0)	
Carnivores (Vulpes, Meles)	12 (20)	2 (6)	0 (0)	2 (11)	1 (2)	0 (0)	1 (2)	
Insectivores (Sorex, Neomys)	5 (8)	0 (0)	1 (0)	1 (5)	2 (4)	1 (5)	0 (0)	
Others (Lepus, Lizard)	0 (0)	1 (3)	3 (8)	0 (0)	1 (2)	1 (5)	0 (0)	
Identified host DNA/analyzed ticks	60/102 (59)	35/103 (34)	39/100 (39)	19/82 (23)	49/123 (40)	21/101 (21)	51/101 (50)	

Legends

Fig. 1: Seasonality of questing tick density (larvae-nymphs-adults) at Thun, Belp, Kiesen and Trimstein. Density of larvae and adults were multiplied by three.

Fig. 2: Relative humidity (%) in relation with temperature (°C) at the four study sites in March and April 2006 to 2009. Macroclimatic data (Nofeln, monthly mean temperature and monthly mean relative humidity) are shown to relate them to microclimatic data recorded at the study sites.

Fig. 3: Temperature at 60 cm (°C, —) and saturation deficit (mmHg, ----) at all studied sites. Horizontal dotted lines represent the 7°C and stars show when temperature reached 7°C in 2007.

Fig. 4: Seasonality of mean tick density (log scale) (larvae and nymphs) per infested host at the four study sites.

Fig. 5: Frequency distributions of *Ixodes ricinus* larvae and nymphs on rodents (*M. glareolus* and *Apodemus* spp.) in 2006, 2007 and 2008. At each intensity of larval infestation (x-axis), the number of hosts coincidentally feeding zero (open bars), 1-2 (grey), 3-4 (stippled), 5-10 (hatched), or 11-20 (black) nymphs are shown.

4. Résultats

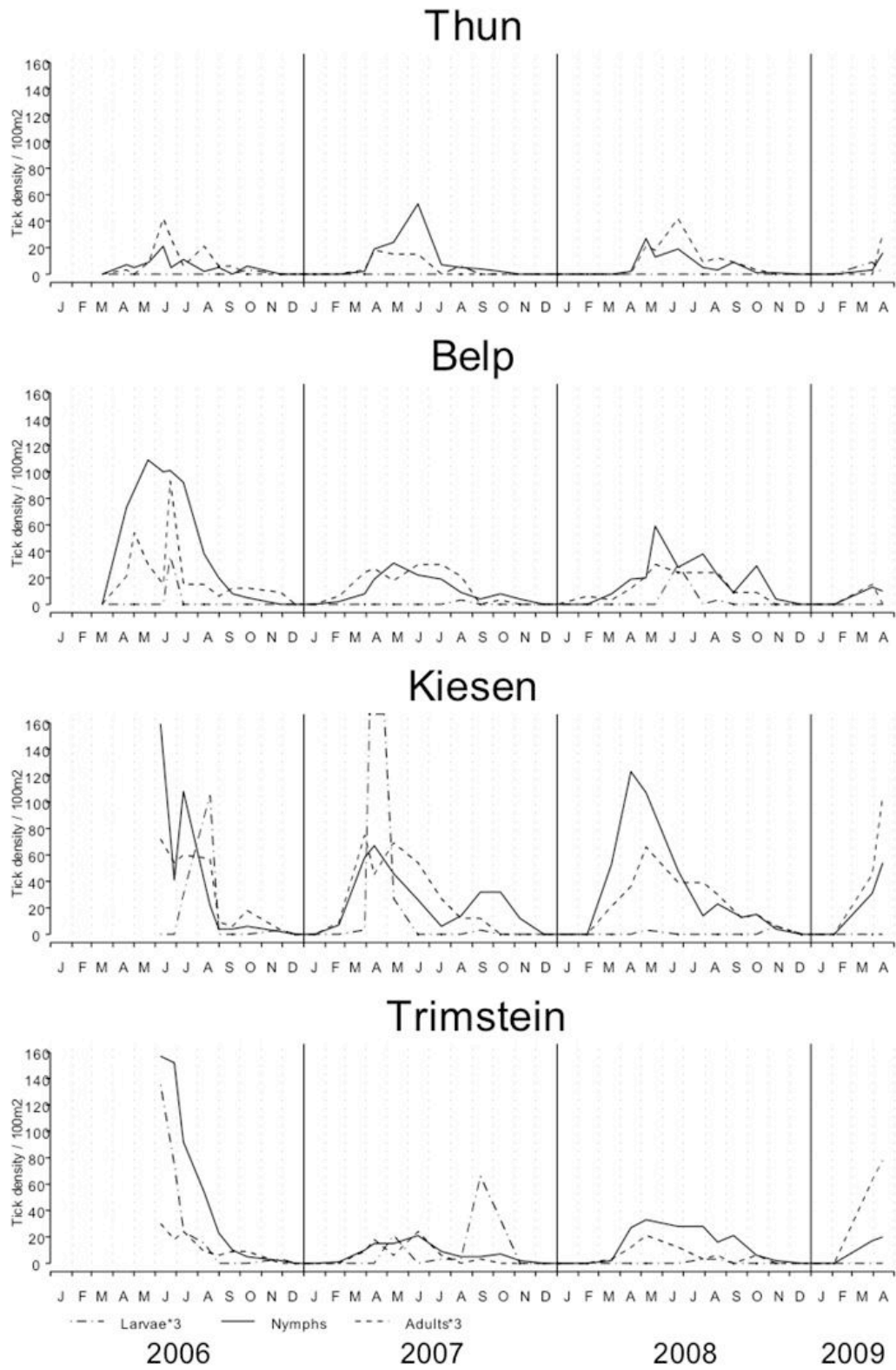


Fig. 1

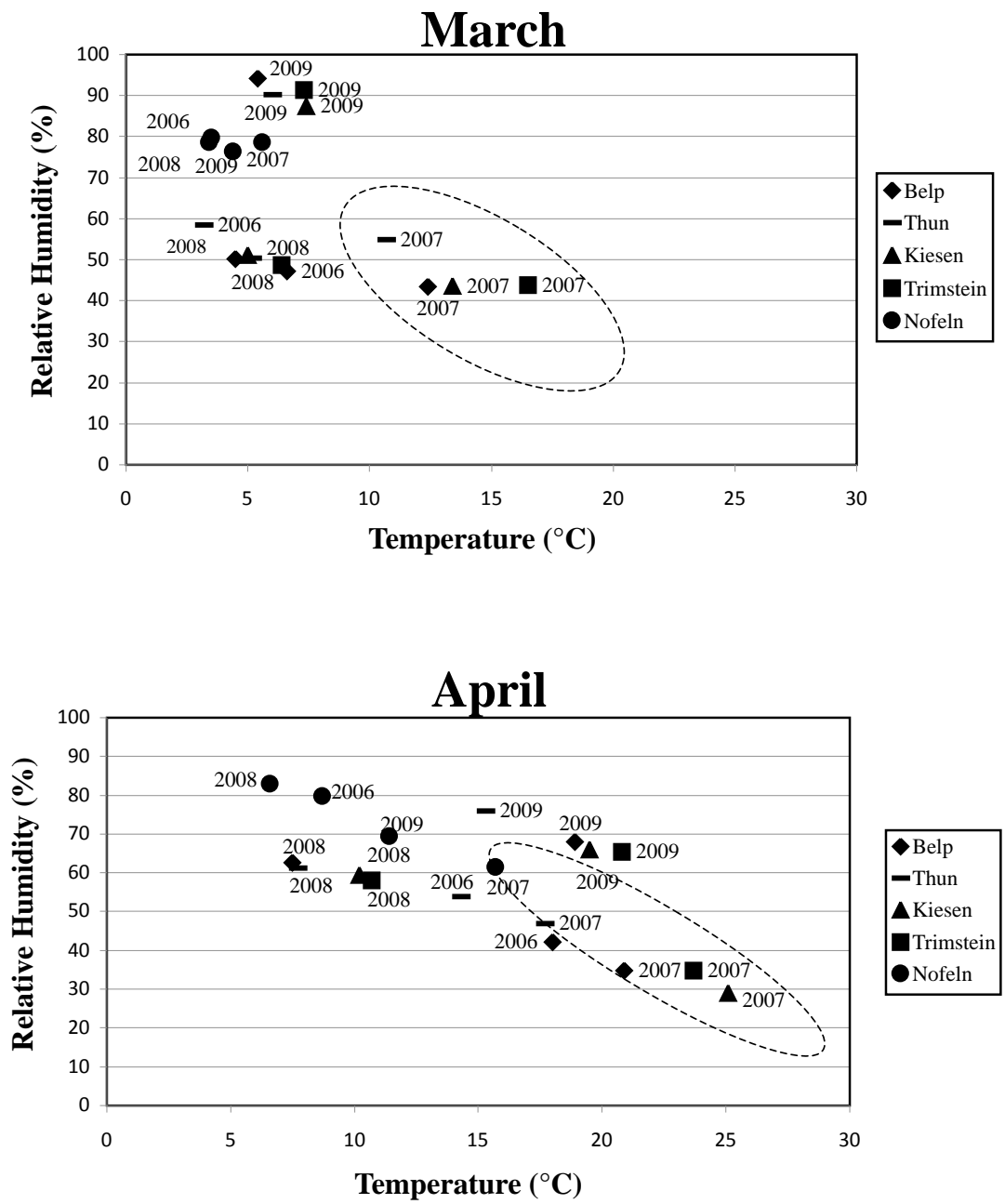


Fig. 2

4. Résultats

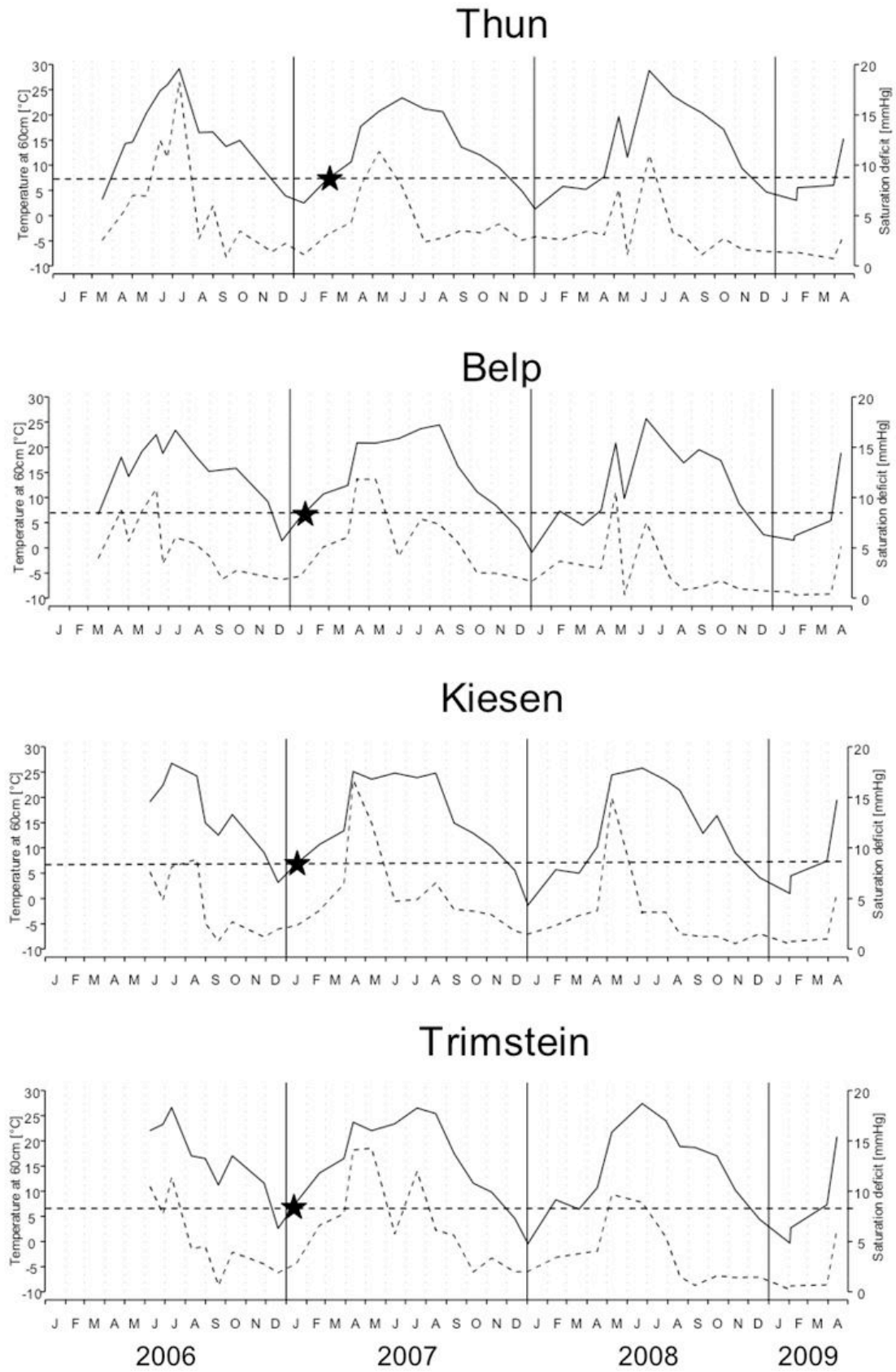


Fig. 3

4. Résultats

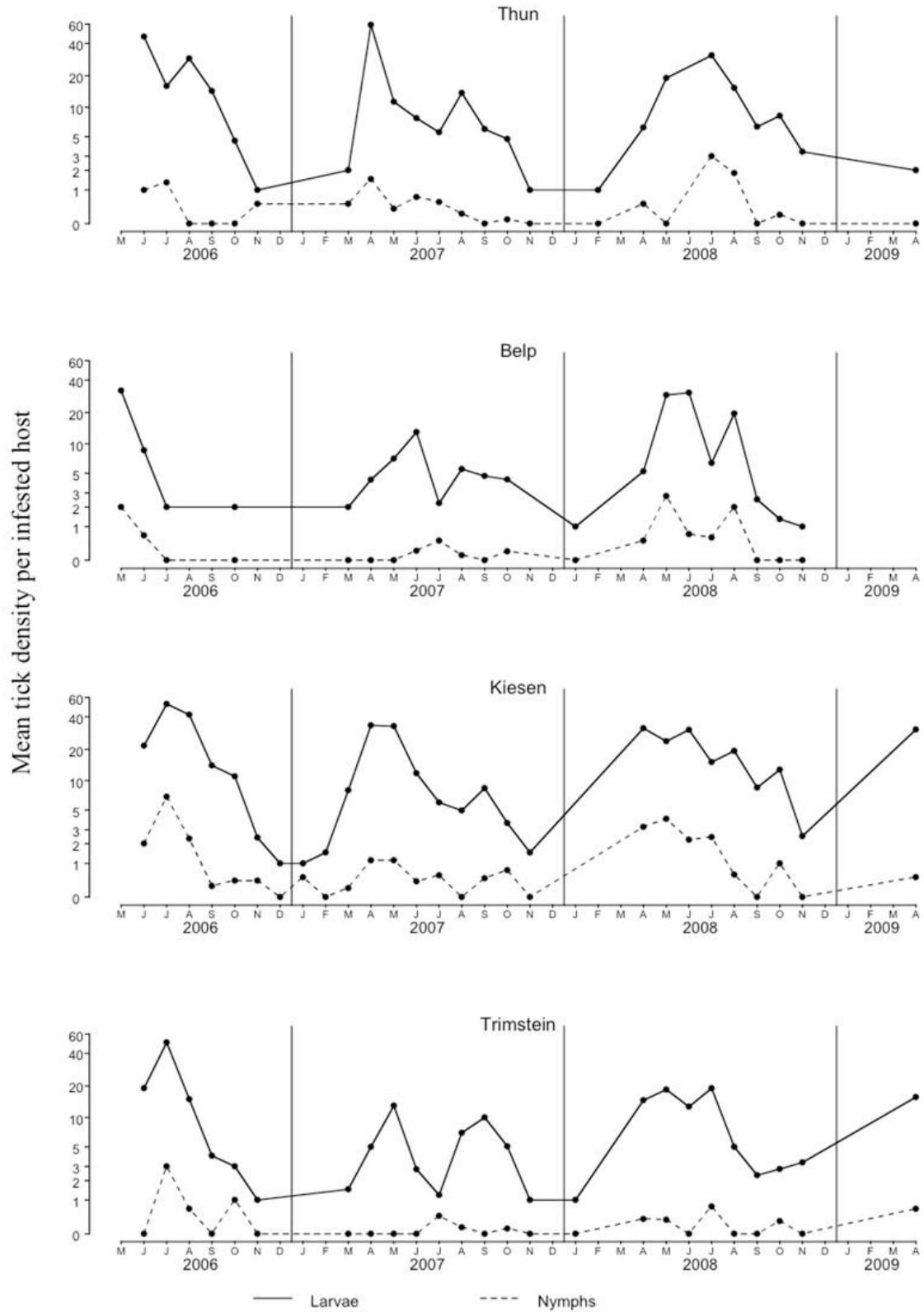


Fig. 4

4. Résultats

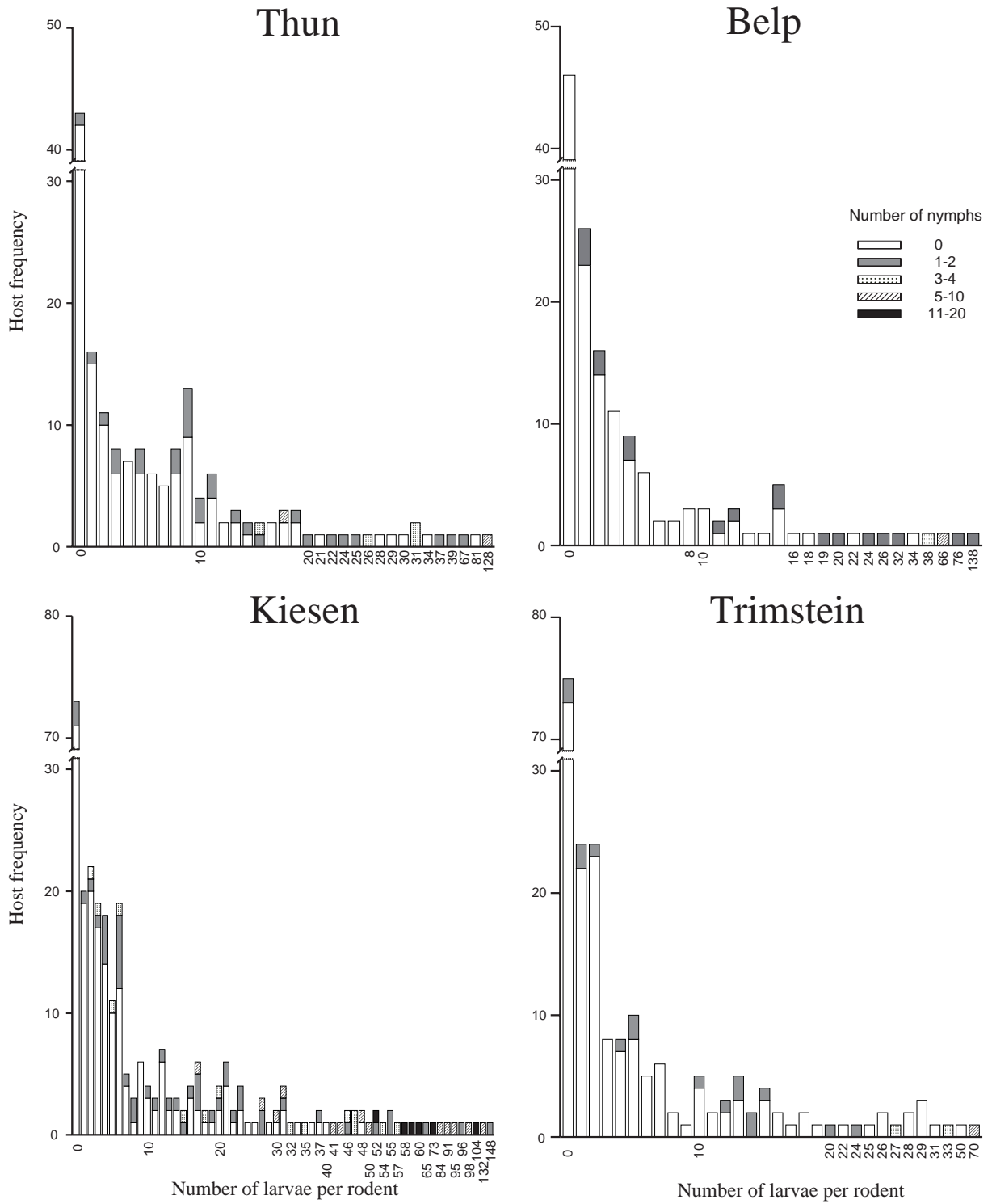


Fig. 5

4.3 Publication 3

Serological evidence of tick-borne encephalitis virus infection in rodents captured at four sites in Switzerland

Journal of Medical Entomology. *Submitted.*

Serological evidence of tick-borne encephalitis virus infection in rodents captured at four sites in Switzerland

Caroline Burri^a, Misa Korva^b, Viktoria Bastic^a, Nataša Knap^b, Tatjana Avšič-Županc^b, Lise Gern^a

Journal of Medical Entomology. *Submitted.*

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

^bInstitute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Slovenia.

Abstract

In a previous study, the presence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in questing *I. ricinus* ticks and in field derived ticks that engorged on small mammals (n=9,986) was investigated at four sites located in a TBE area in Switzerland. Only two of these sites were recognized as TBE foci (Thun and Belp) and the screening of ticks revealed the presence of TBEV in ticks at a third site, Kiesen, but not at the fourth one, Trimstein. The aim here was to test another approach to detect TBE endemic areas. Sera from 333 small mammals (*Apodemus flavicollis*, *A. sylvaticus*, *Myodes glareolus*) captured in 2006 and 2007 at the four sites were examined for the presence of antibodies against TBEV using immunofluorescence and avidity tests. Overall the prevalence of antibodies against TBEV in rodents reached 3.6% (12/333). At two sites known as TBE foci, Thun and Belp, anti-TBEV antibodies were detected in 9.9% (9/91) and 1.6% (1/63) of rodent sera, respectively. At the third site, Kiesen, recently identified as a TBE focus by the detection of TBEV in ticks, anti-TBEV antibodies were detected in 1.8% (2/113) of rodent sera. Finally, at Trimstein, none of the examined rodent sera had antibodies against TBEV (0/66). This study shows another approach to detect TBE foci by testing antibodies in small mammal sera that is less time-consuming and less expensive than molecular tools.

Key words: TBEV-small mammals-antibodies-prevalence.

Introduction

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is a flavivirus that accidentally infects human. In Europe, TBEV is transmitted by a tick bite and is maintained in a zoonotic cycle between *Ixodes ricinus* and vertebrate hosts. In nature, ticks may become infected while feeding on a host during the viraemic phase. However, a threshold of viraemia is necessary to infect ticks (Kunz 1992). In addition, infected hosts rapidly develop specific antibodies and become immune for life (Korenberg 1976). Hence all vertebrates do not act as reservoir hosts (Charrel et al. 2004). Small mammals contribute mostly to the TBEV maintenance because of their high reproduction level that allows decrease the impact of immunization (Shilova 1960 cited in Korenberg 1976) and because they support non-systemic transmission of TBEV to ticks, usually from infected nymphs to uninfected larvae feeding simultaneously and called co-feeding transmission (Labuda et al. 1993).

Previously, we investigated the presence of TBEV in questing *I. ricinus* ticks and in ticks that engorged on rodents (n=9,986) at four sites located in Switzerland (Burri et al. 2011). Among these sites, two of them were known as TBE foci (Thun and Belp), meaning that at least three human cases from each site had been reported to the Federal Office of Public Health. Screening for the presence of the virus in ticks by real-time RT-PCR allowed the detection of TBEV at three out of four sites (Thun, Belp and Kiesen) but not at Trimstein. In the present study, our purpose was to use another approach to detect TBE foci by testing small mammal sera for antibodies against TBEV.

Materials and Methods

Rodents were trapped once a month during 2006 and 2007 using 50 traps that were set at four sites presenting similar beech grove mesophytic lowland vegetation: Thun (46°43'N, 7°36'E, 642 m above sea level), Belp (46°52'N, 7°30'E, 687 m above sea level), Kiesen (46°48'N, 7°34'E, 566 m above sea level) and Trimstein (46°53'N, 7°34'E, 620 m above sea level) (Burri et al. 2011). Rodents were brought to the laboratory. After tick drop-off, rodents were anaesthetized intramuscularly with 0.03 ml of Xylasol[®] (GRAEUB, Bern, Switzerland) (0.02 ml) and Ketazol-100[®] (GRAEUB, Bern, Switzerland) (0.01 ml) and blood was obtained from the retro-orbital sinus using Pasteur pipettes (1.1 mm diameter). Blood samples were centrifuged twice for 10 minutes at 0.8 rcf and sera were stored at -20°C until processed.

Sera were screened for the presence of TBEV antibodies using a homemade indirect immunofluorescence assay (IFA). TBEV (strain: Ljubljana I, U27494) was inoculated on Vero E6 cell lines and incubated at 37 °C and 5% CO₂. After 7 days, when characteristic

4. Résultats

cytopathic effect was noted, cells were centrifuged for 10 min at 720 rcf and 4 °C. Cells were resuspended in 3 ml NaCl with 5% fetal bovine serum (GIBCO, Invitrogen, cat. no. 16415) and 7µl of suspension were put on slides (Biomedicals, cat. no. 096041505), dried, fixed with acetone and stored at – 20 °C. Before IFA, slides were allowed to dry for 10 min. Seven µl of rodent sera diluted 1:10 were used for IFA. After 30 min incubation in a moist chamber at room temperature, slides were washed in phosphate buffer saline (PBS; pH 7.4) for 15 min. The anti-mouse IgG conjugate (A 7506; Sigma, St. Louis, USA) was used at a 1:128 dilution and slides were processed as described above, and examined under a fluorescent microscope (Nikon, eclipse 80i, 400x). Positive and negative controls consisted in one rodent serum that was previously tested positive and PBS (pH 7.4), respectively.

Sera from seropositive rodents were further diluted up to 1:2560 to establish the antibody titers and an IFA avidity assay was performed. IFA assay was performed in duplicate. Conditions were the same as described above. After incubation with anti-mouse IgG conjugate, one set of slides was washed in PBS and the other set with PBS containing 8 M urea. Slides were incubated in PBS with urea for 5 min and then washed with distilled water. The avidity of IgG was calculated as a ratio of the titers obtained from slides washed in PBS and from slides treated with PBS containing urea. An antibody ratio above 32 indicates low IgG avidity and therefore an early period of infection (less than one month) whereas a ratio of 4 or less indicates high IgG avidity and therefore an infection older than one month. After two months of infection, no difference is observed between antibody titers of urea-treated and non-treated specimens.

Sera with antibodies against TBEV were tested for viraemia by amplifying RNA. RNA was isolated using TRIzol[®] (600 µl) (Invitrogen Life Technologies[™], Basel, Switzerland) and samples were analyzed by real-time RT-PCR (Schwaiger and Cassinotti 2003) as described in Burri et al. (2011).

A Fischer's exact test was used for statistical analyses and a p-value ≤ 0.05 was considered as significant.

Results

Overall, 559 rodents were captured: 278 *M. glareolus*, 161 *A. sylvaticus*, 118 *A. flavicollis* and two *Apodemus* spp. Trapping was more successful in 2007 (0.2 rodents/trap/night) compared to 2006 (0.06 rodents/trap/night) (Burri et al. 2011). Details on the number of collected rodents at each site are shown in Table 1. We analyzed 333 sera from three small mammal species: 152 *M. glareolus*, 104 *A. sylvaticus* and 77 *A. flavicollis* captured at the four sites in

4. Résultats

2006 (n=74) and 2007 (n=259). Overall, antibodies against TBEV were detected in 3.6% (12/333) of rodent sera, 6.8% (5/74) in 2006 and 2.7% (7/259) in 2007 (Fisher's exact test, $P>0.05$). Anti-TBEV antibodies were detected in sera from rodents captured at three sites: Thun, Belp and Kiesen whereas sera from rodents captured at Trimstein did not show any antibodies (Table 2). The highest prevalence was observed at Thun (9.9%, 9/91), followed by Kiesen (1.8%, 2/113), Belp (1.6%, 1/63) and Trimstein (0%, 0/66) (Fisher's exact test: Thun/Kiesen, $P= 0.01$, Thun/Belp, $P=0.04$, Thun/Trimstein, $P=0.01$) (Table 2).

Among the 12 rodents with anti-TBEV antibodies, eight belonged to *M. glareolus*, three to *A. sylvaticus* and one to *A. flavicollis* (Fisher's exact test, $P>0.05$) (Table 3). Two *M. glareolus* (one from Thun, one from Kiesen) had no ticks whereas the remaining 10 rodents harbored ticks when they were captured. However, only one *A. flavicollis* male (Th37) carried TBEV infected ticks (Burri et al. 2011). This individual showed a recent TBEV infection as determined by IgG IFA avidity assay (Table 3). Therefore we were interested to detect viraemia in rodent sera presenting antibodies against TBEV. Screening of the sera by real-time RT-PCR did not reveal the presence of viral RNA in the 12 analyzed serum samples.

Discussion

This study showed that serological investigation in the rodent population is another approach to detect presence of TBEV in endemic sites. The analysis of only 333 sera from rodents captured in 2006-2007 allowed us to detect the presence of anti-TBEV antibodies at three out of four (Thun, Belp, Kiesen, but not at Trimstein) sites in Switzerland whereas in a previous study, the screening of 9,986 ticks by real-time RT-PCR (Thun: n=2,001, Belp n=2,117, Kiesen: n= 4,230, Trimstein: n= 1,638) was necessary to evaluate the presence/absence of TBEV at the four sites (Burri et al. 2011).

A small proportion of rodents displayed anti-TBEV antibodies, ranging from 1.6 to 9.9%, but these results are consistent with results from Kozuch et al. (1967) and Bakhvalova et al. (2006) who reported antibody prevalence of 4 to 11% and 2.6-10.2%, respectively. Interestingly, although more rodents were captured in 2007, prevalence of antibodies in rodent sera was lower than in 2006. In 2007, at most sites, a low infestation by immature ticks on rodents, including a low prevalence of rodents with co-feeding ticks due to a reduced questing tick density were observed (Burri et al. 2011). This might explain the low prevalence of antibodies in rodents this year.

Thun was the site where the prevalence of anti-TBEV antibodies in rodent sera was the highest. In 1977 already, Matile (1982) reported the presence of antibodies against TBEV in four small mammals at this same study site. This observation shows the stability of this

focus. At Belp, TBEV in questing *I. ricinus* ticks (de Marval 1994, Casati et al. 2006, Burri et al. 2011) and anti-TBEV antibodies in rodent sera were detected confirming the presence of the virus at this site. Kiesen and Trimstein were not recognized as TBE foci by the Federal Office of Public Health (<http://www.bag.admin.ch/themen/medizin/00682/00684/01069/index.html?lang=fr>) because no human case has ever been reported from these sites. However, Kiesen should now be considered as a TBE focus because TBEV was recently detected in questing ticks (Burri et al. 2011) and because of the detection of anti-TBEV antibodies in rodents. Trimstein is the only site where TBEV was not detected in ticks (Burri et al. 2011) and where anti-TBEV antibodies were not observed in rodents. Current results seemed to show the absence of TBEV at this site but as few sera were analyzed, further studies are needed to confirm the absence of the circulation of TBEV at this site.

No viral RNA was detected in the seropositive samples. It should be noted that the absence of viraemia could be due to the fact that rodent blood was taken after all ticks dropped off (after 7 days) whereas viraemia lasts only 2-3 days (Kozuch et al. 1981).

One *A. flavicollis* that showed a recent TBEV infection by IgG IFA avidity assay was infested by infected larvae (11.9%) and uninfected nymphs (n=5) when it was captured (Burri et al. 2011). Since the dynamic of detachment of these ticks from the rodent is unknown, we can speculate that an infected nymph detached before the mouse was captured and larvae get the infection whereas the uninfected nymphs attached to the rodent after the viraemic phase. The presence of TBEV in larvae might also be explained by transovarial transmission (Danielová and Holubová 1991). However, the prevalence of TBEV in larvae feeding on this *Apodemus* mouse was much higher (11.9%) (Burri et al. 2011) than the efficiency of transovarial transmission (0.2-0.8%) described by Danielová and Holubová (1991) suggesting another way of transmission. Therefore co-feeding transmission of TBEV among co-feeding larvae (some of them having been transovarially infected) might be another explanation.

The screening of rodent sera for anti-TBEV antibodies revealed to be an appropriate approach to localize the presence of TBEV at sites where TBEV was also detected in ticks (Burri et al. 2011). One advantage of this approach is that it is less time-consuming and less expensive than molecular tools. Thus rodents could be used as sentinels to detect TBEV by testing anti-TBEV antibodies in areas suspected to be endemic for TBE. Other animals such as roe deer and dogs were used as sentinels to detect TBEV areas (Gerth et al. 1995, Lindhe et al. 2009). However, small mammals are more appropriate due to their low home range allowing a more precise localization of a TBEV focus.

Acknowledgements

We are thankful to Olivier Rais (University of Neuchâtel, Switzerland) for his precious technical assistance. This work is part of the PhD thesis of Caroline Burri and was financed by the Swiss National Science Foundation (FN n°320000-113936).

References cited

- Bakhvalova, V.N., A.K. Dobrotvorsky, V.V. Panov, V.A. Matveeva, S.E. Tkachev, and O.V. Morozova. 2006.** Natural tick-borne encephalitis virus infection among wild small mammals in the southeastern part of western Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6, 32-41.
- 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.* (2011).
- Casati, S., L. Gern, and J.C. Piffaretti. 2006.** 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.
- de Marval, F. 1994.** Etude séroépidémiologique de l'encéphalite à tiques et de la borréliose de Lyme en Suisse. Ph.D. dissertation. University of Neuchâtel, Switzerland.
- 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. Süß, V.I. Zlobin, and X. de Lamballerie. 2004.** Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 1040-1055.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Danielová, V., and J. Holubová. 1991.** Transovarial transmission rate of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks, pp.7-10. In *Modern Acarology* (eds. Dusbabek, F. and Bukva, V.). Vol. 2. The Hague, Academia, Prague and SPB Academic Publishing.
- 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.
- Korenberg, E.I. 1976.** Some contemporary aspects of natural focality and epidemiology of tick-borne encephalitis. *Folia Parasitol. (Praha).* 23, 357-366.

- Kozuch, O., S.P. Chunikhin, M. Gresíková, J. Nosek, V.B. Kurenkov, and J. Lysý. 1981.** Experimental characteristics of viraemia caused by two strains of tick-borne encephalitis virus in small rodents. *Acta Virol.* 25, 219-224.
- Kozuch, O., M. Gresíková, J. Nosek, M. Lichard, and M. Sekeyová. 1967.** The role of small rodents and hedgehogs in a natural focus of tick-borne encephalitis. *Bull. World Health Organ.* 36 Suppl, 61-66.
- Kunz, Ch. 1992.** Tick-borne encephalitis in Europe. *Acta Leidensia* 60, 1-14.
- Labuda, M., L.D. Jones, T. Williams, V. Danielova, and P.A. Nuttall. 1993.** Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks. *J. Med. Entomol.* 30, 295-299.
- Lindhe, K. E., D. S. Meldgaard, P. M. Jensen, G. A. Houser, M. Berendt. 2009.** Prevalence of tick-borne encephalitis virus antibodies in dogs from Denmark. *Acta Vet. Scand.* 51: 56.
- Matile, H. 1982.** Etudes virologiques et épidémiologiques sur l'encéphalite à tiques en Suisse. Ph.D. dissertation. University of Neuchâtel, Switzerland.
- Radda, A., H. Hofmann, and G. Pretzmann. 1969.** Threshold of viraemia in *Apodemus flavicollis* for infection of *Ixodes ricinus* with tick-borne encephalitis virus. *Acta Virol.* 13, 74-77.
- 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.
- Shilova, S.A. 1960.** On biological grounds of epidemiological forecast of tick-borne encephalitis. *Byull MOIP., otd boil.* 65, 37-47 (In Russian).

4. Résultats

Sites	<i>A. flavicollis</i>		<i>A. sylvaticus</i>		<i>M. glareolus</i>	
	2006	2007	2006	2007	2006	2007
Thun	0.5	3.3	3.0	5.2	3.0	8.3
Belp	0.5	2.0	0.5	6.8	1.3	7.3
Kiesen	1.7	5.3	1.7	2.3	6.9	19.0
Trimstein	3.1	5.5	0.6	8.8	1.4	4.0

Table 1. Number of rodents according to species per 100 traps per site and per night in 2006 and 2007.

Sites	Nb positive/ tested sera	%
Thun	9 / 91	9.9
Belp	1 / 63	1.6
Kiesen	2 / 113	1.8
Trimstein	0 / 66	0
Total	12 / 333	3.6

Table 2. Prevalence of anti-TBEV antibodies in rodents captured at the four study sites using IFA test

Sample ID	Species	Sex	End titre	Titre with urea	Avidity ratio		Infection
Thun 9	<i>M. glareolus</i>	Male	1:80	1:40	2	high	old
Thun 10	<i>M. glareolus</i>	Male	1:320	1	320	low	new
Thun 12	<i>M. glareolus</i>	Female	1:640	1:320	2	high	old
Thun 23	<i>M. glareolus</i>	Female	1:640	1:40	16	equivocal	?
Thun 35	<i>M. glareolus</i>	Male	1:40	1	40	low	new
Thun 37	<i>A. flavicollis</i>	Male	1:40	1	40	low	new
Thun 45	<i>M. glareolus</i>	Male	1:80	1:10	8	high	old
Thun 51	<i>A. sylvaticus</i>	Male	1:40	1:40	1	high	old
Thun 58	<i>M. glareolus</i>	Male	1:640	1:80	8	high	old
Kiesen 26	<i>A. sylvaticus</i>	Female	1:80	1	80	low	new
Kiesen 135	<i>M. glareolus</i>	Female	1:80	1	80	low	new
Belp 49	<i>A. sylvaticus</i>	Female	1:160	1	160	low	new

Table 3. IFA antibody titers and avidity ratio in rodent sera with anti-TBEV antibodies to predict a recent or a past infection in rodents

4.4 Publication 4

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 and zoonotic diseases. 2011. 11:7. Pages 939-944.

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).

Caroline Burri, Christèle Dupasquier, Viktoria Bastic, and Lise Gern¹

Vector-borne and zoonotic diseases. 2011. 11:7. Pages 939-944.

¹Institute of Biology, Laboratory of Eco-Epidemiology of Parasites, University of Neuchâtel, Emile-Argand 11, 2000 Neuchâtel, Switzerland

Abstract

This study is part of a project that aimed to better understand the role of small mammals in the maintenance of the tick-borne encephalitis virus at four different sites in Switzerland. Here we focused on the detection of three intracellular pathogens: *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. and *Babesia* spp. in field-derived ticks that detached from 79 small mammals. We analyzed 465 *Ixodes ricinus* larvae after their molt and 14 semi-engorged *I. trianguliceps* that were feeding on rodents. No pathogen was detected in *I. trianguliceps*. In *I. ricinus*, the most frequently detected pathogen was *Rickettsia* spp. (7.3%). All *Rickettsia* spp. identified DNA belonged to *R. helvetica* except one DNA sample that was identified as *R. monacensis*. The prevalence of *Babesia* spp. reached 2.4% and identification at the species level revealed *B. venatorum* (1.7%) and *B. microti* (0.4%). *A. phagocytophilum* was not detected in *I. ricinus* that detached from rodents. To verify the absence of *A. phagocytophilum* at the four sites, additional questing nymphs collected at these sites were analyzed for *A. phagocytophilum*. This pathogen was detected at one site only where 2% (2/100) of questing ticks were infected. Some of these emerging pathogens are described for the first time in molted larvae that fed on rodents. The presence of medically relevant pathogens, with a global prevalence of 9.7%, highlights the importance to inform the medical corporation on the risk for human health in these areas.

Key words: *Ixodes*, *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, rodents.

Introduction

In Europe, the tick *Ixodes ricinus* is the vector of numerous pathogens such as viruses, bacteria and protozoa. Some of them, like *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. and *Babesia* spp., are considered as agents of emerging human diseases (Hildebrandt et al. 2010a).

Members of the genera *Ehrlichia* and *Anaplasma* are obligate intracellular bacteria that target granulocytes or monocytes according to species. The *Ehrlichia* species were first recognized as pathogens of veterinary importance. Since the reorganization of the *Anaplasmatacea* family, *E. equi* and *E. phagocytophila*, the recognized agent of the human granulocytic ehrlichiosis (HGE), are now described as a unique species named *A. phagocytophilum* (Dumler et al. 2001). However, not all strains are pathogenic for humans (Massung et al. 2003, de la Fuente et al. 2005) and currently less than 70 human cases have been reported throughout Europe (see Hildebrandt et al. 2010b). In Switzerland, *A. phagocytophilum* was detected in cattle (Pfister et al. 1987), dogs (Pusterla et al. 1997), horses (Pusterla et al. 1998a) and in questing ticks (Pusterla et al. 1998b), and Liz et al. (2000) reported infected rodents and infected *I. ricinus* on rodents. In addition, serological studies provided evidence of contacts of Swiss residents with the HGE agent (see Pusterla et al. 1999).

Rickettsia species from spotted fever group are obligate intracellular bacteria and some species such as *R. helvetica* cause human diseases in Europe (Brouqui et al. 2007, Nilsson et al. 2010). In Switzerland, *R. helvetica* and *R. monacensis* have been described in *I. ricinus* (Beati et al. 1994, Boretti et al. 2009), but no human case has been reported so far.

The genus *Babesia* is a protozoan parasite of erythrocytes that was first recognized as agent of animal disease until the first human case was documented in Yugoslavia in 1957 (Skrabalo and Deanovic 1957). While in USA it is *B. microti* that is mainly associated with human pathogenesis, in Europe, several *Babesia* species are involved such as *B. divergens*, a cattle parasite, *B. microti* associated with rodents and *Babesia* sp. EU1 (temporarily named *B. venatorum*) (Gray et al. 2010). In Switzerland, *B. microti*, *B. divergens*, and *B. venatorum* have been described in questing *I. ricinus* and in *I. ricinus* collected from hosts such as dogs, cats, cattle, asses and goats (Foppa et al. 2002, Casati et al. 2006, Hilpertshausen et al. 2006, Gigandet et al. 2011). One human case due to *B. microti* was reported in Switzerland (Meerscherrer et al. 2004) and another confirmed human case due to this species was identified in Germany (Hildebrandt et al. 2007).

This work is part of a project conducted at four sites in Switzerland that aimed to better understand the maintenance of Tick-Borne Encephalitis virus (TBEV) in endemic areas and more specifically the role of rodents as reservoirs for TBEV (Burri et al. 2011). To gain additional information on other pathogens considered as agents of emerging human diseases in Europe, we analyzed part of field-derived ticks (*I. ricinus* and *I. trianguliceps*) infesting the rodents captured at these four sites for *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. and *Babesia* spp.

Materials & Methods

Study sites

This study was carried out in Switzerland in the canton of Bern from May 2006 to April 2009 (Burri et al. in press). Four sites were chosen: Thun (46°43'N, 7°36'E, 642 m above sea level), Belp (46°52'N, 7°30'E, 687 m above sea level), Kiesen (46°48'N, 7°34'E, 566 m above sea level) and Trimstein (46°53'N, 7°34'E, 620 m above sea level).

Tick sampling on rodents and vegetation

Rodents were trapped once a month from May 2006 in Belp and Thun, and from June 2006 in Kiesen and Trimstein to April 2009. Briefly, 50 traps were set at each study site. Captured rodents were released at the point of capture a few days after ticks dropped off. Engorged ticks were identified to species according to Cordas et al. (1993). Because *I. trianguliceps* ticks are difficult to maintain in the laboratory, they were stored as engorged ticks at -20°C while *I. ricinus* were stored in tubes at 98% relative humidity and room temperature until their molt. Two months after their molt, live ticks were washed in 70% ethanol and maintained at -20°C until DNA extraction. The low number of ticks analyzed per rodent was because ticks collected from rodents were used as a priority to detect TBEV in ticks.

In addition, questing nymphs collected in 2008 by flagging vegetation at the four study sites and maintained in the laboratory as described above. One hundred ticks per site were screened for blood meal analysis (see Burri et al. in press) and tested for *A. phagocytophilum* detection.

DNA extraction

DNA from *I. ricinus* nymphs that fed as larvae on rodents and DNA of engorged larvae, nymphs and one female of *I. trianguliceps* (as well as one egg laying) were isolated in a final volume of 85 µl using the kit “Qiasymphony virus/bacteria” (Qiagen) with a robot Qiasymphony® SP system (Qiagen, Switzerland) according to the manufacture and were stored at -80°C.

Detection and Identification of Pathogens

A real-time PCR modified from Courtney et al. (2004) was used to amplify and detect a 77 bp fragment of the *msp2* gene of *A. phagocytophilum*. Primers ApMSP2f and ApMSP2r (0.72 µM each) with the probe ApMSP2-FAM (0.12 µM) (Table 1), KapaTaq hotstart (KapaBiosystems by Labgene Scientific, Switzerland) (0.75 U per test), dNTPs (200 µM each), MgCl₂ (6 mM), and 2 µl of DNA sample were used for the reaction. The amplification was performed in an iCycler (Biorad, Reinach, BL, Switzerland) in a final volume of 25 µl with 2 µl of *A. phagocytophilum* as positive control (Webster strain, kindly provided by Ana Sofia Santos, CEVDI, Portugal). Amplification started with an initial activation at 95°C for 15 min followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min.

For the detection of *Babesia* spp. a fragment of 450 bp of the 18S gene was targeted (Georges et al. 2001). Amplifications using primers B-R2 and F2 (0.2 µM each) (Table 1) with Taq (Qiagen) (0.63 U per test), dNTPs (200 µM each), MgCl₂ (1mM) and 10 µl of DNA were performed in a single reaction volume of 25 µl with 1 µl of *B. divergens* as positive control (kindly provided by Simona Casati, Istituto Cantonale di Microbiologia, Bellinzona, Switzerland) in a Whatman Biometra Tgradient Thermocycler 96 (Göttingen Deutschland). A touchdown PCR was used according to Bekker et al. (2002) with an initial temperature of 94°C for 3 min, followed by a denaturation step at 94°C for 20 s, annealing at 67°C for 30 s, extension for 72°C for 30 s. Then during the subsequent cycle set the annealing temperature was lowered by 1°C during 11 cycles until it reached 57°C. Additional 40 cycles followed with 20 s at 94°C, 30 s at 57°C, 30 s at 72°C, and as a final extension, 10 min at 72°C.

For the detection of *Rickettsia* spp., DNA from the intergenic spacer 23S-5S was amplified by a single PCR. This method described by Jado et al. (2006) amplified a 345 bp fragment. A volume of 50 µl with primers RCK/23-5F, RCK/23-5R (0.5µM each) (Table 1), Taq (Qiagen) (1.5 U per test), dNTPs (200 µM each), and 10 µl of DNA was used. The

4. Résultats

positive control consisted in 1 µl of *R. conorii* (kindly provided by Simona Casati, Istituto Cantonale di Microbiologia, Bellinzona, Switzerland). PCR was used with an initial temperature of 94°C for 9 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec, 60°C for 1 min and 65°C for 4 min with a final extension at 65°C for 7 min.

RLB technique was used for the identification at the species level of *Babesia* spp. and *Rickettsia* spp. (Bekker et al. 2002, Gigandet et al. 2011). The amplified products were hybridized to four probes for *Babesia* spp. and two probes for *Rickettsia* spp. (Table 1). Hybridization conditions were 42°C for *Babesia* spp. and 48°C for *Rickettsia* spp. for one hour followed by two washings at 52°C for 10 min. Samples that could not be identified at the species level were purified with a purification kit (Promega) and sent for sequencing to Microsynth AG (Balgach, Switzerland).

Statistical analysis

The χ^2 test was used for statistical analysis and a p-value of ≤ 0.05 was considered as statistically significant.

Results

In total, 479 ticks fed on 90 rodents captured in 2006 (n=23), 2007 (n=55) and in 2008 (n=12) were analyzed. Among them, 465 *I. ricinus* larvae (analyzed after their molt as nymphs) fed on 79 rodents (51 *Apodemus* spp. and 28 *Myodes glareolus*) (Table 2) and 14 partially engorged *I. trianguliceps* (12 larvae, one nymph, one female) feeding on 12 rodents (10 *M. glareolus* and two *A. sylvaticus*), and one egg laying were tested. No pathogen was detected in *I. trianguliceps* but 9.7% (45/465) of *I. ricinus* were infected by at least one pathogen. These infected ticks were recovered from one third (26/79) of hosts that were infested by *I. ricinus* (Table 2). In 2006 more rodents (43.5%, 10/23) were carrying infected ticks than in 2007 (30.8%, 16/52) but the difference was not significant ($p > 0.05$). For 2008, not enough data were available for comparison.

Rickettsia spp. was the pathogen the most frequently detected in ticks from rodents with a global prevalence of 7.3% (34/465, $p < 0.001$) (Table 2). Ticks infected with *Rickettsia* spp. were recovered from 26.5% (21/79) rodents. All identified *Rickettsia* spp. DNA belonged to *R. helvetica* (7.1%, 33/465) except one sample from Trimstein that was showing 100% homology with *Rickettsia* spp. 362 (*R. monacensis*) (GenBank accession number DQ139797).

4. Résultats

Two ticks from two rodents captured in Thun were co-infected with *R. helvetica* and *Babesia* spp.: one with *B. microti* and one with *B. venatorum*.

The total prevalence of *Babesia* spp. in *I. ricinus* from rodents was 2.4% (11/465) (Table 2) and the frequency of *Babesia* spp. tended to be higher at Thun and Belp. *B. venatorum* was identified in 1.7% (8/465) examined ticks and *B. microti* in 0.4% (2/465). *Babesia* spp. were detected in ticks recovered from 11.4% (9/79) of rodents. Two *M. glareolus* were infested by ticks in which *B. microti*-was identified whereas *B. venatorum* was detected in ticks that were attached on four *A. sylvaticus*, one *A. flavicollis* and one *M. glareolus*. One sample from a tick feeding on one *M. glareolus* from Trimstein could be identified at the genus level only and sequencing result was not conclusive.

A. phagocytophilum was not detected in the 465 *I. ricinus* infesting the rodents (n=79). Therefore, in addition, questing nymphs were screened to verify the absence of *A. phagocytophilum* at the four sites. *A. phagocytophilum* was detected in 2% (2/100) of questing nymphs at one site (Kiesen).

Discussion

In Switzerland *I. ricinus* is the most important vector of pathogens of medical and veterinary importance. In a previous study, we investigated the ecological factors determining the presence of TBEV at four different sites and more specifically the role of rodents as reservoirs for TBEV (Burri et al. in press). In order to gain more information on the presence of other emerging tick-borne pathogens at these sites, we screened *I. ricinus* larvae (analyzed as nymphs) that detached from small mammals for *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. and *Babesia* spp.

Rickettsia spp. and *Babesia* spp. were detected in ticks collected from rodents at each site. Although it has been shown that rodents can be reservoir hosts for *A. phagocytophilum* (Liz et al. 2000, Bown et al. 2008) we did not detect this organism in ticks feeding on rodents. A coexisting cycle between *I. ricinus* and *I. trianguliceps* as it has been demonstrated in UK for *A. phagocytophilum* might explain the absence of the pathogen in *I. ricinus* feeding on rodents suggesting that the pathogen cycle might be supported by *I. trianguliceps* (Bown et al. 2008). At our study sites, few *I. trianguliceps* were infesting rodents, only a dozen of ticks could be tested and none was infected. Since Liz et al. (2000) reported infected rodents and infected *I. ricinus* on rodents in Switzerland, the absence of *A. phagocytophilum* observed

here could also be due to the low number of examined hosts at each site. Therefore, we analyzed questing ticks to confirm the absence of *A. phagocytophilum* at the sites. *A. phagocytophilum* was identified in questing nymphs (2%) at one site only (Kiesen) and one infected nymph showed that its previous host as larva was *S. scrofa* (data not shown). Thus, other reservoir hosts like wild boar and wild cervids could play a more important role than rodents in the maintenance of this pathogen, at least at some sites (Rosef et al. 2009, Portillo et al. 2010).

In contrast, with a global prevalence of 7.1%, *R. helvetica* was the pathogen the most frequently detected in ticks fed on rodents. Another study, recently conducted in Switzerland, showed a similar prevalence (11.7%) in questing tick population (Boretti et al. 2009). In addition to *R. helvetica*, one sample was identified, after sequencing, as *Rickettsia* sp. 362, a species first reported in the blood of two patients with clinically diagnosed Mediterranean spotted fever (Jado et al. 2006) and later identified as *R. monacensis* (Jado et al. 2007). This species was recently reported in questing ticks in Switzerland (Boretti et al. 2009) but reservoir hosts for *R. monacensis* have not yet been identified. Here, one tick that detached from one rodent was infected by *R. monacensis*. Because nothing is known on the transovarial transmission of this pathogen, the question on the role of rodents as reservoirs remains open.

Concerning *Babesia* spp., two species (*B. microti* and *B. venatorum*) were identified in ticks fed on rodents with prevalences ranging between 0.8% and 4.2% according to sites. *B. microti*, with a prevalence of 0.5%, was found in one site only (Thun) confirming previous observation at this site (Gern and Aeschlimann 1986). For *B. venatorum*, the total prevalence was 1.7% and this pathogen was recorded at sites where TBEV is present (Thun, Belp, Kiesen) (Burri et al. 2011). This species was first recognized in human (Herwaldt et al. 2003) before being detected in roe deer in Slovenia (Duh et al. 2005) and France (Bonnet et al. 2007). It was also reported in *I. ricinus* collected from sheep and goats in various European countries including Switzerland (Hilpertshauser et al. 2006, Casati et al. 2006) and in questing *I. ricinus* in Switzerland (Casati et al. 2006, Gigandet et al. 2011). Here, to our knowledge, it is the first report of *B. venatorum* in ticks that fed on *A. sylvaticus*, *A. flavicollis* and *M. glareolus*. As Bonnet et al. (2007) showed that transovarial transmission exists for this pathogen, the question of the role of the rodents as reservoirs remains open. *B. microti* infected ticks were recovered only from *M. glareolus* but other small rodents such as *A. flavicollis* are known as reservoirs for *B. microti* (Gern and Aeschlimann 1986, Duh et al. 2003, Beck et al. 2010). Because transovarial transmission does not occur for *B. microti* (Gray

et al. 2002) our results confirm that *M. glareolus* voles act as reservoirs for this *Babesia* species.

This study showed the presence of *R. helvetica*, *B. venatorum*, and *B. microti* in ticks fed on rodents but we have no clear information on the infectivity of the rodents because rodent blood was not analyzed for these pathogens. However a transmission from rodents to ticks of these emerging pathogens is not excluded, as mentioned above for *B. microti*. For *R. helvetica* and *B. venatorum* other modes of transmission might be involved like transovarial and transstadial transmissions (Bonnet et al. 2007, Brouqui et al. 2007) and therefore the role played by rodents cannot be elucidated here. Co-feeding transmission between infected nymphs and uninfected larvae, as it has been demonstrated for TBEV (Labuda et al. 1993) for example, may also be considered (45.5% of examined rodents were infested by larvae and nymphs, data not shown). However, we observed an infection prevalence that was not significantly higher in larvae feeding together with nymphs on rodents than in larvae feeding without nymphs (data not shown), therefore further studies are needed to explore this transmission way also because we lacked information on infection in co-feeding nymphs.

The presence of emerging pathogens that are of medical relevance, with a global prevalence of 9.7% as observed here, highlights the importance to inform the medical corporation on the risk for emerging tick-borne diseases. This implies that additional investigations on the geographic distribution of ticks infected by these zoonotic pathogens are required in Switzerland.

Acknowledgements

We would like to thank C. Beuret for DNA extraction, S. Casati and A. S. Santos for positive controls, and E. Lommano for her help with the real-time PCR for *A. phagocytophilum*. This work was financially supported by the Swiss National Scientific Foundation (no 320000-113936/1) and is part of the PhD thesis of one of the authors (C.B.).

References cited

- Beati, L, Humair, PF, Aeschlimann, A, Raoult, D. Identification of spotted fever group rickettsiae isolated from *Dermacentor marginatus* and *Ixodes ricinus* ticks collected in Switzerland. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51: 138-148.
- Beck, R, Vojta, L, Curkovic, S, Mrljak, et al. Molecular survey of *Babesia microti* in wild rodents in Central Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; ahead of print.
- Bekker, CP, de Vos, S, Taoufik, A, Sparagano, OA, et al. 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* 2002; 89: 223-238.
- Bonnet, S, Jouglin, M, L'Hostis, M, Chauvin, A. *Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1208-1210.
- Bown, KJ, Lambin, X, Telford, GR, Ogden, NH, et al. 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* 2008; 74: 7118-7125.
- Boretti, FS, Perreten, A, Meli, ML, Cattori, V, et al. Molecular Investigations of *Rickettsia helvetica* infection in dogs, foxes, humans, and *Ixodes* ticks. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 3230-3237.
- Brouqui, P, Parola P, Fournier, PE, Raoult, D. Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 49: 2-12.
- Burri, C, Bastic, V, Maeder, G, Patalas, E, Gern, L. Microclimate and zoonotic cycle of tick-borne encephalitis virus in a risk area in Switzerland. *J Med Entomol* in press.
- Casati, S, Sager, H, Gern, L, Piffaretti, JC. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann Agric Environ Med* 2006; 13: 65-70.
- Courtney, JW, Kostelnik, LM, Zeidner, NS, Massung, RF. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3164-3168.
- Cordas, T, Aeschlimann, A, Morel, PC. *Ixodidae* s.str. (Schulze, 1937) in Switzerland - morphological-study by scanning electronic microscope. *Acarologia* 1993; 34: 21-46.

4. Résultats

- de la Fuente, J, Massung, RF, Wong, SJ, Chu, FK, et al. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 1309-1317.
- Duh, D, Petrovec, M, Trilar, T, Avsic-Zupanc, T. The molecular evidence of *Babesia microti* infection in small mammals collected in Slovenia. *Parasitology* 2003; 126: 113-117.
- Duh, D, Petrovec, M, Avsic-Zupanc, T. Molecular characterization of human pathogen *Babesia* EU1 in *Ixodes ricinus* ticks from Slovenia. *J Parasitol* 2005; 91: 463-465.
- Dumler, JS, Barbet, AF, Bekker, CP, Dash, GA, et al. 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* 2001; 51: 2145-2165.
- Foppa, IM, Krause, PJ, Spielman, Goethert, H, et al. Entomologic and serologic evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti*, eastern Switzerland. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 722-726.
- Georges, K, Loria, GR, Riili, S, Greco, A, et al. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet Parasitol* 2001; 99: 273-286.
- Gern, L, Aeschlimann, A. Etude séroépidémiologique de 2 foyers à babésie de micromammifères en Suisse. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1986; 128: 587-600.
- Gigandet, L, Stauffer, E, Douet, V, Rais, O, Moret, J, Gern, L. Prevalence of three zoonotic *Babesia* species in *Ixodes ricinus* nymphs in a suburban forest in Switzerland. *Vector Borne Zoonot Dis* 2011; 11 (4).
- Gray, J, von Stedingk, LV, Gurtelschmid, M, Granstrom, M. Transmission studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks and gerbils. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1259-1263.
- Gray, JS, Zintl, A, Hildebrandt, A, Hunfeld, K-P, Weiss, L. Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks Tick-Borne Dis* 2010; 1: 3-10.
- Gubbels, JM, De Vos, AP, Van der Weide, M, Viseras, J, Schouls, LM, De Vries, E, Jongejan, F. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1782-1789.

4. Résultats

- Herwaldt, BL, Caccio, S, Gherlinzoni, F, Aspöck, H, et al. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 942-948.
- Hildebrandt, A, Hunfeld, KP, Baier, M, Krumbholz, A, et al. First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 595-601.
- Hildebrandt, A, Fritsch, J, Franke, J, Sachse, S, et al. Co-circulation of emerging tick-borne pathogens in Middle Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010a; 10: ahead of print.
- Hildebrandt, A, Krämer, A, Sachse, S, Straube, E. Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in region of Middle Germany. *Ticks Tick Borne Dis* 2010b; 1: 52-6.
- Hilpertshauer, H, Deplazes, P, Schnyder, M, Gern L et al. *Babesia* spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in southern Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 6503-6507.
- Jado, I, Escudero, R, Gil, H, Jimenez-Alonso, M I, et al. Molecular method for identification of *Rickettsia* species in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4572-4576.
- Jado, I, Oteo, JA, Aldamiz, M, Gil, H, et al. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1405-1407.
- Labuda, M, Danielova, V, Jones, LD, Nuttall PA. Amplification of tick-borne encephalitis virus infection during co-feeding of ticks. *Med Vet Entomol* 1993; 7: 339-342.
- Liz, JS, Anderes, L, Sumner, JW, Massung, RF, et al. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1002-1007.
- Massung, RF, Priestley, RA, Miller, NJ, Mather, TN, et al. Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice. *J Infect Dis* 2003; 188: 1757-1763.
- Meer-Scherrer, L, Adelson, M, Mordechai, E, Lottaz, B, et al. *Babesia microti* infection in Europe. *Curr Microbiol* 2004; 48: 435-437.

4. Résultats

- Nilsson, K, Elfving, K, Pahlson, C. *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 490-492.
- Portillo, A, Pérez-Martinez, L, Santibanez, S, Santibanez, P, et al. *Anaplasma* spp. in wild mammals and *Ixodes ricinus* from North Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; ahead of print.
- Pfister, K, Roesti, A, Boss, PH, Balsiger, B. *Ehrlichia phagocytophila* als Erreger des Weidefiebers im Berner Oberland. *Schweiz Arch Tierheilk* 1987; 129: 343-347.
- Pusterla, N, Huder, J, Wolfensberger, B, Litschi, B, et al. Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2307-2309.
- Pusterla, N, Huder, J, Feige, K, Lutz, H. 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* 1998a; 36: 2035-2037.
- Pusterla, N, Weber, R, Wolfensberger, G, Schär, G, et al. Serological evidence of human granulocytic ehrlichiosis in Switzerland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998b; 17:207-209.
- Pusterla, N, Leutenegger, CM, Huder, JB, Weber, R, et al. Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1332-1334.
- Rosef, O, Paulauskas, A, Radzijeuskaja, J. 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* 2009; 51: 47.
- Skrabalo, Z, Deanovic, Z. Piroplasmosis in man; report of a case. *Doc Med Geogr Trop* 1957; 9: 11-16.

Table 1. Primers and probes used for the amplification and detection of the different pathogen in ticks

Target organism	Name	Design	Sequence (5'-->3')	Concentration (pmol) for RLB	References
<i>Babesia</i> spp.	B-R2	Primer	biotin-CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT	-	Georges et al. (2001)
<i>Babesia</i> spp.	F2	Primer	GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G	-	Georges et al. (2001)
<i>Babesia/Theileria</i>	catch-All B/T	Probe	amino-TAA TGG TTA ATA GGA RCR GTT G	50	Georges et al. (2001)
<i>B. venatorum</i>	B.EU1	Probe	amino-GAG TTA TTG ACT CTT GIC TTT AA	500	Gigandet et al. (in press)
<i>B. microti</i>	B. microti	Probe	amino-GCT TCC GAG CGT TTT TTT AT	500	Gigandet et al. (in press)
<i>B. divergens</i>	B. divergens	Probe	amino-GTT AAT ATT GAC TAA TGT CGA G	500	Gubbels et al. (1999)
<i>Rickettsia</i> spp.	RCK/23-5-F	Primer	biotin-GAT AGG TCR GRT GTG GAA GCA C	-	Jado et al. (2006)
<i>Rickettsiales</i>	RCK/23-5-R	Primer	TCG GGA YGG GAT CGT GTG TTT C	-	Jado et al. (2006)
<i>R. helvetica</i>	Generic	Probe	amino-TAG CTC GAT TGR TTT ACT TTG	100	Jado et al. (2006)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	R. helvetica	Probe	amino-CAT GGC TTG ATC CAC GGT A	100	Jado et al. (2006)
<i>A. phagocytophilum</i>	AmSp2f	Primer	ATG GAA GGT AGT GTT GGT TAT GGT ATT	-	Courtney et al. (2004)
<i>A. phagocytophilum</i>	AmSp2r	Primer	TTG GTC TTG AAG CGC TCG TA	-	Courtney et al. (2004)
<i>A. phagocytophilum</i>	APMSp2-FAM	Probe	FAM-TGG TGC CAG GGT TGA GCT TGA GAT TG-TAMRA	-	Courtney et al. (2004)

4. Résultats

Sites	Nb hosts with infected ticks/nb hosts with ticks (%)	Nb infected ticks/tested ticks (%)		
		<i>Rickettsia</i> spp.	<i>Babesia</i> spp.	<i>A. phagocytophilum</i>
Thun	13/33 (39)	19/173 (11)	6/173 (3.5)	0/173 (0)
Belp	5/11 (46)	7/71 (9.9)	3/71 (4.2)	0/71 (0)
Kiesen	6/15 (40)	7/118 (5.9)	1/118 (0.8)	0/118 (0)
Trimstein	2/20 (10)	1/103 (1)	1/103 (1)	0/103 (0)
Total	26/79 (33)	34/465 (7.3)	11/465 (2.4)	0/465 (0)

Table 2. Prevalence of rodents infested with *I. ricinus* ticks infected by at least one pathogen and prevalence of *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., and *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* ticks after feeding on rodents

4.5 Publication 5

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

Journal of Medical Entomology. *Submitted.*

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, Patalas E, V. Bastic and L. Gern¹

Journal of Medical Entomology. *Submitted.*

¹Institute of Biology, Laboratory of Eco-Epidemiology of Parasites, University of Neuchâtel, Emile-Argand 11, 2000 Neuchâtel, Switzerland

Abstract

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is the causative agent of tick-borne encephalitis (TBE), a neurological disease transmitted by tick bite (genus *Ixodes*) in Eurasia. Currently 10,000-12,000 clinical cases are reported annually in about 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* ticks from one non-endemic and three endemic TBE 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 RT-PCR. Our results confirmed the presence of viral RNA in 0.1% (6/6120) of questing ticks collected in one 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.

Key words: tick-borne encephalitis virus, *Ixodes ricinus* ticks, Switzerland

Introduction

Tick-borne encephalitis (TBE) is a viral zoonosis that can affect humans after the bite of infected *Ixodes ricinus* ticks in Western Europe and *I. 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). Beside the significant increase in TBE cases reported in Switzerland in 2006, an extension of the geographic distribution of TBE foci to the Western part of the country was observed (SFOPH 2007). Until 1999 all TBE cases were registered in a well-defined perimeter including the North and Eastern parts of the country with the West of the lake of Neuchâtel as western limit. However between 2000 and 2007, TBE cases were registered East 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 in the Western part of the country (SFOPH, 2007). In Switzerland, an area is considered as a TBE focus 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 two endemic sites (Kloten/Bülach (ZH) and Thun/Spiez (BE)) with a TBEV prevalence ranging from 0.36% to 0.64% (Wicki et al. 2000) and in the canton of Bern, a known TBE endemic region, from 0.04% (Burri et al. 2011) to 14.3% (Casati et al. 2006). 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 non-endemic area (North of

the Lake of Neuchâtel) in order to determine the geographic distribution of TBEV infected ticks and to analyze the genetic diversity of TBEV strains.

Material and Methods

Study area and tick sampling. This study was carried out in the Western part of Switzerland in three new TBE endemic regions, region A (Plaine de l'Orbe), region B (South of the Lake of Neuchâtel) and region C (Jura Mountains, Moutier) (Fig. 1). 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. 1).

Ticks were collected at 26 sites in endemic region A, 14 sites in region B and 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 1m² white flag in spring-summer 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 1-25 nymphs and from 1-12 males or females and stored at -20°C until processed for TBEV detection.

TBEV RNA isolation and amplification. Ticks were examined for TBEV by real-time reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) (modified from Schwaiger and Cassinotti 2003, as described in Burri et al. 2011). Prior to real-time RT-PCR, ticks were crushed in pools in 300 µl of TRIzol[®] (Invitrogen, Basel, Switzerland) containing a 3 mm ball with a mixer mill MM 300 (Retsch, Arlesheim, Switzerland) during 3 minutes for nymphs and 5 minutes for adults. RNA was extracted according to Invitrogen protocol (Chomczynski and Sacchi 1987). Incubation times were 10 minutes for chloroform and 10 minutes for isopropanol. Centrifugation time after adjunction of isopropanol was 15 minutes and 6 minutes after adjunction of 75% ethanol. Samples were then dried for 30-40 minutes, eluted in 30 µl of RNase-free water (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland) and stored at -20°C until analysis by real-time RT-PCR.

TBEV RNA reverse transcription and amplification were performed in an iCycler (Biorad, Reinach, Basel Land, Switzerland) in a single reaction volume of 25 µl consisting in 12.5 µl of reaction mix (containing dNTP's, 0.04 mM each), primers and probes: 3 µM of F-TBE 1 (5'GGG CGG TTC TTG TTC TCC 3'), 0.6 µM of R-TBE 1 (5'ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT 3') and 0.8 µM of probe TBE-WT (5'FAM-TGA GCC ACC ATC ACC CAG

ACA CA-TAMRA 3'), 0.5 µl Superscript III Platinum Taq (Invitrogen, Basel, Switzerland, Superscript III Platinum One-step quantitative system) and 5 µl of RNA. The TBEV RNA extract was first reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) at 42°C for 30 minutes and then incubated for 10 minutes at 95°C. Directly after reverse transcription the non coding region localized in 3' (NCR3') was amplified at 95°C for 15s, 60°C for 1 minute 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 were included during the RNA isolation and real-time RT-PCR amplification steps in order 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 non-structural protein NS5 using primers described in Puchhammer-Stöckl et al. (1995). Reaction mix for amplification was modified after Saksida et al. (2005). Prior to amplification 10 µl of RNA was transcribed into cDNA according to Invitrogen protocol. The first amplification was performed in a reaction volume of 50 µl containing 5 µl of Qiagen Buffer 10x, 200 µM of each dNTP, 0.2 µM each of primers FSM-1 and FSM-2 (Puchhammer-Stöckl et al. 1995), 1.5 U per test of DNA Taq polymerase (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland) and 10 µl of cDNA. Amplification was performed in 40 cycles (94°C, 30s; 40°C, 30s; 72°C, 30s) followed by a 5 minutes elongation step (72°C). For the nested PCR, a 50 µl reaction mixture consisting in 5 µl of Qiagen Buffer 10x, 200 µM of each dNTP, 0.2 µM each of inner primers FSM-1i and FSM-2i (Puchhammer-Stöckl et al. 1995), 1.5 U per test of DNA Taq polymerase (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland) and 2 µl of amplified DNA was used. The nested PCR program used the following conditions: 94°C, 2 minutes for an initial denaturation step followed by 40 cycles of amplification (94°C, 30s; 53°C, 30s; 72°C, 30s) and 72°C, 5 minutes 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, USA) 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 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

4. Résultats

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 Kumlinge (AJ298321), Sofjin-HO strain (AB062064), MDJ-01 (AY217093), Senzhang (AY182009), Turkish strain (DQ235151), Greek strain (DQ235153), Slovenian strains Stefanja Gora (EU057639), Sodraica (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), 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. 1) 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. 1). Two pools of 8 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

4. Résultats

minimal infection rate (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. 1, 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 non-endemic 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), 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. In order 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. 2). NETBE8 (this study) is more closely related to Neudoerfl strain and to previously identified Swiss TBEV strains (HM450136, HM450137, HM450138, HM450140, HM450141, Canton Bern (BE)) (Burri et al. 2011) than NETBE9, NETBE10 and NETBE11 (this study) that are clustered together with another previously identified Swiss strain NETBE7 (HQ883372, Liesberg, Canton Basel Land (BL)). Alignment of the TBEV nucleotide sequences obtained from ticks collected in Switzerland revealed that sequences of strains NETBE9, NETBE10 and NETBE11 are 100% identical to each other and identical to the sequence of strain NETBE7 from Liesberg (BL) while strain NETBE8 is clearly different from them showing a divergence of 4.3% in the nucleotide sequence (Fig. 3). However, the sequence from strain NETBE8 shows a divergence of only 2.4% with the sequences of strains NETBE1, NETBE2, NETBE5, NETBE6 from Canton BE (Fig. 3).

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 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 areas (regions A, B and C) as well as on a neighboring area (region D). We investigated questing *I. ricinus* ticks for TBEV during four consecutive years in order 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 non-endemic 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). Clinical cases were also reported in region C (Jura Mountains, Moutier) (SFOPH 2006) but we were not able to confirm TBE risks. Similarly, Gäumann et al. (2010) were not able to detect TBEV in ticks collected in this region. An explanation for this discrepancy could be either that the sampling size was too small (n=199 in this study and n=392 in Gäumann et al. (2010)) or that our sampling site did not overlap with the TBE microfocus. In fact, it has been reported that within a focus TBEV infected ticks are not uniformly distributed (Blaskovic and Nosek 1972). Non-endemic 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 TBEV infected ticks were detected in this study nor clinical TBE cases reported in this area, we can therefore conclude that region D is currently not at risk for TBE.

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 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. 2010, 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 6 (Fig. 1) whereas we could not detect the virus in the 137 ticks we analyzed.

Within endemic region A, two different lineages of TBEV sequences (at site 2, and at sites 3 and 5) were present and each lineage was clustered with other previously identified TBEV sequences obtained from ticks collected at Thun and Belp (BE) (Burri et al. 2011) and Liesberg (BL), respectively, two endemic regions situated East and North East of region A (SFOPH, 2010). Genetic comparison of TBEV nucleotide sequences obtained in this study with other Swiss strains showed that the three sequences that formed part of one cluster (NETBE9, NETBE10 and NETBE11 from sites 3 and 5) are exactly identical to each other and identical to NETBE7 (from Liesberg, BL). This may suggest that the corresponding foci emerged independently of each other most probably following the introduction of TBEV infected ticks infesting migrating birds, for example, as it has been reported 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 which 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.

Acknowledgements

Results are parts of the PhD thesis of Lommano E. and Burri C. This work was financially supported by the Swiss National Foundation (grants no 320000-113936/1 and no 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 TBE 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.* (in press).
- 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. Pisciutti, 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. 2010.** Prevalence and molecular characterization of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovenia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* ahead of print.
- 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, USA. Available at <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. Mizzutani, 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.
- 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, A. Kupca, M. Pejcoch, V. Vasilenko, and M. Zygtiene. 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.
- Schaepli, 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.
- Süss, J. 2003.** Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine* 21 (Suppl. 1): S19-35.
- Süss, J. 2008.** Tick-borne encephalitis in Europe and beyond-the epidemiological situation as of 2007. *Euro. Surveill.* 13.
- 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. Mejlom, 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, 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.

4. Résultats

Sampling sites	GPS Coordinates		No tested	No positive
	Latitude	Longitude	ticks	pools
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
Montchérand 1	46° 44' 7" N	6° 29' 31" E	675	1
Montchérand 2	46° 44' 2" N	6° 29' 16" E	901	1
Montchérand 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
Region A 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
Lignerolles	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
Abergement	46° 45' 30" N	6° 28' 39" E	537	1
Total			6,120	6
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
Region B 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
Hauterive1	47° 0' 60" N	6° 58' 18" E	61	0
Hauterive2	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

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

4. Résultats

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. 1.

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

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

Legends

Fig. 1: Geographic location of TBE endemic regions A (West of the lake of Neuchâtel), B (South of the lake of Neuchâtel) and C (Jura Mountains, Moutier) and TBE non-endemic 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: Method; 7: Les Clées 1; 8: Le Suchet 1; 9: Le Suchet 2; 10: Suscevaz; 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: Lignerolles; 25: Le Gothard; 26: Conrad Bourgeois.

Fig. 2: Phylogenetic tree based on the NS5 gene. Only bootstrap values greater than 90% are shown. The tree is rooted by the Omsk-hemorrhagic fever virus. The TBEV sequences obtained in this study are shown in bold.

Fig. 3: 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).

4. Résultats

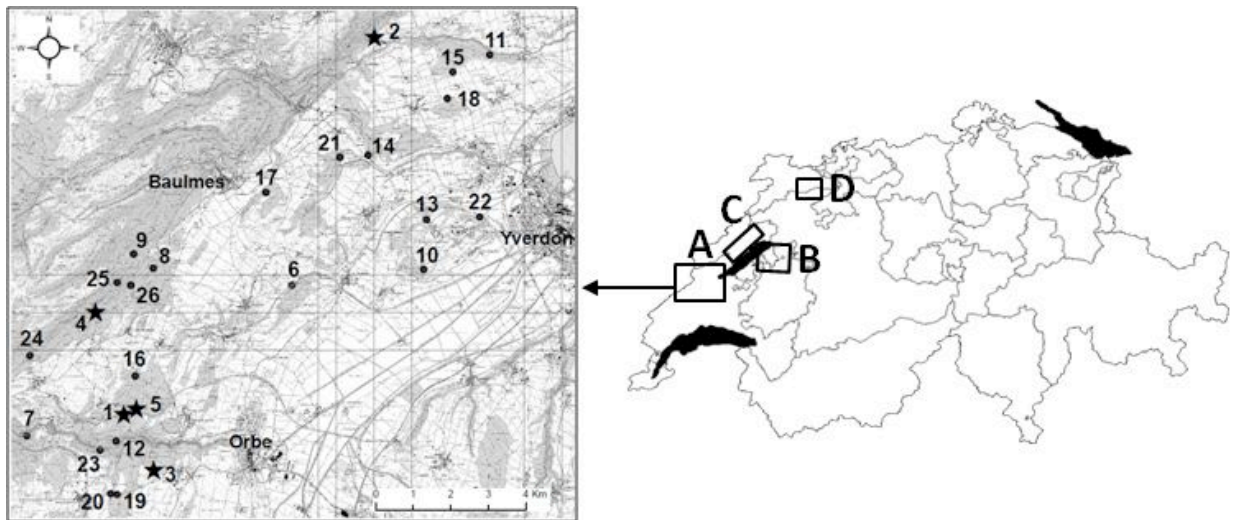


Fig. 1

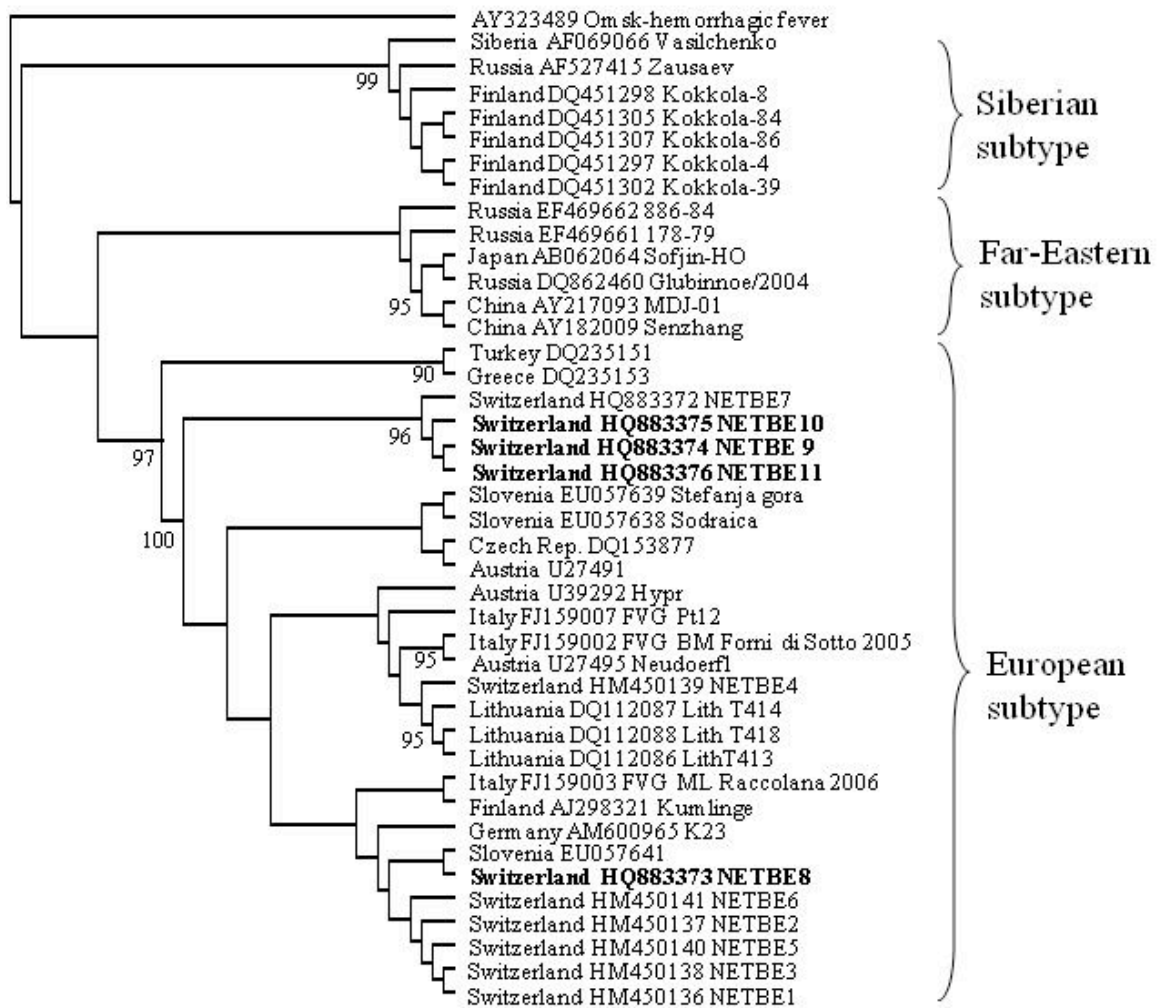


Fig. 2

4. Résultats

```
7788 7846
Agiez08_NETBE9 GAGTTGCTCAGAAGGGGAGAGACCAACATGGGACTGGCTGTCTCTCGGGGCACGGCAA
Agiez09_NETBE10 .....
Montcherand_NETBE11 .....
Vugelles_NETBE8 .....A.T.....T.....T.....
Liesberg_NETBE7 .....
Thun_NETBE1 .....A.G.....T.....T.....
Thun_NETBE2 .....A.G.....T.....T.....
Thun_NETBE5 .....A.G.....T.....T.....
Thun_NETBE6 .....A.G.....T.....T.....
Belp_NETBE3 .....A.G.....T.....T.....
Kiesen_NETBE4 .....A.G.....T.....T.....
***** * ***** *****

7847 7906
Agiez08_NETBE9 GCTTGCCTGGCTTGAGGAACGGGATATGCCACCCTCAAGGGAGAGGTGGTAGATCTTGG
Agiez09_NETBE10 .....
Montcherand_NETBE11 .....
Vugelles_NETBE8 .....--.....T.....C.....
Liesberg_NETBE7 .....
Thun_NETBE1 .....T..G.....
Thun_NETBE2 .....T..G.....
Thun_NETBE5 .....T..G.....
Thun_NETBE6 .....T..G.....
Belp_NETBE3 .....T..G.....T.....
Kiesen_NETBE4 .....
***** ***** ** ** *****

7907 7966
Agiez08_NETBE9 ATGTGGAAGGGGCGGTTGGTCTATTATGCGGCATCCCACCGGCAGTCATGAGTGTGAG
Agiez09_NETBE10 .....
Montcherand_NETBE11 .....
Vugelles_NETBE8 .....C.....
Liesberg_NETBE7 .....
Thun_NETBE1 .....C.....
Thun_NETBE2 .....C.....
Thun_NETBE5 .....C.....
Thun_NETBE6 .....C.....
Belp_NETBE3 .....C.....
Kiesen_NETBE4 .....C.....
***** *****

7967 7988
Agiez08_NETBE9 GGCATACACCATTGGTGAAGAGGGCAGG
Agiez09_NETBE10 .....
Montcherand_NETBE11 .....
Vugelles_NETBE8 .....
Liesberg_NETBE7 .....
Thun_NETBE1 .....
Thun_NETBE2 .....
Thun_NETBE5 .....
Thun_NETBE6 .....
Belp_NETBE3 .....
Kiesen_NETBE4 .....
*****
```

Fig. 3

5. Discussion et conclusions

L'encéphalite à tiques causée par un virus du même nom (TBEV) est une zoonose que l'on rencontre exclusivement sur le continent eurasiatique. Ce virus qui circule entre son vecteur, la tique *I. ricinus* en Europe occidentale et ses hôtes réservoirs principaux que sont les micromammifères, peut atteindre l'homme accidentellement par le biais d'une piqûre de tique infectée. L'épidémiologie de cette maladie va autant dépendre des facteurs qui permettent au virus de se maintenir dans la nature que des contacts de la population avec des foyers d'infection. Ainsi, l'étude des relations entre pathogène-vecteur-hôte contribue à mieux comprendre les récents changements épidémiologiques que l'on observe en Europe et en Suisse, avec d'une part, une augmentation du nombre de cas de TBE et d'autre part une émergence de nouveaux foyers (Randolph 2003, 2004, de Vallière et al. 2006, Bulletin OFSP 4/2007, Süss 2008).

En Suisse, l'OFSP produit une carte avec la distribution des foyers. Cette dernière, qui permet d'établir des recommandations pour la vaccination, est émise sur la base de deux critères. Le premier critère s'appuie sur la déclaration d'au minimum 3 cas cliniques dans un rayon de 10 à 15 km, le deuxième sur la présence de tiques infectées par le virus. C'est d'ailleurs sur cette base que les premiers foyers, au nombre de 12, ont été établis par Wyler et Matile (1984). Depuis la date à laquelle la déclaration des cas d'encéphalite à tiques a été rendue obligatoire (1984) jusqu'à récemment, les foyers étaient tous regroupés dans le nord et l'est du pays, Ins/BE étant le foyer situé le plus à l'ouest (Wyler et Matile 1984, de Marval 1994). Cependant, de 2000 à 2008, des cas sporadiques ont fait leur apparition dans l'ouest de la Suisse, au sud du lac de Neuchâtel et dans la Plaine de l'Orbe. Ces régions déclarées par l'OFSP depuis 2006 comme étant endémiques ont-elles vraiment leur place parmi les zones d'endémies puisque seulement 1 voire 2 cas ont été répertoriés par forêt ce qui ne correspond pas aux critères utilisés par l'OFSP jusqu'à là (3 cas dans un rayon de 10-15 Km)?

Une partie de notre travail a consisté à tenter de répondre à cette question en s'appuyant sur le deuxième critère qui existe pour définir un foyer, celui de la prospection de tiques infectées par le TBEV. Nous nous sommes pour cela concentrés sur la Plaine de l'Orbe. Rappelons que de Marval (1994) avait recherché la présence du virus dans des tiques dans plusieurs régions de Suisse y compris dans des régions proches de la Plaine de l'Orbe, comme à Eclépens. Mais, seules des régions à l'intérieur des zones déjà répertoriées par Wyler et Matile (1984) présentaient des tiques infectées par le virus. Dans notre étude, la recherche du virus dans des

tiques récoltées dans 26 sites de la Plaine de l'Orbe n'a permis de mettre en évidence sa présence que dans 5 sites : Agiez, Vugelles, l'Abergement et deux sites à Montcherand (Lommano et al. soumis), des sites qui correspondent aux lieux décrits par des personnes infectées (de Vallières et al. 2006). Grâce à une autre étude recherchant la présence de tiques infectées dans cette région, Rances a été confirmé comme endémique pour le TBEV (Gäumann et al. 2010). Ces résultats ainsi que les nôtres confirment donc la présence du virus dans cette région grâce à l'analyse des tiques en quête et prouvent qu'il y a réellement une émergence de nouveaux foyers à l'ouest de la Suisse. Dans les autres sites mentionnés par de Vallières et al. (2006) il n'a pas été possible de montrer la présence du virus dans les tiques. Cependant, ces zones ne peuvent pas être décrétées sans risque étant donné les cas de TBE observés (de Vallières et al. 2006).

Pour qu'un nouveau foyer de TBEV s'établisse ailleurs et s'y maintienne comme cela est le cas dans la Plaine de l'Orbe, plusieurs conditions faisant intervenir différents facteurs sont nécessaires. La première d'entre elle est la présence du vecteur qui elle est influencée entre autres par des facteurs climatiques, dont la température qui elle a un impact sur la distribution géographique d'*I. ricinus*. Cette dernière est limitée aux frontières nord de l'Europe par les basses températures qui peuvent y être atteintes. MacLeod (1935) et Gigon (1985) ont d'ailleurs montré que les tiques à jeun mouraient au-delà de -15°C et qu'une exposition pendant 30 jours à -10°C était létale pour une majorité des nymphes non gorgées ainsi que pour les larves et les nymphes gorgées (Dautel et Knülle 1997). Cependant, Lindgren et al. (2000) ont décrit en Suède un déplacement de la distribution d'*I. ricinus* plus au nord suite à un climat plus doux dans les années 90. De même, de nouveaux foyers de TBE ont été observés à des latitudes plus élevées, comme en Finlande (Kunze 2010) et au Danemark (Fomsgaard et al. 2009). Avec une hausse des températures moyennes de $0.6-0.7^{\circ}\text{C}$ depuis le début du XX^e siècle (Walther et al 2002, Gerstengarbe et Werner 2008), il n'est donc pas étonnant de voir la tique *I. ricinus* se propager vers des latitudes plus élevées. Par ailleurs, ce réchauffement climatique semble aussi avoir eu un impact sur la distribution de cette espèce de tique en altitude. Plusieurs auteurs confirment une extension de la distribution d'*I. ricinus* en altitude dans les régions montagneuses de République Tchèque (Daniel et al 2003, Materna et al 2005, 2008, Danielová 2006), probablement associée à des températures plus douces et en Suisse, il semble en être de même. Des études sur la distribution des tiques entreprises depuis 1972 (Aeschlimann 1972) montrent d'abord une distribution des tiques à des altitudes inférieures à 1000m, puis dès 1985 à 1450m (Cotty et al. 1985). En effet, en 1983, 76 endroits ont été étudiés dans l'ouest de la Suisse (Kaltenrieder et al. 1985) et les tiques n'étaient

5. Discussion et conclusions

présentes qu'en très faible quantité à 900m. Par la suite, l'établissement de populations de tiques à des altitudes de plus en plus élevées a été observé sur la montagne de Chaumont (Neuchâtel) (Jouda et al. 2004b, Morán Cadenas et al. 2007a). Ces différentes données suggèrent que la distribution d'*I. ricinus* a pu augmenter en altitude durant ces dix dernières années. Le déplacement du vecteur a eu comme conséquence de favoriser aussi la distribution du virus en altitude comme cela a été observé en République tchèque (Daniel 2003, Danielová 2008). En ce qui concerne la Plaine de l'Orbe, *I. ricinus* y est connue de longue date (Aeschlimann 1972, Jouda et al. 2004a). Randolph et al. (2001) avaient prédit le développement de nouveaux foyers de TBEV dans cette zone grâce à un modèle se basant sur les changements de températures susceptibles de permettre le principal mode de transmission du virus par « co-feeding » permettant le maintien du virus dans un site (Labuda et al. 1993a). Dans la Plaine de l'Orbe, aucune donnée ne nous permet de savoir si des modifications de température au niveau local sont intervenues récemment dans cette zone offrant les conditions requises pour un tel mode de transmission du virus et surtout si la situation du co-repas sur les rongeurs a évolué ces dernières années.

À ce jour, les zones d'endémies se répartissent dans 18 cantons selon l'OFSP en décembre 2010 (Figure 12) depuis la récente découverte de tiques infectées par le TBEV dans le canton du Valais (Gäumann et al. 2010).

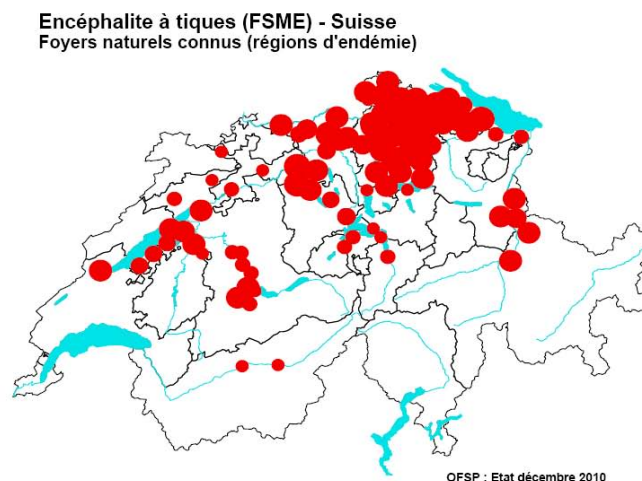


Figure 12: Répartition des foyers de TBE en Suisse selon l'OFSP.

Parallèlement à l'extension de la distribution géographique des foyers de TBEV, la Suisse, à partir de 2005 a connu une augmentation du nombre de cas de TBE en passant d'une moyenne annuelle de 92 cas entre 1995 et 2004 à 208 cas pour l'année 2005 seulement (Randolph et al. 2008). Ce phénomène s'est observé également dans certains pays d'Europe

(Süss 2008). Ainsi, plus de 8'755 cas de TBE par année ont été reportés en Europe et en Russie entre 1990 et 2007 contre 2'755 entre 1976 et 1989. Les raisons de ces fluctuations en Eurasie ne sont pas très claires mais plusieurs hypothèses ont été émises. Un changement politique, économique et social, une restructuration des forêts, un phénomène de migration de populations humaines, un changement climatique, tous pourraient contribuer à ces changements épidémiologiques (Krech 2002, Randolph 2003, Zeman et Beneš 2004, Sumilo et al. 2007, 2008, Randolph et al. 2008, Rizzoli et al. 2009). Nous privilégions aussi l'hypothèse d'un changement de comportement de la population qui suite à des températures plus élevées s'est davantage rendue en forêts pour y trouver des températures plus clémentes ce qui a eu pour conséquence une augmentation de l'exposition aux piqûres de tiques (Randolph et al. 2008). Notons qu'en Suisse on n'observe cependant pas de lien direct entre l'augmentation des cas et le déplacement des foyers vers l'ouest du pays.

Une des explications au déplacement des foyers vers l'ouest est que le virus s'installe dans des biotopes « non colonisés » où les conditions pour son maintien sont présentes suite à l'importation de tiques infectées. Le vecteur du TBEV se nourrit sur une large gamme d'hôtes notamment sur le renard et le chevreuil. Etant donné que ces animaux parcourent de longues distances, les changements dans la structure des forêts peuvent privilégier les déplacements de ces hôtes et donc la dissémination du TBEV comme il a été montré en Italie du Nord (Rizzoli et al. 2009). En effet, des changements dans la structure de la forêt ont entraîné une augmentation de la population de chevreuils qui ont ainsi favorisé la prolifération du vecteur et du virus (Rizzoli et al. 2009). Comme nous n'avons pas de données concernant la variation de l'habitat dans la Plaine de l'Orbe, il est difficile d'établir une telle corrélation avec l'émergence des foyers dans l'ouest du pays. Les oiseaux pourraient aussi être un facteur de dispersion étant donné les grandes distances qu'ils peuvent parcourir, d'autant plus que des tiques infectées par le TBEV ont été observées sur des oiseaux migrateurs (Waldenström et al. 2007). Ceci expliquerait la diversité des séquences du gène NS5 observée chez les virus infectant les tiques de la Plaine de l'Orbe (Lommano et al. soumis). En effet, des similitudes ont été retrouvées entre certaines séquences de TBEV qui proviennent de la Plaine de l'Orbe avec celles trouvées d'une part dans le canton de Berne (Burri et al. 2011a) et d'autre part avec une séquence trouvée à Liesberg dans le canton de Bâle (Lommano et al. soumis). Cependant, même si les oiseaux peuvent transporter des tiques infectées par le TBEV, Waldenström et al. (2007) en analysant, en Suède, les séquences des TBEV présents dans les tiques d'oiseaux migrateurs venant du nord de l'Europe, n'ont pas pu montrer un lien entre ces séquences et celles présentes en Europe centrale. Pour l'instant, il n'est donc pas possible

d'incriminer un hôte particulier dans le transport de tiques infectées et dans l'établissement de nouvelles zones d'endémie en Suisse (Lommano et al. soumis).

Plusieurs études rétrospectives ont montré l'importance du co-repas des larves et des nymphes sur les hôtes réservoirs dans le maintien des foyers de TBEV (Randolph et al. 1999) et dans la prédiction de l'établissement de nouveaux foyers (Randolph et Rogers 2000, Randolph 2001). Mais, à notre connaissance, aucune étude n'avait été effectuée de manière prospective jusqu'ici (Burri et al. 2011a). Rappelons que le co-repas entre larves et nymphes sur les hôtes réservoirs est important pour permettre le principal mode de transmission du virus par « co-feeding » (Randolph et al. 1999). Ce mode de transmission est fondé sur la synchronisation de l'activité de quête des larves et des nymphes sur la végétation (Randolph 1996) mais ceci n'est pas une condition suffisante pour permettre aux larves et aux nymphes d'infester au même moment les rongeurs (co-repas). En effet, d'autres facteurs d'ordre climatique semblent favoriser le co-repas (Randolph et al. 1999). Une rapide augmentation de la température au printemps qui atteint le seuil des 10°C permet aux larves d'être actives au même moment que les nymphes, celles-ci étant en quête dès 7°C (Perret et al. 2000, Randolph 2004). Cette brusque augmentation de température favorise donc la synchronisation de la quête des larves et des nymphes. Mais d'autres facteurs, comme l'humidité relative peut influencer le comportement de quête de la population de tiques et favoriser la rencontre des tiques avec les rongeurs comme l'ont montré Randolph et Storey (1999). En effet, Randolph et Storey (1999) ont montré que les nymphes quêtent plus proche du sol lorsque le déficit de saturation (DS) est élevé. Les nymphes se retrouvent alors à quêter à la même hauteur que les larves et peuvent ainsi infester les mêmes hôtes (Perret et al. 2004). Cependant, comme nous n'avons relevé la température et l'humidité dans les sites du canton de Berne qu'une fois par mois, nous n'avons pas pu observer les variations de ces deux facteurs sur une période continue. Ainsi, nous n'avons pas pu montrer l'influence directe de ces facteurs climatiques qui favorisent le co-repas sur les micromammifères et qui, indirectement, permettent la transmission du TBEV.

En revanche, les conditions microclimatiques mesurées ont montré l'influence de la température et de l'humidité relative sur la densité de tiques en quête. L'effet de l'augmentation de température observée lors du printemps 2007 a été soit bénéfique au vecteur *I. ricinus*, comme on l'a vu à Thun où la densité des nymphes a été la plus élevée des 3 années étudiées, soit au contraire nuisible comme on l'a constaté dans les trois autres sites (Belp, Kiesen et Trimstein). Dans ces derniers sites, les DS dépassaient les 10 mmHg pendant les mois où l'activité est habituellement la plus intense (avril-mai) alors que Perret et al.

(2004) ont montré que des DS >7 mmHg empêchaient déjà la population de tiques de quêter. Ceci laisse suggérer qu'une partie des populations de tiques a fortement souffert des conditions climatiques extrêmes, les DS pouvant atteindre 16.7 mmHg en 2007, et en sont mortes (Perret et al. 2000, 2004, Burri et al. 2007, Morán Cadenas et al. 2007a). Ainsi, le risque de se faire piquer par une tique infectée a pu diminuer à certains endroits où les conditions microclimatiques étaient défavorables à la survie des tiques ce qui expliquerait la diminution de cas cliniques enregistrés cette année-là avec seulement 111 cas (Bulletin OFSP 52/2008). Ce faible nombre recensé en 2007 pourrait néanmoins s'expliquer par la campagne de vaccination lancée en 2006 suite à la forte augmentation du nombre de cas observée en 2005 (Bulletin OFSP 13/2006, 38/2005).

En conséquence, cette baisse de la densité de tiques en quête a engendré une diminution de l'intensité d'infestation des rongeurs. Des études ayant montré que le nombre de larves est corrélé avec le nombre de nymphes sur les rongeurs (Randolph 1999, Perkins 2003), il n'est alors pas étonnant de voir une diminution de la proportion d'hôtes infestés par des tiques en co-repas. Par ailleurs, les sites dans lesquels nous avons observé une diminution de l'intensité des tiques sur les hôtes sont les mêmes que ceux où la proportion d'hôtes avec des tiques en co-repas a baissé (Belp, Kiesen et Trimstein). Les conditions météorologiques extrêmes observées ont donc entraîné une diminution du nombre de larves et de nymphes en co-repas sur les hôtes réservoirs ce qui a pu indirectement défavoriser le mode principal de transmission du TBEV par « co-feeding » (Burri et al. 2011a).

Ce type de transmission semble important pour le maintien d'un foyer puisque le seul site dans lequel aucun virus n'a été détecté (Trimstein) se distingue des foyers de TBEV par la plus faible proportion d'hôtes avec des tiques en co-repas (7-22%) (Burri et al. 2011a). Au contraire, le site de Kiesen qui au départ n'était pas connu comme foyer d'encéphalite à tiques a montré des proportions d'hôtes avec du co-repas (31-63%) ainsi qu'une intensité d'infestation sur les rongeurs les plus élevées, permettant le maintien du TBEV (Burri et al. 2011a). La présence du virus dans ce site a été trouvée chez les tiques en quête avec une prévalence de 0.04% (Burri et al. 2011a) et a par la suite été confirmée par la détection d'anticorps anti-TBEV dans le sérum des rongeurs (Burri et al. soumis).

Les résultats de la recherche du TBEV dans des tiques nourries sur les rongeurs n'ont pas permis de prouver que la transmission par « co-feeding » maintient des foyers de TBEV mais ne l'exclut pas pour autant. En effet, deux rongeurs capturés à Thun étaient infestés par des tiques infectées par le TBEV. Un seul de ces rongeurs était infesté à la fois par des larves et des nymphes. Bien que seules les larves étaient infectées avec une prévalence de 11.9%, nous

pensons que des nymphes, qui elles auraient été infectées, auraient pu se détacher avant la capture du rongeur (Burri et al. 2011a). La sérologie a montré, quant à elle, que ce rongeur avait déjà été en contact avec le virus et qu'il n'était plus virémique ce qui laisse en suspens la question de la transmission par « co-feeding » (Burri et al. soumis). Bien entendu, nous n'excluons pas la possibilité que les larves aient été infectées par une transmission transovarienne comme cela a déjà été montré par Danielová et Holubová (1991). Néanmoins, les résultats trouvés par Danielová et Holubová (1991) ont montré une prévalence nettement inférieure (0.2-0.8%) à celle que nous avons trouvée (11.9%) (Burri et al. 2011a), ce qui suggère que si les larves ont bien été infectées par transmission transovarienne, cette transmission pourrait être associée à la transmission par « co-feeding ».

Depuis la découverte de la transmission par « co-feeding » (Labuda et al. 1993), cette dernière était considérée comme étant la plus importante pour maintenir un foyer de TBEV (Randolph et al. 1996, 1999). Récemment, des études ont montré que le TBEV pouvait être en latence chez des rongeurs (*Microtus agrestis* et *M. glareolus*) (Bakhvalova et al. 2006, Tonteri et al. 2011). Moshkin et al. (2009) ont présenté des résultats d'auteurs russes (Frolova et al. 1982, Frolova et Pogodina 1984) qui ont montré expérimentalement que le TBEV pouvait être réactivé dans certains organes des rongeurs (hamsters de Syrie) par un stress hormonal. Cette activation était accompagnée d'une baisse d'immunité humorale et d'une diminution du poids du thymus. D'autres études citées dans Moshkin et al. (2009) ont par ailleurs montré qu'une augmentation de la production de testostérone chez les rongeurs induisait une baisse de l'immunité. Ainsi, Moshkin et al. (2009) ont émis l'hypothèse que ces variations dans l'immunité de l'hôte sont d'importants facteurs dans la dynamique de transmission du TBEV.

En ce qui concerne la recherche du TBEV dans les tiques en quête, tant les prévalences trouvées dans la Plaine de l'Orbe (0.21-0.95%) que celles observées dans les sites du canton de Berne (0.04-0.38%) sont en accord avec les prévalences décrites dans les précédentes recherches sur la détection du virus dans les tiques en Suisse (Matile 1982, de Marval 1994, Wicki et al. 2000) ainsi qu'avec une récente étude réalisée à l'échelle nationale qui a montré une prévalence moyenne de 0.46% (Gäumann et al. 2010). Une étude a pourtant rapporté une prévalence de 14.3% dans un site du canton de Berne, proche de notre site d'étude de Belp, ce qui indique une grande activité du TBEV à cet endroit (Casati et al. 2006a).

Aeschlimann (1979) avait mentionné le rôle possible d'*I. trianguliceps* dans le maintien du virus en circuit fermé mais nos résultats n'ont pu le confirmer, car nous n'avons certainement

pas analysé suffisamment de tiques de cette espèce vu sa faible abondance observée dans nos sites d'études du canton de Berne (Burri et al. 2011a).

En conclusion, les récents changements épidémiologiques que l'on observe en Suisse et dans le reste de l'Europe ont de multiples causes et ne peuvent se résumer uniquement dans les changements climatiques. Notre étude a néanmoins montré que des températures trop élevées associées à une humidité relative trop basse pendant une période prolongée interféraient dans le mode de transmission du virus (Burri et al. 2011a). Ainsi, il n'est pas impossible que des foyers disparaissent suite à des changements climatiques comme l'avait prédit Randolph (2001). Cette dernière avait prédit la disparition des foyers de TBEV situés dans la limite sud de sa distribution (Slovénie, Croatie, Hongrie) avec une augmentation dans les pays Baltes en 2020 et en 2050, une éradication d'Europe centrale (Randolph 2001). Par la suite, il serait donc utile de surveiller les foyers de TBEV en observant les conditions météorologiques au niveau local.

Il serait intéressant d'étudier les vues aériennes des forêts pour savoir si un changement dans la structure des forêts a eu lieu ces dix dernières années dans la Plaine de l'Orbe. Ainsi, on aurait des informations supplémentaires pour expliquer l'émergence des foyers observés dans cette région. L'utilisation de prédateurs de paysage comme ceux utilisés dans Vanwambeke et al. (2010) pourrait aussi s'avérer utile pour prédire les nouveaux foyers.

L'identification des foyers dans la Plaine de l'Orbe et dans les sites du canton de Berne a pu se réaliser grâce à l'analyse de milliers de tiques récoltées sur plusieurs années (Burri et al. 2011a, Lommano et al. soumis). Etant donné que les micromammifères sont les réservoirs du TBEV et que ceux-ci sont plus mobiles que les tiques, une autre approche pour détecter la présence du virus dans une forêt serait de faire de la séro-surveillance des rongeurs. Cette méthode a montré son efficacité sur les sites du canton de Berne. En effet, il a fallu analyser des tiques sur 3 années de récoltes successives pour finalement montrer que Kiesen était un foyer. Alors qu'en analysant une centaine de sérums seulement nous avons pu prouver l'existence du virus dans ce site. Dans d'autres pays, comme l'Allemagne et le Danemark, des études sentinelles ont été effectuées sur des chevreuils ou des chiens (Gerth et al. 1995, Lindhe et al. 2009). L'avantage de suivre des micromammifères c'est qu'ils parcourent des trajets beaucoup plus courts que ceux effectués par les grands mammifères ce qui permet de localiser un foyer plus précisément.

En parallèle, il est aussi indispensable d'identifier toute la diversité des hôtes présente. En effet, un foyer de TBEV ne se compose pas uniquement du vecteur et de ses hôtes réservoirs, mais il est aussi composé d'hôtes amplificateurs qui permettent le renouvellement de la

population de tiques (Zeman et Januska 1999). Hudson et al. (2001) ont d'ailleurs montré l'importance de la présence du chevreuil dans le maintien de la densité des tiques et du TBEV. Dans notre étude dans le canton de Berne, nous avons analysé les restes de sang présents chez les nymphes en quête et nous avons ainsi pu identifier la gamme d'hôtes sur laquelle les larves se sont nourries (Burri et al. 2011a). Ceci nous a déjà donné une bonne indication de la faune présente. Il aurait été utile d'avoir aussi des données sur l'évolution des proies tuées en période de chasse. Le problème est que ces données sont cantonales et donc difficiles à exploiter lorsque les forêts sont rapprochées géographiquement comme c'était le cas dans notre étude dans le canton de Berne.

En plus d'être le vecteur du TBEV, la tique *I. ricinus* peut transmettre de nombreux autres pathogènes, *B. burgdorferi* sl, la bactérie responsable de la maladie de Lyme, étant la plus connue. Dans cette étude, nous avons aussi recherché la présence de *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., et *A. phagocytophilum*, pathogènes considérés comme émergents et qui sont la cause de cas cliniques apparus ces dernières années en Europe (Hildebrandt et al. 2010a,b). En Suisse, on connaît quelques cas importés causés par *R. conorii*, une espèce que l'on trouve dans le bassin Méditerranéen, ont été mentionnés (Péter et al. 1984) et dus à la piqûre de *Rh. sanguineus*, une espèce de tique qui est établie en Suisse mais uniquement au Tessin (Casati 2005). En revanche, aucun cas clinique causé par *R. helvetica* n'a été recensé bien que Boretti et al. (2009) aient déjà montré la présence de *R. helvetica* chez le vecteur, *I. ricinus*, avec des prévalences de 11.7% dans le canton de Zürich. Dans notre étude nous avons observé une prévalence de 7.1% chez les tiques nourries sur les rongeurs (Burri et al. 2011b). L'étude de Boretti et al. (2009) a également montré la présence d'une autre espèce de rickettsie qui cause une maladie semblable à la fièvre boutonneuse Méditerranéenne (Brouqui et al. 2007), *R. monacensis*, chez des tiques récoltées sur la végétation (Boretti et al. 2009). Nous avons également pu détecter cette espèce, chez une tique nourrie sur un rongeur bien que jusqu'à maintenant, aucun cas clinique n'ait été observé en Suisse (Burri et al. 2011b).

Près de 70 cas humains de babésiose ont été rapportés en Europe (Hunfeldt et al. 2008) et seuls de rares cas ont été mentionnés en Suisse (Meer-Scherrer et al. 2004, Loutan et al. 1993).

Pourtant, on y note la présence des espèces responsables de cette maladie (*B. divergens*, *B. microti*, *B. venatorum*) chez le vecteur (Foppa et al. 2002, Casati et al. 2006b, Hilpertshausen et al. 2006, Gigandet et al. 2011). Parmi ces espèces, *B. venatorum* et *B. microti* ont été détectés avec des prévalences de 0.8 à 4.2% selon les sites (Burri et al. 2011b). *B. microti* n'était présent qu'à Thun, site dans lequel cette espèce avait déjà été communiquée (Gern et Aeschlimann 1986). C'est la première fois, à notre connaissance, que *B. venatorum* a été

défecté chez des tiques nourries sur *A. sylvaticus*, *A. flavicollis* et *M. glareolus* (Burri et al. 2011b). Ces micromammifères pourraient donc jouer le rôle de réservoirs mais comme Bonnet et al. (2007a) ont démontré une transmission transovarienne de ce pathogène chez *I. ricinus*, des investigations plus approfondies sont nécessaires pour identifier le rôle des micromammifères en tant que réservoirs.

Concernant *A. phagocytophilum*, près de septante cas ont été répertoriés chez l'homme, pour la plupart en Slovénie et en Suède, mais aussi aux Pays-Bas, en Pologne, et en Autriche (Hildebrandt et al. 2010a). En Suisse, aucun cas n'a été répertorié alors qu'on a déjà relevé la présence de ce pathogène notamment chez le vecteur (Pusterla et al. 1998b). Liz et al. (2000) ont montré que les rongeurs et les tiques nourries sur rongeurs pouvaient être infectés contrairement à ce que nous avons observé. Nos résultats n'ont montré qu'une prévalence de 2% chez des nymphes en quête et dans un seul site (Kiesen) (Burri et al. 2011b). L'analyse de sang rémanent chez une de ces nymphes a montré qu'elle s'était nourrie précédemment sur un sanglier (*Sus scrofa*) (Burri et al. 2011b). Ainsi, d'autres hôtes que les micromammifères comme les sangliers ou les cervidés pourraient jouer le rôle de réservoirs. Petrovec et al. (2002) ont d'ailleurs montré des prévalences atteignant 86% chez les cervidés en Slovénie. De plus, il semblerait que certains variants circulant chez les cerfs (*Cervus elphus*) soient les mêmes que ceux qui infectent l'homme (Portillo et al. 2011).

Le fait d'avoir trouvé des *Rickettsia* spp. et des *Babesia* spp. chez des tiques nourries sur des rongeurs soulève la question du rôle attribué aux rongeurs en tant que réservoirs pour ces pathogènes. Mais, comme nous n'avons pas analysé le sang des rongeurs, nous ne pouvons pas nous prononcer à ce sujet, excepté pour *B. microti* dont on sait que la transmission transovarienne n'a pas pu être démontrée (Gray et al. 2002). Ainsi, on a pu montrer que *M. glareolus* était un réservoir pour *B. microti* comme cela avait déjà été montré pour *A. flavicollis* (Gern et Aeschlimann 1986, Duh et al. 2003, Beck et al. 2011).

La présence de ces pathogènes émergents chez le vecteur suggère que les quelques cas cliniques observés en Suisse et en Europe sont probablement sous-estimés en raison des symptômes non spécifiques et du manque d'attention du corps médical vis-à-vis de ces pathogènes. Notons qu'aux Pays-Bas, une étude récemment menée sur des tiques prélevées sur des patients a révélé la présence des pathogènes étudiés avec une prévalence de 19% pour les *Rickettsia* spp., 12% pour *Anaplasma/Ehrlichia* et 10% pour *Babesia* spp. (Tijssse-Klasen et al. 2010). Avec une prévalence globale de 9.7% observée chez les tiques en quête dans cette étude (Burri et al. 2011b), il devient important d'attirer l'attention du corps médical sur ces maladies émergentes comme cela a été suggéré par Gern et al. (2010). Par ailleurs, il est à

noter que le risque de se faire piquer par une tique infectée est présent toute l'année. En effet, notre étude a montré que malgré le fait de n'avoir pas récolté de tiques sur la végétation (avec le drapeau) pendant les mois d'hiver, les rongeurs capturés pendant cette période étaient néanmoins infestés par des tiques (Burri et al. 2011a).

Avec le recensement du nombre de cas cliniques causés par le TBEV, *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp. et *Rickettsia* spp., seule la pointe émergente de l'iceberg a été découverte. Cette étude a en effet montré l'importance d'analyser le vecteur dans lequel nous avons pu identifier différents pathogènes pour l'homme. Ceci nous a permis de localiser et confirmer précisément des foyers de TBEV et d'identifier des pathogènes considérés comme émergents. Dès lors, il devient important de continuer l'investigation de ces pathogènes chez les tiques en quête dans différentes régions de Suisse pour permettre d'une part de localiser de nouvelles régions endémiques et d'autre part de mieux évaluer les risques de se faire piquer par une tique infectée par un de ces pathogènes. Pour compléter cette évaluation, il serait aussi intéressant de poursuivre cette étude sur des tiques récoltées sur des patients. Une autre voie de recherche de pathogènes transmis par les tiques serait de faire une étude sérologique chez les hôtes qui se font infester par les tiques, plus particulièrement chez les rongeurs. En effet, de par leur domaine vital restreint, les rongeurs sont de bons indicateurs pour localiser précisément des foyers comme on l'a montré dans cette étude pour le TBEV. Ainsi, la sérologie chez les rongeurs pourrait aussi s'appliquer pour rechercher des foyers endémiques à d'autres pathogènes tels qu'*A. phagocytophilum*, *Babesia* spp. et *Rickettsia* spp.

6. Bibliographie

- Anderson, J.F. (1991). "Epizootiology of Lyme borreliosis." Scand Journ Infect Dis Supp 77 : 23-34.
- Aeschlimann, A. (1972). "*Ixodes ricinus*, Linné, 1758, (*Ixodoidea; Ixodidae*). Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse." Acta Trop 29: 321-340.
- Aeschlimann, A., M. Brossard, G. Quenet (1975). "[Contribution to the knowledge of Swiss piroplasmas]." Acta Trop 32: 281-289.
- Aeschlimann, A., W. Burgdorfer, H. Matile, O. Péter, R. Wyler (1979). "Aspects nouveaux du rôle de vecteur joué par *Ixodes ricinus* L. en Suisse." Acta Trop 36: 181-191.
- Aeschlimann, A., W. Buttiker, P. A. Diehl, G. Eichenberger, R. Immler, N. Weiss (1970). "Présence d'*Ixodes trianguliceps* (Birula, 1895) et *Ixodes apronophorus* (Schulze, 1924) en Suisse (*Ixodoidea; Ixodidae*)." Rev Suisse Zool 77: 527-536.
- Bakhvalova, V. N., O. F. Potapova, V. V. Panov, O. V. Morozova (2009). "Vertical transmission of tick-borne encephalitis virus between generations of adapted reservoir small rodents." Virus Res 140: 172-178.
- Bakhvalova, V. N., A. K. Dobrotvorskyy, V. V. Panov, V. A. Matveeva, S. E. Tkachev, O. V. Morozova (2006). "Natural tick-borne encephalitis virus infection among wild small mammals in the southeastern part of western Siberia, Russia." Vector Borne Zoonot Dis 6: 32-41.
- Beati, L., P. F. Humair, A. Aeschlimann, 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.
- Beck, R., L. Vojta, S. Curkovic, V. Mrljak, J. Margaletic, B. Habrun (2011). "Molecular survey of *Babesia microti* in wild rodents in Central Croatia." Vector Borne Zoonot Dis 11: 81-83.
- Bekker, C. P., S. de Vos, A. Taoufik, O. A. Sparagano, 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.
- Beninati, T., N. Lo, H. Noda, F. Esposito, A. Rizzoli, G. Favia, C. Genchi (2002). "First detection of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* from Italy." Emerg Infect Dis 8: 983-986.
- Binn, L. N. (1987). "*Togavirus* and *Flavivirus*." In: Virus infection of vertebrates (M.J. Appel, ed.). Elsevier science publisher, New York : 105-112.
- Blaskovic, D. et J. Nosek (1972). "The ecological approach to the study of tick-borne encephalitis." Progr Med Virol 14: 275-320.

6. Bibliographie

- Bonnet, S., M. Jouglin, M. L'Hostis, A. Chauvin (2007a). "*Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*." Emerg Infect Dis 13: 1208-1210.
- Bonnet, S., M. Jouglin, L. Malandrin, C. Becker, A. Agoulon, M. L'Hostis, A. Chauvin (2007b). "Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique." Parasitol 134: 197-207.
- Boretti, F. S., A. Perreten, M. L. Meli, V. Cattori, B. Willi, N. Wengi, S. Hornok, H. Honegger, D. Heggin, R. Woelfel, C. E. Reusch, H. Lutz, 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, N. H. Ogden (2003). "Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom." Emerg Infect Dis 9: 63-70.
- Brossard M. et S.K. Wikel (1997). "Immunology of interactions between ticks and hosts." Med Vet Entomol 11: 270-276.
- Brouqui, P., P. Parola, P. E. Fournier, D. Raoult (2007). "Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe." FEMS Immunol Med Microbiol 49: 2-12.
- Burgdorfer, W., A. Aeschlimann, O. Peter, S. F. Hayes, R. N. Philip (1979). "*Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland." Acta Trop 36: 357-367.
- Burri, C., M. Korva, N. Knap, V. Bastic, T. Avšič-Županc, L. Gern. "Serological evidence of tick-borne encephalitis virus infection in rodents captured at four sites in Switzerland." J Med Entomol submitted.
- Burri, C., V. Bastic, G. Maeder, E. Patalas, L. Gern (2011a). "Microclimate and zoonotic cycle of tick-borne encephalitis virus in a risk area in Switzerland." J Med Entomol 48: 615-627.
- Burri, C., Dupasquier, C., Bastic, V., L. Gern (2011b). "Pathogens of emerging tick-borne diseases, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks collected from rodents at four sites in Switzerland (Canton of Bern)". Vector Borne Zoonot Dis 11: 939-944.
- Burri, C., F. Morán Cadenas, V. Douet, J. Moret, 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 Zoonot Dis 7: 50-58.
- Calisher, C. H. et E. A. Gould (2003). "Taxonomy of the virus family *Flaviviridae*." Adv Virus Res 59: 1-19.

6. Bibliographie

- Calisher, C. H., N. Karabatsos, J. M. Dalrymple, R. E. Shope, J. S. Porterfield, E. G. Westaway, W. E. Brandt (1989). "Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera." J Gen Virol 70: 37-43.
- Casati, S., L. Gern, 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., H. Sager, L. Gern, J. C. Piffaretti (2006b). "Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland." Ann Agric Environ Med 13: 65-70.
- Casati, S. (2005). "Etude sur la diversité génétique des tiques *Rhipicephalus sanguineus* et *Ixodes ricinus*, et des agents pathogènes *Rickettsia* sp, *Coxiella* sp, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Babesia* sp et le virus de l'encéphalite à tique en Suisse". Thèse, Université Neuchâtel, Neuchâtel.
- Chambers, T. J., C. S. Hahn, R. Galler, C. M. Rice (1990). "Flavivirus genome organization, expression, and replication." Annu Rev Microbiol 44: 649-688.
- Chamot, E., P. Chatelanat, P. Humair, A. Aeschlimann, J. Bowessidjaou (1987). "Cinq cas de fièvre boutonneuse méditerranéenne en Suisse." Ann Parasitol Hum Comp 62: 371-379.
- 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, X. de Lamballerie (2004). "Tick-borne virus diseases of human interest in Europe." Clin Microbiol Infect 10: 1040-1055.
- Chemini, C., A. Rizzoli, S. Merler, C. Furlannello, C. Genchi (1997). "*Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) infestation on roe deer (*Capreolus capreolus*) in Trentino, Italian Alps." Parasitologia 39: 59-63.
- Chen, S. M., S. Dumler, J. S. Bakken, D. H. Walker (1994). "Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease." J Clin Microbiol 589-595.
- Chomczynski, P. et N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem 162: 156-159.
- Cinco, M., D. Padovan, R. Murgia, M. Maroli, L. Frusteri, M. Heldtander, K. E. Johansson, E. O. Engvall (1997). "Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing." J Clin Microbiol 35: 3365-3366.
- Clavel, C. H., L. Cantoni-Rieckhoff, C. Ruef (1992). "Fièvre boutonneuse en Suisse: à propos d'un cas reporté." Schweiz Med Wochenschr 122: 1858-1862.

6. Bibliographie

- Coia, G., M. D. Parker, G. Speight, M. E. Byrne, E. G. Westaway (1988). "Nucleotide and complete amino acid sequences of Kunjin virus: definitive gene order and characteristics of the virus-specified proteins." J Gen Virol 69: 1-21.
- Conrad, P. A., A. M. Kjemtrup, R. A. Carreno, J. Thomford, K. Wainwright, M. Eberhard, R. Quick, S. R. Telford, 3rd, B. L. Herwaldt (2006). "Description of *Babesia duncani* n.sp. (*Apicomplexa: Babesiidae*) from humans and its differentiation from other piroplasms." Int J Parasitol 36: 779-789.
- Cordas, T., A. Aeschlimann, P. C. Morel (1993). "*Ixodidae* S Str (Schulze, 1937) in Switzerland – Morphological study by scanning electronic microscope." Acarol 34: 21-46.
- Cotton, M. J. et C. H. Watts (1967). "The ecology of the tick *Ixodes trianguliceps* Birula (*Arachnida; Acarina; Ixodoidea*)." Parasitol 57: 525-531.
- Cotty, A. (1985). "Clé de détermination des *Ixodidae* et Amblyommidae de Suisse." Thèse, Université de Neuchâtel, Neuchâtel.
- Cotty, A., A. Aeschlimann, 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, 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. Pisciutti, 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.
- Daniel, M., V. Danielová, B. Kriz, A. Jirsa, J. Nozicka (2003). "Shift of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne encephalitis to higher altitudes in central Europe." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 22: 327-328.
- Danielová, V. et J. Holubová (1991). "Transovarial transmission rate of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks." In *Modern Acarology* (ed. Dusbabek, F. and Bukva, V.). The Hague, Academia, Prague and SPB Academic Publishing: 7-10.
- Danielová, V., S. Kliegrová, M. Daniel, C. Benes (2008). "Influence of climate warming on tick-borne encephalitis expansion to higher altitudes over the last decade (1997-2006) in the Highland Region (Czech Republic)." Cent Eur J Public Health 16: 4-11.
- Danielová, V., N. Rudenko, M. Daniel, J. Holubová, J. Materna, M. Golovchenko, L. Schwarzova (2006). "Extension of *Ixodes ricinus* ticks and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic." Int J Med Microbiol 296 Suppl 40: 48-53.

6. Bibliographie

- Dautel, H. et W. Knülle (1997). "Cold hardiness, supercooling ability and causes of low-temperature mortality in the soft tick, *Argas reflexus*, and the hard tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodoidea) from Central Europe." J Insect Physiol 43: 843-854.
- Dawson, J. E., C. K. Warner, V. Baker, S. A. Ewing, D. E. Stallknecht, W. R. Davidson, A. A. Kocan, J. M. Lockhart, J. G. Olson (1996). "*Ehrlichia*-like 16S rDNA sequence from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*)." J Parasitol 82: 52-58.
- de Marval, F. (1994). "Etude séroépidémiologique de l'encéphalite à tiques et de la borréliose de Lyme en Suisse." Thèse, Université Neuchâtel, Neuchâtel.
- de Vallière, S., A. Cometta, H. Zimmermann, B. Vaudaux, P. Meylan (2006). "[Evidence of new foci of tick-borne encephalitis in the French speaking part of Switzerland]." Rev Med Suisse 2: 2191-2194.
- Duh, D., M. Petrovec, A. Bidovec, T. Avsic-Zupanc (2005). "Cervids as Babesiae hosts, Slovenia." Emerg Infect Dis 11: 1121-1123.
- Duh, D., M. Petrovec, T. Trilar, T. Avsic-Zupanc (2003). "The molecular evidence of *Babesia microti* infection in small mammals collected in Slovenia." Parasitol 126: 113-117.
- Dumler, J. S., K. S. Choi, J. C. Garcia-Garcia, N. S. Barat, D. G. Scorpio, J. W. Garyu, D. J. Grab, J. S. Bakken (2005). "Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*." Emerg Infect Dis 11: 1828-1834.
- Dumler, J. S., A. F. Barbet, C. P. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa, 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.
- Dumpis, U., D. Crook, J. Oksi (1999). "Tick-borne encephalitis." Clin Infect Dis 28: 882-890.
- Ecker, M., S. L. Allison, T. Meixner, F. X. Heinz (1999). "Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia." J Gen Virol 80: 179-185.
- Elfving, K., B. Olsen, S. Bergström, J. Waldenström, A. Lundkvist, A. Sjöstedt, H. Mejlon, K. Nilsson (2010). "Dissemination of spotted fever rickettsia agents in Europe by migrating birds." PLoS One 5 : 1-5.
- Espy, M. J., J. R. Uhl, L. M. Sloan, S. P. Buckwalter, M. F. Jones, E. A. Vetter, J. D. Yao, N. L. Wengenack, J. E. Rosenblatt, F. R. Cockerill, 3rd, T. F. Smith (2006). "Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing." Clin Microbiol Rev 19: 165-256.
- Ernek, E., O. Kozuch, M. Lichard, J. Nosek (1968). "The role of birds in the circulation of tick-borne encephalitis virus in the Tribec region." Acta Virol 12: 468-470.

6. Bibliographie

- Ewing, S. A., W. R. Roberson, R. G. Buckner, C. S. Hayat (1971). "A new strain of *Ehrlichia canis*." J Am Vet Med Assoc 159: 1771-1774.
- Floris, R., A. N. Yurtman, E. F. Margoni, K. Mignozzi, B. Boemo, A. Altobelli, M. Cinco (2008). "Detection and identification of *Rickettsia* species in the northeast of Italy." Vector Borne Zoonot Dis 8: 777-782.
- Fomsgaard, A., C. Christiansen, R. Bodker (2009). "First identification of tick-borne encephalitis in Denmark outside of Bornholm." Euro Surveill 14:1-2.
- Fournier, P. E., C. Allombert, Y. Supputamongkol, G. Caruso, P. Brouqui, D. Raoult (2004). "An eruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand." J Clin Microbiol 42: 816-818.
- Fournier, P. E., F. Grunnenberger, B. Jaulhac, G. Gastinger, D. Raoult (2000). "Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France." Emerg Infect Dis 6: 389-392.
- Frolova, T. V., V.V. Pogodina, G.I. Larina, M.P. Frolova, V.I.A. Karmysheva (1982). "Activating effect of cyclophane at late stages of persistence of tick-borne encephalitis virus." Vopr Virusol 27:66-73 (en russe).
- Frolova T.V. et V.V. Pogodina (1984). "Activating effect of adrenaline, prednisolone and vincristine in the late periods of tick-borne encephalitis virus persistence." Vopr Virusol 29: 103-108 (en russe).
- Gäumann, R., K. Mühlemann, M. Strasser, C. M. Beuret (2010). "A 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.
- Genchi, C. (2007). "Human babesiosis, an emerging zoonosis." Parasitologia 49 Suppl 1: 29-31.
- Georges, K., G. R. Loria, S. Riili, A. Greco, S. Caracappa, F. Jongejan, 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.
- Gerlinskaya, L. A., V. N. Bakhvalova, O. V. Morozova, N. A. Tsekhanovskaya, V. A. Matveeva, M. P. Moshkin (1997). "Sexual transmission of tick-borne encephalitis virus in laboratory mice." Bull Exp Biol Med 123: 327-328.
- Gern, L., R. Lienhard, O. Péter (2010). "Maladies et agents pathogènes transmis par les tiques en Suisse." Rev Med Suisse 6: 1906-1909.
- Gern, L. (2004). "Tiques et Borréliose de Lyme en Suisse occidentale." Bull Société Neuch Sciences Nat 127: 5-21.
- Gern, L. et P. F. Humair (2002). "Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe." In: J.S. Gray, O. Kahl, R.S. Lane, G. Stanek. Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control, 149-174. CAB International, Wallingford, Oxon, United Kingdom.

6. Bibliographie

- Gern, L. et A. Aeschlimann (1986). "Etude séroépidémiologique de 2 foyers à babésie de micromammifères en Suisse." Schweiz Arch Tierheilkd 128: 587-600.
- Gerstengarbe, F.-W. et P. C. Werner (2008). "Climate development in the last century - Global and regional." Int J Med Microbiol 298: 5-11.
- Gerth, H. J., D. Grimshandl, B. Stage, G. Doller, C. Kunz (1995). "Roe deer as sentinels for endemicity of tick-borne encephalitis virus." Epid Inf 115: 355-365.
- Gigandet, L., Stauffer, E., Douet, V., Rais, O., Moret, J., Gern, L. (2011). "Prevalence of three zoonotic *Babesia* species in *Ixodes ricinus* nymphs in a suburban forest in Switzerland." Vector Borne Zoonot Dis 11: 363-366.
- Gigon, F. (1985). "Biologie d'*Ixodes ricinus* L. sur le Plateau Suisse - une contribution à l'écologie de ce vecteur." Thèse, Université Neuchâtel, Neuchâtel.
- Gorelova, N., E. Korenberg, I. Kovalevskiï, D. Postic, G. Baranton (1996). "The isolation of *Borrelia* from the tick *Ixodes trianguliceps* (*Ixodidae*) and the possible significance of this species in the epizootiology of ixodid tick-borne borrelioses (in Russian)." Parazitologija 30: 13-18.
- Gorenflot, A., K. Moubri, E. Precigout, B. Carcy, T. P. Schetters (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, X. de Lamballerie (2007). "Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy." Virology 361: 80-92.
- Gray, J., L. V. von Stedingk, M. Gurtelschmid, M. Granstrom (2002). "Transmission studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks and gerbils." J Clin Microbiol 40: 1259-1263.
- Gray, J., O. Kahl, C. Janetzki, J. Stein, E. Guy (1995). "The spatial distribution of *Borrelia burgdorferi*-infected *Ixodes ricinus* in the Connemara region of County Galway, Ireland." Exp App Acarol 19: 163-172.
- Gray, J. (1991). "The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis." Review of Medical and Veterinary Entomology 79: 323-333.
- Gresikova, M. et M. Kaluzova (1997). "Biology of tick-borne encephalitis virus." Acta Virologica 41: 115-124.
- Gribble, D. H. (1969). "Equine ehrlichiosis." J Am Vet Med Assoc 155: 462-469.
- Gritsun, T. S., P. A. Nuttall, E. A. Gould (2003a). "Tick-borne flaviviruses." Adv Virus Res 61: 317-371.

6. Bibliographie

- Gritsun, T. S., T. V. Frolova, A. I. Zhankov, M. Armesto, S. L. Turner, M. P. Frolova, V. V. Pogodina, V. A. Lashkevich, E. A. Gould (2003b). "Characterization of a siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis." J Virol 77: 25-36.
- Gritsun, T. S., V. A. Lashkevich, E. A. Gould (2003c). "Tick-borne encephalitis." Antiviral Res 57: 129-146.
- Gritsun, T. S., K. Venugopal, P. M. Zanutto, M. V. Mikhailov, A. A. Sall, E. C. Holmes, I. Polkinghorne, T. V. Frolova, V. V. Pogodina, V. A. Lashkevich, E. A. Gould (1997). "Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: analysis and significance of the 5' and 3'-UTRs." Virus Res 49: 27-39.
- Gubbels, J. M., A. P. de Vos, M. van der Weide, J. Viseras, L. M. Schouls, E. de Vries, F. Jongejan (1999). "Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization." J Clin Microbiol 37: 1782-1789.
- Guy, E. C. et G. Stanek (1991). "Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction." J Clin Pathol 44: 610-611.
- Haller, X. (1992). Méningoencéphalite à tiques. Les cas alsaciens, le point en 1991. Eléments épidémiologiques des départements de l'Est. Thèse, Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- Haselbarth, K., A. M. Tenter, V. Brade, G. Krieger, 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.
- Hausser, J., V. Aellen, R. Arlettaz, M. Baettig, A. Beck, et al. (1995). "Mammifères de la Suisse : répartition, biologie, écologie". Mémoires de l'Académie Suisse des Sciences Naturelles. Vol. 103. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Hayes, S. F., W. Burgdorfer, 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.
- Hechemy, K. E., T. Avsic-Zupanc, J. E. Childs, D. A. Raoult (2003). "Rickettsiology: present and future directions: preface." Ann N Y Acad Sci 990: 17-20.
- Heikkilä H.M., A. Bondarenko, A. Mihalkov, K. Pfister, T. Spillmann (2010). "Anaplasma phagocytophilum infection in a domestic cat in Finland: case report." Acta Vet Scand 15: 52-62.
- Heinz, F. X. (2003). "Molecular aspects of TBE virus research." Vaccine 21 Suppl 1: S3-S10.

6. Bibliographie

- Heinz F.X, M.S. Collett, R.H. Purcell, E.A. Gould, C.R Howard, M. Houghton, R.J.M. Moormann, C.M. Rice, H.J. Thiel (2000). "Family Flaviviridae. " In M.H. Van Regenmortel, CM. Fauquet, D.H.L. Bishop, E. Carstens, M.K. Estes, S. Lemon, J. Maniloff, MA. Mayo, D. McGeoch, C.R. Pringle, and R. Wickner (eds.): Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. 7th Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego. Academic Press: 859-878.
- Heinz, F. X. et C. W. Mandl (1993). "The molecular biology of tick-borne encephalitis virus. Review article." APMIS 101(10): 735-745.
- 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, N. J. Pieniazek (2003). "Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe." Emerg Infect Dis 9: 942-948.
- Hildebrandt, A., A. Krämer, S. Sachse, E. Straube (2010a). "Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in region of Middle Germany." Ticks Tick Borne Dis 1: 52-56.
- Hildebrandt, A., K. Pauliks, S. Sachse, E. Straube (2010b). "Coexistence of *Borrelia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in middle Germany." Vector Borne Zoonot Dis 10: 831-837.
- Hildebrandt, A., K. P. Hunfeld, M. Baier, A. Krumbholz, S. Sachse, T. Lorenzen, M. Kiehnopf, H. J. Fricke, E. Straube (2007). "First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 26: 595-601.
- Hilpertshauer, H., P. Deplazes, M. Schnyder, L. Gern, 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.
- Homer, M. J., I. Aguilar-Delfin, S. R. Telford, 3rd, P. J. Krause, D. H. Persing (2000). "Babesiosis." Clin Microbiol Rev 13: 451-469.
- Horak, I. G., J. L. Camicas, J. E. Keirans (2002). "The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (*Acari: Ixodidea*): a world list of valid tick names." Exp Appl Acarol 28: 27-54.
- Hubalek, Z. et J. Halouza (1997). "Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review." Eur J Epidemiol 13: 951-957.
- Hubalek Z. (1994). "Pathogenic microorganisms associated with free-living birds (a review)." Acta Sc Nat Brno 28:1-74.
- Hudson, P. J., A. Rizzoli, R. Rosa, C. Chemini, L. D. Jones, E. A. Gould (2001). "Tick-borne encephalitis virus in northern Italy: molecular analysis, relationships with density and seasonal dynamics of *Ixodes ricinus*." Med Vet Entomol 15: 304-313.

6. Bibliographie

- Hulinska, D., K. Langrova, M. Pejcoch, I. Pavlasek (2004). "Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in animals by real-time polymerase chain reaction." APMIS 112: 239-247.
- Humair, P. F., V. Douet, F. M. Cadenas, L. M. Schouls, I. Van De Pol, and L. Gern (2007). "Molecular identification of bloodmeal source in *Ixodes ricinus* ticks using 12S rDNA as a genetic marker." J Med Entomol 44: 869-880.
- Humair, P. F., N. Turrian, A. Aeschlimann, L. Gern (1993). "*Ixodes ricinus* immatures on birds in a focus of Lyme borreliosis." Folia Parasitol (Praha) 40: 237-242.
- Hunfeld, K. P., A. Hildebrandt, J. S. Gray (2008). "Babesiosis: recent insights into an ancient disease." Int J Parasitol 38: 1219-1237.
- Jado, I., R. Escudero, H. Gil, M. I. Jimenez-Alonso, R. Sousa, A. L. Garcia-Perez, M. Rodriguez-Vargas, B. Lobo, P. Anda (2006). "Molecular method for identification of *Rickettsia* species in clinical and environmental samples." J Clin Microbiol 44: 4572-4576.
- Jensen, J., D. Simon, E. H. Murua, J.T. Soller, J. Bullerdiek, P. Beelitz, K. Pfister, I. Nolte (2007). "*Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany." Zoo Public Health 54: 94-101.
- Jones, L. D., C. R. Davies, G. M. Steeie, P. A. Nuttall (1987). "A novel mode of arbovirus transmission involving a non-viraemic host." Science 237: 775-777.
- Jouda, F., J. L. Perret, L. Gern (2004a). "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 Zoonot Dis 4: 23-32.
- Jouda, F., J. L. Perret, L. Gern (2004b). "Ixodes ricinus density, and distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient." J Med Entomol 41: 162-169.
- Kaltenrieder, M., E. Hess, A. Aeschlimann (1985). "Zur Vorkommen der Zecke *Ixodes ricinus* L. (*Ixodoidea*, *Ixodidae*) in der Schweiz." Rev Suisse Zool 92: 685-692.
- Kattler, H. (2004). "Zeitlich-örtliche Verteilung der in den Jahren 1984-2002 gemeldeten Frühsommer-Meningoenzephalitis-Fälle in der Schweiz und im Fürstentum Liechtenstein." Master-thesis zur Erlangung des Masters of Public Health im Rahmen des interuniversitären Nachdiplomstudiums Public Health der Universitäten, Basel, Bern und Zürich.
- Knülle, W. et D. Rudolph (1982). "Humidity relationships and water balance of ticks". In *Physiology of Ticks* (ed. by F. D. Obenchain and R. Galum). Pergamon Press, Oxford: 43-70.
- Kohn, B., C. Silaghi, D. Galke, G. Arndt, K. Pfister (2010). "Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany." Res Vet Sci (ahead of print).

6. Bibliographie

- Kohn, B., D. Galke, P. Beelitz, K. Pfister (2008). "Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs." J Vet Intern Med 22:1289-1295.
- Korenberg, E. I. (2000). "Seasonal population dynamics of *Ixodes* ticks and tick-borne encephalitis virus." Exp Appl Acarol 24: 665-681.
- Kozuch, O., S. P. Chunikhin, M. Gresikova, J. Nosek, V. B. Kurenkov, J. Lysy (1981). "Experimental characteristics of viraemia caused by two strains of tick-borne encephalitis virus in small rodents." Acta Virol 25: 219-224.
- Kozuch, O., M. Gresikova, J. Nosek, M. Lichard, 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, T. (2002). "TBE foci in Switzerland." Int J Med Microbiol 291 Suppl 33: 30-33.
- Krech, U., F. Jung, M. Jung (1969). "Zentraleuropäische Zeckenencephalitis in der Schweiz." Schweiz med Wschr 99: 282-285.
- Kunze, U. et le ISW TBE (2010). "TBE- awareness and protection: the impact of epidemiology, changing lifestyle, and environmental factors." Wien Klin Wochenschr 160: 252-255.
- Labuda, M. et P. A. Nuttall (2004). "Tick-borne viruses." Parasitol 129 Suppl: S221-245.
- Labuda, M., E. Eleckova, M. Lickova, A. Sabo (2002). "Tick-borne encephalitis virus foci in Slovakia." Int J Med Microbiol 291 Suppl 33: 43-47.
- Labuda, M. et S. E. Randolph (1999). "Survival strategy of tick-borne encephalitis virus: cellular basis and environmental determinants." Zentralbl Bakteriol 289: 513-524.
- Labuda, M., J. M. Austyn, E. Zuffova, O. Kozuch, N. Fuchsberger, J. Lysy, P. A. Nuttall (1996). "Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission." Viol 219: 357-366.
- Labuda, M., P. A. Nuttall, O. Kozuch, E. Eleckova, T. Williams, E. Zuffova, A. Sabo (1993a). "Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature." Experientia 49: 802-805.
- Labuda, M., L. D. Jones, T. Williams, V. Danielova, P. A. Nuttall (1993b). "Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between co-feeding ticks." J Med Entomol 30: 295-299.
- Labuda, M., L. D. Jones, T. Williams, P. A. Nuttall (1993c). "Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts." Med Vet Entomol 7: 193-196.
- Lees, A. D. et A. D. Milne (1951). "The seasonal and diurnal activities of individual sheep ticks (*Ixodes ricinus* L.)." Parasitology 41: 189-208.

6. Bibliographie

- Lees, A. D. (1946). "The water balance in *Ixodes ricinus* L. and certain other species of ticks." Parasitology 37: 1-20.
- Levin, M. L. et D. Fish (2000). "Acquisition of coinfection and simultaneous transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* ticks." Infect Immun 68: 2183-2186.
- Lindgren, E. et R. Gustafson (2001). "Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change." Lancet 358: 16-18.
- Lindgren, E., L. Tälleklint, T. Poltfeldt (2000). "Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*." Environ. Health Persp 108: 119-123.
- Lindhe, K. E., D. S. Meldgaard, P. M. Jensen, G. A. Houser, M. Berendt (2009). "Prevalence of tick-borne encephalitis virus antibodies in dogs from Denmark." Acta Vet Scand 51: 56.
- Liz, J.S, J. W. Sumner, K. Pfister, M. Brossard (2002). "PCR detection and serological evidence of Granulocytic Ehrlichial infection in Roe Deer (*Capreolus capreolus*) and Chamois (*Rupicapra rupicapra*)." J Clin Micro 40: 892-897.
- Liz, J. S., L. Anderes, J. W. Sumner, R. F. Massung, L. Gern, B. Rutti, 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.
- Liz, J.S., B. Rutti, M. Brossard (1997). Human granulocytic ehrlichiosis in Switzerland : serological evidences. Clin Microbiol Infect 3 : 343.
- Liz, J. S. (1994). *Ehrlichia phagocytophila*: aspects épidémiologiques, hématologiques et sérologiques de l'infection chez les bovins en Suisse. Thèse, Université Neuchâtel, Neuchâtel.
- Lommano, E., C. Burri, G. Maeder, M. Guerne, V. Bastic, E. Patalas, L. Gern. "Prevalence and genotyping of tick-borne encephalitis virus in questing *Ixodes ricinus* ticks in a new endemic area in Western Switzerland." J Med Entomol submitted.
- Loutan, L., J. Rossier, G. Zufferey G, D. Cuenod, C. Hatz, H.P. Marti, L. Gern. (1993). "Imported babesiosis diagnosed as malaria." Lancet 342: 749.
- MacLeod, J. (1935). "*Ixodes ricinus* in relation to its physical environment.II. The factors governing survival and activity." Parasitology 27: 123-144.
- Mandl, C. W., F. X. Heinz, E. Stockl, C. Kunz (1989). "Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses." Virology 173: 291-301.
- Marchesi, P., M. Blant, Capt, S. (2008). "Clés de détermination des mammifères de Suisse. " Centre suisse de cartographie de la faune (CSCF), Neuchâtel.

6. Bibliographie

- Massung, R. F., J. W. Courtney, S. L. Hiratzka, V. E. Pitzer, G. Smith, R. L. Dryden (2005). "*Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer." Emerg Infect Dis 11: 1604-1606.
- Massung, R. F., M. J. Mauel, J. H. Owens, N. Allan, J. W. Courtney, K. C. Stafford, 3rd, T. N. Mather (2002). "Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode Island and Connecticut." Emerg Infect Dis 8: 467-472.
- Massung, R. F., K. Slater, J. H. Owens, W. L. Nicholson, T. N. Mather, V. B. Solberg, J. G. Olson (1998). "Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae." J Clin Microbiol 36: 1090-1095.
- Materna, J., M. Daniel, L. Metelka, J. Harcarik (2008). "The vertical distribution, density and the development of the tick *Ixodes ricinus* in mountain areas influenced by climate changes (The Krkonose Mts, Czech Republic)." Int J Med Microbiol 298: 25-37.
- Materna, J., M. Daniel, V. Danielova (2005). "Altitudinal distribution limit of the tick *Ixodes ricinus* shifted considerably towards higher altitudes in central Europe: results of three years monitoring in the Krkonose Mts. (Czech Republic)." Cent Eur J Public Health 13: 24-28.
- Matile, H. (1982). Etude virologique et épidémiologique sur l'encéphalite à tiques en Suisse. Thèse, Université Neuchâtel, Neuchâtel.
- Meer-Scherrer, L., M. Adelson, E. Mordechai, B. Lottaz, R. Tilton (2004). "*Babesia microti* infection in Europe." Curr Microbiol 48: 435-437.
- Mejlon, H. A. et T. G. T. Jaenson (1997). "Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (*Acari: Ixodidae*)." Exp App Acar 21: 747-754.
- Morán Cadenas, F. (2007). Identification de *Borrelia* sp., agent de la borréliose de Lyme, et de l'ADN de l'hôte chez la tique *Ixodes ricinus* et étude de sa phénologie en fonction de l'altitude en Suisse. Thèse. Université Neuchâtel, Neuchâtel.
- Morán Cadenas, F., O. Rais, F. Jouda, V. Douet, P. F. Humair, J. Moret, L. Gern (2007a). "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.
- Morán Cadenas, F., O. Rais, P. F. Humair, V. Douet, J. Moret, L. Gern (2007b). "Identification of host bloodmeal source and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in Chaumont (Switzerland)." J Med Entomol 44: 1109-1117.
- Moshkin, M. P., E. A. Novikov, S. E. Tkachev, V. V. Vlasov (2009). "Epidemiology of a tick-borne viral infection: theoretical insights and practical implications for public health." Bioassays 31: 620-628.

6. Bibliographie

- Movila, A., A. L. Reye, H. V. Dubinina, O. O. Tolstenkov, I. Toderas, J. M. Hubschen, C. P. Muller, A. N. Alekseev (2011). "Detection of *Babesia* sp. EU1 and members of spotted fever group Rickettsiae in ticks collected from migratory birds at Curonian Spit, North-Western Russia." Vector Borne Zoonot Dis 11: 89-91.
- Nijhof, A. M., C. Bodaan, M. Postigo, H. Nieuwenhuijs, M. Opsteegh, L. Franssen, F. Jebbink, F. Jongejan (2007). "Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands." Vector Borne Zoonot Dis 7: 585-95.
- Nilsson, K. (2009). "Septicaemia with *Rickettsia helvetica* in a patient with acute febrile illness, rash and myasthenia." J Infect 58: 79-82.
- Nilsson, K., K. Elfving, C. Pahlson (2006). "*Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006." Emerg Infect Dis 16: 490-492.
- Nilsson, K., O. Lindquist, C. Pahlson (1999). "Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death." Lancet 354: 1169-1173.
- Nosek, J. et I. Grulich (1967). "The relationship between the tick-borne encephalitis virus and the ticks and mammals of the Tribec mountain range." Bull World Health Organ 36: Suppl 1: 31-47.
- OFSP (2008). "Déclarations des maladies infectieuses." Bull. OFSP 52 : 913.
- OFSP (2007). "Encéphalites à tiques: nouvelle augmentation du nombre de cas rapportés en 2006." Bull. OFSP 4: 57-60.
- OFSP (2006). Recommandations pour la vaccination contre l'encéphalite à tiques. Bull. OFSP 13: 225-231.
- OFSP (2005). Encéphalite à tiques: nette augmentation du nombre de cas rapportés. Bull. OFSP 38: 671-673.
- Ogden, N. H., A. N. Casey, N. P. French, K. J. Bown, J. D. Adams, and Z. Woldehiwet (2002). "Natural *Ehrlichia phagocytophila* transmission coefficients from sheep 'carriers' to *Ixodes ricinus* ticks vary with the numbers of feeding ticks." Parasitology 124: 127-136.
- Parola, P., C. D. Paddock, D. Raoult (2005). "Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts." Clin Microbiol Rev 18: 719-756.
- Parola, P. et D. Raoult (2001). "Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat." Clin Infect Dis 32: 897-928.
- Pavlovsky, E. (1947). "Ticks and tick-borne encephalitis (in Russian)." Parazitologia Dalnego Vostoka Leningrad 5: 212-264.
- Perkins, S. E., I. M. Cattadori, V. Tagliapietra, A. P. Rizzoli, P. J. Hudson (2003). "Empirical evidence for key hosts in persistence of a tick-borne disease." Int J Parasitol 33: 909-917.

6. Bibliographie

- Perret, J. L., O. Rais, L. Gern (2004). "Influence of climate on the proportion of *Ixodes ricinus* nymphs and adults questing in a tick population." J Med Entomol 41: 361-5.
- Perret, J. L. (2003). Computer-assisted laboratory observations and field studies of the host-finding behaviour of the tick *Ixodes ricinus* (Acarina: Ixodidae): ecological implications of climate and light. Thèse, Université de Neuchâtel, Neuchâtel.
- Perret, J. L., E. Guigoz, O. Rais, L. Gern (2000). "Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland)." Parasitol Res 86: 554-557.
- Péter, O., Burgdorfer W., A. Aeschlimann (1981). "Enquête épidémiologique dans un foyer naturel de Rickettsies à *Ixodes ricinus* du Plateau suisse". Ann parasitol Hum Comp 56: 1-8.
- Péter, O., W. Burgdorfer, A. Aeschlimann, P. Chatelanat (1984). "*Rickettsia conorii* isolated from *Rhipicephalus sanguineus* introduced into Switzerland on a pet dog." Z Parasitenkd 70: 265-70.
- Péter, O. (1985). "Présence d'anticorps contre la "Rickettsie suisse" chez les mammifères sauvages et domestiques du canton de Neuchâtel." Schweiz Arch Tierheilkd 127: 461-468.
- Petrovec, M., W. Sixl, R. Schweiger, S. Mikulasek, L. Elke, G. Wust, E. Marth, K. Strasek, D. Stunzner, 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.
- Petrovec, M., A. Bidovec, J. W. Sumner, W. L. Nicholson, J. E. Childs, T. Avsic-Zupanc (2002). "Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages." Wien Klin Wochenschr 114: 641-647.
- Pfister, K., A. Roesti, PH. Boss, B. Balsiger (1987). "Ehrlichia phagocytophila als Erreger des Weidefiebers im Berner Oberland." Schweiz Arch Tierheilk 129: 343-347.
- Poitras, E. et A. Houde (2002). "La PCR en temps réel: principes et applications." Rev Biol Biotech 2: 2-11.
- Polin, H., P. Hufnagl, R. Haunschmid, F. Gruber, G. Ladurner (2004). "Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria." J Clin Microbiol 42: 2285-2286.
- Portillo, A., L. Pérez-Martinez, S. Santibanez, P. Santibanez, A. M. Palomar, J. A. Oteo (2011). "*Anaplasma* spp. in wild mammals and *Ixodes ricinus* from North Spain." Vector Borne Zoonot Dis 11: 1-8.
- Puchhammer-Stockl, E., C. Kunz, C. W. Mandl, 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.

6. Bibliographie

- Pusterla, N., C. M. Leutenegger, J. B. Huder, R. Weber, U. Braun, H. Lutz (1999). "Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland." J Clin Microbiol 37: 1332-1334.
- Pusterla, N., J. B. Huder, K. Feige, H. Lutz (1998a). "Identification of 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., R. Weber, C. Wolfensberger, G. Schär, R. Zhinden, W. Fierz, J. E. Madigan, J. S. Dumler, H. Lutz (1998b). "Serological evidence of human granulocytic ehrlichiosis in Switzerland." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 17: 207-209.
- Pusterla, N., C. Wolfensberger, B. Litschi, A. Parvis, H. Lutz (1997). "Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland." J. Clin. Microbiol. 35: 2307-2309.
- Radulovic, Z., D. Chochlakis, S. Tomanovic, M. Milutinovic, Y. Tselentis, A. Psaroulaki. "First detection of spotted fever group rickettsiae in ticks in Serbia." Vector Borne Zoonot Dis 11: 111-115. Ahead of print.
- Randolph, S. E., L. Asokliene, Avsic-Zupanc, T., Bormane, A., Burri, C., Gern, L., Golovljova, I. Hubalek, Z., Knap, N., Kondrusik, M., Kupca, A., Pejcoch, M., Vasilenko, V., Zygtiene, M. (2008). "Variable spikes in tick-borne encephalitis incidence in 2006 independent of variable tick abundance but related to weather." Parasit Vectors 1: 44.
- Randolph, S. E. (2004). "Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by *ixodid* ticks as vectors." Parasitology 129 Suppl: S37-65.
- Randolph, S. E. (2003). "[Fauna, climate and politics: possible causes for the recent increases in tick-borne zoonoses]." Arch Pediatr 11: 1282-1285.
- Randolph, S. E., R. M. Green, A. N. Hoodless, M. F. Peacey (2002). "An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*." Int J Parasitol 32: 979-989.
- Randolph, S. E. (2001). "The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 356: 1045-1056.
- Randolph, S. E. et D. J. Rogers (2000). "Fragile transmission cycles of tick-borne encephalitis virus may be disrupted by predicted climate change." Proc Biol Sci 267: 1741-1744.
- Randolph, S. E., D. Miklisova, J. Lysy, D. J. Rogers, M. Labuda (1999). "Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus." Parasitology 118: 177-186.
- Randolph, S. E. et K. Storey (1999). "Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission." J Med Entomol 36: 741-748.

6. Bibliographie

- Randolph, S. E., L. Gern, P. A. Nuttall (1996). "Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission." Parasitol Today 12: 472-479.
- Randolph, S. E. (1995). "Quantifying parameters in the transmission of *Babesia microti* by the tick *Ixodes trianguliceps* amongst voles (*Clethrionomys glareolus*)." Parasitology 110: 287-295.
- Randolph, S. E. (1975). "Seasonal dynamics of a host-parasite system: *Ixodes trianguliceps* (*Acarina: Ixodidae*) and its small mammal hosts." J Anim Ecol 44: 425-449.
- Rennoise, A. et D. Raoult (2009). "[An update on rickettsiosis]." Med Mal Infect 39: 71-81.
- Rijpkema, S., D. Golubic, M. Molkenboer, N. Verbeek-De Kruif, J. Schellekens (1996). "Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia." Exp Appl Acarol 20: 23-30.
- Rizzoli, A., H. C. Hauffe, V. Tagliapietra, M. Neteler, R. Rosa (2009). "Forest structure and roe deer abundance predict tick-borne encephalitis risk in Italy." PLoS One 4: 1-11.
- Roux, V., M. Drancourt, 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.
- Saksida, A., D. Duh, S. Lotric-Furlan, F. Strle, M. Petrovec, 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, A. Cometta (2007). "[Tick-borne encephalitis in the North part of the canton de Vaud]." Rev Med Suisse 3: 2609-2613.
- Schneider, H. (1931). "Über epidemische akute Meningitis serosa." Wiener Klin Wschr 44: 350-352.
- Schwaiger, M. et 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.
- Severinsson, K., T. G. Jaenson, J. Pettersson, K. Falk, 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: 1-7.
- Simser, J. A., A. T. Palmer, V. Fingerle, B. Wilske, T. J. Kurtti, 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: 4559-4566.
- Skrabalo, Z. et Z. Deanovic (1957). "Piroplasmosis in man; report of a case." Doc Med Geogr Trop 9: 11-16.

6. Bibliographie

- Spiess, H. et M. Mumenthaler (1969). "Central European encephalitis ("Tick-borne encephalitis") in Switzerland." Minn Med 52: 41-46.
- Sprong, H., P. R. Wielinga, M. Fonville, C. Reusken, A. H. Brandenburg, F. Borgsteede, C. Gaasenbeek, J. W. van der Giessen (2009). "*Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species." Parasit Vectors 2 :41.
- Stürchler, D., Oberreich J., Vorkauf H. (2000). "Déclarations des maladies infectieuses: un premier bilan à propos du nouveau système." Bull Méd suisses 81: 937-939.
- Sumilo, D., A. Bormane, L. Asokliene, V. Vasilenko, I. Golovljova, T. Avsic-Zupanc, Z. Hubalek, S. E. Randolph (2008). "Socio-economic factors in the differential upsurge of tick-borne encephalitis in central and Eastern Europe." Rev Med Virol.
- Sumilo, D., L. Asokliene, et al. (2007). "Climate change cannot explain the upsurge of tick-borne encephalitis in the Baltics." PLoS ONE 6: 1-11.
- Süss, J. (2008). "Tick-borne encephalitis in Europe and beyond-the epidemiological situation as of 2007." Euro Surveill 13 : 1-8.
- Süss, J. (2003). "Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines." Vaccine 21 Suppl 1: S19-35.
- Tälleklint, L. et T. G. Jaenson (1994). "Transmission of *Borrelia burgdorferi* s.l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in Sweden." J Med Entomol 31: 880-886.
- Tampieri, M., R. Galuppi, C. Bonoli, G. Cancrini, A. Moretti, M. Pietrobelli (2008). "Wild ungulates as *Babesia* hosts in northern and central Italy." Vector Borne Zoonot Dis 8: 667-674.
- Telford, S. R., 3rd, J. E. Dawson, P. Katavolos, C. K. Warner, C. P. Kolbert, 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.
- Tijssse-Klasen, E., L. J. Jameson, M. Fonville, S. Leach, H. Sprong, J. M. Medlock (2010). "First detection of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in the UK." Epidemiol Infect: 1-6.
- Tonteri, E., A. E. Jaaskelainen, T. Tikkakoski, L. Voutilainen, J. Niemimaa, H. Henttonen, A. Vaheri, O. Vapalahti (2011). "Tick-borne encephalitis virus in wild rodents in winter, Finland, 2008-2009." Emerg Infect Dis 17: 72-75.
- Urban, C. F., S. Lourido, A. Zychlinsky (2006). "How do microbes evade neutrophil killing?" Cell Microbiol 8: 1687-1696.
- Vannier, E. et P. J. Krause (2009). "Update on babesiosis." Interdiscip Perspect Infect Dis 2009 :1-9.

6. Bibliographie

- Wall, R. et D. Schearer (2001). "Veterinary ectoparasites : biology, pathology and control." Blackwell Sciences Ltd 2^e edition.
- Waldeström Jonas, A. L., K. I. Falk, U. Garpmo, S. Bergström, G. Lindegren, A. Sjöstedt, H. Mejlon, T. Fransson, P. D. Haemig, B. Olsen (2007). "Migrating birds and tick-borne encephalitis virus." Emer Inf Dis 13: 1215-1218.
- Walther, G. R., E. Post, P. Convey, A. Menzel, C. Parmesan, T. J. C. Beebee, J. M. Fromentin, O. Hoegh-Guldberg, F. Bairlein (2002). "Ecological responses to recent climate change." Nature 416: 389-395.
- Wicki, R., P. Sauter, C. Mettler, A. Natsch, T.ENZler, N. Pusterla, P. Kuhnert, G. Egli, M. Bernasconi, R. Lienhard, H. Lutz, 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, J. W. B. 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 Zoonot Dis 9: 119-122.
- Wyler, R. et H. Matile (1984). "Die Zeckenzephalitis in der Schweiz. 1. Klinik und Epidemiologie. 2. Diagnose und Immunprophylaxe." Schweiz Rundschau Med (Praxis) 73: 601-619.
- Wyler, R., W. Schmidtke, C. Kunz, A. Radda, V. Henn, R. Meyer (1973). "Tick-borne encephalitis in the Schaffhausen region: isolation of virus from ticks and serological studies." Schweiz Med Wochenschr 103: 1487-1492.
- Zeman, P. et C. Bene (2004). "A tick-borne encephalitis ceiling in Central Europe has moved upwards during the last 30 years: possible impact of global warming?" Int J Med Microbiol 293 Suppl 37: 48-54.
- Zeman, P. et J. Januska (1999). "Epizootiologic background of dissimilar distribution of human cases of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in a joint endemic area." Comp Immunol Microbiol Infect Dis 22: 247-260.
- Zimmermann, H. et D. Koch (2005). "Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Switzerland 1984 to 2004." Ther Umsch 62: 719-725.
- Zintl, A., G. Mulcahy, H.E., Skerrett, S.M., Taylor, J.S. Gray (2003). "*Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance." Clin Microbiol Rev 16: 622-636.

7. Remerciements

Je tiens à remercier Lise Gern, ma directrice de thèse, qui m'a accompagnée moralement et spirituellement tout au long de ce projet. Chère Lise, je te remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir soutenue dans les moments difficiles. Grâce à toi j'ai appris à avoir confiance en moi-même ! Merci aussi pour ta disponibilité !

Ma reconnaissance va également au prof. Michel Brossard, au Dr Hanspeter Zimmermann et au prof. Kurt Pfister pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier le Fonds National Suisse qui a financé ce projet, le projet EDEN, les autorités cantonales pour m'avoir donné les autorisations de capture de micromammifères et Agrométéo qui m'a permis d'obtenir des données météorologiques.

Mes remerciements vont aussi à mes chers étudiants en master, Viki, Gilles et Maud. Sans vous ce travail n'aurait pas pu voir le jour. Un grand merci également à Eva qui m'a aidée dans mes analyses et qui mettait toujours de la bonne humeur.

Merci aussi au prof. Bruno Betschart de m'avoir donné ma chance en tant qu'assistante.

Un chaleureux merci à Elencka, Katka, Marketa, et Veronika pour m'avoir si bien accueillie lors de mon séjour en Slovaquie.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont fait partie du labo de parasitologie et qui ont su garder une ambiance chaleureuse:

Merci à toi Kika qui a toujours su me redonner du courage dans les moments difficiles.

Merci Véro pour tes conseils et ton aide en biologie moléculaire.

Merci Pitou, toi qui es toujours prêt à me faire courir... (Et en plus, ça marche...encore !).

Merci à mes compagnes de bureau Elena et Barbara qui ont transformé ce bureau en un espace agréable pour travailler mais aussi pour blaguer !

Merci à vous tous qui avez agrémente ce travail par votre bonne humeur quotidienne et vos bons apéros. Merci à vous Marion (et la Fouine évidemment), Nico, Maude, Lucia, Renaud, David, Christian Z. et K., Delphine, Yvan, Jean-Christophe, Léonore, Christèle, Coralie, Gabriel, Gianluca, Kangaji, Mirko, Mélody, Virginie, Luce, Daniel, Séverine, Lucas, Romain, Elena G., Mona, Jeanne, Morgane, Nadège, et Christopher.

Merci à ceux qui ont apporté un peu d'exotisme à notre labo : Islay, Katarina, Natacha, Irina, Sacha, Anna, Vaclav, Alexandru, Claudia C. et Claudia N.

Je remercie également les gens qui font fonctionner notre laboratoire tout en restant tapis dans l'ombre :

Merci Jacqueline pour tes magnifiques graphes.

Merci à toi Romain pour ta bonne humeur et ton génie informatique.

Merci Luis pour ton bonjour quotidien et ta bonne humeur.

Au préparateur M. Duvoisin qui m'a fabriqué des nouveaux pièges et me réparait les anciens et aussi merci à Pascale Prêtre qui m'a toujours trouvé les articles introuvables !

7. Remerciements

Merci à vous deux Brigitte et Natacha pour les belles sorties et fêtes de Noël que vous avez organisées !

Merci aussi à Josiane et Michèle.

Merci à mes amis : René, Yann, Géraldine, Séverine, Fabien, aux poufs de Fontaine-André: Fabienne, Aline, Saskia, Gaëlle, Joëlle, Charlène, Adrien, et aussi Virginie, Blaise, Stéphanie, Guillaume, Yvan, CriCri, Lolo, M.-C., Sophie, Sandra, Sylvie, Laure, Sarah, Anahi, Vio.

Un grand merci à toute ma belle famille : Annette, Arthur, Martine, Jacques, Aziz, Francine, Pierre, Hanna, Sarah, Pauline et Yanis.

A mon cher Claude qui m'a soutenue tout au long de ce travail et qui m'a aidée à surmonter chaque épreuve. Merci d'avoir été à mes côtés jusqu'au bout!

Enfin, je dédie cette thèse à mes parents, Pierre et Sophie, qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont donné toutes les chances pour réussir. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous faites pour moi!

Merci à vous tous pour vos encouragements et votre amitié qui m'ont permis de réaliser ce projet.

8. Annexe 1

8.1 Isolation de l'ARN/ADN

8.1.1 Extraction ARN au TRIzol[®] selon Chomczynski et Sacchi (1987)

Toutes les expériences qui ont pour cible l'ARN requièrent une zone de travail ainsi que du matériel RNase free. Il faut donc veiller à travailler sous une hotte stérile, à changer de gants régulièrement, à utiliser des pointes à filtres, à nettoyer la surface de travail ainsi que la centrifugeuse au préalable à l'eau de javel 5% puis au « Mercury Rnase free » suivi de l'eau DEPC pour rincer. Il faut également enclencher les UV 15 minutes sur la surface de travail avant et après avoir travaillé.

1. Mettre une bille de 3mm dans un tube de 2 ml avec une pince préalablement passée à la flamme, puis ajouter les tiques congelées.
2. Ajouter 300µl (tiques) ou 600µl (sérum de rongeur) de TRIzol[®] (3:1= TRIzol:échantillon) et vortexer.
3. Homogénéiser avec une broyeuse 3-5 min à 30/s.
4. Centrifuger rapidement l'homogénat et incubé à température ambiante pendant 5 minutes.
5. Transférer les 300µl (tiques) ou 600µl (sérum de rongeur) dans un nouveau tube stérile de 1.5 ml.
6. Ajouter 60µl (tiques) ou 120µl (sérum de rongeur) de chloroforme (1/5 du volume de TRIzol) au mélange, mélanger par inversion 15x, vortexer et incubé à température ambiante pendant 10 min (vortexer chaque 5 min.).
7. Centrifuger les tubes à 12'000g (rcf) pendant 15 min. à 4°C.
8. Transférer le surnageant (couche supérieure, phase aqueuse, l'ARN s'y trouve) dans de nouveaux tubes stériles mais attention à ne pas transférer les protéines (anneau blanc entre la phase aqueuse et la phase organique).
9. Ajouter 150µl (tiques) ou 300µl (sérum de rongeur) d'isopropanol (1/2 volume de TRIzol) et mélanger par inversion 5x puis vortexer.
10. Centrifuger les tubes à 12'000g (rcf) pendant 15 min à 4°C. Jeter le reste de l'étape 8.

11. Enlever le surnageant (sans toucher les bords ni le fond avec le tips) et le jeter.
12. Ajouter 300µl (tiques) ou 600µl (sérum) d'éthanol 75% (1:1= Ethanol:Trizol) au culot et vortexer 1 min.
13. Centrifuger les tubes à 7'500g (rcf) pendant 6 min à 4°C.
14. Enlever le surnageant et le jeter.
15. Laisser sécher les tubes ouverts sous la hotte pendant 30-40 min. Eviter que le culot ne sèche trop.
16. Eluer l'ARN avec 30µl (tiques) ou 25µl (sérum de rongeur) d'eau RNase free.
17. Congeler à -20°C ou à -80°C pour une conservation de plus de 10 ans.

8.1.2 Extraction ADN d'hôtes à l'hydroxyde d'ammonium selon Guy et Stanek (1991) et Rijpkema et al. (1996)

1. Laver les tiques au DNAzap pendant 3 min. puis rincer à l'eau distillée.
2. Placer 100µl de NH₄OH 0.7M fraîchement préparée dans chaque tube eppendorf.
3. Ajouter une tique par tube. Vérifier que la tique soit immergée (centrifuger brièvement si besoin).
4. Incuber les tubes fermés à 100°C pendant 15 min. dans le bloc chauffant.
5. Laisser refroidir les tubes 1 min et les centrifuger brièvement.
6. Ouvrir les tubes et laisser évaporer le NH₃ pendant 15min à 100°C.
7. Conserver l'ADN à -20°C.

8.2 Amplification et détection de l'ARN ou l'ADN

8.2.1 PCR en temps réel pour la détection du TBEV selon Schwaiger et Cassinotti (2003)

Les amorces utilisées sont décrites au point 6.3. Le positif utilisé provient d'un isolat humain (Europe centrale) et nous a été donné par Philippe de Mendonca (EDEN).

Réaction PCR (25 µl) :

Réaction Mix (2X)	12.5µl
Amorce F-TBE 1 (100µM)	0.75µl
Amorce R-TBE 1 (50µM)	0.15µl
Sonde TBE-WT (20µM)	0.25µl
H ₂ O RNase/DNase free	5.85µl
SSIII Platinum Taq	0.5µl
ARN	5µl
ARN TBE positif	3µl

Programme TBE:

Remarque : Fluorophore à choisir sur le icycler (Biorad) : FAM-490

Reverse transcription	42°C	30min	
Inactivation des reverse transcriptases et activation de la Taq polymérase	95°C	10min	
Dénaturation	95°C	15sec	} 45 cycles
Elongation et libération de la FAM	60°C	60sec	

8.2.2 PCR en temps réel pour la détection d'*A. phagocytophylum* selon Courtney et al. (2004)

Le protocole a été modifié à partir de Courtney et al. (2004). Les amorces utilisées sont décrites au point 6.3

Réaction PCR (25µl) :

Tampon (5X)	5µl
dNTP's (10mM)	0.5µl
Amorce ApMSP2f (10µM)	1.8µl
Amorce ApMSP2r (10µM)	1.8µl
Sonde ApMSP2p-FAM (10µM)	0.3µl
MgCl ₂ (25mM)	6µl
Taq Kapa	0.15µl
H ₂ O RNase/DNase free	7.45µl
ADN	2µl
ADN <i>A.phagocytophylum</i> (souche Webster) dilué 100x	2µl

Programme *Anaplasma*:

Dénaturation initiale	95°C	15min	
Dénaturation	95°C	15sec] 40 cycles
Elongation et extension finale	60°C	1min	

8.2.3 PCR et Nested PCR pour la détection du TBEV selon Saksida et al. (2005)

Les protocoles de la PCR et de la nested PCR ont été modifiés à partir de Saksida et al. (2005). Les amorces qui ont été employées sont celles de Puchhammer-Stockl et al. (1995) et sont décrites au point 9.3.

8.2.3.1 RT-PCR pour la transformation de l'ARN en ADNc

La RT-PCR (selon le protocole fourni par Invitrogen) transforme l'ARN en ADN complémentaire par le biais d'une enzyme.

Réaction 1 :

1µl Random hexamers ou random primer

1µl dNTP (10mM)

10 µl ARN

5 minutes à 65°C puis plonger les échantillons dans glace.

Réaction 2 :

4µl Tampon (selon le fournisseur utilisé)

2µl Eau RNase free

1µl RNase Out ou RNAsin

2 minutes à 25°C puis plonger les échantillons dans la glace.

Réaction 3 :

1µl Superscript II Reverse transcriptase ou M-MLV

Centrifuger puis incuber 10 minutes à 25°C, 50 minutes à 42°C, et pour inactiver la réaction, chauffer 15 minutes à 72°C. Stocker les échantillons à -20°C.

8.2.3.2 PCR et Nested PCR

Les amorces utilisées sont décrites au point 6.3.

Réaction PCR (50µl) :

Tampon (10X)	5µl
dNTP's (10mM)	1µl
Amorce FSM-1 (10µM)	1µl
Amorce FSM-2 (10µM)	1µl
H ₂ O RNase/DNase free	31.7µl
Taq polymerase Qiagen	0.3µl
ADNc	10µl

Programme TBE PCR:

Dénaturation	94°C	30sec	} 40 cycles
Hybridation	40°C	30sec	
Elongation	72°C	30sec	
Elongation finale	72°C	5min	

Réaction Nested PCR (50µl) :

Les amorces utilisées sont décrites au point 6.3.

Tampon (10X)	5µl
dNTP's (10mM)	1µl
Amorce FSM-1i (10µM)	1µl
Amorce FSM-2i (10µM)	1µl
H ₂ O RNase/DNase free	39.7µl
Taq polymerase Qiagen	0.3µl
ADN	2µl

Programme TBE nested PCR:

Dénaturation initiale	94°C	2min	
Dénaturation	94°C	30sec	40 cycles
Hybridation	53°C	30sec	
Elongation	72°C	30sec	
Elongation finale	72°C	5min	

8.2.4 PCR pour la détection de *Babesia* spp. selon Georges et al. (2001)

Les amorces utilisées sont décrites au point 6.3.

Réaction PCR (25µl):

Tampon (contient 15mM MgCl ₂) (10X)	2.5µl
MgCl ₂ (25mM)	1µl
dNTPs (10mM)	0.5µl
Amorce B-R2 (10µM)	0.5µl
Amorce F2 (10µM)	0.5µl
H ₂ O nanopure	9.875µl
Taq polymérase QIAGEN (5U/µl)	0.125µl
ADN de tiques libres	10µl
ADN <i>B. divergens</i> dilué jusqu'à 1000x	1µl

Programme *Babesia* selon Bekker et al. (2002):

Dénaturation initiale	94°C	3min	
Dénaturation	94°C	20sec	11 cycles (-1°C/cycle)
Hybridation	de 67 à 57°C	30sec	
Extension	72°C	30sec	
Dénaturation	94°C	20sec	40 cycles
Hybridation	57°C	30sec	
Extension	72°C	30sec	
Extension finale	72°C	10min	

8.2.5 PCR pour la détection de *Rickettsia* spp. selon Jado et al. (2006)

Les amorces utilisées sont décrites au point 9.3.

Réaction PCR (50µl) :

Tampon (contient 15mM MgCl ₂) (10X)	5µl
dNTPs (10mM)	1µl
Amorce RCK/23-5-F (10µM)	2.5µl
Amorce RCK/23-5-R (10µM)	2.5µl
H ₂ O nanopure	28.7µl
Taq polymérase QIAGEN (5U/µl)	0.3µl
ADN de tiques libres	10µl
ADN <i>R. conorii</i>	1µl

Programme *Rickettsia*:

Dénaturation initiale	94°C	9min	
Dénaturation	94°C	15sec	40 cycles
Hybridation	60°C	1min	
Elongation	65°C	4min	
Elongation finale	65°C	7min	

8.2.6 PCR pour la détection d'hôtes selon Humair et al. (2007)

Les amorces utilisées sont décrites au point 9.3.

Réaction PCR (50µl):

Tampon Taq (contient 15mM MgCl ₂) (10X)	5µl
MgCl ₂ (25mM)	3µl
dNTPs (10mM)	1µl
Amorce 12S6F (10µM)	4µl
Amorce B12S9R (10µM)	4µl
H ₂ O	12.75µl
Taq polymérase QIAGEN (5U/µl)	0.25µl
ADN	20µl
ADN positif	3µl

Programme détection d'hôtes:

Dénaturation initiale	94°C	3min	
Dénaturation	94°C	20sec	1°C/cycle
Hybridation	60 → 52°C	30sec	
Elongation	72°C	30sec	
Dénaturation	94°C	20sec	40 cycles
Hybridation	52°C	30sec	
Elongation	72°C	30sec	
Elongation finale	72°C	7min	

8.2.7 Reverse Line Blot (RLB)

8.2.7.1 Activation de la membrane

- 1 Mettre 50, 100 ou 500 pmol de sondes selon la concentration à utiliser (cf Annexe 2, au point 9.4) dans 150µl de NaHCO₃ 500mM, pH 8.4 (4µl de sondes à 25pmol + 146µl de NaHCO₃).
- 2 Découper la membrane biodyne[®] C à la taille du coussinet.
- 3 Activer la membrane en incubant 10 minutes à température ambiante dans 10ml d'EDAC 16%. La membrane activée est rincée à l'eau puis placée sur un coussinet dans un miniblottter. L'eau restante est enlevée des puits par aspiration.
- 4 Charger les puits avec les sondes diluées dans le NaHCO₃ (1 puits sur 2 pour faciliter la lecture des résultats). Le premier et le dernier puits sont chargés avec de l'encre diluée 100x (1 ml d'encre dans 99 ml d'H₂O) afin de définir le champ d'hybridation et l'orientation des sondes sur la membrane.
- 5 Incuber au moins 1 minute à température ambiante.
- 6 Aspiration des puits contenant les sondes dans le même ordre que celui du chargement et du côté opposé.
- 7 Retirer la membrane du miniblottter à l'aide de pinces (la membrane ne doit pas être touchée avec les doigts) et la placer dans une bouteille longue en l'enroulant dans le sens de chargements des puits.
- 8 Inactiver la membrane en l'incubant 10 minutes (maximum) dans 100ml de NaOH 100mM (1ml NaOH 10M + 99ml H₂O) dans un four tournant à température ambiante.
- 9 Rincer la membrane à l'eau.
- 10 Laver la membrane avec 100 ml de 2X SSPE/0.1% SDS (la solution doit être préchauffée) pendant 5 minutes à 60°C dans un four agitateur.
- 11 La membrane est prête à l'emploi
- 12 En cas d'utilisation ultérieure, laver la membrane avec 100 ml d'EDTA 20mM (pH=8) pendant 15 minutes.
- 13 Sceller la membrane dans un plastique et la conserver à 4°C jusqu'à utilisation.

8.2.7.2 Hybridation de la membrane

Remarque: Toutes les solutions utilisées doivent être préchauffées à la bonne température avant utilisation et tous les lavages et incubations sont faits dans une boîte en plastique propre à chaque solution et sous agitation.

1. Diluer 10µl de produit PCR dans 150 µl de 2X SSPE / 0.1 % SDS.
2. Dénaturer les produits PCR dilués à 99°C pendant 10 minutes puis plonger les produits dans la glace immédiatement après.
3. Centrifuger légèrement afin d'enlever la condensation contenue dans les bouchons et maintenir dans la glace.
4. Incuber la membrane dans 100 ml de 2X SSPE / 0.1 % SDS pendant 5 minutes à température ambiante (peut être incubée plus longtemps si nécessaire) tout en gardant assez de 2X SSPE / 0.1 % SDS pour pouvoir remplir les puits vides après chargement des échantillons.
5. Placer la membrane sur un coussinet dans un miniblottier de manière à ce que les puits du blot soient perpendiculaires à l'orientation des sondes et visser le miniblottier.
6. Sécher les puits par aspiration.
7. Remplir les puits avec 150 µl de produit PCR dilué en évitant les bulles.
8. Remplir les puits non utilisés avec le reste de 2X SSPE / 0.1 % SDS.
9. Hybrider les produits PCR sur la membrane à 42°C pour *Babesia* et ADN d'hôtes ou 48°C pour *Rickettsia* pendant 1 heure sur une surface horizontale (sans agitateur).
10. Enlever les produits PCR par aspiration et retirer la membrane du miniblottier en utilisant des pinces.
11. Laver la membrane 2X dans 100 ml 2X SSPE / 0.5% SDS pendant 10 minutes à 52°C pour *Babesia* et *Rickettsia* ou 55°C pour l'ADN d'hôtes.
12. Mettre la membrane dans une bouteille en l'enroulant dans le sens de chargement (les puits à l'intérieur) et l'incuber de 30 minutes dans un mélange de 10 ml de 2X SSPE /0.5% SDS avec 2,5 µl de streptavidine.
13. Laver la membrane 2X 10 minutes à 42°C dans 100 ml de 2X SSPE / 0.5 % SDS.
14. Rincer la membrane 2X 5 minutes à température ambiante dans 100 ml de 2X SSPE.

15. Incuber la membrane 1 à 2 minutes dans 6ml de liquide de détection ECL (contient la peroxydase) :
- 3 ml de réactif 1
- 3 ml de réactif 2
- Ajouter directement sur la membrane placée sur une feuille transparente.
- 16 Placer la membrane entre deux feuilles transparentes et y déposer un film photo dans une chambre noire.
- 17 Laisser le film pendant 15 minutes pour *Babesia* et *Rickettsia* ou 1 heure pour l'ADN d'hôtes puis le développer

8.2.7.3 Déshydratation de la membrane

1. Laver la membrane 2X 30 minutes à 80°C dans 100 ml de SDS 1%.
2. Laver la membrane 15 minutes à température ambiante dans 100 ml d'EDTA 20mM (pH=8).
3. Sceller la membrane dans un sac en plastique pour éviter la déshydratation et la stocker à 4°C jusqu'à la prochaine utilisation.

8.3 Amorces utilisées

Organisme cible	Nom de l'amorce	Séquence (5' -> 3')	Gène cible	Références
<i>virus du TBE</i>	F-TBE 1	GCG CGG TTC TTG TTC TCC	RNC 3'	Schwaiger et Cassinotti 2002
<i>virus du TBE</i>	R-TBE 1	ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT	RNC 3'	Schwaiger et Cassinotti 2002
<i>virus du TBE</i>	FSM-1	GAGGCTGAACAATGCACGA	NS5	Puchhammer-Stöckl 1995
<i>virus du TBE</i>	FSM-2	GAACACGTCCATTCTGATCT	NS5	Puchhammer-Stöckl 1995
<i>virus du TBE</i>	FSM 1i	ACGGAACGTGACAAGGCTAG	NS5	Puchhammer-Stöckl 1995
<i>virus du TBE</i>	FSM 2i	GCTTGTTACCATCTTTGGAG	NS5	Puchhammer-Stöckl 1995
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	ApMSP2f	ATG GAA GGT AGT GTT GGT TAT GGT ATT	msp2	Courtney et al. 2004
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	ApMSP2r	TTG GTC TTG AAG CGC TCG TA	msp2	Courtney et al. 2004
<i>Babesia</i> spp.	RLB-R2	biotin-CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT	18S	Georges et al. 2001
<i>Babesia</i> spp.	RLB-F2	GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G	18S	Georges et al. 2001
<i>Rickettsia</i> spp.	RCK/23-5-F	biotin-GAT AGG TCR GRT GTG GAA GCA C	23S-5S	Jado et al. 2006
<i>Rickettsia</i> spp.	RCK/23-5-R	TCG GGA YGG GAT CGT GTG TTT C	23S-5S	Jado et al. 2006
ADN hôte	12S-6F	CAA ACT GGG ATT AGA TAC C	12S	Humair et al. 2007
ADN hôte	B-12S-9R	biotin- AGA ACA GGC TCC TCT AG	12S	Humair et al. 2007

Tableau 5: Séquences des différentes amorces utilisées pour l'amplification des pathogènes (*virus du TBE*, *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Rickettsia* spp.) et de l'ADN d'hôtes.

8.4 Sondes utilisées

Organisme cible	Nom de la sonde	Séquence (5' -> 3')	Références	concentration (pmol) à utiliser pour la RLB
virus du TBE	Sonde TBE-WT	FAM-TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA-TAMRA	Schwaiger et Cassinotti 2002	-
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	ApMSP2p-FAM	FAM-TGG TGC CAG GGT TGA GCT TGA GAT TG-TAMRA	Courtney et al. 2004	-
<i>Babesia/Theileria</i>	Catch-All B/T	amino-TAA TGG TTA ATA GGA RCR GTT G	Georges et al. 2001	50
<i>B. odocoilei</i>	B.odocoilei	amino-TAT TTT GAC TTT TGT CGA CTG	Georges et al. 2001	500
<i>B. EU1</i>	B. EU1	amino-GAG TTA TTG ACT CTT GTC TTT AA	Gigandet et al. in press	500
<i>B. microti</i>	B.microti	amino-GCT TCC GAG CGT TTT TTT AT	Gigandet et al. in press	500
<i>B. divergens</i>	B.divergens	amino-GTT AAT ATT GAC TAA TGT CGA G	Gubbels et al. 1999	500
<i>B. bovis</i>	B.bovis	amino-CAG GTT TCG CCT GTA TAA TTG AG	Gubbels et al. 1999	500
<i>Rickettsiales</i>	Generic	amino-TAG CTC GAT TGR TTT ACT TTG	Jado et al. 2006	100
<i>Rickettsia helvetica</i>	R. helvetica	amino-CAT GGC TTG ATC CAC GGT A	Jado et al. 2006	100

Tableau 6: Sondes utilisées pour la détection des pathogènes (virus du TBE, *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Rickettsia* spp.).

Organisme cible	Nom de la sonde	Séquence (5' -> 3')	Références	concentration (pmol) à utiliser pour la RLB
<i>Muridae</i>	Small rodents	amino- GGC GGT ACT TTA TAT CCA T	Humair et al. 2007	100
<i>Bovidae, Cervidae, Suidae</i>	Artiodactyles	amino- TAT TCG CCA GAG TAC TAC	Humair et al. 2007	100
<i>Birds</i>	Birds	amino- TAC GAG CAC AAA CGC TTA A	Humair et al. 2007	100
<i>Lézards</i>	Lizards	amino- GAG AAC TAC AAG TGA AAA ACT	Humair et al. 2007	500
<i>Clethrionomys glareolus</i>	Clethrionomys	amino- AAA CTT CAA CAT TTA TAA AAC AAA AG	Humair et al. 2007	100
<i>Apodemus sylvaticus, A. flavicollis</i>	Apodemus	amino- TAA ACT TAA ATA ATT TAA TAA CAA AAC TAT	Humair et al. 2007	100
<i>Microtus agrestis, Micromys minutus, Sciurus vulgaris, Glis glis</i>	M.agrestis	amino- CTT AG CCC TAA ACT TTA ATA ATT	Humair et al. 2007	100
<i>Lepus europaeus, Erinaceus europaeus, Sorex araneus, S. alpinus, S. minutus, S. coronatus</i>	Sciurus	amino- AAC ATA GAC ACT CAA TTA ACA AG	Humair et al. 2007	100
<i>Neomys anomalus, N. fodiens</i>	Glis	amino- AAA CCC TTA CTA ACG CAA C	Humair et al. 2007	100
<i>Neomys anomalus</i>	Lepus	amino- TTA AAC CTA AAT AAT TTC CTA ACA AA	Humair et al. 2007	100
<i>Talpa europaea, Vulpes vulpes, Meles meles, Mustela erminea</i>	Erinaceus	amino- GAC AGT TAC TTA ACA AAA TTG TA	Humair et al. 2007	100
<i>Mustela putorius, (M.nivalis)</i>	Sorex sp.	amino- AAT ACC CGC CAG AGA AC	Humair et al. 2007	100
<i>Capreolus capreolus, Sus scrofa, Turdus merula, T. iliacus, T. philomelos, T. pilaris, Parus major, P. caeruleus, Erithacus rubecula, Parus major, P. caeruleus, Parus ater, Fringilla coelebs, F. montifringilla, Pyrrhula pyrrhula, Prunella modularis, Sitta europaea, Sylvia atricapilla, Troglodytes troglodytes, Garrulus glandarius</i>	Neomys sp.	amino- ACA AAA TTA CTC GCC AGA G	Humair et al. 2007	100
	N.anomalus	amino- TAA ACT CAA GTA ATT CAC AAA CA	Humair et al. 2007	100
	T.europaea	amino- ACC AAG ACA ATC AAG TTA ACA	Humair et al. 2007	100
	Vulpes	amino- CTA TAA CAA AAC AAT TCG CCA	Humair et al. 2007	100
	Meles	amino- GAT AAC TCA CAG AAC AAA ACT	Humair et al. 2007	100
	M.erminea	amino- CAT AAA TAG TTC TAA CAA CAA AAC	Humair et al. 2007	100
	M.putorius	amino- CTA AAC ATA AAT AAT TAT CAC AAC AA	Humair et al. 2007	100
	Capreolus	amino- CCT AAA CAC AAG TAA TTA ATA TAA CAA	Humair et al. 2007	100
	Sus	amino- ACC CAA ATA GTT ACA TAA CAA AA	Humair et al. 2007	100
	Turdus/Parus	amino- TGA TGC TCG ATA TTA CCT G	Humair et al. 2007	100
	Erithacus	amino- ATC TTG ATG CTC CAC CTT A	Humair et al. 2007	100
	Parus	amino- TGA GCG TCC GCC TGA	Humair et al. 2007	100
	Pater	amino- TTG ATG CTT AAC ATT ACC TGA	Humair et al. 2007	100
	Fringilla/Pyrrhula	amino- TGA TGC TTA CCC CTA CTA A	Humair et al. 2007	100
	Prunella	amino- TGA TGC TTA ACC CTA CCT A	Humair et al. 2007	100
	Sitta	amino- TAT ACA ACC TAA GCA TCC G	Humair et al. 2007	100
	Sylvia	amino- GCT CGA TCT TACT GGA G	Humair et al. 2007	500
	Troglodytes	amino- TGA TGC TTT ATA TAA CCC AAG	Humair et al. 2007	100
	Garrulus	amino- TTG ACA CTC TAT GCT ACC T	Humair et al. 2007	100

Tableau 7: Sondes utilisées pour la détection d'ADN d'hôtes.

8.5 Purification du produit amplifié par PCR, préparation au séquençage

Protocole suivi selon le fournisseur (Promega). Eluer dans 25µl d'H₂O nuclease free au lieu de 50µl.

1. Ajouter un volume égal de Membrane Binding Solution au produit PCR (40µl).
2. Placer une SV mini-colonne dans un tube de recollection
3. Ajouter le produit PCR à la colonne et attendre 1 minute.
4. Centrifuger à 16'000g pendant 1 minute. Enlever la SV mini-colonne du tube de recollection et jeter le liquide qui est dans le tube de recollection. Remettre la SV mini-colonne dans le tube de recollection
- 5 Laver la colonne en ajoutant 700µl de Membrane Wash Solution (MWS) à la mini-colonne. Centrifuger 1 minute à 16000g. Vider le tube de recollection et le replacer avec la SV mini-colonne. Répéter le lavage avec 500µl de MWS et centrifuger 5 minutes à 16000g.
- 6 Enlever la SV mini-colonne du tube de recollection et jeter le liquide qui est dans le tube de recollection et centrifuger à nouveau avec l'assemblage pendant 1 minute.
- 7 Transférer avec précaution la SV mini-colonne sur un eppendorf 1.5ml. Ajouter 25µl d'H₂O nuclease free. Incuber 1 minute à température ambiante. Centrifuger 1 minute à 16000g.
- 8 Jeter la SV mini-colonne et garder le tube eppendorf 1.5 ml. Conserver à 4°C.

9 Annexe 2

9.1 Matériel et solutions pour l'extraction d'ARN

9.1.1 Matériel

TRIZol: TRIZOL® reagent (Invitrogen, n°cat. 15596-026). Stocké à 4°C. Toxique en cas d'ingestion ou contact avec la peau. Contient du phénol et de l'isothiocyanate de guanidine.

Billes de Ø 3mm : en acier inox (SKF, n°cat. RB-3RS).

Vibro-broyeur MM 301(Retsch).

Microcentrifugeuse (Eppendorf).

Ethanol 75%: A préparer avec de l'eau DEPC (DiEthyl PyroCarbonate). Stocké à -20°C.

Isopropanol: Isopropanol for molecular biology (Acros organics, n°cat. 327270010). Stocké à -20°C.

Chloroforme: Chloroform for molecular biology. (Fluka, n°cat. 25668-100ML). Stocké à 4°C à l'abri de la lumière.

Eau Rnase free: MBG water (Qiagen, n°cat. 129115). Température ambiante.

Mercury Rnase free (ITF labortechnik, n°cat. 5454).

DEPC (Fluka, n°cat. 32490-25ml) Toxique en cas d'ingestion ou de contact avec la peau.

Eau de javel 5% (Migros).

9.1.2 Solutions

1 litre Eau traitée au DEPC

999 ml H₂O

1 ml DEPC

Bien mélanger, laisser reposer une nuit puis autoclaver.

9.2 Matériel pour l'extraction d'ADN

Hydroxyde d'ammonium (Sigma-Aldrich, n°cat. A6899).

Eau Rnase free: MBG water (Qiagen, n°cat. 129115). Température ambiante.

DNAzap (Ambion, n°cat. 9890).

9.3 Matériel pour PCR et PCR en temps réel pour la détection du TBEV

Thermocycler Biometra TGradient (Biometra).

iCycler (Biorad).

Mini centrifugeuse (Biolabo).

Taq DNA Polymerase 1000U (Qiagen, n°cat. 201205).

Superscript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, n°cat. 11732-020).

Amorces et sondes (www.microsynth.ch).

dNTP's 100mM (Promega, n°cat. U1420).

Eau Rnase/Dnase free: MBG water (Qiagen, n°cat. 129115). Température ambiante.

9.4 Matériel pour la RT-PCR de l'ARN en ADNc

Thermocycler Biometra TGradient (Biometra).

Random hexamers (Qiagen, n°cat. 79236) ou **Random primer** (Promega, n°cat. C1181).

dNTP 10mM (Promega, n°cat. U1420).

Eau RNase free (Qiagen, n°cat. 129115).

RNase Out (Invitrogen, cat. n°10777-019) ou **RNAsin** (Promega, n°cat. N2611).

Superscript II Reverse transcriptase (Invitrogen, n°cat. 18064-022) ou **M-MLV** (Promega, n°cat. M3682).

9.4.1 Solutions pour gel d'agarose 2%

2g d'agarose dans 100 ml de TBE 0.5X

3µl gel red

6µl d'échelle 100pb

10µl d'ADN amplifié mélangé à 2µl de tampon de charge 6x

9.4.2 Matériel pour la purification

Wizard® SV gel and PCR clean-up system (Promega, n°cat. A9281).

9.5 Matériel et solutions pour la RLB

9.5.1 Matériel

Thermocycler Biometra TGradient (Biometra).

Mini-four à hybridation OV1 (Biometra).

Four à hybridation/agitateur (Amersham).

Miniblotter MN45 (Immunetics, n°cat. MN45).

Foam cushions (Immunetics, n°cat. PC200).

Biodyne® C Membrane (Pall Europe Ltd., Portsmouth, UK, n°cat. 60251).

Streptavidin-POD-conjugate (Boehringer Mannheim, n°cat. 1089153).

ECL Detection liquid (Amersham International, n°cat. RPN2105).

Hyperfilm ECL (GE healthcare Europe GmbH, Otelfingen (Suisse), n°cat. 28906836, 18x24).

20x SSPE, 4 litres (Gibco BRL Life Technologies Inc., n°cat. 15591-035).

SDS particulièrement pur (BDH Chemicals Ltd., Poole, England, n°cat. 442444H).

EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl carbodiimide) (Sigma-Aldrich GmbH, n°cat. E7750). Stocké à -20°C.

9.5.2 Solutions

EDAC 16%

Dissoudre 1.6g d'EDAC dans 10 ml d'eau

NaHCO₃ 0.5M pH=8.4

Dissoudre 10.5g de NaHCO₃ dans 240 ml d'eau nanopure. Ajuster le pH à 8.4 avec du NaOH 2M. Ajouter de l'eau jusqu'à un volume final de 250 ml. Bouillir 10 minutes et stocker à température ambiante.

NaOH 10M

Dissoudre 10g de NaOH dans 25 ml d'eau. Stocker à température ambiante. Ne pas stocker dans une bouteille en verre !

SDS 10%

Dissoudre 10g de SDS dans 100 ml d'eau. Chauffer la solution pour la dissoudre. Stocker à température ambiante pendant 1 mois.

100 ml 2X SSPE / 0.1 % SDS

89 ml H₂O

10 ml SSPE 20X

1 ml SDS 10%

200 ml 2X SSPE / 0.5 % SDS

170 ml H₂O

20 ml SSPE 20X

10 ml SDS 10%

200 ml 2X SSPE

180 ml H₂O

20 ml SSPE 20X

EDTA 20mM pH=8

7,4g d'EDTA dans 800 ml d'eau.

Ajuster le pH à 8 avec du NaOH 100mM puis compléter à 1 litre avec de l'eau nanopure.

Autoclaver puis stocker à température ambiante pas plus d'une année.

10 Annexe 3

10.1 Génome du TBEV avec les différentes amorces utilisées

Le génome entier de la souche Neudoerfl (U27495) totalise 11'143 nucléotides.

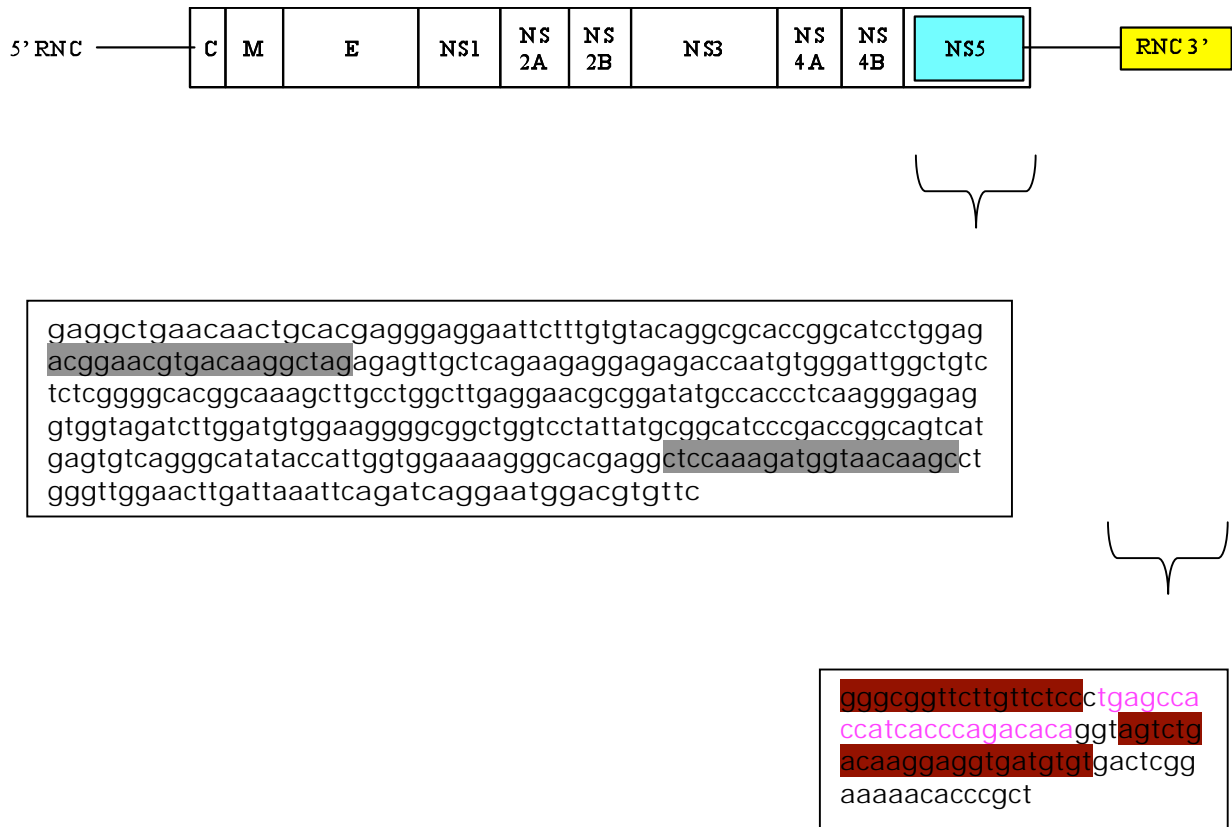


Figure 13 : Organisation du génome selon Heinz et Mandl (1993) modifiée avec les régions amplifiées (en bleu = gène NS5 et en jaune = région non codante en 3'). En gras, les amorces FSM1 et FSM2 qui amplifient 358 pb et en gris, les amorces FSM1i et FSM2i qui amplifient une partie du gène NS5 (252 pb). En brun, les amorces F-TBE1 et R-TBE1 amplifient une partie de la région non codante en 3' (68 pb) avec la sonde TBE-WT en rose.

11 Annexe 4

11.1 Relevé floristique dans les sites du canton de Berne

Liste des relevés floristiques par strates végétales recensées à Thun, Belp, Kiesen et Trimstein faites par René Amstutz (laboratoire sol et végétation, Université de Neuchâtel) (Tableaux 8 à 10). Elle se décompose en grands arbres, buissons hauts, buissons bas et herbacées.

Grands arbres	Noms latins	Noms vernaculaires
Thun	<i>Fraxinus excelsior</i>	frêne
	<i>Picea abies</i>	épicéa
	<i>Abies alba</i>	sapin blanc
	<i>Fagus sylvatica</i>	hêtre
	<i>Quercus sp.</i>	chêne
Belp	<i>Abies alba</i>	sapin blanc
	<i>Fagus sylvatica</i>	hêtre
Kiesen	<i>Abies alba</i>	sapin blanc
	<i>Fraxinus excelsior</i>	frêne
	<i>Fagus sylvatica</i>	hêtre
	<i>Picea abies</i>	épicéa
Trimstein	<i>Fagus sylvatica</i>	hêtre
	<i>Fraxinus excelsior</i>	frêne

Buissons hauts	Noms latins	Noms vernaculaires
Thun	<i>Ulmus sp.</i>	orme
	<i>Acer sp.</i>	érable
	<i>Fraxinus excelsior</i>	frêne
	<i>Abies alba</i>	sapin blanc
Belp	<i>Abies alba</i>	sapin blanc
	<i>Fagus sylvatica</i>	hêtre
Kiesen	<i>Fraxinus excelsior</i>	frêne
	<i>Acer sp.</i>	érable
	<i>Abies alba</i>	sapin blanc
	<i>Ulmus sp.</i>	orme
	<i>Fagus sylvatica</i>	hêtre
Trimstein	<i>Fagus sylvatica</i>	hêtre
	<i>Abies alba</i>	sapin blanc

Buissons bas	Noms latins	Noms vernaculaires
Thun	<i>Acer sp.</i>	érable
	<i>Fraxinus excelsior</i>	frêne
	<i>Lonicera xylosteum</i>	chèvrefeuille des haies
	<i>Cornus sanguinea</i>	cornouiller sanguin
	<i>Prunus spinosa</i>	épine noire
	<i>Prunus avium</i>	cerisier sauvage
	<i>Viburnum lantana</i>	viorne lantane
	<i>Viburnum opulus</i>	viorne obier
Belp	<i>Acer sp.</i>	érable
	<i>Fagus sylvatica</i>	hêtre
	<i>Fraxinus excelsior</i>	frêne
Kiesen	<i>Fraxinus excelsior</i>	frêne
	<i>Acer sp.</i>	érable
	<i>Fagus sylvatica</i>	hêtre
	<i>Coryllus avelana</i>	noisetier
	<i>Ulmus sp.</i>	orme
	<i>Lonicera periclymenum</i>	chèvrefeuille des bois
	<i>Cornus sanguinea</i>	cornouiller sanguin
	<i>Ligustrum vulgare</i>	troène vulgaire
<i>Prunus avium</i>	cerisier sauvage	
Trimstein	<i>Fagus sylvatica</i>	hêtre
	<i>Fraxinus excelsior</i>	frêne

Tableau 8 : Relevé floristique des grands arbres, buissons hauts, et buissons bas à Thun, Belp, Kiesen et Trimstein.

Herbacées	Noms latins	Noms vernaculaires
Thun	<i>Carex alba</i>	laiche blanche
	<i>Epipactis atrorubens</i>	épipactis pourpre noirâtre
	<i>Ligustrum vulgare</i>	troène vulgaire
	<i>Rubus saxatilis</i>	ronce des rochers
	<i>Rubus caesius</i>	ronce bleuâtre
	<i>Aquilegia vulgaris</i>	ancolie
	<i>Fragaria vesca</i>	fraise des bois
	<i>Aegopodium podagraria</i>	égopode podagraire
	<i>Brachypodium sylvatica</i>	brachypode des forêts
	<i>Carex flacca</i>	laiche glauque
	<i>Melica uniflora</i>	mélique uniflore
	<i>Polygonum verticillatum</i>	sceau de Salomon
	<i>Carex digitata</i>	laiche digitée
	<i>Arunco dioicus</i>	reine des bois
	<i>Daphne mezereum</i>	bois gentil
	<i>Eupatorium cannabinum</i>	eupatoire chanvrine
	<i>Aconitum vulparia</i>	aconit tue-loup
	<i>Angelica sylvestris</i>	angélique des bois
	<i>Knautia dipsacifolia</i>	knautie à feuille de cardère
	<i>Poa trivialis</i>	paturin commun
	<i>Trifolium pratense</i>	trèfle des prés
	<i>Deschampsia cespitosa</i>	canche gazonnant
	<i>Potentilla erecta</i>	potentille dressée
<i>Campanula trachelium</i>	campanule gantelée	
<i>Viola reichenbachiana</i>	violette	
<i>Dactylis glomerata</i>	dactyle aggloméré	
<i>Majanthemum bifolium</i>	maienthème à deux feuilles	
Belp	<i>Mercurialis perennis</i>	mercuriale vivace
	<i>Paris quadrifolia</i>	parisette à quatre feuille
	<i>Gallium odoratum</i>	gaillet odorant
	<i>Fragaria vesca</i>	fraise des bois
	<i>Hedera helix</i>	lierre
	<i>Oxalis acetosella</i>	pain de coucou
	<i>Circaea lutetiana</i>	herbe aux sorcières
	<i>Arum maculatum</i>	gouet
	<i>Dryopteris filix-mas</i>	fougère mâle
	<i>Polygonatum odoratum</i>	sceau de Salomon
	<i>Allium ursinum</i>	ail des ours
	<i>Lapsana communis</i>	lapsane commune
	<i>Viola reichenbachiana</i>	violette
	<i>Lathyrus vernus</i>	gesse du printemps
	<i>Geranium robertianum</i>	géranium herbe à robert

Tableau 9 : Relevé floristique des herbacées à Thun et Belp.

Herbacées	Noms latins	Noms vernaculaires
Kiesen	<i>Carex sylvatica</i>	laiche des forêts
	<i>Circaea lutetiana</i>	herbe aux sorcières
	<i>Mercurialis perennis</i>	mercuriale vivace
	<i>Lamium galeobdolon</i>	lamier jaune
	<i>Brachypodium sylvatica</i>	brachypode des forêts
	<i>Aegopodium podagraria</i>	égopode podagraire
	<i>Stachys sylvatica</i>	épière des forêts
	<i>Geum urbanicum</i>	benites des villes
	<i>Rubus caesius</i>	ronce bleuâtre
	<i>Carex pendula</i>	laiche à épis pendants
	<i>Deschampsia cespitosa</i>	canche gazonnant
	<i>Aconitum vulparia</i>	aconit tue-loup
	<i>Prunella vulgaris</i>	brunelle vulgaire
	<i>Ranunculus lanuginosus</i>	renoncule laineuse
	<i>Oxalis acetosella</i>	pain de coucou
	<i>Oxalis corniculata</i>	oxalis corniculé
	<i>Polygonum verticillatum</i>	sceau de Salomon
	<i>Knautia dipsacifolia</i>	knautie à feuille de cardère
	<i>Gallium odoratum</i>	gaillet odorant
	<i>Viola reichenbachiana</i>	violette
<i>Impatiens parviflora</i>	impatiente à petites fleurs	
<i>Hedera helix</i>	lierre	
<i>Dryopteris filix-mas</i>	fougère mâle	
<i>Phyteuma spicatum</i>	raiponce en épi	
<i>Quercus sp.</i>	chêne	
<i>Viburnum lantana</i>	viorne lantane	
<i>Polygonatum odoratum</i>	sceau de Salomon	
<i>Angelica sylvestris</i>	angélique des bois	
<i>Aquilegia vulgaris</i>	ancolie	
Trimstein	<i>Gallium odoratum</i>	gaillet odorant
	<i>Arum maculatum</i>	gouet
	<i>Viola reichenbachiana</i>	violette
	<i>Polygonum verticillatum</i>	sceau de Salomon
	<i>Prunus avium</i>	cerisier sauvage
	<i>Allium ursinum</i>	ail des ours
	<i>Luzula sylvatica</i>	luzule des forêts
	<i>Lamium galeobdolon</i>	lamier jaune
	<i>Phyteuma spicatum</i>	raiponce en épi
	<i>Carex sylvatica</i>	laiche des forêts
	<i>Geum urbanicum</i>	benites des villes
	<i>Circaea lutetiana</i>	herbe aux sorcières
<i>Geranium robertianum</i>	géranium herbe à robert	

Tableau 10 : Relevé floristique des herbacées à Kiesen et Trimstein.

9.2 Récoltes de tiques supplémentaires dans le canton de Berne

Les sites où des tiques infectées par le virus du TBE ont été récoltées sont en rouge.

Lieu	ID	Date	Coord X start	Coord Y start	Coord X stop	Coord Y stop	Nymphes	Femelles	Mâles	Total
Thun	Tht1	26.10.06	612846	174402	613079	174144	0	3	2	5
Thun	Tht2	12.04.07	612845	174577	612819	174572	1	2	1	4
Thun	Tht3	12.04.07	612751	174449	612302	174494	8	0	1	9
Thun	Tht4	12.04.07	612750	174507	612758	174515	6	1	1	8
Thun	Tht5	12.04.07	612761	174521	612727	174605	3	1	0	4
Thun	Tht6	10.05.07	612399	174629	612425	174685	7	2	2	11
Thun	Tht7	10.05.07	612425	174685	612434	174678	3	4	2	9
Thun	Tht8	10.05.07	612449	174611	612473	174627	1	0	2	3
Thun	Tht9	10.05.07	612413	174756	612424	174769	10	3	0	13
Thun	Tht10	10.05.07	612386	174752	612907	174861	5	0	0	5
Thun	Tht11	24.05.07	612957	174240	612974	174259	11	3	7	21
Thun	Tht12	24.05.07	612835	174404	612846	174364	32	3	1	36
Thun	Tht13	24.05.07	612854	174287	612337	174244	17	3	8	28
Thun	Tht14	15.06.07	611362	175766	611362	175762	9	4	3	16
Thun	Tht15	15.06.07	611636	175352	611566	175318	10	0	3	13
Thun	Tht16	15.06.07	611557	175340	611569	175310	21	1	3	25
Thun	Tht17	15.06.07	611592	175289	611674	175273	13	16	6	35
Thun	Tht18	15.06.07	611711	175277	611699	175284	15	17	13	45
Thun	Tht19	18.07.07	613110	174291	613097	174302	0	1	0	1
Thun	Tht20	15.08.07	613206	174375	613205	174356	1	1	1	3
Thun	Tht21	15.08.07	613346	174060	613405	173904	0	3	2	5
Thun	Tht22	12.09.07	613213	173849	613211	173821	0	1	0	1
Thun	Th A1 A2 N1	08.05.08	613190	174029	613197	174072	1	1	3	5
Thun	Th A3 A4 N2	08.05.08	613176	174091			2	2	1	5
Thun	Th A5 A6 N3	08.05.08	613161	174156	613144	174214	2	1	2	5
Thun	Th A7 A8 N4	08.05.08	613080	174326			8	5	3	16
Thun	Th A31 A32 N16	21.05.08	613080	174326	613176	174091	7	3	2	12
Thun	Th A33 A34 N17	21.05.08	613161	174156	613144	174214	18	2	4	24
Thun	Th A35-38 N18	22.05.08	605369	1900660	613193	174136	3	7	8	18
Thun	Th A46-47 N23	23.06.08	613000	174849	613397	174668	15	3	3	21
Thun	Th A75	25.06.08	613210	174328	613261	174265	39	3	3	45
Thun	Th A76	25.06.08	611536	175633			13	9	7	29
Thun	Th A83	29.07.08	612721	174617	613029	174208	58	4	6	68
Thun	Th A88	19.08.08	613190	174946	613740	174416	2	3	5	10
Thun	Th A89	11.09.08	612950	173906	613111	173977	72	10	13	95
Thun	Th A89	23.09.08	612950	173906	613111	173977	44	4	7	55
Thun	Th A91	14.10.08	613514	173677	613253	173884	0	0	1	1

Tableau 11 : Nombre de tiques (nymphes, mâles, femelles) récoltées à différents endroits de la forêt de Thun.

Lieu	ID	Date	Coord X start	Coord Y start	Coord X stop	Coord Y stop	Nymphes	Femelles	Mâles	Total
Belp	Bpt1	26.10.06	605414	190608	605425	190413	3	0	0	3
Belp	Bpt2	12.04.07	605451	190666	605412	190624	9	0	0	9
Belp	Bpt3	12.04.07	605402	190776	605403	190787	3	7	5	15
Belp	Bpt4	12.04.07	605365	190833	605369	190851	6	2	1	9
Belp	Bpt5	12.04.07	605369	190884	605371	190926	1	3	3	7
Belp	Bpt6	12.04.07	605369	190926	605312	191037	0	1	1	2
Belp	Bpt7	10.05.07	605182	191669	605196	191638	6	10	14	30
Belp	Bpt8	10.05.07	605191	191642	605199	191586	6	7	4	17
Belp	Bpt9	10.05.07	605221	191535	605207	191519	7	8	7	22
Belp	Bpt10	10.05.07	605227	191865	605254	191860	5	11	10	26
Belp	Bpt11	24.05.07	605383	190885	605441	191039	12	9	3	24
Belp	Bpt12	24.05.07	605437	191259	605380	191138	8	8	16	32
Belp	Bpt13	24.05.07	605506	191230	605467	191305	8	5	16	29
Belp	Bpt14	18.07.07	605558	192346	605533	192368	1	0	2	3
Belp	Bpt15	18.07.07	605488	192313	605513	192179	1	0	1	2
Belp	Bpt16	15.08.07	605398	190378	605387	190431	2	1	0	3
Belp	Bpt17	15.08.07	605338	190442	605278	190419	11	5	6	22
Belp	Bpt18	15.08.07	605271	190379	605207	190238	0	1	1	2
Belp	Bpt19	12.09.07	605621	190776	605554	190736	1	1	0	2
Belp	Bpt20	12.09.07	605579	191016	605578	191146	9	0	2	11
Belp	Bpt21	12.09.07	605615	191160	605550	191191	12	0	0	12
Belp	Bp A23 N12	08.05.08	605443	190943	605394	191109	4	0	4	8
Belp	Bp A24 A25 N13 N14	08.05.08	605385	191167	605446	191176	31	2	3	36
Belp	Bp A26-30 N15	08.05.08	605516	191274	605449	191214	8	13	9	30
Belp	Bp A39-43 N19	21.05.08	605369	190660	605326	190723	20	7	13	40
Belp	Bp N20	21.05.08	605408	190651	605407	190648	16	0	0	16
Belp	Bp A44-45 N21-22	22.05.08	605389	1900613	605362	190509	27	1	3	31
Belp	Bp A56-57 N33	23.06.08	605264	192024	605178	191749	16	2	2	20
Belp	Bp A58 N34	23.06.08	605336	191111	605371	190940	15	1	0	16
Belp	Bp A77	25.06.08	605285	191925	605329	191957	7	0	0	7
Belp	Bp A78	29.07.08	605398	191072	605457	191171	45	2	3	50
Belp	Bp A79	29.07.08	605380	191057	605457	190895	80	10	7	97
Belp	Bp A84	19.08.08	605466	192300	605561	192228	4	2	0	6
Belp	Bp A90	23.09.08	605601	190844	605612	190717	27	0	0	28
Belp	Bp A94	14.10.08	605367	190511	605424	190532	9	1	0	10

Tableau 12 : Nombre de tiques (nymphes, mâles, femelles) récoltées à différents endroits de la forêt de Belp.

11. Annexe 4

Lieu	ID	Date	Coord X start	Coord Y start	Coord X stop	Coord Y stop	Nymphes	Femelles	Mâles	Total
Kiesen	Kit1	26.10.06	611567	184359	611455	184228	0	2	0	2
Kiesen	Kit2	26.10.06	611495	184175	611490	184099	3	1	2	6
Kiesen	Kit3	29.03.07	611131	184259	611128	184762	4	6	3	13
Kiesen	Kit4	29.03.07	611138	184194	611153	184209	9	0	3	12
Kiesen	Kit5	12.04.07	610992	184187	611001	184188	4	3	1	8
Kiesen	Kit6	12.04.07	611001	184188	610924	184130	5	2	0	7
Kiesen	Kit7	12.04.07	610904	184111	610377	184117	5	3	0	8
Kiesen	Kit8	12.04.07	610871	184148	610869	184185	13	3	5	21
Kiesen	Kit9	10.05.07	612906	174856	611203	183960	16	5	4	25
Kiesen	Kit10	10.05.07	611255	183965	611299	183997	10	10	7	27
Kiesen	Kit11	10.05.07	611314	183937	611305	183891	9	5	10	24
Kiesen	Kit12	10.05.07	611340	183856	611394	183875	24	7	7	38
Kiesen	Kit13	10.05.07	611471	184011	611429	183954	16	9	7	32
Kiesen	Kit14	24.05.07	611515	184165	611464	184244	16	4	10	30
Kiesen	Kit15	24.05.07	611529	184248	611465	184355	9	2	8	19
Kiesen	Kit16	24.05.07	611447	184272	611520	184295	9	6	4	19
Kiesen	Kit17	15.06.07	611642	175356	611225	184095	0	4	6	10
Kiesen	Kit18	15.06.07	611275	183999	611310	183924	49	8	6	63
Kiesen	Kit19	15.06.07	611351	183997	611335	184006	22	11	8	41
Kiesen	Kit20	18.07.07	611358	184012	611360	184084	5	6	5	16
Kiesen	Kit21	18.07.07	611115	184190	611112	184201	0	0	1	1
Kiesen	Kit22	18.07.07	611178	184216	611214	184217	2	1	0	3
Kiesen	Kit23	18.07.07	611226	184280	611298	184254	1	1	0	2
Kiesen	Kit24	15.08.07	613406	174012	611362	184243	3	0	0	3
Kiesen	Kit25	12.09.07	611332	184014	611411	183889	1	1	0	2
Kiesen	Kit26	12.09.07	611359	183996	611323	184073	4	1	2	7
Kiesen	Kit27	12.09.07	611318	183963	611320	183929	7	1	0	8
Kiesen	Kit28	12.09.07	611290	183861	611383	183850	3	0	0	3
Kiesen	Ki A9-12 N5	08.05.08	611200	184388	610974	184217	9	8	7	24
Kiesen	Ki A13 A14 A15 N6	08.05.08	611004	184258	611060	184235	8	6	8	22
Kiesen	Ki A16-18 N7-9	08.05.08	611046	184174	611049	184147	64	6	10	80
Kiesen	Ki A48-50 N24-26	23.06.08	611124	184208	611196	184196	44	5	11	60
Kiesen	Ki A51-53 N27-29	23.06.08	611278	184283	611374	184287	49	4	8	61
Kiesen	Ki A81	29.07.08	610855	184068	611004	184202	28	3	0	31
Kiesen	Ki A82	29.07.08	611029	184257	610966	184264	2	6	6	14
Kiesen	Ki A86	19.08.08	611473	184240	611475	184149	12	4	3	19
Kiesen	Ki A87	19.08.08	611494	184291	611486	184385	5	2	0	7
Kiesen	Ki A92	14.10.08	611224	183972	611090	184240	11	8	5	24
Trimstein	Trit1	26.10.06	610221	193550	610339	193493	7	2	1	10
Trimstein	Trit2	29.03.07	611102	184191	610188	193524	0	1	1	2
Trimstein	Trit3	29.03.07	610198	193495	610194	193452	2	0	0	2
Trimstein	Trit4	12.04.07	610221	193555	610214	193558	9	1	0	10
Trimstein	Trit5	12.04.07	610214	193558	610238	193574	3	0	0	3
Trimstein	Trit6	12.04.07	610177	193554	610181	193554	1	0	1	2
Trimstein	Trit7	12.04.07	610181	193554	610215	193498	6	1	1	8
Trimstein	Trit8	10.05.07	610272	193426	610311	193412	5	0	0	5
Trimstein	Trit9	10.05.07	610335	193441	610302	193513	18	1	0	19
Trimstein	Trit10	10.05.07	610314	193507	610248	193549	7	1	1	9
Trimstein	Trit11	24.05.07	610157	193558	610184	193497	10	0	1	11
Trimstein	Trit12	24.05.07	610191	193514	610206	193524	2	3	2	7
Trimstein	Trit13	15.06.07	610203	193431	610231	193490	4	8	3	15
Trimstein	Trit14	15.06.07	610228	193423	610227	193395	5	0	1	6
Trimstein	Trit15	15.06.07	610233	193381	610269	193400	5	2	0	7
Trimstein	Trit16	18.07.07	610184	193562	610204	193534	3	0	0	3
Trimstein	Trit17	15.08.07	610227	193487	610203	193422	3	0	0	3
Trimstein	Trit18	12.09.07	611399	183897	610283	193649	4	1	0	5
Trimstein	Tri A19 A20 N10	08.05.08	610221	193551	610246	193543	2	1	4	7
Trimstein	Tri A21 A22 N11	08.05.08	610213	193479	610222	193424	18	2	2	22
Trimstein	Tri N30	23.06.08	610283	193436	610205	193491	16	0	0	16
Trimstein	Tri A54-55 N31-32	23.06.08	610290	193444	610370	193459	26	1	2	29
Trimstein	Tri A80	29.07.08	600222	193402	610196	193462	52	2	1	55
Trimstein	Tri A85	19.08.08	610267	193380	610295	193309	14	2	1	17
Trimstein	Tri A93	14.10.08	610210	193467	610182	193533	3	0	1	4

Tableau 13 : Nombre de tiques (nymphes, mâles, femelles) récoltées à différents endroits des forêts de Kiesen et Trimstein.