

963/1

Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel, Suisse

Aspects nouveaux du rôle de vecteur joué par *Ixodes ricinus* L. en Suisse¹

Note préliminaire

A. AESCHLIMANN², W. BURGENDORFER³, H. MATILE⁴, O. PETER², R. WYLER⁴

Summary

Title: New aspects of the part of the vector played by *Ixodes ricinus* L. in Switzerland. Preliminary note

The authors, after having recalled their recent work on *Ixodes ricinus* ecology, give the new results about the part played by this species in the transmission of different infectious agents in Switzerland. *I. ricinus* was already known to be the most important vector of the tick borne encephalitis virus, and of protozoans of the *Babesia* genus. In this article, we describe the existence in the hemolymph of different *I. ricinus* populations, of a rickettsia species related to the RMST group (Rocky-Mountain Spotted Fever), of a trypanosome, which is close to *T. theileri*, and of an infectious larval form (L3) of *Dipetalonema rugosicauda*. An outline is suggested with the object of illustrating the functioning of a natural foci of tick encephalitis. The biological significance of the unusual presence of trypanosomes and of larval filariae in ticks is also discussed. The authors underline the fact that rickettsia, trypanosomes and filarial forms are observed for the first time in Swiss *I. ricinus*.

Key words: *Ixodes ricinus*; tick borne encephalitis; rickettsia; trypanosomes; filariae.

¹ Travail effectué avec l'aide du Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique, Requête No. 3.303.78

² Institut de Zoologie, Neuchâtel

³ Rocky Mountain Laboratory, Hamilton, Montana USA

⁴ Institut de Virologie, Zurich

Correspondance: Prof. Dr A. Aeschlimann, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel, CH-2000 Neuchâtel 7

Introduction

Dans un précédent travail, et exprimé dans son sens très général, nous posons la question de savoir si les tiques de Suisse transmettaient des agents pathogènes (Aeschlimann et al., 1969). Depuis lors, l'inventaire des espèces d'Ixodoïdes récoltés en Suisse a été établi. Il ressort de cette étude qu'*Ixodes ricinus* est la tique la plus répandue. Elle colonise tous les milieux où la végétation offre les conditions microclimatiques nécessaires à sa survie. On la trouvera donc dans des biotopes où le couvert végétal est abondant: forêts à riche sous-bois, bosquets, buissons, haies, etc. *I. ricinus* est rare dans les pâturages à ciel ouvert; il disparaît dans les champs cultivés; sa limite de distribution en altitude ne dépasse guère 1200 m (Aeschlimann, 1972). L'espèce s'accommode d'hôtes aussi divers que les reptiles, les oiseaux et les mammifères les plus variés.

En 1969, à la suite des résultats d'études entreprises dans les pays limitrophes, on pouvait admettre qu'*I. ricinus*, en Suisse aussi, jouait un rôle dans la transmission d'agents pathogènes, particulièrement du virus de l'encéphalite à tiques (Frühsoommer-Meningoenzephalitis: FSME) et des babésies. Nous avons donc élaboré un programme de recherches destiné à démontrer qu'*I. ricinus* est porteur de tels agents pathogènes. Les observations enregistrées à ce jour laissent supposer qu'*I. ricinus* joue également un rôle important dans l'épidémiologie d'autres microorganismes que ceux évoqués ci-dessus. Aussi, cet article est-il destiné à présenter nos premiers résultats et à les comparer avec les données de la littérature.

Virus à tiques (FSME)

En 1969 déjà, Krech et al. ainsi que Spiess et al. ont rapporté quelques cas cliniques et sérologiques de FSME. Cependant, c'est en 1972 seulement que le virus est isolé par Wandeler et al., mais à partir du cerveau d'un chien. En 1973, Wandeler et al. récolte le sérum de carnivores sauvages: 91 des 560 séras examinés présentent des anticorps contre le virus FSME. Enfin, Wyler et al., toujours en 1973, isole pour la première fois le virus à partir de tiques récoltées sur la végétation dans la région de Schaffhouse (voir aussi Schmidtke, 1973 et Radda et al., 1974). Depuis lors, des anticorps FSME ont été mis en évidence dans des séras humains provenant des régions de Schaffhouse, Winterthour, Thoune et Neuchâtel (Munzinger et al., 1977). L'un des auteurs du présent article⁵ a d'autre part isolé une souche de virus FSME à partir d'un *Apodemus flavicolis* et des anticorps ont été repréérés dans le sang de 4 autres rongeurs (1 *Clethrionomys glareolus* et 3 *Microtus agrestis*). Ces mammifères provenaient de la région de Thoune (Zwieselberg).

L'ensemble des résultats évoqués ci-dessus démontre que le virus FSME est installé en Suisse dans divers foyers, par ailleurs écologiquement caractéris-

⁵ Certains des résultats présentés dans ce chapitre font l'objet de la thèse de H. Matile.

Tiques ditropes et tétotropes
(exophilites)

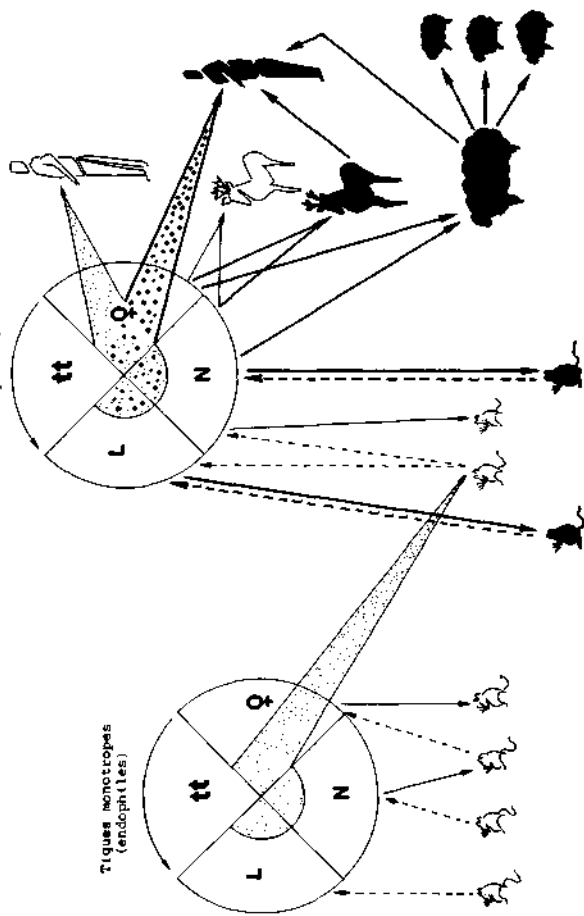


Fig. 1. *Fonctionnement de chaînes épidémiologiques.* Une population de tiques monotropes (grande spécificité parasitaire) et endophilites (vivant cachées, dans des terriers, galeries, etc.) accompli son cycle entier sur des micromammifères, des rongeurs par exemple. Si les hôtes sont réservoirs du virus de l'encéphalite, un foyer naturel sauvage s'établit. Si larves et nymphes se nourrissent sur des animaux infectés, elles transmettront respectivement comme nymphes ou comme adultes (—→ = repas infectieux; - - -→ = repas infectieux). La transmission transovarienne (tt) assurera l'infectiosité des larves de la génération suivante. Sans l'intervention de tiques d'autres espèces, ce foyer naturel fonctionnera en circuit fermé. Mais si des immatures de tiques ditropes (les immatures parasitent des vertébrés de petite taille, les adultes des vertébrés de grande taille) ou tétotropes (sans spécificité parasitaire), pratiquant l'exophilite (les tiques attendent à l'affût sur les herbes l'hôte de passage), se nourrissent sur des rongeurs infectés par l'un ou l'autre stade évolutif de tiques monotropes (cette infection est représentée par une zone pointillée sur la figure), le foyer (origine) va donner naissance à d'autres foyers par le fait que ces tiques, en général des nymphes et des adultes, devenues à leur tour infectées, peuvent être transportées au loin par divers animaux. On parle alors de «pulsations» du foyer. L'homme entre par hasard dans la chaîne épidémiologique et contracte la maladie. Cet exemple pourrait très bien fonctionner avec *Axodes trianguliceps* comme tique monotrope-endophile, et *Lxodes ricinus* comme tique (tétrope-exophile. - Flèches et pointillés fins, animaux et homme blancs = exemple de l'encéphalite à tiques. Flèches et pointillés gras, animaux et homme noirs = exemple de la fièvre-Q. Dans ce cas, remarquez l'infection possible des moutons entre eux (et de l'homme) par le contact direct ou par aérosols.

tiques pour *I. ricinus*. Tout laisse supposer que cette tique est le vecteur et assure la transmission du virus à l'homme, à des animaux domestiques (chien) et à des animaux sauvages (carnivores, rongeurs). Comme les carnivores et les rongeurs sont également les hôtes d'autres tiques du genre *Ixodes* (*I. hexagonus* pour les premiers et *I. trianguliceps* pour les seconds), on ne doit pas négliger le rôle possible que ces espèces endophiles pourraient jouer dans la circulation du virus dans la nature.

La Fig. 1 et sa légende renseigne le lecteur sur notre hypothèse de travail. D'autres travaux sont donc indispensables pour mieux comprendre la distribution et l'écologie de ce virus dans les conditions suisses. Il faut cependant souligner que si nos connaissances à ce sujet restent encore minces, c'est que l'encéphalite à tiques n'apparaît toujours pas, dans notre pays, comme une maladie aussi importante qu'en Europe centrale.

Rickettsies

1. *Coxiella burnetii*. La «Q-fever» est la seule rickettsiose connue en Suisse. Encore l'histoire naturelle de ce microorganisme n'a-t-elle pas été étudiée. En principe, tous les cas humains signalés (environ 120 cas par année) sont dus à la manipulation d'animaux domestiques infectés (bovins, ovins, caprins). En effet, l'infection se fait par aérosol et il est inutile de rappeler ici la très grande résistance de *Coxiella burnetii* aux conditions externes défavorables. La rickettsie survit donc pour de longues périodes dans le milieu ambiant, permettant la résurgence brutale et accidentelle de l'infection chez l'homme alors que la source primaire (les animaux domestiques infestés) a été éloignée depuis longtemps.

Cependant, la présence de *C. burnetii* a été démontrée dans *Dermacentor reticulatus* en Allemagne voisine (Liebisch et al., 1978). Brossard et Aeschlimann (1976) ont d'autre part obtenu une souche de cette rickettsie à partir du rongeur *Clethrionomys glareolus* et ont réussi son passage par *I. ricinus*. On peut donc concevoir pour *C. burnetii*, moyennant quelques modifications, un cycle naturel en Suisse comparable à celui envisagé pour le virus FSME. Ceci reste évidemment à démontrer (Fig. 1).

2. *Autres microorganismes de la famille des Rickettsias*. D'autres microorganismes de «type rickettsien» ont pu être mis en évidence dans *I. ricinus*, comme le démontre le Tableau 1 et la Fig. 2. En fait, selon le biotope où les tiques ont été capturées, le pourcentage d'infection d'*I. ricinus* par des agents rickettsiens varie de 1,8–11,7%⁶.

L'identification de ces microorganismes n'a pas encore été établie mais, par immunofluorescence directe, une parenté avec les rickettsies de la fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses a été démontrée. Nous n'oublions pas que

⁶ Certains des résultats présentés dans ce chapitre font l'objet de la thèse d'O. Peter.

Tableau 1. Présence de microorganismes de type rickettsien dans les Tiques *Ixodes ricinus* capturées sur la végétation de plusieurs régions de Suisse

Lieu	Nombre de tiques examinées	Nombre de tiques positives	%
Bois d'Hôpital NE	11 NN	3	3.9
	131 ♂♂	8	
	179 ♀♀	5	
Staatswald BE	520 NN	38	8.3
	421 ♂♂	27	
	903 ♀♀	88	
Le Chablais BE	230 ♂♂	19	9.2
	420 ♀♀	41	
Seewald BE	273 NN	27	11.7
	116 ♂♂	15	
	411 ♀♀	53	
Schachenwald ZG	34 NN	2	6.7
	96 ♂♂	9	
	123 ♀♀	6	
Sins AG	57 ♂♂	1	1.8
	65 ♀♀	1	
Kappel ZH	9 ♂♂	1	7.7
	4 ♀♀		
Winzwilen ZG	5 ♂♂		
Chamauwald ZG	4 ♂♂		
	3 ♀♀		
Totaux	4104	344	8.3

NN = Résultats basés sur l'étude de frottis des tissus de nymphes

♂♂ } = Résultats basés sur l'étude de l'hémolymphe des tiques adultes
 ♀♀ }

d'autres collègues (Rehacek et al., 1976) ont décrit, sous le nom de *R. slovacca*, une rickettsie observée dans *D. marginatus*. Bien entendu, rien n'est connu sur l'éventuelle pathogénicité des rickettsies que nous avons trouvées dans les *I. ricinus* de Suisse. On pourrait supposer que les rongeurs leur servent de réservoirs.

Protozoaires

1. *Babésies*. Nous avons publié ailleurs quelques réflexions sur les babésies de Suisse (Aeschlimann et al., 1975). Nous n'y reviendrons que pour mémoire, afin de rappeler que les rongeurs (*Apodemus sylvaticus* et *flavicolis*, *Clethrionomys glareolus* et *Microtus arvalis*) hébergent régulièrement ces hématozoaires. Aucun essai de transmission par les tiques inféodées à ces rongeurs (immatures

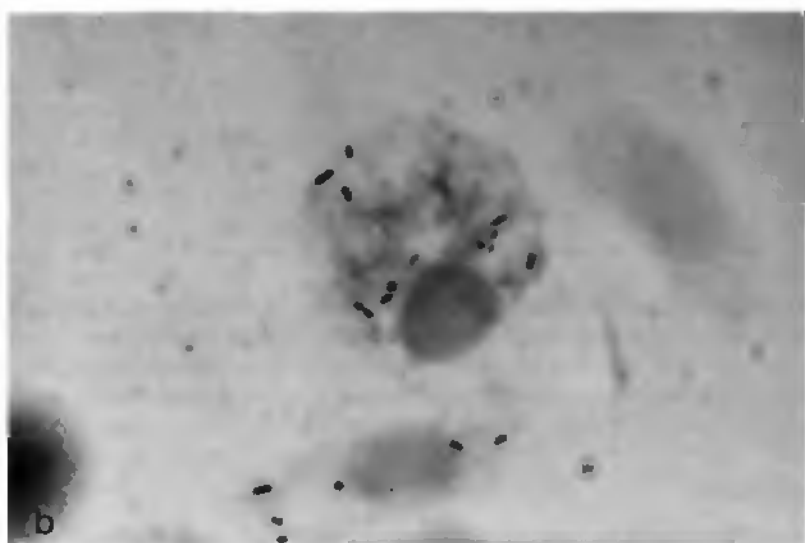


Fig. 2. Microorganismes de type rickettsien dans *Ixodes ricinus*. Coloration: Gimenez. a) Frotis de l'hypoderme montrant une forte population d'agents rickettsiens. Observer le pléomorphisme des microorganismes. Agr. 2200 \times . b) Hémocyte avec «rickettsies». 4400 \times .

Tableau 2. Présence de Trypanosomes et de Microfilaires L₃ dans l'hémolymphe de tiques *Ixodes ricinus* adultes

Lieu	Nombre de tiques examinées	Nombre de tiques positives	%
Trypanosome (<i>T. theileri</i>)			
Staatswald BE	1324	2	0,15
Le Chablais BE	650	1	0,15
Seewald BE	527	2	0,37
Totaux	2501	5	0,19
Microfilaire L₃ (<i>Dipetalonema rugosicauda</i>)			
Staatswald BE	124	6	4,8
<i>Remarque:</i> Seules 124 tiques sur 1324 furent disséquées; 6 tiques présentaient des microfilaires L ₃ , soit 4 ♂♂ avec 2 L ₃ chacun et 2 ♀♀ avec 1 L ₃ chacune.			

d'*I. ricinus* et tous les stades évolutifs d'*I. trianguliceps*) n'a été jusqu'ici tenté en Suisse. D'autre part, nous n'avons pas encore réussi à «visualiser» des babésies dans les tiques capturées dans le terrain. Rappelons cependant les travaux de Morisod et al. (1972) et de Brossard (1976) sur la transmission, dans notre pays, de babésioses du bétail par *I. ricinus*.

2. *Trypanosomes*. L'examen de l'hémolymphe des tiques a permis d'y découvrir des trypanosomes, il est vrai dans un très petit nombre de cas seulement (Tab. 2). La présence de trypanosomes dans les tiques constitue un problème qui apparaît sporadiquement dans la littérature (voir l'article de synthèse publié par Krinsky et Burgdorfer, 1976). Deux hypothèses sont possibles.

a) *Trypanosoma theileri*. On admet généralement que l'évolution de ce protozoaire dans la tique (on observe souvent des formes en division dans l'hémolymphe; Fig. 3) ne s'achève pas par la production de formes infectieuses (Hoare, 1972). La tique représenterait donc un cul-de-sac pour *T. theileri*. Cependant, dans des travaux récents, divers auteurs (Burgdorfer et al., 1973), ont mis en évidence l'existence d'un cycle de trypanosomes dans les tiques, ce qui peut laisser supposer que ces Arthropodes sont mieux que de simples cul-de-sac pour ces Flagellés. Les tiques joueraient-elles, aux côtés des Tabanides, un rôle dans la transmission de *T. theileri*? Il est possible que les trypanosomes rencontrés chez *I. ricinus* appartiennent à *T. theileri*. Ceci serait d'autant moins étonnant qu'on a démontré la présence massive de *T. theileri* dans des bovins de Suisse orientale (Metzler, 1975). Rappelons que cette espèce de protozoaire parasite également les chevreuils, hôtes fréquents d'*I. ricinus*.

b) *Autres trypanosomes*. Il faut évoquer ici le fait que des trypanosomes se rencontrent souvent sur des rongeurs infestés de tiques, tout en sachant que les puces sont rendues responsables de leur transmission. On ne peut cependant éliminer définitivement l'hypothèse que des trypanosomes de rongeurs puissent également se multiplier dans les tiques du genre *Ixodes*.

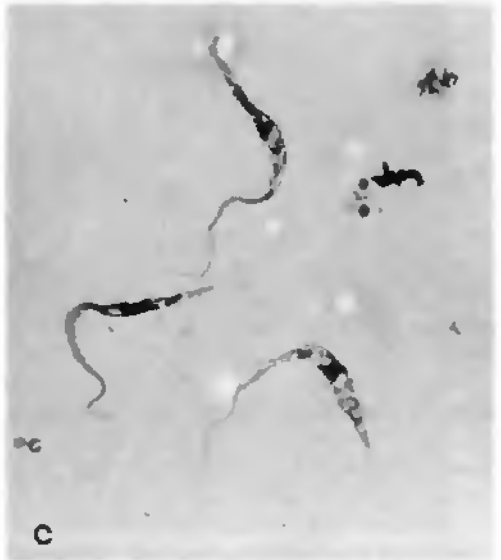
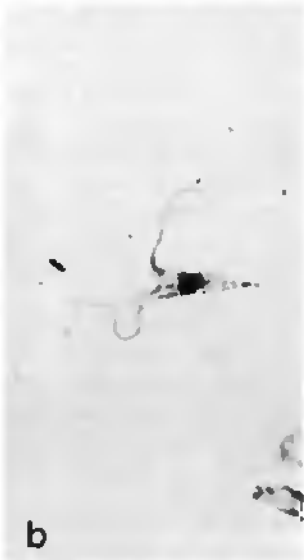
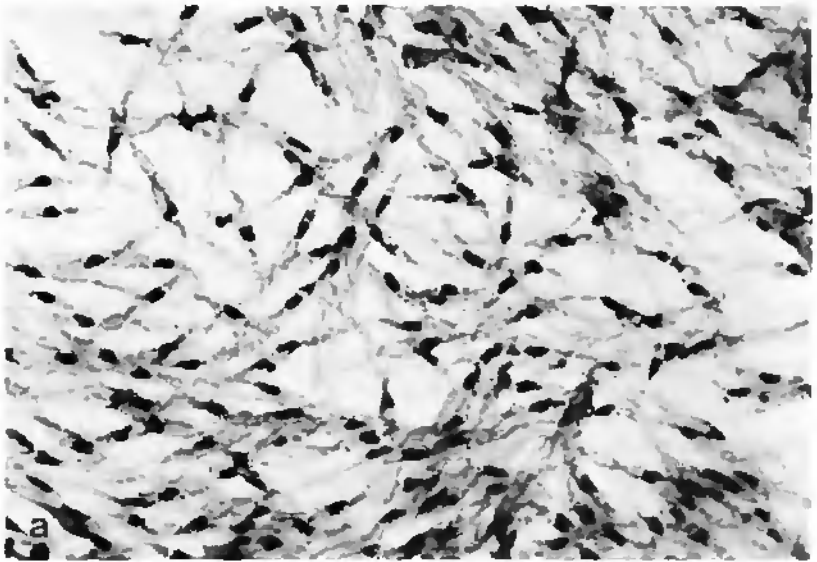


Fig. 3. Trypanosomes (*T. theileri* ?) dans l'hémolymphe d'*Ixodes ricinus*. Coloration: Giemsa. 2200× a) Colonie de trypanosomes. b) Forme en division. c) Trypomastigote et épimastigote.

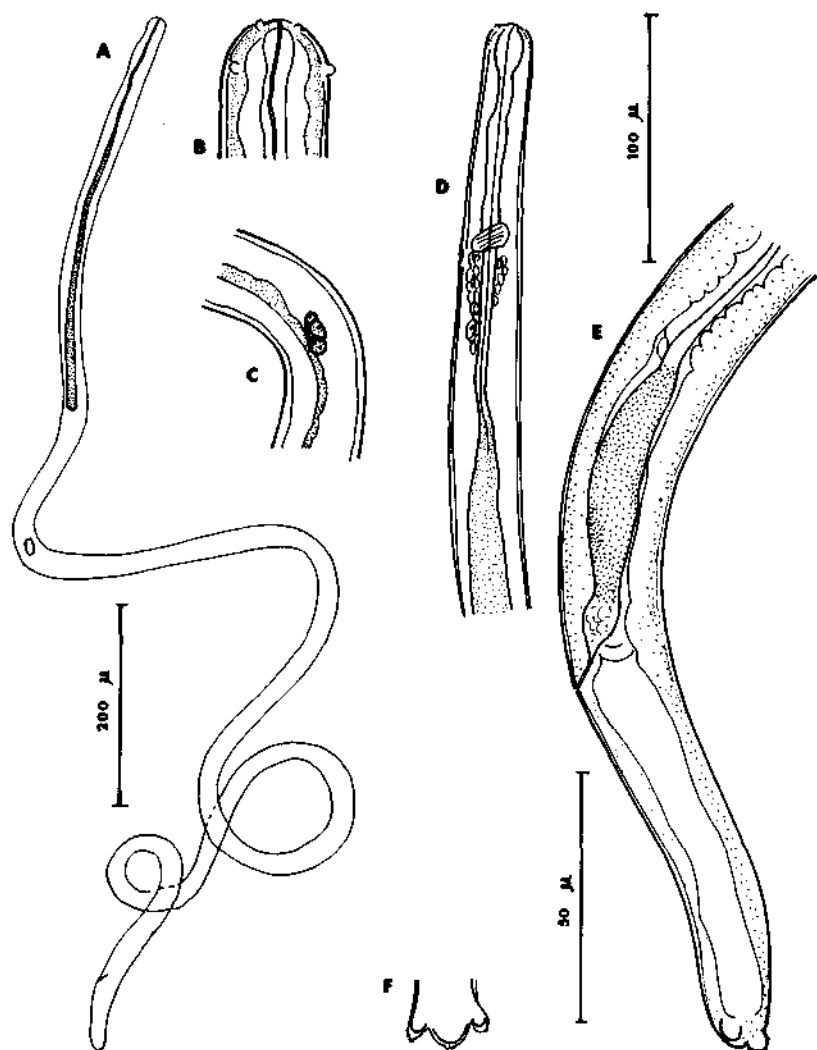


Fig. 4. *Dipeilonema (Wehrdickmansia) rugosicauda*: Larve 3 prélevée dans la cavité générale d'*Ixodes ricinus*. A: larve ♂; B: tête; C: ébauche génitale à la hauteur de l'intestin; D: région antérieure, vue latérale; E: région caudale, vue latérale; F: extrémité caudale, vue ventrale. (Erhelle: A: 200 µ; B, C, E, F: 50 µ; D: 100 µ.)

Filaires

Des microfaires de stade 3 (Fig. 4) ont été découvertes à la dissection dans la cavité générale d'*I. ricinus* adulte, aussi bien chez des mâles que chez des femelles (Tab. 2). Comme les Arthropodes étaient à jeun, c'est donc aux stades de larves ou de nymphes qu'ils s'étaient infestés.

La présence de microfaires dans des Ixodides d'Europe est rare. Notre observation est originale pour la Suisse. Un premier essai d'identification laisse supposer que nous avons à faire à l'espèce *Dipetalonema (Wehrdickmansia) rugosicauda* (Chabaud et Bain, communication personnelle)⁷. Le chevreuil sert d'hôte définitif aux macrofaires de cette espèce.

Il est impossible pour l'instant de tirer une quelconque conclusion sur la biologie et l'importance de cette filaire en Suisse. L'espèce est actuellement étudiée à Tübingen (Wenk, communication personnelle).

Conclusions

Cette étude préliminaire du rôle de vecteur joué par *I. ricinus* en Suisse s'est révélée intéressante. Si l'isolation du virus FSME à partir de matériel de notre pays n'est pas surprenante, s'il ne fait pas de doute qu'*I. ricinus* est un chaînon important dans l'épidémiologie des babésioses, il faut souligner quelques résultats originaux et inattendus de notre recherche.

- a) Présence de microorganismes non encore identifiés, proches des rickettsies, dans l'hémolymphe et les tissus des tiques (nymphes et adultes).
- b) Découverte de larves infestantes d'une filaire du genre *Dipetalonema* (probablement *D. rugosicauda*) dans la cavité générale d'adultes d'*I. ricinus*.
- c) Comparée aux données d'autres auteurs, la découverte en Suisse de l'infection d'*I. ricinus* par des trypanosomes (*T. theileri*) révèle que ce phénomène est probablement assez répandu en Europe occidentale et qu'il mérite une étude approfondie.

- 1 Aeschlimann A.: *Ixodus ricinus*, Linné 1758 (Ixodoidea: Ixodidae). Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse. Acta trop. (Basel) 29, 321-340 (1972).
- 2 Aeschlimann A., Brossard M., Quenet G.: Contribution à la connaissance des piroplasmes de Suisse. Acta trop. (Basel) 32, 281-289 (1975).
- 3 Aeschlimann A., Büniker W., Eichenberger G.: Les tiques (Ixodoidea) sont-elles des vecteurs de maladie en Suisse? Mitt. Schweiz. ent. Ges. XLII, 317-320 (1969).
- 4 Brossard M.: *Ixodes ricinus*, vecteur expérimental de 3 espèces de babésies (*B. bovis*, *B. berbera* et *B. argentina*). Rev. suisse Zool. 83, 443-462 (1976).
- 5 Brossard M., Aeschlimann A.: Preliminary Study of *Coxiella burnetii* in Switzerland. Isolation of a strain. Transmission by *Ixodes ricinus*. Proc. II. Int. Coll. Nat. foci Infect. Diseases in Central Europa. Graz, p. 305-312 (1976).

⁷ Nous remercions très sincèrement nos amis Chabaud et Bain, du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris qui, non seulement ont procédé aux identifications, mais nous ont autorisé à publier la Fig. 4 préparée à partir de notre matériel.

- 6 Burgdorfer W., Schmidt M. L., Hoogstraal H.: Detection of *Trypanosoma theileri* in Ethiopian cattle ticks. Acta trop. (Basel) 30, 340-346 (1973).
- 7 Hoare C. A.: The trypanosomes of mammals. Blackwell Sci. Publ., London 1972.
- 8 Krech U., Jung F., Jung M.: Zentraleuropäische Zeckenenzephalitis in der Schweiz. Schweiz. med. Wschr. 99, 282-285 (1969).
- 9 Krinsky W. L., Burgdorfer W.: Trypanosomes in *Amblyomma americanum* from Oklahoma. J. Parasit. 62, 824-825 (1976).
- 10 Liebisch A., Burgdorfer W., Rabman M. S.: Epidemiologische Untersuchungen an Schafzecken (*Dermacentor marginatus*) auf Infektionen mit Rickettsien. Dtsch. tierärztl. Wschr. 4, 121-126 (1978).
- 11 Metzler A.: Kultureller Nachweis von *Trypanosoma theileri*-ähnlichen Trypanosomen beim Braunvieh der Ostschweiz. Schweiz. Arch. Tierheilk. 117, 113-117 (1975).
- 12 Morisod A., Brossard M., Lambert C., Suter H., Aeschlimann A.: *Babesia bovis*, transmission par *Ixodes ricinus* (Ixodoidea) dans la plaine du Rhône. Schweiz. Arch. Tierheilk. 114, 392-394 (1972).
- 13 Munzinger J., Marki H., Modde H., Iltbold P., Schneider M., Henn V., Wyler R.: Seroepidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen der Zeckenenzephalitisvirus-Infektion in der Schweiz. Schweiz. Rundschau Med. (Praxis) 66, 968-972 (1977).
- 14 Radda A., Schmidtke W., Wandeler A.: Nachweis des Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in *Ixodes ricinus* aus dem Kanton Zürich. Schweiz. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 229, 268-272 (1974).
- 15 Rehacek J., Pospisil V., Ciampor F.: First record of bacillary rickettsia-like organism in European tick *Dermacentor marginatus* (Sulzer). Folia parasit. 23, 301-308 (1976).
- 16 Schmidtke W.: Isolierung des Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) aus Zecken und Nachweis von Antikörpern gegen dieses Virus in Seren von Menschen und Weidetieren in der Region Schaffhausen. Diss., Vet. Med. Fak. Univ. Zürich 1973.
- 17 Spiess H., Mumenthaler M., Burkhardt S., Keller H.: Zentraleuropäische Enzephalitis (Zeckenenzephalitis) in der Schweiz. Schweiz. med. Wschr. 99, 277-282 (1969).
- 18 Wandeler A., Kunz Ch., Steck F.: Beobachtungen über die zentraleuropäische Zeckenenzephalitis in der Schweiz. Path. et Microbiol. (Basel) 39, 35-36 (1973).
- 19 Wandeler A., Steck F., Fankhauser R., Kammermann B., Gresikova M., Blascovic D.: Isolierung des Virus der zentraleuropäischen Zeckenenzephalitis in der Schweiz. Path. et Microbiol. (Basel) 38, 258-270 (1972).
- 20 Wyler R., Schmidtke W., Kunz A., Radda A., Henn V., Meyer R.: Zeckenenzephalitis in der Region Schaffhausen: Isolierung des Virus aus Zecken und serologische Untersuchungen. Schweiz. med. Wschr. 103, 1487-1492 (1973).

216 312

¹ US Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Rocky Mountain Laboratory, Hamilton, Montana 59840, USA

² Zoological Institute of the University of Neuchâtel, Switzerland

***Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland**

W. BURGDORFER¹, A. AESCHLIMANN², O. PETER², S. F. HAYES¹, R. N. PHILIP¹

Summary

A tick/rickettsial survey in various parts of Switzerland revealed the presence of a new, hitherto undescribed spotted fever group rickettsia ("Swiss agent") in up to 11.7% of *I. ricinus* collected off vegetation. Infection in ticks was found to be generalized with rickettsiae developing intracellularly and occasionally also intranuclearly. As a result of massive growth in ovarial tissues, including the germinative cells, the rate of transovarial and filial infection was 100%.

The "Swiss agent" appears to be nonpathogenic for guinea pigs, domestic rabbits, and Swiss mice, but in male meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) it produces a microscopically detectable infection in the tunica vaginalis. The rickettsia grows well in tissue culture systems including chick embryo fibroblast, Vero, and vole tissue cells, when inoculated via yolk sac into 5-day-old hens' eggs, it kills 100% of the embryos after 5 to 7 days.

Antigenic relatedness of the "Swiss agent" to rickettsiae of the spotted fever group was indicated by indirect and direct fluorescent antibody staining. Preliminary serologic typing by microimmunofluorescence and by microagglutination indicated that the "Swiss agent" differs from all prototype strains of spotted fever group rickettsiae studied so far.

Key words: tick; *Ixodes ricinus*; rickettsia; spotted fever group.

Correspondence: Prof. Dr. A. Aeschlimann, Zoological Institute of the University of Neuchâtel, CH-2000 Neuchâtel 7

Introduction

The only rickettsial disease of man recognized in Switzerland is Q fever. Every year about 125 serologically confirmed cases come to the attention of the public health authorities. Although it is generally assumed that ticks are important means by which *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever, is transferred from natural foci to domestic animals, there is no evidence that ticks in Switzerland are responsible for transmitting this rickettsia to man. All cases, to the best of our knowledge, are being contracted as the result of close association with livestock, particularly sheep, goats, and cattle. Recent discoveries of *C. burnetii* and of spotted fever group rickettsiae in ticks from southern Germany (Liebisch, 1977; Řeháček et al., 1977; Liebisch et al., 1978) and from Austria (Kaaserer et al., 1976; Bazlikova et al., 1977) prompted the Zoological Institute of the University of Neuchâtel to initiate a long-term project to determine the role of ticks as vectors of rickettsiae and other microorganisms in Switzerland (Aeschlimann et al., 1979)³. This paper presents preliminary data on the occurrence of a hitherto undescribed spotted fever group rickettsia, hereafter referred to as "Swiss agent", in up to 11.7% of *Ixodes ricinus* collected from various parts of Switzerland.

Material and methods

From May through July, 1978, several known foci of *I. ricinus* in the cantons of Neuchâtel, Bern, Zug, Aargau, and Zürich were visited, and ticks were collected by flagging. The ticks were examined for rickettsiae as follows: nymphs were crushed individually on microscope slides and their tissues were stained by Giménez' (1964); adults were subjected to the hemolymph test (Burgdorfer, 1970). All hemolymph test-positive males and some positive females were dissected for the preparation of multiple tissue smears. Some were stained by Giménez', others were treated with fluorescein isothiocyanate-labelled immune sera to *Rickettsia rickettsii* (Wachsmuth-74), *R. conorii* (Simko), *R. prowazekii* (ZRS), and *C. burnetii* (Ohio) to obtain preliminary identification of the rickettsiae.

Many hemolymph test-positive female ticks were fed together with normal males on domestic rabbits and/or guinea pigs. Upon repletion, the females were stored separately in vials and were allowed to lay eggs. We speculated that the rickettsiae present in these ticks would be passed transovarially to the progeny. From each line, the F₁ larval ticks were eventually fed on Swiss mice, and the resulting nymphs were used for isolation and characterization of the agent.

For isolation of the rickettsiae, tissues of spent females or of freshly molted F₁ nymphs were triturated in 2.0 ml of cold brain heart infusion broth (BHI), and 0.25 ml of the suspension was injected intraperitoneally into each of four male meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). The remaining inoculum, frozen at -65°C, was stored as reference material. Beginning at day 3 after inoculation, one or two voles per day were killed and multiple smears were prepared from scrapings of their tunica vaginalis. These were stained by Giménez' method and were examined for rickettsiae.

Limited studies were also carried out to determine the behavior of the "Swiss agent" in chick embryos and in cell cultures. For this purpose, tunica vaginalis and spleens of infected voles were

³ Supported by a grant of the Swiss National Foundation for Scientific Research (No. 3 303 78). Some of the results of this work are part of O. Peter's dissertation.

trituated in BHI and aliquots of 0.25 to 0.5 ml were injected into the yolk sacs of 5-day-old embryos or into monolayers of chick embryo fibroblasts, Vero cells, and cell lines derived from embryonic or tunica vaginalis tissues of voles (Burgdorfer and Mavros - unpublished data). The methods used for maintaining and inoculation cell cultures were similar to those reported by Cory et al. (1974).

Indirect microimmunofluorescence (MIF) and microagglutination (MA) tests were used to determine serologic responses of Swiss mice, infected with the "Swiss agent" either by inoculation or by feeding of infected ticks, to various rickettsial antigens. In the MIF test (Philip et al., 1978), these antigens included: the "Swiss agent" (C₉ P₉), *R. rickettsii* ("R"; "Hlp"), *R. conorii* (BF), *R. sibirica* (No. 246), *R. slovaca* ("B" and "D"), *R. parkeri* (Mississippi), *R. montana* (M₅₋₆), *R. australis* (Phillips), *R. akari* (No. 29), *R. rhipicephali* (3-7-26), *R. prowazekii* (Breinl), *R. typhi* (Wilmington), and *R. canada* (No. 2678).

In the MA test, antigens prepared according to Ormsbee et al. (1978), included: the "Swiss agent" (C₉ P₉), *R. rickettsii* (Camas ♀165; Hansen-73; Sawtooth ♀2), *R. montana* (M₅₋₆), *R. conorii* (Simko), *R. rhipicephali* (3-7-26), *R. sibirica* (No. 246), *R. prowazekii* (ZRS), *R. typhi* (Wilmington), and *R. canada* (No. 2678). The test was performed according to Fiset et al. (1969), with the exception that an isotonic saline buffer (pH 7.0) with Tris (hydroxymethyl) aminomethane was mixed with bovine serum albumin and used as diluent to facilitate agglutination.

Lastly, the ultrastructure of the "Swiss agent" in tick tissues was determined by procedures described elsewhere (Hayes and Burgdorfer, 1979).

Results

As summarized in Table 1, a total of 4,092 nymphal and adult *I. ricinus* was collected from vegetation in 7 tick-infested areas. Of these, 344 (8.4%) were positive for a rickettsialike organism. The prevalence of infected ticks varied from 1.8 to 11.7% depending on the site of collection. In Giménez' stained hemolymph or tissue smears, the organisms appeared faintly pink and predominantly diplococcal or rodshaped (Fig. 1). Occasionally, a tick was recorded as being infected with long, bacilluslike or threadlike organisms. All positive ticks showed moderate to massive generalized intracellular infections of their tissues. Intranuclear growth was regularly seen in the tissues of the rectal ampule (Fig. 2) and in those of the male genital organs. Rickettsial infections were also heavy in ovarian tissues including the oogonia and oocytes. Each of 50 randomly selected eggs and larvae from each of 25 positive females proved to be infected, as shown by transmission to the progeny.

None of the Swiss mice, guinea pigs, or domestic rabbits responded to injected suspensions or to feeding of infected ticks with elevated temperatures, splenomegaly, or microscopically detectable infections in tissues. Male meadow voles, on the other hand, developed pronounced splenomegaly and invariably had rickettsial growth in their tunica vaginalis as early as 3 days after inoculation (Fig. 3). However, serial passages of the "Swiss agent" in meadow voles have been unsuccessful.

So far isolates from five different tick lines have been established in chick embryos. In each case, numbers of rickettsiae in yolk sac tissues were moderate but killed 100% of the embryos in 5 to 7 days after inoculation.

The "Swiss agent" grew well and produced massive infections in all cell

Table 1. Rickettsialike organisms in *Ixodes ricinus* from vegetation in various parts of Switzerland, 1978

Site	Number of ticks		Percentage
	examined	infected	
Bois d'Hôpital (Neuchâtel) . . .	100 NN*	3	3.9
	310 AD**	13	
Staatswald (Bern)	520 NN	38	8.3
	1,324 AD	115	
Le Chablais (Fribourg)	650 AD	60	9.2
Seewald (Bern)	273 NN	27	11.7
	527 AD	68	
Schachenwald (Zug)	34 NN	2	6.7
	219 AD	15	
Sims (Aargau)	122 AD	2	1.8
Kappel (Zürich)	13 AD	1	7.7
Totals	4,092	344	8.4

* NN = nymphal ticks. Giménez-stained tissues

** AD = adult ticks. hemolymph test

culture systems used (Fig. 4); however, there was little cytopathogenicity and no evidence of plaque formation.

The ultrastructure of the "Swiss agent" is similar to that of *R. rickettsii* and other spotted fever group agents (Fig. 5). The cytoplasmic matrix has a pale, at times splotchy almost vacuolar appearance; it is fibrillar and reticular and contains rather nondistinct ribosomes. Where present, the slime layer is much less prominent than in other pathogenic rickettsiae. Organisms often are closely associated with the cytoplasmic components of the host cell. The cell wall shows some minor variations from that of other rickettsiae of the spotted fever and typhus groups. The outer leaflet is thicker (2–4 nm) and the inner layer is not as osmophilic as it is in other rickettsiae. The periplasmic space appears to be uniform in size, and the plasma membrane, in general, is not as sinuous as seen in other rickettsiae.

Limited testing by MA and MIF of sera from Swiss mice inoculated with infected tick suspensions or fed upon by infected F_1 larvae revealed highly specific homologous reactions with little or no cross reaction against any other rickettsial antigen (Table 2). Nevertheless, antigenic relationship of the "Swiss agent" to the spotted fever group was indicated by direct fluorescent antibody staining. Invariably, conjugates against *R. rickettsii* or *R. conorii*, gave a particulate, dustlike staining pattern suggesting reaction(s) with certain antigenic components of the agent. Similarly, homologous conjugates prepared from sera of

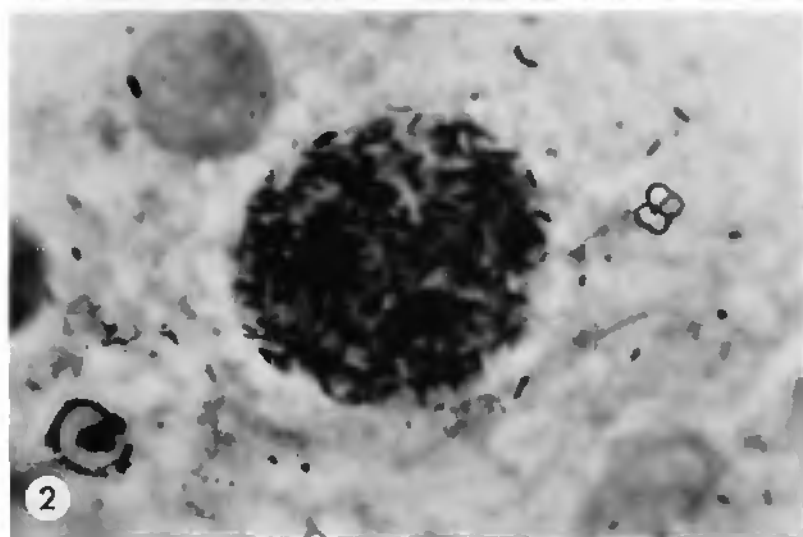
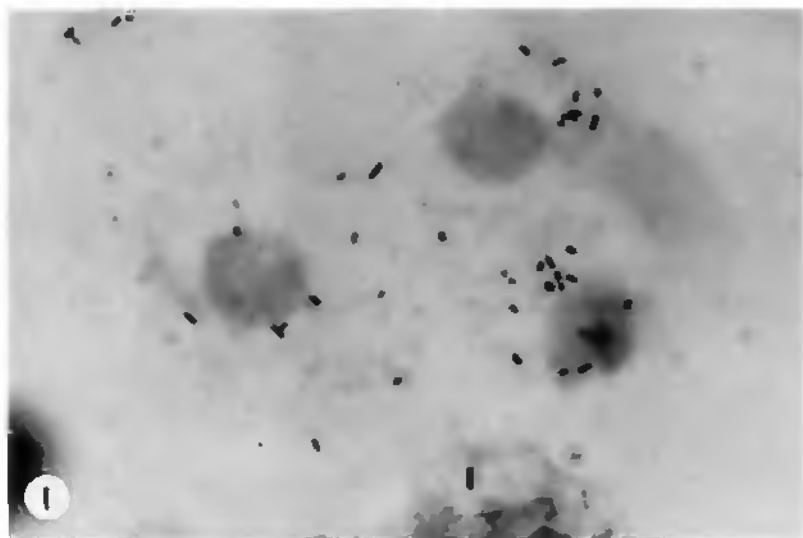


Fig. 1. Appearance of the "Swiss agent" in hemocytes of infected adult *Fontes ricinus* from Staatswald (Bern) (Giménez stain, 1,900 \times).

Fig. 2. Intranuclear growth of the "Swiss agent" in rectal ampule tissue of infected *I. ricinus* (Giménez stain, 1,900 \times).

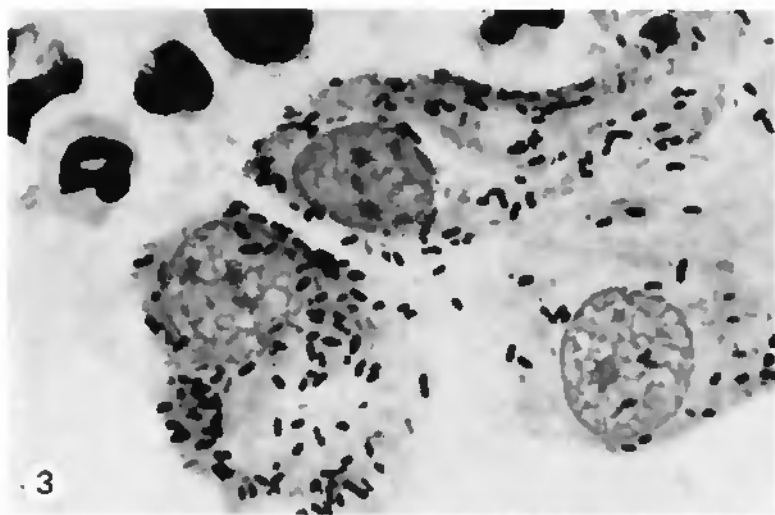


Fig. 3. "Swiss agent" rickettsia in tunica vaginalis of *Microtus pennsylvanicus* (Giménez stain, 1,900 \times).

Fig. 4. Massive growth of the "Swiss agent" in a cell line of tunica vaginalis from *M. pennsylvanicus* (Giménez stain, 1,900 \times).

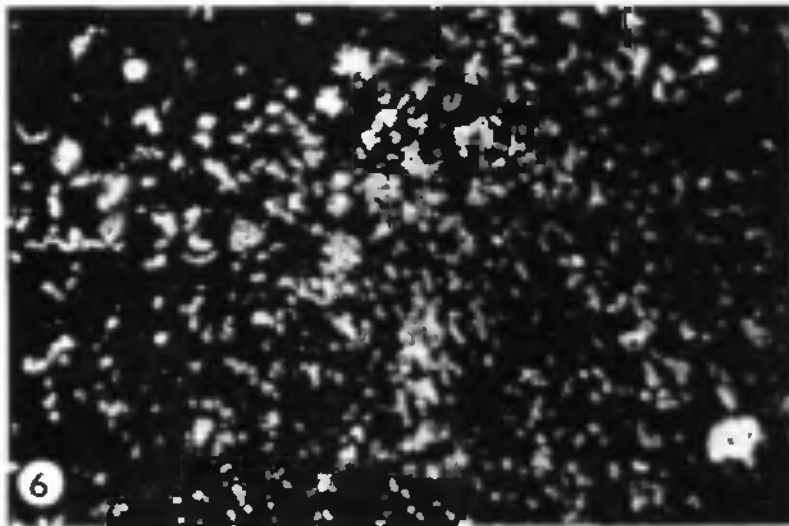
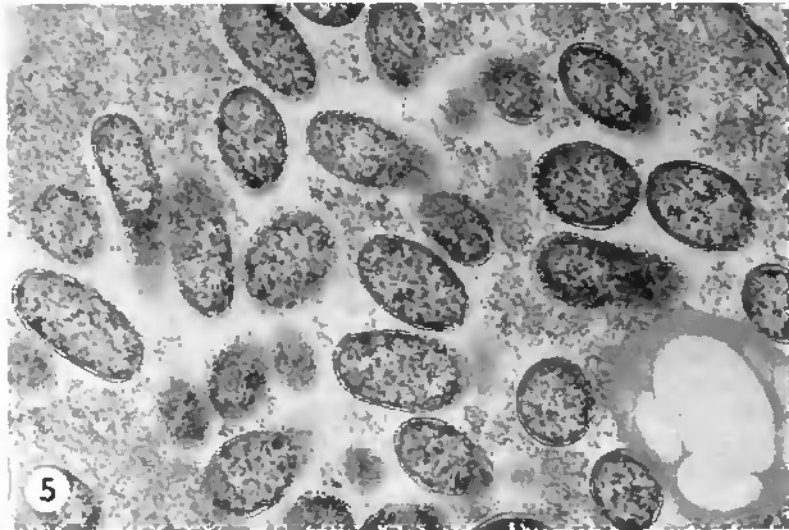


Fig. 5. Electromicrograph of the "Swiss agent" in Malpighian tubule tissue of engorged nymphal *I. ricinus* (26,300 \times)

Fig. 6. Indirect fluorescent antibody reaction of the "Swiss agent" with convalescent serum from a person affected with Rocky Mountain spotted fever (1,100 \times).

Table 2. Identification of the "Swiss agent" in MIF-cross tests of mouse sera*

Antisera	Antigens				
	Swiss agent (110)**	<i>R. rickettsii</i> (35)	<i>R. conorii</i> (51)	<i>R. slovaca</i> (81)	<i>R. sibirica</i> (3)
"Swiss agent" (110)	128***	0	0	0	0
<i>R. rickettsii</i> (35)	0	128	0	32	16
<i>R. conorii</i> (51)	0	tr****	128	32	32
<i>R. slovaca</i> (81)	0	16	32	256	128
<i>R. sibirica</i> (3)	0	64	64	512	512

* Results with additional antigens cited in the text were similar to those tabulated here.

** Figures in parentheses denote code numbers of rickettsial strains.

*** serum dilution endpoint

**** trace of reaction at 1:8 dilution

Table 3. Spotted fever group relationship of "Swiss agent" by direct FA staining

Antigens	"Swiss agent" conjugate							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
"Swiss agent" (110)	+	+	+	+	+	+	+	(+)
<i>R. rickettsii</i> (35)	+	+	+	+	(+)			
<i>R. montana</i> (9)	+	+	+	(+)				
<i>R. sibirica</i> (3)	+	+	+	(+)				
<i>R. slovaca</i> (81)	+	+	+	(+)				
<i>R. akari</i> (8)	+	+	(+)					
<i>R. conorii</i> (51)	+	+	(+)					
<i>R. rhipicephali</i> (12)	+	(+)						

+ = good fluorescence

(+) = weak fluorescence

meadow voles immunized by inoculation with infected tick suspensions reacted with several prototypes of spotted fever group rickettsiae (Table 3). Specific reactions against the "Swiss agent" were obtained only after 32-fold dilution of the preparation. Antigenic relatedness to the spotted fever group rickettsiae was also shown in the indirect FA test. Human immune sera to *R. rickettsii* reacted strongly with the "Swiss agent", as illustrated in Fig. 6.

Discussion

The presence of spotted fever group rickettsiae in *I. ricinus* has been reported from several European countries. Giroud et al. (1962) noted rickettsialike

microorganisms in four pools of this tick taken off domestic animals in the eastern part of France. They identified them serologically as *R. conorii*. In a subsequent survey in various parts of that country, 33 of 71 pools of *I. ricinus* contained morphologically typical or atypical rickettsiae that could not readily be adapted to chick embryos or other laboratory animals. However, sera of animals inoculated with these rickettsiae, had antibodies against *R. conorii*, *C. burnetii*, and the psittacosis group agents (Giroud et al., 1965). Additional evidence of spotted fever group rickettsiae (*R. conorii*) in *I. hexagonus*, *Dermacentor reticulatus*, and *D. marginatus* from southeastern parts of France was reported by Gilot (1975).

During extensive investigations on tick-borne rickettsioses in various parts of Slovakia from 1968–1974, and more recently in south Bohemia, Řeháček and associates (1972; 1975; 1976a; 1976b; 1977) examined 4,441 adult *I. ricinus* by the hemolymph test and found 171 infected with rickettsiae. Most were identified serologically of by direct immunofluorescence as members of the spotted fever group. No characterization of these organisms was reported. In the 1968–1970 study, Řeháček et al., (1972) obtained 3 rickettsial isolates in chick embryos. They multiplied poorly but killed the embryos in 3 to 4 days after inoculation. Guinea pigs were said to respond only exceptionally with short and weak febrile reactions. There was moderate scrotal involvement, but this manifestation was seen also in guinea pigs without fever.

Recent tick/rickettsial surveys in Bulgaria revealed extremely high (up to 52.2%) percentages of *I. ricinus* infected with spotted fever group rickettsiae (Georgieva et al., 1976; Georgieva and Kyossev, 1978). These findings were based on positive hemolymph tests and on subsequent identification of the rickettsiae by direct immunofluorescence. Guinea pigs inoculated with suspensions of 5 infected adult *I. ricinus* responded in at least 4 instances with CF antibodies to spotted fever group antigens.

Thus, rickettsiae detected so far in *I. ricinus* and in many other species of European ticks (see references cited) have been identified in preliminary ways only by serologic tests and/or immunofluorescence. Their precise antigenic relation to the prototype strains of tick-borne rickettsiae remains to be established. An exception to this is a spotted fever group agent isolated from *D. marginatus* in Slovakia (Brezina et al., 1968). When subjected to serologic tests, this organism was found to differ so much from other prototype species of the spotted fever group that it was considered a new species, for which the name, *R. slovacica*, was proposed (Urvölgyi and Brezina, 1978).

The "Swiss agent" also appears to be a hitherto undescribed member of the spotted fever group. Its antigenic relationship to this group is indicated by cross reactions in direct and indirect immunofluorescent staining. Also typical for spotted fever group rickettsiae is its growth pattern in the tick vector in which it produces generalized infection, its ability to invade and multiply in nuclei, and its transmission via eggs to the progeny.

Serologically, at least in MA and MIF tests, the "Swiss agent" is quite distinct in that it does not cross-react with any of the prototypes of spotted fever group rickettsiae. In spite of these rather unique biological characteristics, we do not now propose a scientific name for the "Swiss agent". This must await results of experiments in progress to determine the guanine plus cytosine composition of the rickettsia's DNA, its protein patterns by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, its antibiotic sensitivity, and the immune responses of laboratory animals as measured by other serologic tests. Also underway are investigations pertaining to the ecology of this tick-borne agent as well as its potential significance as a pathogen for man.

Lastly, it should be noted that none of the 3,165 adult *I. ricinus* examined was infected with *C. burnetii*, although all these ticks originated from areas where human cases of Q fever occurred in association with the livestock industry. Detection of natural foci of this agent would not be surprising in view of reports from Slovakia (Řeháček et al., 1970; 1975), Austria (Kaaserer et al., 1976), and Bulgaria (Georgieva et al., 1976; Georgieva and Kyossev, 1978) where *I. ricinus* and other species of ixodid ticks were found to be infected with *C. burnetii*.

- 1 Aeschlimann A., Burgdorfer W., Matile H., Peter O., Wyler R.: Aspects nouveaux du rôle de vecteur joué par *Ixodes ricinus* L. en Suisse. Note préliminaire. Acta trop. (Basel) 36, 181 (1979).
- 2 Bazlikova M., Kaaserer B., Brezina R., Kováčová E., Kaaserer G.: Isolierungen von Rickettsien der Spotted-Fever-Gruppe (SF-Gruppe) aus *Dermacentor marginatus*-Zecken aus Tirol. Österreich. Immunität u. Infektion 5, 167 (1977).
- 3 Brezina R., Řeháček J., Āč P., Majerská M.: Two strains of rickettsiae of Rocky Mountain spotted fever group recovered from *Dermacentor marginatus* ticks in Czechoslovakia. Results of preliminary serological identification. Acta virol. 13, 142 (1968).
- 4 Burgdorfer W.: Hemolymph test. A technique for detection of rickettsiae in ticks. Amer. J. trop. Med. Hyg. 19, 1010 (1970).
- 5 Cory J., Yunker C. E., Ormsbee R. A., Peacock M., Meibos H., Tallent G.: Plaque assay of rickettsiae in a mammalian cell line. Appl. Microbiol. 27, 1157 (1974).
- 6 Fiset P., Ormsbee R. A., Silberman R., Peacock M., Spielman S. H.: A microagglutination technique for detection and measurement of rickettsial antibodies. Acta virol. 13, 60 (1969).
- 7 Georgieva G., Kyossev B.: Comparative analysis and evaluation of the various kinds of ixodid ticks as carriers of rickettsiae in Bulgaria. VII. Int. Congr. Infectious and Parasitic Dis., Varna, Bulgaria, Oct. 2-6, 1978, Report 1, p. 515.
- 8 Georgieva G., Serbezov V., Alexandrov E.: Investigation on some ixodid ticks for infestation with rickettsiae by means of immunofluorescent hemocytic test. 2. Int. Arbeitskolloquium über «Naturherde von Infektionskrankheiten in Zentraleuropa», Graz, 25.-28. Febr. 1976 (ed. by W. Sixl and H. Troger, Graz), p. 317.
- 9 Gilot B.: Recherches des rickettsies hébergées par les tiques (Acariens: *Ixodoidea*) du Sud-Est de la France. Premier bilan. Contexte écologique de rencontre avec l'homme. Bull. Soc. Path. exot. 68, 529 (1975).
- 10 Giménez D. F.: Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. Stain Technol. 39, 135 (1964).
- 11 Giroud P., Capponi M., Dumas N., Rageau J.: Les *Ixodes ricinus* et *hexagonus* de France contiennent des agents rickettsiens ou proches. C.R. Acad. Sci. Paris 260, 4874 (1965).

- 12 Giroud P., Capponi M., Dumas N., Colas Belcour J., Masson R.: Mise en évidence d'une façon presque constante sur des tiques de l'Est de la France de l'antigène du groupe boutonneux pourpré et isolement de souches. C.R. Acad. Sci. Paris 255, 611 (1962).
- 13 Hayes S. F., Burgdorfer W.: Ultrastructure of *Rickettsia rhipicephali*, a new member of the Spotted Fever group rickettsiae in tissues of the host vector *Rhipicephalus sanguineus*. J. Bact. 137, 605 (1979).
- 14 Kaaserer B., Kaaserer G., Sixl W., Stünzner D.: Q-Fieber-Untersuchungen in Tirol. 2. Int. Arbeitskolloquium über «Naturherde von Infektionskrankheiten in Zentraleuropa», Graz, 25.–28. Febr. 1976 (ed. by W. Sixl and H. Troger, Graz), p. 331.
- 15 Liebisch A.: Das Q-Fieber als Naturherdinfektion in Süddeutschland. Bundesgesundheitsblatt 20, 185 (1977).
- 16 Liebisch A., Burgdorfer W., Rahman M. S.: Epidemiologische Untersuchungen an Schafzecken (*Dermacentor marginatus*). Dtsch. tierärztl. Wschr. 85, 121 (1978).
- 17 Philip R. N., Casper E. A., Burgdorfer W., Gerloff R. K., Hughes L. E., Bell E. J.: Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. J. Immunol. 127, 1961 (1978).
- 18 Řeháček J., Kováčová E., Kováč P.: Rickettsiae belonging to the spotted fever group from ticks in the Tribeč mountains. Folia parasit. (Praha) 23, 69 (1976a).
- 19 Řeháček J., Liebisch A., Urvölgyi J., Kováčová E.: Rickettsiae of the spotted fever isolated from *Dermacentor marginatus* in South Germany. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A. 239, 275 (1977).
- 20 Řeháček J., Áč P., Brezina R., Majerská M.: Q fever investigation in Slovakia. 1. Isolation of the agent from ticks and serological surveys in small mammals in the districts of Zvolen and Lučenec. Central Slovakia Region. J. Hyg. Epidemiol. (Praha) 14, 230 (1970).
- 21 Řeháček J., Brezina R., Áč P., Župančičová M., Kováčová E.: Contribution to the natural focality of rickettsiae belonging to the Rocky Mountain spotted fever (RMSF) group in Slovakia. Folia parasit. (Praha) 19, 41 (1972).
- 22 Řeháček J., Palanova A., Župančičová M., Urvölgyi J., Kováčová E., Jarábek L., Brezina R.: Study of rickettsioses in Slovakia. I. *Coxiella burnetii* and rickettsiae of the spotted fever (SF) group in ticks and serological surveys in animals and humans in certain selected localities in the Lučenec and V. Krtíš districts. J. Hyg. Epidemiol. (Praha) 19, 105 (1975).
- 23 Řeháček J., Vošta J., Tarasevič I. V., Brezina R., Jablonskaja V. A., Plotnikova L. F., Feisova N. F., Hanák P.: Rickettsioses studies. 3. Natural foci of rickettsioses in south Bohemia. Bull. WHO 55, 455 (1977).
- 24 Řeháček J., Župančičová M., Áč P., Brezina R., Urvölgyi J., Kováčová E., Tarasevič I. V., Jablonskaja V. A., Pospíšil R., Baloghova D.: Rickettsioses studies. 2. Natural foci of rickettsioses in east Slovakia. Bull. WHO 53, 31 (1976b).
- 25 Urvölgyi J., Brezina R.: *Rickettsia slovacica*: A new member of spotted fever group rickettsiae. In: Rickettsiae and rickettsial diseases. Proc. 2. Int. Symp. Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Smolenice, Czechoslovakia, 1976, p. 299. VEDA, Bratislava 1978.

Présence d'anticorps contre la «Rickettsie suisse» chez les mammifères sauvages et domestiques du Canton de Neuchâtel¹

O. Péter²

Introduction

La tique *Ixodes ricinus* est un vecteur des rickettsies connu en Europe depuis de nombreuses années. Les chercheurs de plusieurs pays ont en effet décelé une rickettsie du groupe de la fièvre pourprée dans cet ectoparasite (France: Giroud *et al.*, 1962, 1965; Belgique: Jadin et Giroud, 1966; Tchécoslovaquie: Řeháček *et al.*, 1972, 1976a, 1976b, 1977; Bulgarie: Georgieva *et al.*, 1976).

En 1979, on a démontré, pour la première fois en Suisse, la présence d'une rickettsie chez la tique *I. ricinus* (Aeschlimann *et al.*, 1979). Son isolement et son identification ont révélé qu'il s'agissait probablement d'une nouvelle rickettsie du groupe de la fièvre pourprée (Burgdorfer *et al.*, 1979).

En Suisse, la distribution géographique d'*I. ricinus* est limitée par l'altitude (Aeschlimann, 1972). En effet, au-dessus de 900 à 1000 m, la densité des populations de ce vecteur diminue rapidement. Nous avons donc entrepris une enquête sérologique dans un double but:

1. Connaître les mammifères impliqués dans la circulation de cette rickettsie.
2. Mettre en relation la distribution supposée d'*I. ricinus* et les cas sérologiquement positifs.

Matériels et méthodes

1. Captures et récoltes de sang

Nous avons capturé des micromammifères vivants à l'aide de trappes tchèques dans des lieux situés à des altitudes différentes (4 biotopes au-dessous de 600 m, 2 biotopes entre 700 et 800 m et 1 biotope au-dessus de 1000 m).

Le prélèvement de sang des micromammifères a été effectué par ponction rétroorbitale. En outre, la récolte de sang des grands mammifères sauvages a nécessité la collaboration de l'Inspecteur de la chasse et de la pêche, des gardes-chasse et des chasseurs du Canton de Neuchâtel. Le sang est collecté dans la cavité thoracique des animaux abattus. Nous avons également profité de prélèvements de sang effectués par l'Office Vétérinaire Cantonal sur les bovins pour recueillir des échantillons de sera.

2. Techniques sérologiques

Les sera de tous les animaux ont été testés par microagglutination (Fiset *et al.*, 1969). L'antigène³ employé provenait d'un isolement de la «rickettsie suisse» à partir d'*I. ricinus* (Burgdorfer *et al.*, 1979). Nous avons fixé le seuil de spécificité à 1/8.

¹ Ce travail présente des résultats qui font partie de la thèse de l'auteur.

² Adresse: Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel, Chantemerle 22, CH-2000 Neuchâtel 7

³ fourni par le Rocky Mountain Laboratory, Hamilton, Mt, USA

Cependant, avec cette technique, les sera de bovins ont présenté de trop nombreuses réactions non-spécifiques. Par conséquent, nous n'avons pu tenir compte de ces résultats et nous avons réexaminé une partie de ces sera (372) par microimmunofluorescence (Philip *et al.*, 1976) dès la dilution 1/16 (seuil de spécificité) avec un conjugué anti-IgG de bovins. Pour des raisons de statistique, nous avons tiré au hasard 100 sera parmi les 879 disponibles (25 sera de 4 districts, soit 2 districts du bas du canton, Neuchâtel (NE) et Boudry (BO), et 2 districts du haut du canton, Le Locle (LO) et La Chaux-de-Fonds (CF).

Résultats

1. Micromammifères

Au total 4 espèces de petits rongeurs ont été capturées: 26 *Clethrionomys glareolus*, 19 *Apodemus sylvaticus*, 23 *A. flavicollis* et 10 *Mus musculus*. Nous avons détecté des anticorps contre la «rickettsie suisse» dans 28,2% des cas (22 sur 78 micromammifères). Cependant, 86% des petits rongeurs forestiers présentant des anticorps provenaient d'au-dessous de 600 m et 7,3% d'une zone située entre 700 et 800 m. Au-dessus de 1000 m, aucun animal ne présentait plus d'anticorps (Tableau 1). Les sera des 10 souris grises (*M. musculus*) étaient tous négatifs.

2. Grands mammifères sauvages

Nous avons constaté que 30,7% des chevreuils examinés (*Capreolus capreolus*) avaient des anticorps contre la «rickettsie suisse» (Tableau 2). Mais, de même que pour les rongeurs, nous observons chez ces animaux une diminution des anticorps en rapport avec l'altitude. La séparation est toutefois moins marquée mais reste tout de même évidente. Si nous choisissons une limite arbitraire, fixée à 1000 m, 20 chevreuils sur 45 abattus à des altitudes inférieures possèdent des anticorps, alors qu'au-dessus de cette limite seuls 7 chevreuils sur 43 en possèdent. De plus, cette situation est confirmée par

Tableau 1 Test sérologique (microagglutination) contre la «rickettsie suisse» sur les micromammifères du Canton de Neuchâtel.

Altitudes	Lieux	Espèces			Totaux	%
		<i>Clethrionomys glareolus</i>	<i>Apodemus spp.</i>	<i>Mus musculus</i>		
Inf. 600	Bois de l'Hôpital	1/ 1*	7/ 7	-	8/ 8	} 86
	Peseux	7/ 7	4/ 7	-	11/14	
	Neuchâtel	-	-	0/ 4	0/ 4	
700-800	St-Blaise	-	-	0/ 6	0/ 6	} 7,3
	Fontaines	1/ 3	1/12	-	2/15	
Sup. 1000	Coffrane	0/14	1/12	-	1/26	}
	La Brévine	0/ 1	0/ 4	-	0/ 5	
Totaux		9/26	13/42	0/10	22/78	28,2

* sera positifs/sera testés

- pas d'animaux

Tableau 2 Test sérologique (microagglutination) contre la «rickettsie suisse» sur les chevreuils du Canton de Neuchâtel

Districts	Altitude		Totaux
	inf. 1000 m	sup. 1000 m	
Neuchâtel	12/20*	1/ 3	13/23
Boudry	6/16	1/ 6	7/22
Val-de-Ruz	1/ 2	0/ 1	1/ 3
Val-de-Travers	1/ 6	4/27	5/33
Le Locle	0/ 1	0/ 3	0/ 4
La Chaux-de-Fonds	-	1/ 3	1/ 3
Totaux	20/45 (44,4%)	7/43 (16,3%)	27/88 (30,7%)
Titres d'anticorps maximaux	(1/512)	(1/32)	

* sera positifs/sera testés

Test de fréquence double: $20/45 \neq 7/43$ $\alpha = 0,00546$ limites admises 0,05 ou 0,01

Tableau 3 Test sérologique (microimmunofluorescence) contre la «rickettsie suisse» sur les bovins du Canton de Neuchâtel

Districts	Sera testés	Sera positifs
Neuchâtel	98	22
Boudry	55	11
Val-de-Ruz	51	1
Val-de-Travers	43	2
Le Locle	60	1
La Chaux-de-Fonds	65	1
Totaux	372	38 (10,2%)

les titres d'anticorps décelés. Ainsi, le titre maximal est de 1/512 au-dessous de 1000 m et de 1/32 seulement au-dessus.

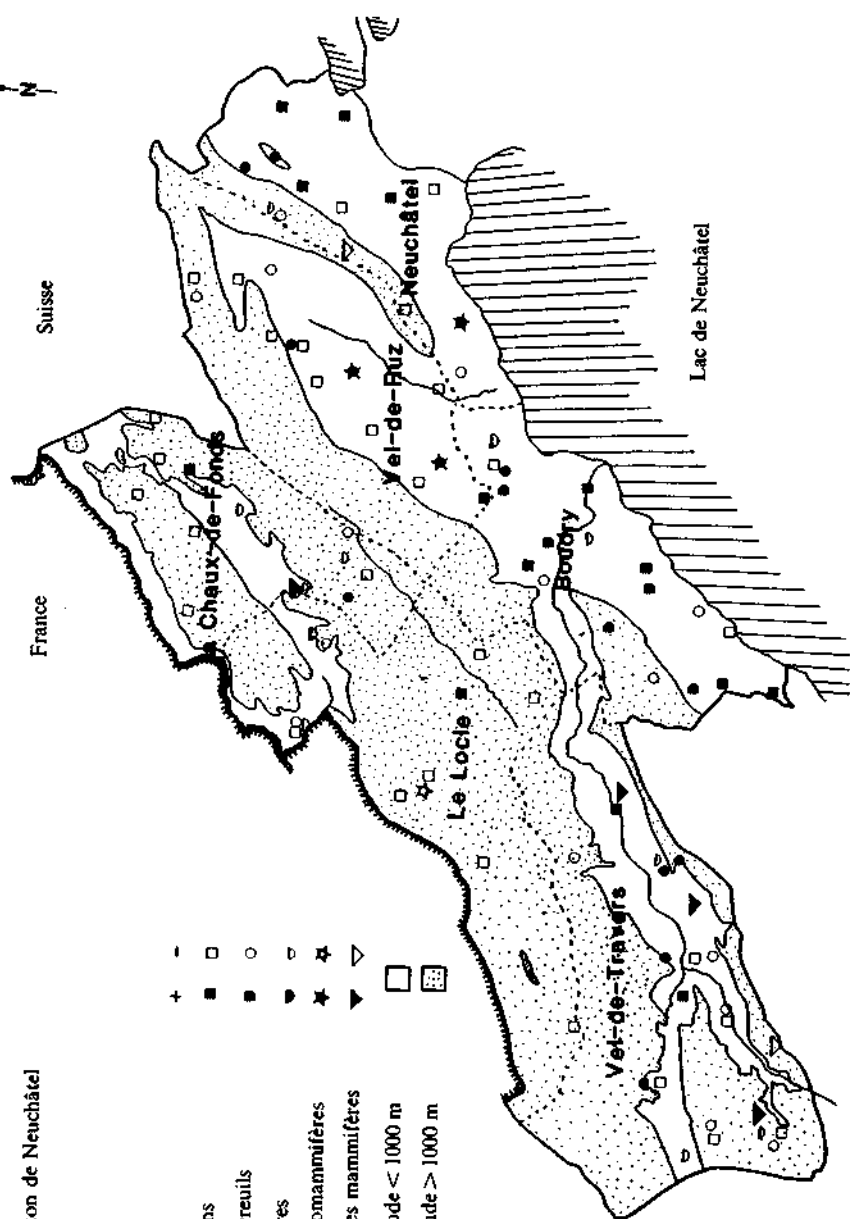
Quant aux autres animaux sauvages, nous les avons également étudiés en fonction de la même limite d'altitude. Sur les 14 sera de lièvres (*Lepus europaeus*) contrôlés, tous négatifs, seuls 4 provenaient de régions de basse altitude.

D'autre part, 3 renards (*Vulpes vulpes*) sur 4 présentaient des anticorps. Le serum de l'un d'eux, capturé à Môtiers (800 m) possédait un titre de 1/256 et celui des 2 autres, respectivement de La Côte-aux-Fées (1100 m) et de Roche Queune (1000 m), avaient un titre de 1/16. Enfin, 1 sanglier (*Sus scrofa*) capturé à Travers (850 m), ainsi qu'une martre (*Martes martes*) de La Côte-aux-Fées, ont présenté une réaction contre la «rickettsie suisse» (1/32). Ainsi, comme pour les chevreuils, une proportion plus forte d'animaux (2 sur 6) présentaient des anticorps au-dessous de 1000 m, alors que 3 sur 18 seulement étaient positifs au-dessus de cette limite.

Fig. 1 Recherche d'anticorps contre la « rickettsie suisse» parmi les mammifères du Canton de Neuchâtel. Tests sérologiques de microagglutination et de microimmunofluorescence

Canton de Neuchâtel

- | | | | | | | | | |
|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bovins | + | □ | ○ | ▽ | ☆ | ▽ | □ | ▨ |
| Chevreuils | ■ | ■ | ● | ▽ | ☆ | ▽ | □ | ▨ |
| Lièvres | ■ | ■ | ● | ▽ | ☆ | ▽ | □ | ▨ |
| Micromammifères | ■ | ■ | ● | ▽ | ☆ | ▽ | □ | ▨ |
| Autres mammifères | ■ | ■ | ● | ▽ | ☆ | ▽ | □ | ▨ |
| Altitude < 1000 m | | | | | | | □ | ▨ |
| Altitude > 1000 m | | | | | | | □ | ▨ |



3. Bovins

Au total 372 bovins ont été testés par microimmunofluorescence et 38 individus (soit 10,2%) ont réagi positivement (Tableau 3). Trente-trois provenaient des districts de Neuchâtel (NE) et de Boudry (BO) dont les territoires sont presque entièrement situés au-dessous de 1000 m (Fig. 1). Les 5 animaux positifs restants se répartissaient dans les 4 autres districts du canton. Parmi les 100 sera tirés au hasard, 14 ont présenté des anticorps spécifiques (Tableau 4). Si nous séparons les bovins en 2 populations, l'une établie au-dessous, l'autre au-dessus de 1000 m, la différence est alors évidente: 13/50 pour la première et 1/50 pour la deuxième. D'ailleurs le test statistique de fréquence double nous indique que α (le risque) est plus petit que 1/1000.

Tableau 4 Test sérologique (microimmunofluorescence) contre la «rickettsie suisse» sur les bovins de 4 districts du Canton de Neuchâtel

Districts	Altitude	Nombre de		Totaux*
		sera testés	sera positifs	
Neuchâtel	Inférieure à 1000 m	25	5	13/50
Boudry	1000 m	25	8	
Le Locle	Supérieure à 1000 m	25	0	1/50
La Chaux-de-Fonds	1000 m	25	1	
Totaux		100	14	

* sera positifs/sera testés

Test de fréquence double: $13/50 \neq 1/50$ $\alpha = 0,001$ limites admises 0,05 ou 0,01

Tableau 5 Répartition des animaux à sérologie positive par rapport à l'altitude 1000 m dans le Canton de Neuchâtel

Espèces	Altitude	
	inf. 1000 m	sup. 1000 m
Chevreaux	20/ 45*	7/ 43
Lièvres	0/ 4	0/ 10
Micromammifères	22/ 73	0/ 5
Autres mammifères sauvages	2/ 2	3/ 8
Bovins	13/ 50	1/ 50
Totaux	57/174 (32,5%)	11/116 (9,4%)

* sera positifs/sera testés

Test du χ^2	altitude		pos. neg.	DDL = 1
	inf. 1000 m	sup. 1000 m		
	57	11	117	
		11	105	
$\chi^2 = 19,73$				χ^2 crit. = 3,84

4. Résultats globaux en fonction de l'altitude 1000 m

Si nous appliquons cette séparation selon l'altitude à tous les sera des animaux sauvages et domestiques examinés, nous obtenons la répartition présentée sur le tableau 5 et la figure 1. Au total, 57 animaux sur 174 (32,5%) du bas du canton possèdent des anticorps contre la «rickettsie suisse», alors que, dans le haut, seuls 11 sur 116 en possèdent (9,5%). La différence entre les 2 populations animales est statistiquement significative (test de X^2 , DDL = 3,84, X^2 obs. = 19,73).

Discussion

I. ricinus est une tique triphasique et télotrope. Son spectre d'hôtes est très large (mammifères, oiseaux et reptiles) (Aeschlimann, 1972). Tous les stades évolutifs, larves, nymphes et adultes, sont capables de transmettre la «rickettsie suisse» (Péter et al., 1981). De plus, partout où nous avons récolté cette espèce, nous l'avons trouvée infectée de rickettsies mais à des pourcentages variables. Dès lors nous pouvons admettre que les animaux exempts d'anticorps contre la «rickettsie suisse» ne sont que rarement en contact avec *I. ricinus*. C'est notamment le cas des quelques souris grises (*M. musculus*) examinées, toutes négatives (0 sur 10), capturées dans une région où 86% (19 sur 22) des rongeurs forestiers possèdent des anticorps spécifiques contre la «rickettsie suisse». Cela signifie que tiques et hôtes ne fréquentent pas le même biotope. Le même facteur pourrait expliquer les résultats sérologiques fort différents obtenus dans les diverses populations animales vivant au-dessus et au-dessous de la limite de 1000 m d'altitude. Cette différence est particulièrement vraie pour les espèces sédentaires, rongeurs et bovins, malgré le petit nombre d'animaux examinés. Elle est toutefois moins marquée avec les grands mammifères sauvages dont les déplacements sont souvent importants. La tendance reste cependant la même: les titres d'anticorps sont élevés en basse altitude et dénotent une population d'*I. ricinus* importante.

Les petits rongeurs sont de bons indicateurs quant à la présence et à la densité d'*I. ricinus* infectés par la «rickettsie suisse» dans une région donnée. D'ailleurs, le haut pourcentage de micromammifères présentant des anticorps spécifiques en basse altitude n'est pas inhabituel. Dans une forêt du Plateau suisse proche (Staatswald, 450 m d'altitude) nous avons observé 79,7% (114 sur 143) de rongeurs sauvages immuns contre la «rickettsie suisse» (Péter et al., 1981).

A l'heure actuelle, le seul réservoir connu de la «rickettsie suisse» est son vecteur, soit *I. ricinus*. Cependant, les mammifères qui possèdent des anticorps sont tous susceptibles d'être une source d'infection et plus particulièrement les micromammifères.

En effet, pour toutes les rickettsies du groupe de la fièvre pourprée, certains petits rongeurs sont des réservoirs suspectés ou confirmés (Burgdorfer et al., 1966; Řeháček et al., 1972). Toutefois, pour la «rickettsie suisse», cette hypothèse mérite une confirmation par la voie expérimentale.

Remerciements

Je suis reconnaissant à M. le Prof. A. Aeschlimann, Directeur de l'Institut de Zoologie de Neuchâtel, et au Dr W. Burgdorfer, Head Epidemiology Branch of the Rocky Mountain Laboratories,

Hamilton, Montana (USA), de leurs commentaires et critiques lors de la préparation de ce manuscrit.

M. W. Burgdorfer doit être remercié spécialement de m'avoir fourni l'antigène indispensable aux tests sérologiques.

Je remercie également Mme J. Moret, de l'Institut de Mathématiques de Neuchâtel, de son aide pour les tests statistiques, ainsi que le Dr J. C. Pedrolì, Inspecteur de la Chasse et de la Pêche, le Dr J. Staehli, à l'époque Vétérinaire cantonal, les chasseurs du Canton de Neuchâtel et le personnel de l'Office Vétérinaire Cantonal de leur étroite collaboration pour la récolte d'échantillons de sang.

Résumé

Au cours de l'étude de l'écologie de la «rickettsie suisse», une rickettsie du groupe de la fièvre pourprée transmise par *Ixodes ricinus*, nous avons entrepris d'examiner le serum d'animaux domestiques et sauvages du Canton de Neuchâtel pour déceler la présence d'anticorps contre ce micro-organisme. L'ensemble des sera a été testé par microagglutination ou par microimmunofluorescence. Au vu des résultats, nous pouvons affirmer qu'un très large éventail d'hôtes est en contact avec des tiques infectées. Cependant, nous montrons que la répartition des animaux à sérologie positive n'est pas uniforme. En effet, si nous séparons l'ensemble des animaux examinés en 2 populations, l'une établie au-dessous de 1000 m d'altitude et l'autre en dessus on remarque que respectivement 32,5% et 9,5% des sera recueillis ont des anticorps. La séparation est très nette pour les animaux sédentaires (bovins et micromammifères) ce qui correspond à la distribution attendue de la tique *I. ricinus*.

Zusammenfassung

Im Verlauf von Studien zur Ökologie der «Rickettsie suisse», einem provisorisch so benannten, durch *Ixodes ricinus* übertragenen Erreger aus der Fleckfieber-Gruppe, wurden Seren von Haus- und Wildtieren aus dem Kanton Neuenburg untersucht, um Antikörper gegen diesen Mikroorganismus nachzuweisen. Verwendet wurden die Techniken der Mikroagglutination und der Mikroimmunofluoreszenz. Die erhaltenen Resultate bestätigen, dass ein grosses Spektrum von Wirten im Kontakt mit infizierten Zecken gewesen, jedoch die Verteilung der serologisch positiv Reagierenden nicht einheitlich ist. Wenn man die Gesamtmenge der untersuchten Tiere in zwei Populationen einteilt – unter und über 1000 m Höhe –, so enthalten jeweils 32,5% und 9,5% der gesammelten Seren Antikörper. Die Trennung ist besonders offensichtlich bei den «sesshaften» Tieren (Rinder und Kleinsäuger), was dem erwarteten Vorkommen der Zecke *I. ricinus* entspricht.

Riassunto

Nel corso dello studio dell'ecologia della «rickettsie suisse» per una rickettsia del gruppo della febbre purpurea trasmessa dall'*Ixodes ricinus*, abbiamo cercato di esaminare il siero degli animali domestici e selvatici del Cantone di Neuchâtel per scoprire la presenza di anticorpi contro questo microorganismo. L'insieme dei sieri è stato controllato per microagglutinazione o per microimmunofluorescenza. Dai risultati ottenuti possiamo affermare che un elevato ventaglio di ospiti è in contatto con le zecche infette. Tuttavia dimostriamo che la ripartizione degli animali sieropositivi non è uniforme. In effetti, se separiamo gli animali esaminati in due popolazioni, una situata sotto i 1000 metri di altitudine e l'altra al di sopra, si constata che il 32,5% ed il 9,5% dei sieri contiene anticorpi. La separazione è molto netta per gli animali sedentari (bovini e micromammiferi), ciò che corrisponde alla constatata presenza della zecca *Ixodes ricinus*.

Summary

In the course of studying the ecology of the «Swiss Agent», which is the name given provisionally to a spotted fever group rickettsia transmitted by *Ixodes ricinus*, we have undertaken an examination of the serum of both domestic and wild animals in the Canton of Neuchâtel in order to ascertain the presence of antibodies against this microorganism. All the sera were tested by microagglutination or microimmunofluorescence. The results enable us to affirm that there is a very broad spectrum of hosts

in contact with infected ticks, but we also show that the distribution of the animals with a positive serological reaction is not uniform. Indeed, if all the animals examined are separated into 2 populations, the one living below and the other above 1000 m above sea-level, it is seen that the percentages of the collected sera containing antibodies are 32.5% and 9.5% respectively. The separation is particularly clear among «sedentary» animals (cattle and small mammals), an observation corresponding with the expected distribution of the *I. ricinus* tick.

Bibliographie

- Aeschlimann A.: *Ixodes ricinus* L. Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse. Acta trop. 29, 321-340 (1972). - Aeschlimann A., Burgdorfer W., Matile H., Péter O. et Wyler R.: Aspects nouveaux du rôle de vecteur joué par *Ixodes ricinus* L. en Suisse. Acta trop. 36, 181-191 (1979). - Burgdorfer W., Friedhoff K. T. and Lancaster Jr. J. L.: Natural history of tick-borne spotted fever in the USA: Susceptibility of small mammals to virulent *Rickettsia rickettsii*. Bull. Org. Mond. Santé 35, 149-153 (1966). - Burgdorfer W., Aeschlimann A., Péter O., Hayes S. F. and Philip R. N.: *Ixodes ricinus*: Vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. Acta trop. 36, 357-367 (1979). - Fiset P., Ormsbee R. A., Silberman R., Peacock M. and Spielman S. H.: A microagglutination technique for detection and measurement of rickettsial antibodies. Acta virol. 13, 60-66 (1969). - Georgieva G., Serbezov V. and Alexandrov E.: Investigation of some ixodic ticks for infestation with rickettsiae by means of immunofluorescent hemocytic test. 2. Internat. Arbeitskolloquium über Naturherde von Infektionskrankheiten in Zentraleuropa, Graz, 25-28. 2. 1976 (Herausg.: W. Sidl and H. Troger), 317-322, Graz 1976. - Giroud P., Capponi M., Dumas N. et Rageau J.: Les *Ixodes ricinus* et *hexagonus* de France contiennent des agents rickettsiens ou proches. Compt. rend. Acad. Sci., Paris 260, 4874-4876 (1965). - Giroud P., Capponi M., Dumas N., Colas-Belcour J. et Masson R.: Mise en évidence d'une façon presque constante sur des tiques de l'Est de la France de l'antigène du groupe boutonneux pourpré et isolement de souches. Compt. Rend. Acad. Sci., Paris 255, 611-612 (1962). - Jadin J. et Giroud P.: Présence de rickettsies chez *Ixodes ricinus* en Belgique. Manuscrit non publié, 1-7, (1966). - Péter O., Burgdorfer W. et Aeschlimann A.: Enquête épidémiologique dans un foyer naturel de rickettsies à *Ixodes ricinus* du Plateau suisse. Ann. parasitol. 56, 1-8 (1981). - Philip R. N., Casper E. A., Ormsbee R. A., Peacock M. G. and Burgdorfer W.: Microimmunofluorescence test for the serological study of Rocky Mountain spotted fever and typhus. J. clin. Microbiol. 3, 51-61 (1976). - Řeháček J., Brezina R., Ač P., Župančičová M. and Kováčová E.: Contribution to the natural locality of rickettsiae belonging to the Rocky Mountain spotted fever group in Slovakia. Folia parasitol. 19, 41-52 (1972). - Řeháček J., Kováčová E. and Kováč P.: Rickettsiae belonging to the spotted fever group from ticks in the Tribeč Mountains. Folia parasitol. 23, 69-73 (1976a). - Řeháček J., Župančičová M., Brezina R., Urvoelgyi J., Kováčová E., Tarasevič I. V. and Jablonskaja V. A.: Rickettsioses studies. 2. Natural foci of rickettsioses in East Slovakia. Bull. Org. Mond. Santé 53, 31-38 (1976b). - Řeháček J., Vošta J., Tarasevič I. V., Brezina R., Jablonskaja V. A., Plotnikova L. F., Fetisova N. F. and Hanák P.: Rickettsioses studies. 3. Natural foci of rickettsioses in South Bohemia. Bull. Org. Mond. Santé 55, 455-461 (1977).

Régistration du manuscrit: 30 octobre 1984

ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

963/4

Tome 56

1981

N° 1

© Masson, Paris, 1981.

Annales de Parasitologie (Paris)
1981, t. 56, n° 1, pp. 1-8

MÉMOIRES ORIGINAUX

Enquête épidémiologique dans un foyer naturel de Rickettsies à *Ixodes ricinus* du plateau suisse (1)

par O. PETER *, W. BURGDORFER ** et A. AESCHLIMANN *

* Institut de Zoologie, Chantemerle 22, CH-2000 Neuchâtel.

** Epidemiology Branch, Rocky Mountain Laboratories, Hamilton, Montana 59840, U.S.A.

RESUME. Dans une forêt de plaine humide du Plateau suisse, une Rickettsie du groupe de la fièvre pourprée, appelée par commodité « Rickettsie suisse », a été trouvée dans 8,5 % des tiques de l'espèce *Ixodes ricinus*.

L'évolution de ce microorganisme dans les tiques a été étudiée. Quatre cent trente-trois descendants de la première génération, provenant de 17 ♀♀ infectées, ont été testés. Tous les descendants, quel que soit leur stade évolutif (larve, nymphe, adulte), se sont révélés être infectés. La transmission transovarienne et transstadiale a donc eu lieu dans le 100 % des cas.

Cent-soixante-huit micromammifères ont été capturés dans cette même forêt, soit 127 *Clethrionomys glareolus*, 29 *Apodemus sylvaticus* et *flavicolis*, 7 *Microtus agrestis* et 5 *Sorex araneus*. Tous étaient lourdement infestés par les larves d'*I. ricinus* (3 612 larves récoltées). Un échantillonnage de 143 séra, provenant des 5 espèces de micromammifères capturés, ont été testés par microagglutination avec un antigène spécifique anti-« Rickettsie suisse » : 114 d'entre eux (82 %) présentaient des anticorps contre cette Rickettsie.

Epidemiological survey in a natural focus of Rickettsia transmitted by Ixodes ricinus in Switzerland.

SUMMARY. A spotted fever group Rickettsia referred to as « Swiss agent » was detected in 8.5 % of *Ixodes ricinus* collected in a marshy forest of the Swiss plateau.

(1) Ce travail, réalisé avec l'aide du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (Requête n° 3.303.78), présente des résultats qui feront partie de la thèse du premier des auteurs.

Accepté le 21 juillet 1980.

This organism, in its tick vector, was found to be transmitted stadially as well as ovarially; of 433 larval, nymphal or adult ticks from 17 parental tick females, all were infected.

A total of 3,612 larval *I. ricinus* were collected from 168 small mammals including 127 *Clethrionomys glareolus*, 29 *Apodemus sylvaticus* and *flavicolis*, 7 *Microtus agrestis*, and 5 *Sorex araneus* from the same forest. 143 sera were obtained from these rodents: 114 (82 %) had microagglutinating antibodies to the « Swiss agent ».

I - Introduction

Récemment, à l'instar d'auteurs allemands, autrichiens, tchécoslovaques et français, travaillant chacun dans leur pays respectif (Liebisch, 1976; Liebisch *et al.*, 1978; Kaaserer *et al.*, 1976; Bazlikova *et al.*, 1977; Rehacek *et al.*, 1971, 1977; Gilot, 1975), nous avons pu mettre en évidence la présence en Suisse d'une rickettsie dans la tique *Ixodes ricinus* (Aeschlimann *et al.*, 1979; Burgdorfer *et al.*, 1979). Les premiers essais d'identification montrent que cette « Rickettsie suisse » (= Rs) (2) s'apparente au groupe de la fièvre pourprée. Elle est cependant différente des autres espèces décrites jusqu'à présent en Europe, soit *R. conorii*, *R. sibirica* et *R. slovaca*. Des recherches plus approfondies sont actuellement en cours pour préciser son statut systématique définitif.

La Rs a été isolée pour la première fois au lieu-dit « Staatswald » (coordonnées : 575-576/203-204, carte de Suisse au 1/25 000, feuille Murten n° 1165), une forêt de plaine humide, à sous-bois broussailleux, située dans la région du Grand Marais à environ 15 km au sud-est de Neuchâtel (alt. 433 m). Après avoir contrôlé le taux de tiques infectées, nous avons effectué une étude sérologique pour connaître l'importance de la circulation de cette rickettsie parmi les populations de micromammifères. Ce sont les résultats de cette enquête que nous publions ici.

II - Matériel et méthodes

I - Récolte du matériel.

Les travaux ont été menés durant l'année 1979. D'avril à septembre, les tiques ont été récoltées au « drapeau » dans la forêt du Staatswald, puis placées jusqu'à leur examen dans un bac à température ambiante où l'humidité relative est maintenue à environ 95 %.

De mi-mars à fin septembre, dans cette même forêt, nous avons capturé des micromammifères que nous avons transférés dans de petites cages grillagées, elles-

(2) Dans la littérature anglaise, la Rs est désignée sous le nom de « Swiss agent ».

mêmes enfermées dans des sacs de toile. Les micromammifères sont ainsi gardés pendant 5 à 7 jours. Deux fois par jour, les tiques gorgées sont récoltées au fond des sacs. Toutes les tiques d'un animal sont maintenues séparées dans des tubes jusqu'à la mue. La détermination de l'Arthropode est ainsi plus aisée, de même que la confection des tests pour la présence de rickettsies. D'autre part, des échantillons de sang de chaque micromammifère sont prélevés du sinus orbital.

2 - Travaux de laboratoire.

Toutes les tiques adultes récoltées sur la végétation ont subi le test de l'hémolymphe (Burgdorfer, 1970). Les frottis sont colorés par la technique de Giménez (1964). Chaque femelle trouvée infectée est nourrie sur un cobaye ou un lapin. Les tiques des deux sexes — les femelles après la ponte seulement — sont ensuite disséquées et des frottis d'hypoderme et de tubes de Malpighi colorés au Giménez ou préparés pour une étude en immunofluorescence (IF). Les nymphes sont écrasées individuellement sur des lames et les frottis colorés au Giménez.

La transmission transovarienne et transstadiale des rickettsies a également été étudiée. Une partie des larves (F₁) provenant de plusieurs femelles positives ont été écrasées individuellement sur des lames et les tissus préparés pour les réactions en IF. Les larves restantes ont été nourries sur des souris blanches.

Pour la transmission transstadiale, on a recherché les rickettsies dans les frottis de tissus de nymphes et d'adultes descendant de femelles infectées. Les lots de nymphes et d'adultes ont été nourris sur le lapin.

Toutes les réactions d'IF directe ont été réalisées avec un conjugué spécifique [immun-sérum de *Microtus pennsylvanicus* anti *Rs* marqué à l'isothiocyanate de fluoresceïne (3)], selon la technique décrite par Burgdorfer et Lackman (1960).

Pour la sérologie, nous avons utilisé le test de microagglutination (Fiset *et al.*, 1969), avec un antigène préparé à partir d'une souche de *Rs* (3) et un antigène de *Coxiella burnetii* (souche Ohio) (3). Les titres égaux à 1/8, ou plus grands, ont été considérés comme spécifiques.

III - Résultats

Infection des tiques.

Sur un total de 2 217 *Ixodes ricinus* récoltés au « Staatswald » (1 675 adultes et 544 nymphes), 188 présentaient des rickettsies (147 adultes et 41 nymphes), soit 8,5 % (Tableau I). Les transmissions transovarienne et transstadiale ont réussi dans le 100 % des cas. En effet, 433 descendants de 17 femelles infestées ont été testés, soit 191 larves (transmission transovarienne), 113 nymphes et 129 adultes (transmission transstadiale). Tous les descendants examinés étaient infectés (Tableau II).

(3) Préparé au Rocky Mountain Laboratory, Hamilton, U.S.A.

Tableau I. Présence de la « *Rickettsie suisse* » dans les tiques *I. ricinus* capturées sur la végétation

Adultes : résultats basés sur l'étude des tests d'hémolymphe

Nymphes : résultats basés sur l'étude de frottis de tissus de nymphes

année	Nombre de tiques examinées	Nombre de tiques infestées	%
1978	1324 adultes	115 adultes	8,3
	520 nymphes	38 nymphes	
1979	349 adultes	32 adultes	9,4
	24 nymphes	3 nymphes	
Total	2217	188	8,5

Tableau II. Transmissions transovarienne et transstadiale de la « *Rickettsie suisse* » par *Ixodes ricinus*

Descendance de 17 ♀♀ (groupée par lots)	Nombre de descendants examinés et trouvés infestés				
	Transmission transovarienne	Transmission transstadiale (larves → nymphes)	Transmission transstadiale (nymphes → adultes) ♂ ♀		Transmission transovarienne totaux
Lot 1: 4 ♀♀ 134 descendants	80/80	54/54	pas étudié		134/134
Lot 2: 5 ♀♀ 130 descendants	111/111	19/19	pas étudié		130/130
Lot 3: 2 ♀♀ 71 descendants	pas étudié	9/9	21/21	41/41	71/71
Lot 4: 4 ♀♀ 41 descendants	pas étudié	27/27	8/8	6/6	41/41
Lot 5: 2 ♀♀ 57 descendants	pas étudié	4/4	14/14	39/39	57/57
Totaux : 433 descendants	191/191	113/113	43/43	86/86	433/433

Les micromammifères.

L'ensemble des animaux capturés (168 individus) ont produit 3 612 larves et 77 nymphes gorgées de l'espèce *Ixodes ricinus* (Tableau III) et quelques rares *I. trianguliceps* dont nous ne tiendrons pas compte dans ce travail. Quelques *Sorex araneus*, trouvés morts dans les pièges, ont subi un déparasitage manuel sous la loupe binoculaire. Quant aux autres micromammifères, ils ont libéré naturellement leurs tiques.

Tableau III. Nombre d'immatures d'*I. ricinus* fixés sur différentes espèces de micromammifères

Nombre de micromammifères	Nombre de larves fixées	Nombre de nymphes fixées	Nombre moyen de larves / animal
<i>Clethrionomys glareolus</i> : 127	2792	58	22.0
<i>Apodemus</i> sp. : 29	635	14	22.0
<i>Microtus agrestis</i> : 7	113	5	16.1
<i>Sorex anareus</i> : 5	72	0	14.4
Totaux : 168	3612	77	21.5

Nous avons étudié, dans le détail, le nombre de tiques qui s'étaient nourries sur les campagnols roussâtres (*Clethrionomys glareolus*), en classant les hôtes selon l'âge et le sexe après chaque récolte mensuelle. Les animaux juvéniles ont été séparés des adultes par le critère du poids, la limite ayant été fixée par l'observation à 19 g (Tableau IV).

La technique de microagglutination a révélé que 77 *Cl. glareolus* sur 102 testés (75,5 %) présentaient des anticorps spécifiques contre la *Rs* avec des titres variant de 1/8 à 1/1 024 (Tableau V). Si l'on ne tient compte que des adultes, 52 animaux sur 57 (91,2 %) ont été en contact avec la *Rs*.

Sur 34 *Apodemus sylvaticus* et *flavicolis* récoltés, 30 présentaient des anticorps (88,2 %), avec des titres variant de 1/8 à 1/1 024.

Des anticorps ont également été trouvés dans 6 *Microtus agrestis* et 1 *Sorex araneus*.

Soulignons que sur l'ensemble des micromammifères examinés, seul un *Apodemus sylvaticus* présentait un titre d'anticorps de 1/8 contre *Coxiella burnetii*.

IV - Discussion

Dans la forêt du « Staatswald », le taux d'infection d'*I. ricinus* par la *Rs* varie de 7 à 11 %. Ce chiffre est nettement inférieur à celui trouvé en Bulgarie (Georgieva *et al.*, 1976) où 42 % d'*I. ricinus* étaient infectés par une rickettsie du groupe de la fièvre pourprée. La présence de rickettsies de ce groupe chez *I. ricinus* a par ailleurs été mise en évidence dans plusieurs autres pays d'Europe : France, Allemagne, Autriche, Tchécoslovaquie. La Suisse ne fait donc pas exception.

Burgdorfer et Brinton (1975) ont montré que les transmissions transovarienne et transstadiale ont lieu dans 100 % des cas avec *Dermacentor andersoni* infecté de *R. rickettsii*. Nous avons obtenu les mêmes résultats avec la Rickettsie suisse.

Tableau IV. Nombre d'*I. ricinus* trouvés gorgés sur *Clethrionomys glareolus* et représentation graphique des résultats
 (LL : larves ; NN : nymphes ; Nr : nombre de rongeurs ; n : nombre moyen de larves gorgées par rongeur ; nt : nombre moyen d'immatures gorgées par rongeur)

Année 1979	Cl. glareolus ♂		n	Cl. glareolus ♀		n	Cl. glareolus juv.		n	nt
	Nr	LL		Nr	LL		Nr	LL		
mars	4	6	1.5	2	0	0	0	0	0	1
mai	4	48	12	2	68	0	34	2	0	14.5
juin	18	1073	60	19	382	15	20	18	342	3
juillet	10	328	32.8	5	129	4	26	18	145	2
septembre	5	38	7.5	2	56	2	23	11	85	1
total	46	1580	34.3	32	640	21	20	49	572	6

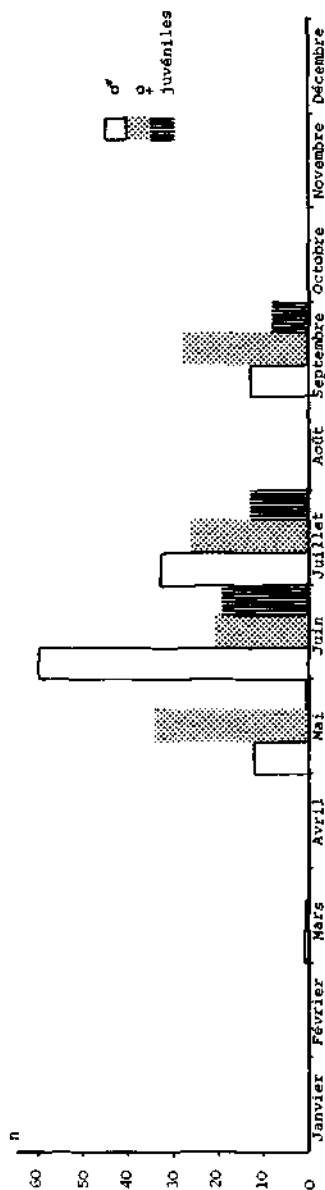


Tableau V. Sérologie des micromammifères (test de microagglutination)

ESPECES	sera testés / sera positifs	%	TITRES				
			1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
<i>Cl. glareolus</i> ♂	34/31	91,2	3	3	1	8	16
	23/21 ¹		0	0	1	2	18
	juv.	45/25	55,5	5	6	4	2
Totaux	102/77	75,5	8	9	6	12	42
<i>Apodemus</i> Sp.	34/30	88,2	1	1	8	7	13
<i>M. agrestis</i>	6/6		0	0	1	0	5
<i>S. araneus</i>	1/1		0	0	0	0	1
Totaux	143/114	79,7	9	10	15	19	61

C'est un fait bien connu que les micromammifères sont, au printemps, lourdement infestés par les larves d'*I. ricinus*. Cette infestation varie au cours de la saison et nos résultats récents avec le campagnol roussâtre (*Cl. glareolus*) coïncident avec ceux obtenus dans la même forêt par Mermod *et al.* (1973). Nous apportons cependant des précisions nouvelles quant au taux d'infestation des divers individus au sein d'une même population. Ainsi, au mois de juin, les campagnols mâles sont 3 fois plus parasités par les larves que les femelles ou les juvéniles. On pourrait supposer que les déplacements des mâles sont plus fréquents et plus étendus que ceux des femelles, par conséquent leurs possibilités d'infestation par les tiques seraient également plus nombreuses. Cette différence de comportement des hôtes pourrait se refléter dans les résultats sérologiques, en ce sens que le nombre de mâles positifs devrait être plus élevé que celui des femelles. Or ce n'est pas le cas. En effet, l'enquête sérologique révèle que 7 semaines après leur naissance, soit après avoir atteint le poids de 19 g, 91,2 % des campagnols des deux sexes ont déjà été en contact avec un nombre suffisant de tiques infectées pour qu'ils présentent des anticorps décelables par microagglutination. Par contre, le 55,5 % seulement des animaux juvéniles présente une sérologie positive. Ces résultats sérologiques n'ont rien d'étonnant si l'on tient compte de l'importance de la population de tiques au « Staatswald », du pourcentage de tiques infectées et du taux d'infestation des micromammifères par les larves. Il est cependant remarquable de constater que les enquêtes sérologiques effectuées sur les populations de micromammifères en Allemagne (Krauss *et al.*, 1977), en Tchécoslovaquie (Rehacek *et al.*, 1972, 1976, 1977) et en Autriche (Kaaserer *et al.*, 1976) révèlent des pourcentages nettement inférieurs (maximum 33 %). Certes la nature du biotope choisi,

mais peut-être aussi l'utilisation par ces auteurs d'un antigène non spécifique (p. ex. préparé avec une autre espèce de rickettsie du groupe de la fièvre pourprée), pourraient expliquer cette différence.

Bibliographie

- Aeschlimann A., Burgdorfer W., Maïlle H., Péter O., Wyler R.: Aspects nouveaux du rôle de vecteur joué par *Ixodes ricinus* L. en Suisse. *Acta Tropica*, 1979, 36, 181-191.
- Bazlikova M., Kaaserer B., Brezina R., Kovacova E., Kaaserer G.: Isolierungen von Rickettsien der Spotted-Fever-Gruppe (SF-Gruppe) aus *Dermacentor marginatus*-Zecken aus Tirol, Österreich. *Immunität Infektion*, 1977, 5, 167.
- Burgdorfer W.: Hemolymph test. A technique for detection of rickettsia in ticks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1970, 19, 1010-1014.
- Burgdorfer W., Brinton L. P.: Mechanisms of transovarial infection of Spotted Fever Rickettsiae in ticks. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1975, 266, 61-72.
- Burgdorfer W., Lackman D.: Identification of *Rickettsia rickettsii* in the wood tick. *Dermacentor andersoni*, by means of fluorescent antibody. *J. Inf. Dis.*, 1960, 107, 241-244.
- Burgdorfer W., Aeschlimann A., Péter O., Hayes S. F., Philip R. N.: *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Tropica*, 1979, 36, 357-367.
- Fiset P., Ormsbee R. A., Silberman R., Peacock M., Spielman S. H.: A microagglutination technique of detection and measurement of rickettsial antibodies. *Acta Virol.*, 1969, 13, 60-66.
- Georgieva G., Serbezov, Alexandrov E.: Investigation on some ixodic ticks for infestation with rickettsiae by means of immunofluorescent hemocytic test. 2. Int. Arbeitskolloquium über « Naturherde von Infektionskrankheiten in Zentraleuropa », ed. W. Sixl und H. Troger, Graz, 1976, 317-322.
- Giménez D. F.: Staining rickettsiae in yolk-sack cultures. *Stain Technol.*, 1964, 39, 135-140.
- Gilot B.: Recherches des rickettsies hébergées par les tiques (Acariens: *Ixodoidea*) du Sud-Est de la France. Premier bilan. Contexte écologique de rencontre avec l'homme. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 1975, 68, 529-538.
- Kaaserer B., Kaaserer G., Sixl W., Wirthalm H., Stünzer D.: Serologische Untersuchungen von Wildtieren in der Alpenen Region in Tirol. 2. Int. Arbeitskolloquium über « Naturherde von Infektionskrankheiten in Zentraleuropa », ed. W. Sixl und H. Troger, Graz, 1976, 331-334; 399-402.
- Krauss H., Weber A., Schmatz H. D.: Untersuchungen zum Vorkommen von Komplementbindenden Antikörpern gegen Rickettsien bei Haus- und Wildtieren in der Bundesrepublik Deutschland. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 1977, 90, 143-146.
- Liebisch A.: Die Rolle einheimischer Zecken (*Ixodidae*) in der Epidemiologie des Q-Fiebers in Deutschland. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 1976, 85, 274-276.
- Liebisch A., Burgdorfer W., Rahman M. S.: Epidemiologische Untersuchungen an Schafzecken (*Dermacentor marginatus*). *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 1978, 85, 121-126.
- Mermod Cl., Aeschlimann A., Graf J. F.: Ecologie et éthologie d'*Ixodes ricinus* Linné 1758, en Suisse (*Acarina, Ixodoidea*). I. Fluctuations numériques. *Acarologia*, 1973, 15, 197-205.
- Rechacek J., Brezina R., Zupancicova M., Kovacova E.: Relationship between ticks and rickettsiae of the RMSF group isolated in Slovakia. *Proc. 3rd Int. Cong. Acar.*, 1971, 627-630.
- Rechacek J., Brezina R., Ac P., Zupancicova M., Kovacova E.: Contribution to the natural locality of rickettsiae belonging to the Rocky Mountain spotted fever (RMSF) group in Slovakia. *Folia parasitol.*, 1972, 19, 41-51.
- Rechacek J., Kovacova E., Kovac P.: Rickettsiae belonging to the spotted fever group from ticks in the Tribec mountains. *Folia parasitol.*, 1976, 23, 69-73.
- Rechacek J., Vosta J., Tarasevic I. V., Brezina R., Jablonskaja V. A., Plotnikova L. F., Fctisova N. F., Hanak P.: Rickettsioses studies. 3. Natural foci of rickettsioses in South Bohemia. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 1977, 55, 455-461.