

Etude écologique de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, agent de la borréliose de Lyme en Suisse et au Maroc: distribution et prévalence d'infection chez *Ixodes ricinus*.

PAR

FATIMA JOUDA

THESE PRESENTEE A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE NEUCHATEL  
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

NEUCHATEL 2003

IMPRIMATUR POUR LA THESE

**Etude écologique de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, agent de la borréliose de Lyme en Suisse et au Maroc: distribution et prévalence d'infection chez *Ixodes ricinus***

**Mme Fatima JOUDA**

---

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

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

Mmes L. Gern, D. Postic (Paris),  
MM. B. Betschart et O. Péter (Sion)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 27 octobre 2003

La doyenne:



Martine Rahier

<b>I. INTRODUCTION</b> .....	<b>6</b>
I.1 HISTORIQUE DE LA BORRELIOSE DE LYME .....	6
I.2 LES VECTEURS DE LA BORRELIOSE DE LYME .....	6
I.2.1 <i>Systématique</i> .....	6
I.2.2 <i>Ecologie d'I. ricinus</i> .....	9
I.2.3 <i>Cycle de vie d'I. ricinus</i> .....	10
I.2.4 <i>Hôtes d'I. ricinus</i> .....	11
I.3 LE PATHOGENE .....	12
I.3.1 <i>Systématique et biologie de B. burgdorferi sl</i> .....	12
I.3.2 <i>Complexe B. burgdorferi sl</i> .....	13
I.3.3 <i>Cycle des Borrelia</i> .....	13
I.3.4 <i>Epidémiologie de la borréliose de Lyme</i> .....	14
I.3.5 <i>Hôtes réservoirs</i> .....	15
I.3.6 <i>Transmission de B. burgdorferi sl</i> .....	17
I.3.7 <i>Protéines antigéniques de Borrelia</i> .....	17
I.4 LE SERODIAGNOSTIC DE LA BORRELIOSE DE LYME ET SA FIABILITE .....	19
<b>II. BUTS</b> .....	<b>20</b>
<b>III. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	<b>21</b>
III.1 TIQUES .....	21
III.1.1 <i>Zones d'étude en Suisse</i> .....	21
III.1.2 <i>Zones d'étude au Maroc</i> .....	23
III.1.2.1 <i>Récolte des tiques</i> .....	24
III.2.1 <i>Immunofluorescence directe</i> : .....	25
III.2.3 <i>Mise en culture</i> .....	26
III.2.4 <i>Identification de B. burgdorferi sl</i> .....	26
III.3 WESTERN BLOT.....	27
III.3.1 <i>Préparation de l'antigène pour le Western blot</i> . .....	27
III.3.2 <i>Sérums</i> .....	28
III.3.3 <i>SDS PAGE et Western Blot</i> .....	28
III.3.4 <i>Interprétation des résultats de Western blot</i> .....	29
<b>IV RÉSULTATS</b> .....	<b>31</b>
IV.1 PUBLICATION I .....	32

<i>Distribution and Prevalence of Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ricinus Ticks of Canton Ticino (Switzerland)</i> .....	32
<i>European Journal of Epidemiology 2003. 18:907-912</i> .....	32
IV.2 PUBLICATION II .....	39
<i>Influence of altitude on Ixodes ricinus density, and on distribution and prevalence of Borrelia burgdorferi sensu lato infection</i> .....	39
<i>Journal of Medical Entomology 2003, In press</i> .....	39
IV.3 PUBLICATION III .....	63
<i>First isolation of Borrelia burgdorferi sensu lato from Ixodes ricinus ticks in Morocco</i> ..	63
<i>Vector borne and Zoonotic Diseases 2003. 3:133-139</i> .....	63
IV.4 PUBLICATION IV .....	71
<i>Density of questing Ixodes ricinus nymphs and adults infected by Borrelia burgdorferi sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale</i> .....	71
<i>Submitted to Vector borne and Zoonotic Diseases 2003</i> .....	71
IV.5 ETUDES SEROLOGIQUES AU MAROC .....	95
IV.5.1 <i>Sérums Humains</i> .....	95
IV.5.1.1 <i>Identification des bandes qui ont réagi avec le sérum de référence pour les quatre espèces</i> .....	95
IV.5.1.2 <i>Résultats des Western blots des différents groupes de sérums étudiés</i> .....	95
IV.5.2 <i>Sérums de chiens</i> .....	96
IV.5.2.1 <i>Identification des bandes qui ont réagi avec le sérum de référence de chien pour les trois espèces de Borrelia</i> .....	96
IV.5.2.2 <i>Résultats des Western blots des différents sérums de chiens</i> .....	97
<b>V. DISCUSSION</b> .....	<b>106</b>
V.1 I. RICINUS ET B. BURGDORFERI SL EN SUISSE .....	106
V.1.1 <i>Densité des tiques</i> .....	106
V.1.2 <i>Prévalence d'infection par B. burgdorferi sl</i> .....	107
V.1.3 <i>Espèces de Borrelia</i> .....	109
V.2 I. RICINUS ET B. BURGDORFERI SL AU MAROC .....	112
V.2.1 <i>Densité de tiques</i> .....	112

V.2.2 Prévalence d'infection par <i>B. burgdorferi</i> sl. ....	115
V.2.3 Les espèces de <i>Borrelia</i> au Maroc.....	116
V.3 Sérodiagnostic de la borréliose de Lyme au Maroc. ....	118
<b>RESUME</b> .....	<b>122</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>123</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>125</b>

## I. Introduction

La borréliose de Lyme est une maladie infectieuse, causée par un spirochète appartenant à *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Ce pathogène persiste dans les zones endémiques à travers un cycle impliquant des tiques du genre *Ixodes* et des hôtes vertébrés. L'homme ne constitue qu'un hôte accidentel.

### I.1 Historique de la borréliose de Lyme

La borréliose de Lyme a été décrite au début du siècle par Afzelius, (1910) en Suède et Lipschütz (1913) en Autriche. Ces auteurs ont décrit pour la première fois l'érythème migrant (EM), la lésion qui se développe autour du site de la piqûre de la tique. Quelques années plus tard des formes neurologiques de la maladie ont été rapportées par l'observation des cas de méningo-radculite suite à une morsure de tique et à un érythème. (Garin et Bujadoux, 1922, Bannwarth, 1941). En 1975, aux États-Unis une augmentation de cas d'arthrites inflammatoires, en particulier chez les enfants, a été signalée près d'une ville du Connecticut: Lyme (Steere et al. 1977). Des études entomologiques ont permis d'impliquer un agent infectieux transmis par des tiques ou d'autres arthropodes hématophages.

En 1979, Steere et Malawista ont rapporté une corrélation étroite entre la maladie de Lyme et *I. dammini* au nord-est des États-Unis et *I. pacificus* à l'Ouest.

Au début des années 80, le Dr W. Burgdorfer cherchait sur la côte du nord-est des États-Unis la présence de rickettsies dans des tiques. Il découvre des spirochètes dans le tube digestif des tiques *I. dammini* (Burgdorfer et al. 1982).

Par la suite, des spirochètes similaires ont pu être isolés d'*I. ricinus* dans plusieurs pays d'Europe telle que la Suisse (Burgdorfer et al. 1983, Barbour et al. 1983), et en Allemagne (Ackermann et al. 1984).

### I.2 Les vecteurs de la borréliose de Lyme

La distribution de la borréliose de Lyme est étroitement associée à celle de ses vecteurs. Il convient de présenter la systématique des tiques ainsi que leur écologie.

#### I.2.1 Systématique

Les tiques sont des arthropodes appartenant à la classe des *Chelicerata*, ectoparasites hématophages vivant au dépend des vertébrés, parasites obligatoires à tous les stades de

leur développement. Elles sont regroupées en 850 espèces, réparties dans le monde entier, elles sont représentées par trois familles (Tableau 1).

La famille des *Nuttalliellidae* regroupe une seule espèce, elle n'a pas d'intérêt en santé humaine.

La famille des *Argasidae*, "tiques molles", comprend des tiques dont l'anatomie externe est sans bouclier dorsal ou scutum. Elle regroupe environ 167 espèces (Hoogstraal, 1985). Leur repas est rapide et la piqûre peut être douloureuse.

La famille des *Ixodoidea*, "tiques dures", comprend des tiques dont l'anatomie externe présente toujours un scutum dorsal. Leur repas est long de 4 à 10 jours, et la piqûre est indolore. Elle regroupe environ 643 espèces répandues dans le monde entier (Hoogstraal, 1985) et regroupées en une dizaine de genres. C'est à cette dernière famille qu'appartient le genre *Ixodes*.

Tableau 1 : Systématique des tiques et leurs principaux genres selon Hoogstraal (1985).

<b>Embranchement</b>	<i>Arthropoda</i>	
<b>Classe</b>	<i>Chelicerata</i>	
<b>Sous classe</b>	<i>Arachnida</i>	
<b>Ordre</b>	<i>Acarina</i>	
<b>Sous ordre</b>	<i>Metastigmata</i>	
<b>Famille</b>	<b>Sous Famille</b>	<b>Genre</b>
<i>Ixodoidea</i>	<i>Ixodinae</i>	<i>Ixodes</i>
	<i>Amblyomminae</i>	<i>Aponoma</i>
		<i>Amblyomma</i>
	<i>Haemaphysalinae</i>	<i>Haemaphysalis</i>
	<i>Hyalomminae</i>	<i>Hyalomma</i>
	<i>Rhipicephalinae</i>	<i>Rhipicephalus</i>
		<i>Dermacentor</i>
	<i>Boophilus</i>	
<i>Argasidae</i>		<i>Argas</i>
		<i>Otobius</i>
<i>Nuttalliellidae</i>		<i>Nuttalliella</i>

Il existe quatre espèces principales d'*Ixodes* vectrices de *B. burgdorferi* sl (Eisen et Lane, 2002). Aux États-Unis *I. scapularis* et *I. pacificus*, sont les principales espèces vectrices de *B. burgdorferi* sl (Piesman, 2002). *I. scapularis* est répandue dans les états centraux du nord du pays et dans ceux de l'est. La distribution d'*I. pacificus* se prolonge le long de la Côte Pacifique au Nord ouest des États-Unis et au sud ouest du Canada. En Europe *I. ricinus* et *I. persulcatus* sont les principaux vecteurs des agents de la maladie de Lyme (Gern et al. 2002). *I. ricinus* se rencontre de l'Europe du Nord à l'Afrique du Nord et du Portugal à l'Europe de l'est où la distribution de cette espèce chevauche celle d'*I. persulcatus*. Cette dernière espèce est répandue en Europe de l'Est et en Asie (Korenberg et al. 2001, Miyamoto et al. 2002).

On peut signaler que ces différentes espèces peuvent également transmettre d'autres agents pathogènes à l'homme (Tableau 2).

Tableau 2 : Agents pathogènes connus transmis à l'homme par les vecteurs de *B. burgdorferi* sl (Eisen et Lane, 2002)

vecteur	Répartition géographique	Pathogènes							
		Bb ss	Ba	Bg	TBE	Bab div	Bab mic	Ana pha	
<i>I. persulcatus</i>	Europe de l'est et Asie		X	X					
<i>I. pacificus</i>	Nord ouest des Etats-Unis	X						X	
<i>I. scapularis</i>	Nord est des Etats-Unis	X			X		X	X	
<i>I. ricinus</i>	Europe, Afrique du Nord, ouest de l'Asie	X	X	X	X	X		X	

*Bb ss*: *B. burgdorferi* sensu stricto

*Ba*: *B. afzelii*

*Bg*: *B. garinii*

TBE: Encéphalite à tique

*Bab mic*: *Babesia microti*

*Bab div*: *Babesia divergens*

*Ana pha*: *Anaplasma phagocytophila*

En Europe, c'est principalement *I. ricinus* qui transmet *B. burgdorferi* sl à l'homme. Le taux d'infection d'*I. ricinus* par *B. burgdorferi* sl diminue de l'est à l'ouest de l'Europe (Gray et al. 1998) et varie selon les régions géographiques et aussi selon les méthodes utilisées pour détecter et identifier *B. burgdorferi* sl (Gern et al. 1999, Péter et al. 1995, Hubalek et Halouzka. 1998).

En Suisse la prévalence d'infection d'*I. ricinus* par *B. burgdorferi* sl varie entre 3% et 47.5% (Aeschlimann et al. 1986, Péter et al. 1995).

## I.2.2 Ecologie d'*I. ricinus*

La tique *I. ricinus* est largement répandue en Europe, de l'Islande à l'Afrique du Nord et du Portugal à la Russie (Gern et Humair 2002) (Fig 1)



Fig 1: Répartition géographique d'*I. ricinus* selon Gern et Humair (2002)

Malgré cette grande distribution, *I. ricinus* ne se rencontre que dans certains biotopes. Des facteurs biotiques et surtout abiotiques sélectionnent les milieux que cette tique occupe: la température ne doit pas dépasser 35°C dans l' air et le sol et ne doit pas être inférieure à 10°C dans les couches superficielles du sol (Gigon et al. 1985). Ce facteur joue un rôle important dans la morphogenèse, et l'activité saisonnière des *I. ricinus* à jeun. L'humidité relative doit être supérieure à 80% (Gern et Humair 2002). Elle constitue un des facteurs importants pour l'activité et la survie des *I. ricinus*, surtout pour les stades immatures qui sont plus influencés. Perret et al. (2000) ont rapporté que le déficit de saturation peut être un facteur influençant l'activité des tiques.

*I. ricinus* colonise des biotopes caractérisés par un couvert végétal dense et une litière humide riche en feuilles mortes, pour cela cette tique est abondante dans les forêts mixtes et les régions boisées (Gern et Humair 2002). *I. ricinus* peut aussi se rencontrer dans les pâturages comme il a été rapporté en Irlande (Gray et al. 1995b)

En Suisse *I. ricinus* est largement répandue, elle se rencontre dans différents milieux tels que les forêts mixtes, forêts riches en sous – bois, hêtraies, chênaies, bordures des chemins

forestiers, mais rarement dans les milieux ouverts où les conditions climatiques sont sévères telles que la forte exposition au soleil et au vent. L'altitude constitue également un facteur limitant, aucune tique n'a été récoltée à une altitude supérieure à 1450m (Cotty et al. 1986, Kaltenrieder et al. 1985).

En Afrique du Nord *I. ricinus* a été récoltée dans des régions montagneuses. Au Maroc, elle a été rapportée principalement au Moyen Atlas occidental, Haut Atlas central, Haut Rif et à Zear (Bailly - Choumara et al. 1974, Bailly - Choumara et al. 1976, Bailly - Choumara et al. 1979). En Tunisie *I. ricinus* a été récoltée à El Jouza, Col des Ruines, Oued El Abid et Kesra (Zhioua et al. 1989, Zhioua et al. 1999, Younsi et al. 2001). En Algérie, elle a été rapportée dans la région de Saïda et Tlemcen (Yousfi et al. 1986).

### 1.2.3 Cycle de vie d'*I. ricinus*.

Les tiques *I. ricinus* possèdent trois stades: larves, nymphes et adultes (Fig 2). Chacun des stades prend un seul repas sanguin et quitte l'hôte d'où l'appellation de tique triphasique. Après le repas sanguin, la femelle quitte son hôte vertébré, se laisse tomber au sol et après 3 à 4 semaines commence la ponte qui durera une vingtaine de jours. Un mois plus tard de ces œufs (0.5mm) sortent des larves hexapodes de 0.5-1.5mm. Ces larves doivent chercher l'hôte vertébré sur lequel elles effectueront un repas sanguin d'une durée de trois à cinq jours, la larve se détache et tombe au sol où elle subira une mue. Quelques semaines plus tard, elle se transforme en une nymphe (2 à 3.5mm). Ce stade prend aussi un repas sanguin sur un vertébré avant de subir au sol une autre mue qui l'amènera au stade adulte plusieurs semaines à plusieurs mois plus tard. Les adultes à leur tour devront se gorger sur un 3ème hôte convenable et rechercher un partenaire sexuel. L'accouplement des adultes a lieu sur le sol, parfois sur l'hôte. Les mâles se nourrissent peu ou pas du tout. Les femelles quant à elles peuvent ingérer jusqu'à 150 fois leurs poids de sang. Le cycle de vie se boucle en 2 à 3 ans. *I. ricinus* montre une activité saisonnière qui dépend de sa distribution géographique, ses besoins écologiques et ses relations avec l'hôte sur lequel elle se gorge. En général *I. ricinus* en Europe enregistre une grande densité au printemps et en automne et disparaît en été et en hiver. Le cycle de vie d'*I. ricinus* comporte une phase exophile à la recherche de l'hôte et une phase endophile dans la litière du sol pour la diapause, la morphogenèse, et le développement (Aeschlimann et al. 1990, Gigon et al. 1985).

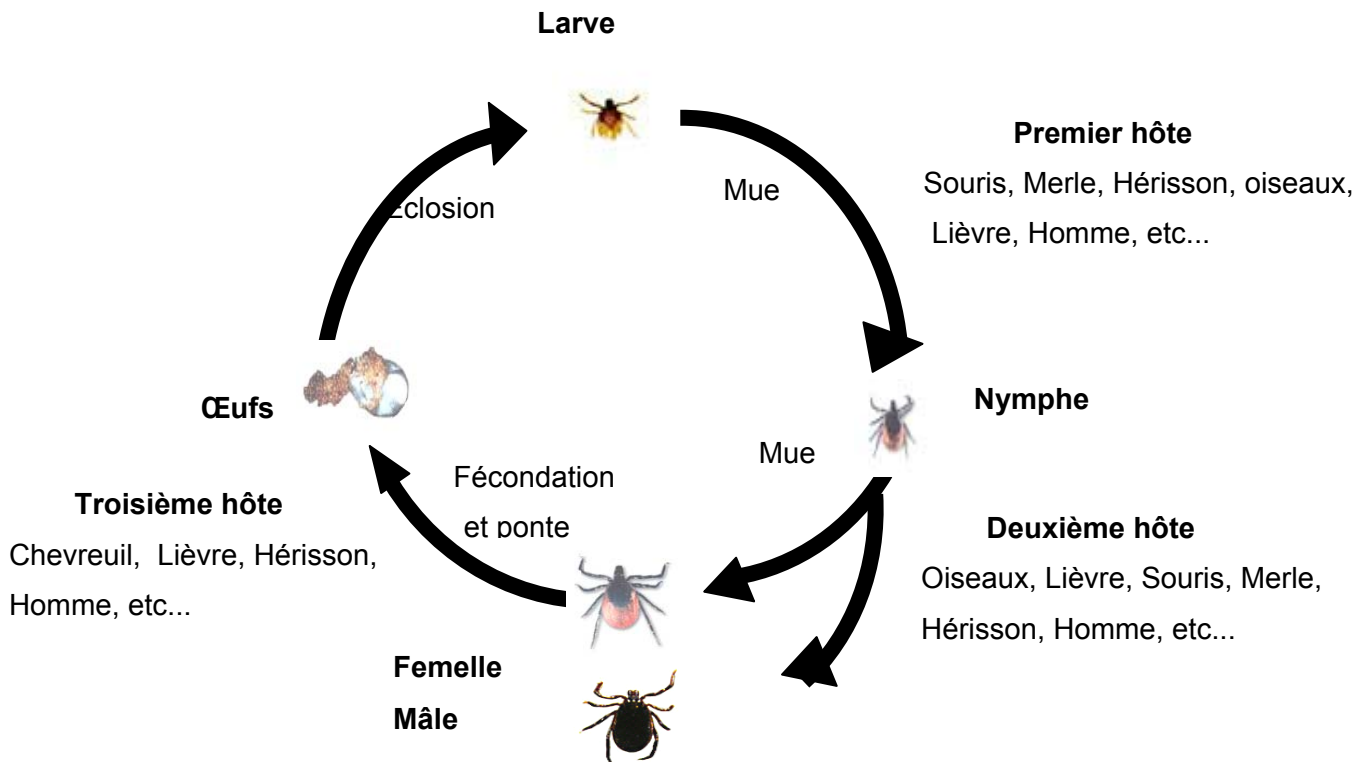


Fig 2: Cycle de vie d'*I. ricinus*.

#### 1.2.4 Hôtes d'*I. ricinus*

*I. ricinus* se nourrit sur une large gamme d'hôtes, comprenant les mammifères, les oiseaux, les reptiles (Aeschlimann et al. 1972). Les différents stades montrent des préférences non négligeables des hôtes. En général les stades immatures se gorgent sur les oiseaux, les reptiles, les rongeurs, et autres petits mammifères (Humair et al. 1993a, b, Humair et al. 1998, Olsen et al. 1995, Papadopoulos et al. 2002), alors que les adultes se nourrissent sur les grands mammifères (Tälleklint et Jaenson 1994, Gern et al. 1998, Gern et al. 2002). Humair et al. (1993a) ont montré que les larves se gorgent 40 fois plus sur des petits mammifères que les nymphes, et que les nymphes se nourrissent 6 à 7 fois plus sur les oiseaux que les larves. De même, Tälleklint et Jaenson (1994) ont rapporté que 70% des larves prennent leur repas sanguin sur de petits mammifères, 80% des nymphes et 45% des adultes se nourrissent sur des lièvres et sur de grands mammifères, respectivement. Papadopoulos et al. (2002) ont observé un taux d'infestation chez les oiseaux de 65 % et 73% par des nymphes et des larves, respectivement ; par contre les adultes étaient presque absents (1317 nymphes contre 5 adultes uniquement).

Tous les stades peuvent se gorger sur l' homme, mais ce dernier ne constitue qu'un hôte accidentel.

### I. 3 Le pathogène

#### I.3.1 Systématique et biologie de *B. burgdorferi* sI

*B. burgdorferi* sI est l'agent pathogène responsable de la borréliose de Lyme, il appartient à l'ordre des *Spirochaetales* qui comprend deux familles, les *Spirochaetaceae* et les *Leptospiraceae* (Tableau 2).

Plus de 20 espèces du genre *Borrelia* ont été identifiées. Et elles sont classées en deux catégories principales, les *Borrelia* des fièvres récurrentes et *Borrelia* du complexe *B. burgdorferi* sI, qui diffèrent par leurs caractéristiques écologiques et génétiques (Wang et al. 1999).

Tableau 2 : Systématique des spirochètes selon Wang et al. (1999)

<b>Ordre</b>	<i>Spirochaetales</i>	
<b>Famille</b>	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Leptospiraceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Spirochaeta</i>	<i>Leptospira</i>
	<i>Treponema</i>	<i>Leptomonas</i>
	<i>Cristispira</i>	
	<i>Serpulina</i>	
	<b><i>Borrelia</i> des fièvres récurrentes</b>	
	<b><i>Borrelia</i> du complexe <i>B. burgdorferi</i> sI</b>	

*B. burgdorferi* sI est une bactérie micro-aérophile de forme hélicoïdale mesurant 4-30 µm de long et 0.18-0.25 µm de diamètre, animée de mouvements de translation et de rotation. Elle possède 7-11 flagelles. Son génome est complètement séquencé (Frazer et al. 1997), comprend un chromosome linéaire d'environ 1000kb, plusieurs plasmides linéaires de 15 à 60 kb et des plasmides circulaires de 5-30 Kb. (Bergström et al. 2002). *B. burgdorferi* sI possède au moins 4 protéines majeures de surface de nature lipoprotéine reconnue par le système immunitaire, dont certaines sont exprimées chez la tique et d'autres chez l'hôte vertébré (De Silva et al. 1999). Elle présente des parentés antigéniques avec d'autres spirochètes tels que les tréponèmes et les leptospires. La présence d'anticorps dirigé contre ces deux germes chez les patients donne une sérologie de la maladie faussement positive (Dressler et al. 1993, Ma et al. 1992, Shanafelt et al. 1991). Pour des informations plus approfondies sur la biologie de *B. burgdorferi* on peut se référer au travail de Bergström et al. (2002).

### I.3.2 Complexe *B. burgdorferi* sl

Depuis la découverte de la borréliose de Lyme, des milliers d'isolats de *B. burgdorferi* ont été identifiés dans diverses régions géographiques et à partir de diverses sources biologiques. L'utilisation des techniques de biologie moléculaire telles que les méthodes d'amplification génique (Polymerase Chain Reaction, PCR) et de digestion enzymatique (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) ainsi que l'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis de réaliser que les isolats de *B. burgdorferi* étaient phénotypiquement divers (Wilske et al. 1991, Hu et al. 1996). Onze espèces de *Borrelia* ont été rapportées: *B. burgdorferi* ss (Johnson et al. 1984), *B. garinii* (Baranton et al. 1992), *B. afzelii* (Canica et al. 1993), *B. valaisiana* (Wang et al. 1997), *B. lusitaniae* (Le Fleche et al. 1997), *B. andersonii* (Marconi et al. 1995), *B. japonica* (Kawabata et al. 1993), *B. tanukii* et *B. turdi* (Fukunaga et al. 1996), *B. bissettii* (Postic et al. 1998) et *B. sinica* (Masuzawa et al. 2001).

En Europe six espèces de *Borrelia* ont été décrites: *B. burgdorferi* ss, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* et *B. bissettii*. En Suisse toutes les espèces de *B. burgdorferi* sl décrites en Europe ont été identifiées sauf *B. bissettii* (Péter et al. 1995, Jouda et al. in press).

### I.3.3 Cycle des *Borrelia*

La circulation de *B. burgdorferi* sl dans la nature est réalisée grâce aux différents stades d' *I. ricinus* et aux hôtes réservoirs. Les adultes s'infectent soit par la transmission transstadiale lors de la mue des nymphes infectées ou bien en se gorgeant sur des hôtes infectés. Chez les femelles gorgées les spirochètes peuvent passer dans les tissus ovariens, et après la ponte, les œufs éclosent en larves infectées (Bellet-Edimo,1997). Cette transmission transovarienne donne un taux d'infection des larves dans la nature très faible, allant de 0 à 4,8% (Miserez et al. 1990, Zhioua et al. 1994, Mejlou et al. 1993, Gustafson et al. 1995). Les larves en se gorgeant sur des hôtes infectés conservent les spirochètes après la mue et donneront des nymphes infectées à leur tour. La transmission transstadiale reste le phénomène fondamental au maintien à long terme de l'infection dans la nature (Gern et al. 2002a). En général dans la nature les larves constituent le stade le moins infecté, par contre chez les nymphes et les adultes les prévalences d'infection varient selon les régions géographiques (Miserez et Jaenson 1990, Zhioua et al. 1994, Mejlou et al. 1993, Gustafson et al. 1995, Misonne et al. 1998, Cinco et al. 1998, Gilot et al. 1996).

#### I.3.4 Epidémiologie de la borréliose de Lyme.

L'existence de *B. burgdorferi* si a été rapportée du Nord de l'Europe à l'Afrique du Nord et du Portugal jusqu'à la Russie (Hubalek et Halouzka 1997, Gern et Humair 2002, Postic et al. 1997). De même ce pathogène est présent en Amérique du Nord (Piesman, 2002), au Canada (Barker et al.1992), en Russie (Postic et al. 1997), en Chine (Li et al.1998 ) et au Japon (Nakao et al. 1994). Trois espèces de *B. burgdorferi* si ont été identifiées en Amérique du Nord, *B. burgdorferi* ss, *B. andersonii* et *B. bissettii*. *B. andersonii* et *B. bissettii* ont été décrites principalement chez des tiques et des petits mammifères, mais jamais chez des patients. En Europe *B. garinii* et *B. afzelii* sont les plus fréquemment isolées d'*I. ricinus* (Hubalek et Halouzka 1997). *B. burgdorferi* ss est distribuée principalement en Europe occidentale mais rarement isolée en Europe de l'Est (Hubalek et Halouzka 1997, Gern et al. 1999) , *B. valaisiana* a été identifiée dans une dizaine de pays d'Europe : l'Irlande (Kirstein et al. 1997a et b), la Suisse (Péter et al. 1995, Humair et al. 1998, Jouda et al. in press), la France (Quessada et al. 2003), l'Angleterre (Kurtenbach et al. 1998a), l'Italie (Cinco et al. 1998), Pays Bas (Schouls et al. 1999), et en Russie (Korenberg et al. 2002). Cependant cette espèce est la plus fréquente chez *I. ricinus* en Irlande (Kirstein et al. 1997a, b). *B. lusitaniae* a été décrite dans de rares pays d'Europe: au Portugal (De Michelis et al. 2000), en Espagne (Barral et al. 2002, Escudero et al. 2000), en Slovaquie (Gern et al. 1999), en République Tchèque, Moldavia, en Ukraine (Postic et al. 1997), en Pologne (Mizak et al. 2000), en France (Richter et al. 2003), et en Suisse (Jouda et al. 2003). Cette espèce reste fréquente en Portugal (De Michelis et al. 2000).

En Afrique du Nord, *B. lusitaniae*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* ss et *B. valaisiana* ont été aussi identifiées (Zhioua et al. 1999, Younsi et al. 2001, Sarih et al.2003, Gern et al. poster 2002). *B. lusitaniae* reste l'espèce dominante en Afrique du Nord.

En Asie *B. garinii* et *B. afzelii* ont été isolées d'*I. persulcatus* en Chine (Li et al. 1998) et au Japon (Nakao et al. 1994). *B. burgdorferi* ss a été identifiée à Taiwan (Shih et al. 1998, Shih et al. 2002). *B. valaisiana* a été décrite au Sud de l'Asie (Miyamoto et al. 2002). *B. tanukii*, *B. japonica* et *B. turdi* sont limités au Japon (Miyamoto et al. 2002), alors que *B. sinica* est distribuée au centre de la Chine, en Thaïlande et au Népal (Miyamoto et al. 2002).

Plusieurs auteurs ont démontré qu' il existe une corrélation entre les différentes espèces de *B. burgdorferi* si pathogènes et les manifestations cliniques (Cinco et al. 1996, Norman et al. 1996, Assous et al. 1993, Péter et al. 1997, Demaerschalck et al. 1995, Van Dam et al. 1993). La neuroborréliose et/ou la paralysie faciale est souvent associée à une infection par *B. garinii*, alors que les symptômes cutanés ou arthrites sont associés à *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss, respectivement.

Dans les régions d'études qui font l'objet de ce travail, le Maroc et la Suisse, la borréliose de Lyme présente des épidémiologies différentes dues probablement aux différentes pathogénicités des espèces de *Borrelia* présentes dans ces deux pays. En Suisse toutes les manifestations cliniques de la borréliose de Lyme ont été décrites, comme il a été rapporté par Nahimana et al. (2000) dans une enquête séro – épidémiologique entreprise en Suisse romande entre juillet 1996 et décembre 1997 : l'érythème migrant a été observé dans 46% des cas, les manifestations de stade II dans 33% des cas (dont 26 paralysies faciales, 20 arthrites aiguës, 5 lymphocytomes cutanés bénins) et les manifestations chroniques dans 21% des cas (dont 23 acrodermatites chroniques atrophiantes, 26 neuropathies chroniques, 8 arthrites chroniques). En Suisse romande l'incidence de la borréliose de Lyme varie entre 9 et 95 pour 100 000 habitants respectivement au Valais et à Neuchâtel (Nahimana et al. 2000).

En Afrique du Nord, en Tunisie, une étude sérologique entreprise chez 271 sujets ayant consulté dans des hôpitaux de la région de Tunis entre 1992 et 1996 a montré la présence d'anticorps chez 29 personnes (Aoun et al. 1998). La symptomatologie clinique de ces cas était dominée par des signes neurologiques et articulaires : la paralysie faciale a été signalée dans 14% des cas, la méningite lymphocytaire dans 38% et l'arthrite dans 33% des cas, ainsi que deux cas de fièvre isolée (Aoun et al. 1998). Une étude précédente, effectuée à l'hôpital d'Ain Drahim, avait également montré une séroprévalence de 10% (Zhioua et al. 1990). Au Maroc seule la paralysie faciale a été rapportée (Ouhabi et al. 1994), l'incidence réelle de la borréliose de Lyme pourrait y sous estimée à cause du manque d'information de la maladie dans le domaine médical.

Chez l'homme l'infection par *B. burgdorferi* si survient de façon égale pour les deux sexes et atteint tous les âges avec une certaine prédilection pour les enfants et certaines professions qui sont plus exposées aux piqûres de tiques (Zhioua, 1993).

### I.3.5 Hôtes réservoirs

Les hôtes vertébrés interviennent non seulement dans le maintien de la population de tiques mais aussi dans la circulation de *B. burgdorferi* si dans la nature (Gern et al. 2002). L'identification des hôtes réservoirs est réalisée par xénodiagnose. La xénodiagnose consiste à faire nourrir des larves non infectées sur des animaux sauvages capturés dans la nature, une fois ces larves gorgées, elles vont être examinées, pour voir si elles ont acquis une infection. Mais pour certaines espèces d'animaux, il est difficile d'appliquer cette méthode, en raison de la difficulté que présente leur maintien en laboratoire. D'autres méthodes sont alors utilisées telles que la comparaison du taux d'infection des tiques récoltées sur la végétation et du taux d'infection des tiques récoltées sur les hôtes vertébrés

principalement les larves, et la détection de *B. burgdorferi* si dans les tissus des animaux, ainsi que la détermination des anticorps anti-*Borrelia* dans le sérum, mais ces méthodes restent moins bonnes.

Dans la nature, il existe environ 300 espèces d'hôtes vertébrés qui servent d'hôtes à *I. ricinus* (Gern et al. 2002). En Europe, au moins 9 espèces de petits mammifères sont reconnues comme des hôtes réservoirs (par exemple *Apodemus sylvaticus* (Mulot sylvestre), *A. flavicollis* (Mulot à collier), *A. agrarius* (Mulot rayé), *Clethrionomys glareolus* (Campagnol roussâtre), *Sorex araneus* (Musaraigne carretet), *S. minutus* (Musaraigne pygmée), 7 espèces de mammifères de taille moyenne (par exemple *Erinaceus europaeus* (Hérisson d'Europe), *Sciurus vulgaris* (Ecureuil roux), *S. carolinensis* (Ecureuil gris), *Meles meles* (Blaireau d'Europe) ainsi que 16 espèces d'oiseaux, ( par exemple *Alca torda* (Pingouin torda), *Erithacus rubecula* (Rouge-gorge familier), *Sylvia communis* (Fauvette grisette), *Sylvia atricapilla* (Fauvette à tête noire) (Gern et al. 1998). Olsen et al. (1995) ont montré que des échanges et des transports de *Borrelia* peuvent s'effectuer via les oiseaux migrateurs.

A côté de ces hôtes réservoirs compétents, il existe des hôtes qui maintiennent la population de tiques dans une région donnée, mais qui n'interviennent pas dans l'infection d'*I. ricinus*. Ces hôtes sont dit incompetents pour la circulation de *B. burgdorferi* si. On peut citer *Alces alces* (Elan), *Cervus elaphus* (Cerf élaphe), *Cervus nippon* (Cerf du Japon), *Dama dama* (Daim), *Ovis aries* (Mouton cameroun) (Gern et al. 1998). Certains auteurs (Humair, 1998, Kurtenbach et al. 1998b, Kurtenbach et al. 2002a et b ) ont montré une association spécifique entre les espèces de *Borrelia* et les hôtes. Cette association semble liée au système complément. *B. burgdorferi* si réagit de façon variable au système complément de l'hôte (Kurtenbach et al. 2002a, 1998b) et présente soit une résistance ou une sensibilité au système complément. Les souches résistantes au complément ont la capacité de fixer les régulateurs de complément, le facteur H et FHL-1, grâce à deux protéines Crasp-1 et Crasp-2 de poids moléculaire respectivement de 27.5 kDa et de 20/21 kDa, alors que les souches sensibles au complément ne montrent pas cette capacité (Kraiczy et al. 2001, Kurtenbach et al. 2002b). Comme mentionné plus haut, il existe une association entre espèce de *Borrelia* et les hôtes, par exemple, les rongeurs constituent les principaux réservoirs pour *B. afzelii* (Humair et al. 1995, Richter et al. 1999), pour *B. garinii*, les oiseaux restent les principaux réservoirs (Olsen et al. 1995 et Humair et al. 1995), de même *B. garinii* sérotype 4 a été transmis des rongeurs aux tiques se nourrissant sur eux (Hu et al. 2001, Huegli et al. 2002). *B. burgdorferi* ss est principalement associée aux rongeurs (Kurtenbach et al. 1998, Humair, 1998, Nelson et al. 2000), *B. valaisiana* a été décrite chez les oiseaux (Gern et al. 1998 et Humair 1998, Kurtenbach et al. 1998). En ce qui concerne *B. lusitaniae* l' hôte réservoir n'est pas connu. Kurtenbach et al. (1998b) ont démontré que le sérum des rongeurs est bactéricide pour *B. garinii* et *B. valaisiana* et pas pour *B. afzelii*, le sérum des oiseaux est

favorable pour *B. garinii* et *B. valaisiana* et non pour *B. afzelii*, les sérums de lièvres, porc et chats favorisent la multiplication de *B. burgdorferi* ss.

### I.3.6 Transmission de *B. burgdorferi* sl

Chez les tiques à jeun les spirochètes sont généralement dans l'intestin d'*I. ricinus* (Gern et al. 1996, Leuba – Garcia et al. 1994, Crippa, 2003). La première étape de la transmission de *B. burgdorferi* sl se fait par l'attachement de tiques infectées à l'hôte vertébré, la prise de repas sanguin déclenche une multiplication rapide de spirochètes dans l'intestin de la tique *I. scapularis* (De Silva et Fikrig 1995), qui est due à une augmentation de la température et une diminution de pH causés par l'afflux du sang de mammifère (De Silva et al. 1999, Ramamoorthy et al. 2001). Chez *I. ricinus* cette multiplication des borrelies au début du repas sanguin n'a pas été observée (Crippa, 2003). Les spirochètes de ces deux espèces de tiques traversent la barrière intestinale et passent dans l'hoemocèle et migrent ensuite vers les glandes salivaires (Gern et al. 1996, De Silva et Fikrig 1995) et sont transmis à l'hôte via la salive. Les spirochètes envahissent les glandes salivaires seulement pendant une brève période pendant la transmission comme cela a été démontré par Gern et al. (1996) et De Silva et Fikrig (1995). Crippa et al. (2002) ont démontré que la période de transmission de *B. burgdorferi* sl varie selon les espèces de *Borrelia*, *B. burgdorferi* ss n'est transmis à l'hôte qu'après 48 h d'attachement, alors que *B. afzelii* est transmis plus tôt.

*B. burgdorferi* exprime des protéines de surface différentes chez le vecteur et chez l'hôte vertébré (De Silva et al. 1999, Ramamoorthy et al. 2001, Fingerle et al. 1995,). L'OspA est une protéine abondamment exprimée à la surface du spirochète dans l'intestin des tiques à jeun (De Silva et al. 1999, Pal et al. 2000). Après que les tiques s'attachent et commencent leur repas sanguin, les spirochètes expriment l'OspC pendant leur migration vers les glandes salivaires. Ce changement de l'expression de ces protéines de surface constitue un mécanisme d'échappement des spirochètes de l'intestin vers les glandes salivaires (De Silva et al. 1999, Pal et al 2000, Schwan et Piesman 2002). Une fois à l'intérieur de l'hôte, les spirochètes doivent disséminer dans les tissus pour survivre à long terme.

### I.3.7 Protéines antigéniques de *Borrelia*

De nombreuses études ont montré la variété de la structure des protéines antigéniques de *B. burgdorferi*. Il existe au moins 30 protéines qui sont régulièrement reconnues par le sérum humain de patients atteints de borréliose de Lyme (Zöller et al. 1993), dont certaines sont communes à de nombreuses espèces de borrelies. Les protéines considérées comme antigènes majeurs sont les suivantes:

- La flagelline d'un poids moléculaire de 41 kDa, c'est une protéine très immunogène et apparaissant au stade précoce de la borréliose de Lyme (Ma et al. 1992, Dressler et al. 1993, Zöller et al. 1993). Cette protéine est réactive avec le serum de sujets asymptomatiques (Dressler et al. 1993). Elle montre une homologie des séquences d'acides aminés avec *B. hermsii*, *T. phagedensis* et *Salmonella typhimurium* (Zöller et al. 1993).
- Une protéine de 39 kDa (P39) située au-dessous de la flagelline, mais différente. C'est une protéine antigénique spécifique de *B. burgdorferi*, elle apparaît être conservée entre les isolats nord-américains et européens. Cette protéine est non réactive avec le sérum des sujets asymptomatiques d'après Simpson et al. (1994), alors que Dressler et al. (1993) ont constaté une réaction avec la P39 chez 11% des sujets syphilitiques. Ma et al. (1992) ont également trouvé une réactivité contre cette protéine chez 2.8% des sujets syphilitiques. Les anticorps anti-P39 apparaissent à 100 % chez les patients avec un taux élevé d'anticorps anti-*Borrelia*. Les anticorps anti-P39 apparaissent au stade précoce de la maladie de Lyme (Ma et al. 1992, Strle et al. 1996).
- P60 est une protéine fortement immunogène. Les anticorps contre cette protéine présentent une réaction croisée avec un antigène équivalent, présent chez d'autres spirochètes. Cette réaction croisée est responsable de sa faible spécificité dans le diagnostic sérologique. L'homologie des séquences d'acides aminés de la P60 de *B. burgdorferi* avec *Escherichia coli* et *Mycobacterium bovis* est respectivement de 58% et 55% (Shanafelt et al. 1991).
- P100 ou dans notre étude P90 a été décrite comme fortement immunogène et spécifique. Elle est située dans le cylindre protoplasmique et aide à la fixation des flagelles. Elle constitue un bon marqueur caractéristique du stade tardif de la maladie (Hauser et al. 1997, Dressler et al. 1993, Ma et al. 1992)

D'autre part, on observe des protéines de surface dénommées "outer surface protein" 'Osp'. Il existe 3 protéines de surface importantes: OspA, OspB et OspC. Les gènes codant pour ces différentes protéines de surface sont localisés au niveau des plasmides : l'OspA et l'OspB sur un plasmide linéaire de 49 kb et l'OspC sur un plasmide circulaire de 27 kb (Bergström et al. 2002). L'OspA, l'OspB et l'OspC montrent une variabilité selon les espèces de borrelies et montrent aussi une hétérogénéité parmi les isolats d'une même espèce. L'expression de l'OspB est absente chez une partie des souches européennes (Zöller et al. 1993). L'OspC montre une intensité d'expression variable selon les isolats. Parmi les souches l'isolat Pko, montre une intensité élevée, tandis que la majorité des souches montre des intensités faibles de l'OspC (Zöller et al. 1993). Les poids moléculaires de ces protéines varient de 30-33.5 kDa pour l'OspA, pour l'OspB de 34-35 kDa et pour l'OspC de 20-23 kDa (Dressler et al. 1993, Wilske et al.

1991, Hu et al. 1996, Péter et al. 1992). L'OspA et l'OspB de *B. burgdorferi* ss ont un poids moléculaire respectivement de 31 kDa et 34 kDa, l'OspC a un poids moléculaire compris entre 20 et 23 kDa. Pour *B. afzelii* le poids moléculaire de l'OspA et l'OspB est de respectivement 32 kDa et 35 kDa. L'OspA de *B. garinii* varie entre 32 et 33 kDa (Hu et al. 1996, Péter et al. 1992). Ces protéines de surface semblent jouer un rôle dans la transmission du pathogène et dans l'infection de l'hôte au stade précoce de la borréliose de Lyme comme nous l'avons vu précédemment. Il existe en outre trois autres protéines de surface décrites chez *B. burgdorferi*: OspE (19.2 kDa), OspF (26 kDa), OspD (28.4 kDa). Ces protéines jouent un rôle mineur dans le sérodiagnostic de la borréliose de Lyme, et aucun anticorps monoclonal approprié n'est disponible (Hauser et al. 1997).

#### I.4 Le sérodiagnostic de la borréliose de Lyme et sa fiabilité

Le diagnostic de la borréliose de Lyme est basé sur la reconnaissance des signes cliniques aidé par des examens sérologiques, tels que l'EIA (enzyme immunoassay), l'immunofluorescence indirecte ou le Western blot. Le sérodiagnostic par chacune de ces méthodes n'est pas totalement fiable. Ceci est dû aux réactions croisées de certains polypeptides de *Borrelia* avec ceux d'autres spirochètes (Hauser et al. 1997) et à la variabilité des titres d'anticorps spécifiques selon les stades de la maladie. En effet, ceux-ci n'apparaissent qu'après la dissémination de l'infection et la sensibilité sérologique n'est que de 50% au stade primaire. Le titre maximal est atteint plusieurs semaines après la piqûre infectieuse. Au stade secondaire et tertiaire de la maladie, la sensibilité est proche de 100%. D'autre part, une antibiothérapie précoce peut affecter la réaction immunitaire et donner un résultat négatif malgré l'infection. Des titres élevés peuvent persister pendant des années et n'indiquent pas une infection nécessairement active.

Aux USA, la 2<sup>ème</sup> conférence nationale de sérodiagnostic de la borréliose de Lyme a recommandé deux étapes, un test EIA dont les résultats positifs doivent être confirmés par les réactions de Western blot (Dressler et al. 1993). On a aussi recommandé l'utilisation des critères de positivité de Western blot proposés par Dressler et al. (1993). Ces critères sont la présence dans le cas des IgM, d'au moins 2 bandes parmi les 8 bandes suivantes: (18, 21, 28, 37, 41, 45, 58, et 93 Kda) et dans le cas des IgG, d'au moins 5 bandes parmi les 10 bandes suivantes: 18, 21, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66 et 93 kDa. En 1996, Hilton et al. (1996) ont recommandé l'ajout de l'OspA et de l'OspB à ces critères de confirmation de positivité de Western blot.

En Europe les critères de positivité de Western blot ne sont pas encore établis à cause de l'hétérogénéité des souches, et de leur distribution géographique, ce qui complique la standardisation et la comparaison des résultats entre laboratoires. Roberston et al. (2000)

ont rapporté que l'interprétation des résultats de Western blot en Europe, doit être adaptée en relation avec les caractéristiques de la borréliose dans une région donnée.

## II. Buts

Les buts de ce travail sont divers :

- Déterminer la distribution géographique d'*I. ricinus* infectés par *B. burgdorferi* sl et les différentes espèces de *Borrelia* en Suisse occidentale.
- Etudier l'effet du gradient d'altitude sur la distribution et la prévalence d'infection d'*I. ricinus* par *B. burgdorferi* sl.
- Etudier la distribution géographique d'*I. ricinus* infecté par *B. burgdorferi* sl et l'identification des différentes espèces de *B. burgdorferi* sl au Tessin.
- Démontrer la présence de la borréliose de Lyme au Maroc par la détermination de la distribution géographique d'*I. ricinus* infecté par *B. burgdorferi* sl et l'identification des espèces de *Borrelia* présentes au Maroc, afin d'attirer l'attention des médecins et des biologistes sur l'existence de cette maladie au Maroc par la recherche d'anticorps anti-*Borrelia* dans les sérums des malades.

### III. Matériel et méthodes

#### III.1 Tiques

La récolte des tiques a été réalisée dans différents endroits en Suisse et au Maroc.

##### III.1.1 Zones d'étude en Suisse

La récolte des tiques en Suisse a été réalisée en partie par Jean-Luc Perret dans le cadre de son travail de thèse. Les récoltes de tiques ont été réparties en 26 sites dont 12 au Tessin et 14 sur le Plateau suisse. (Fig3). Les caractéristiques des différents endroits de la récolte d' *I. ricinus* sont représentées dans le tableau 4.

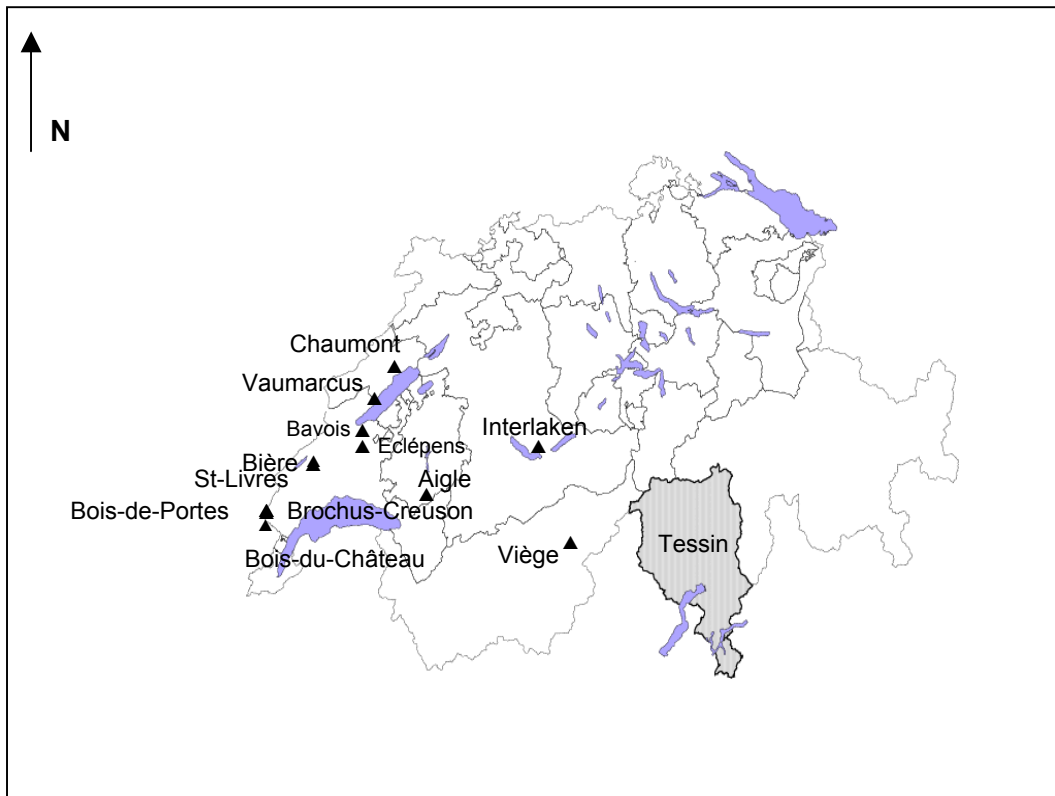


Fig 3: Répartition géographique des différents endroits de récolte d' *I. ricinus* en Suisse  
BASE CARTOGRAPHIQUE: Copyright GEOSTAT, Office fédéral de la statistique

La récolte des tiques a été faite par la méthode du drapeau (Aeschlimann et al 1972) , qui consiste à traîner à travers la végétation un linge blanc de 1m<sup>2</sup> sur lequel les tiques en phase de quête vont s'accrocher. Les tiques ont été comptées tous les 25 mètres sauf pour le canton du Tessin où le drapeau a été retourné tous les 18 mètres, et la récolte a été

effectuée sur une distance de 150m. Les différents stades ont été séparés et conservés dans des tubes avec des brins d'herbe pour assurer la survie des tiques.

Les tiques libres ont été collectées une fois par mois pendant 3 ans 1999, 2000 et 2001. Au Tessin les récoltes ont été réalisées une fois par année entre fin mai et début juin.

Tableau 4: Caractéristiques des différents endroits de récolte d' *I. ricinus* en Suisse

Régions	Localité	Altitude	Cordonnées géographiques
Plateau Suisse	Aigle	420	563994/128790
	Bavois	440	531907/171132
	Bière	800	513845/155263
	Viège	780	634552/125852
	Eclépens	485	531336/168437
	St-Livres	680	517778/152534
	Interlaken	620	632431/171149
	Vaumarcus	480	546669/190400
	Bois-de-Portes	480	499894/130664
	Bois-du-Château	475	49318/118283
	Brochus-Creuson	440	498900/128450
	Chaumont haut	900	563121/207718
	Chaumont mi - côte	740	562670/207125
	Chaumont bas	620	562287/206035
Tessin	Arcegno 1	360	701029/1103050
	Arcegno 2	400	700252/113197
	Carena	950	726036/114621
	Bironico 2	580	716364/107688
	Cadempino	400	716099/99606
	Bruzella	660	724250/82414
	Morbio superiore	500	72335/80185
	Alpe di Zalto	980	718150/107100
	Gala di Lago	800	718000/106000
	Odogno	588	718300/104300
	Cyanasco	224	714940/113594
	Arbostora	340	713248/87693

### III.1.2 Zones d'étude au Maroc

Au Maroc, les régions sélectionnées ont été étudiées selon le travail de Bailly-Choumara et al. (1974 - 1979) (Fig 4). D'autres zones ont été ajoutées à ce projet en se basant sur les conditions climatiques (humidité et température) et sur la végétation favorable à *I. ricinus*. Il s'agit des régions d' Ifrane et de Taza.

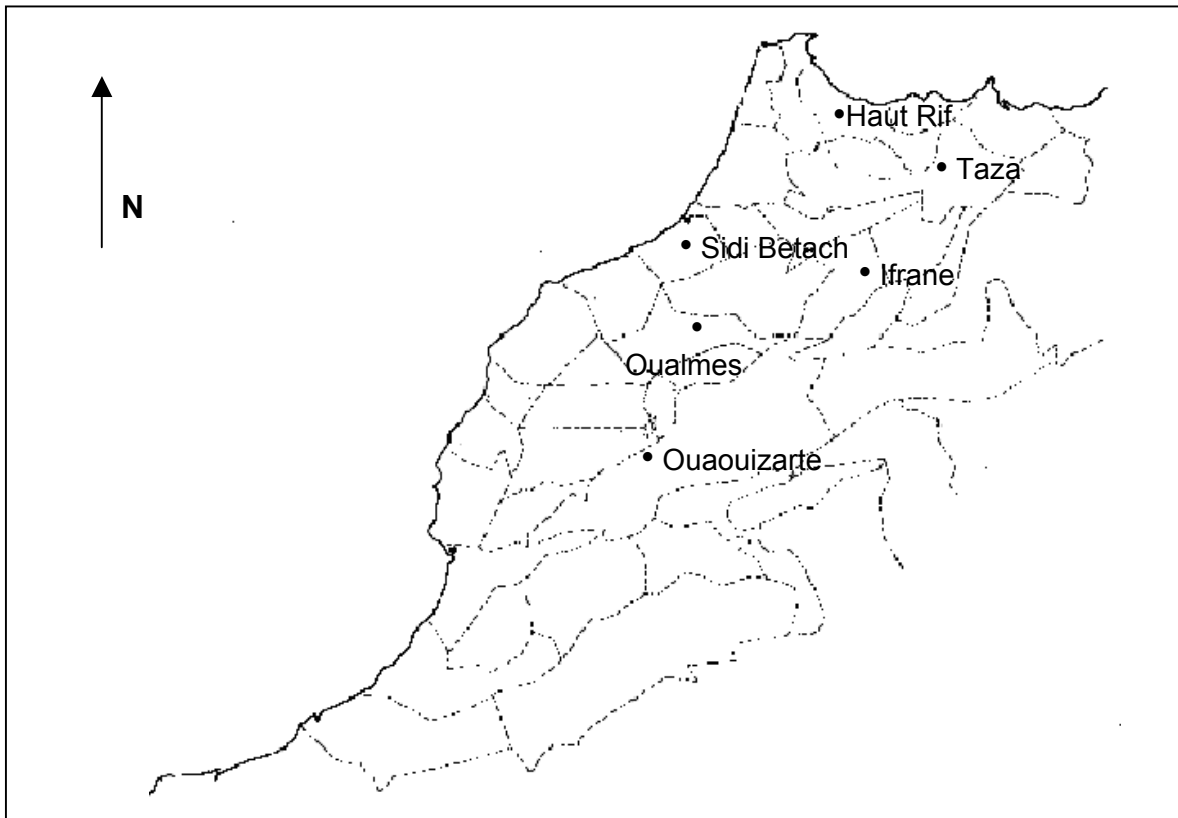


Fig 4: Répartition géographique des différents endroits de récolte d' *I. ricinus* au Maroc selon Bailly-Choumara et al. (1974 - 1979)

#### Zones d'étude

##### 1- Chefchaouen : Haut Rif

Le climat est typiquement méditerranéen, situé à l'étage bioclimatique sub-humide, les précipitations varient entre 800 et 1400mm/an. La végétation est dominée par des forêts de pins et chênes liège.

## 2-Sidi Betach: Zeär

Sidi Bettach est situé dans la région de Zeär qui s'étale sur un étage bioclimatique semi - aride. La pluviométrie moyenne annuelle est de 500mm. La végétation naturelle est dominée par des forêts de chênes liège.

## 3-El Harcha:

El Harcha est situé dans la région de Oualmes. Le climat de la région est froid et humide. Les précipitations annuelles varient entre 700 et 1000 mm. Cette localité se situe dans l'étage bioclimatique sub-humide à humide. La végétation naturelle est dominée par des forêts de chênes verts, pins maritimes, thuyas, cèdres et des reboisements d'eucalyptus et des sites de pâturage.

## 4- Région de Ouaouizarte: Haut Atlas central

Le climat de la région est sub-humide à sub-aride. La pluviométrie moyenne annuelle est de 250mm. La végétation naturelle est représentée par du thuya et du cèdre.

## 5- Ain Leuh: Ifrane

Ain Leuh est situé dans la région d' Ifrane. Le climat de la région est sub-humide à humide. La végétation naturelle est représentée par du chêne vert, du pin maritime, et des pâturages.

## 6- Taza

Elle s'étale à l'étage bioclimatique sub-humide à humide. La végétation naturelle est représentée par du chêne vert, chêne, cyste, fougère et du pin maritime.

### III.1.2.1 Récolte des tiques

Au Maroc, les récoltes ont été faites par Dr. M. Sarih, Institut Pasteur du Maroc ; occasionnellement par Dr. D. Postic, Institut Pasteur de Paris et Dr. L. Gern, Université de Neuchâtel, et par nous-même. Nous avons récolté les tiques libres ainsi que les tiques infestant des animaux domestiques. Les tiques libres au Maroc ont été capturées par la méthode de drague qui consiste à traîner sur la végétation un linge blanc de 2 m X 2,5 m tiré derrière soi. Les tiques collectées ont été comptées et conservées dans des tubes.

Plusieurs troupeaux de bovins, moutons et ainsi que des chiens de troupeaux ont été minutieusement examinés dans les sites d'étude. Les tiques ont été transportées vivantes dans des tubes pour l'identification au laboratoire.

Les tiques ont été déterminées en utilisant les clés de détermination de Hoogstraal et al. (1956), Cotty (1985) et Bouattour (2001).

### III.2 Borrélioses

La mise en évidence et l'isolement de *B. burgdorferi* si se sont faits selon différentes méthodes:

#### III.2.1 Immunofluorescence directe:

Immunofluorescence directe est une méthode immunologique qui consiste à visualiser, au microscope à fluorescence, le complexe antigène - anticorps spécifique qui se déroule entre des protéines de surface de Borrélioses qui constituent l'antigène et de sérums humains présentant des taux élevés d'anticorps anti - *B. burgdorferi* si qui constituent l'anticorps. Ce dernier est marqué à une substance fluorescente, l'isothiocyanate de fluorescéine, qui forme le conjugué fluorescent. Le couplage antigène - anticorps réalisé permet de visualiser des Borrélioses en microscope à fluorescence. Cette conjugaison a été réalisée selon Peacock et al. (1971).

Une fois les tiques récoltées, tous les adultes et les nymphes ont été examinés en IF.

En ce qui concerne les tiques récoltées à Chaumont, Interlaken et Viège un maximum de 20, 10 et 10 nymphes, respectivement, ont été examinées chaque mois. Les tiques ont été lavées dans une solution d'éthanol 70% pendant 2 min Puis chaque tique a été coupée en deux moitiés dont une partie a été écrasée sur une spot de la lame à IF préalablement dégraissée, puis mise à l'étuve à 37°C toute la nuit. Ensuite les lames ont été fixées à l'acétone pendant 10min et incubées avec le conjugué spécifique anti - *B. burgdorferi* marqué à la fluorescéine. Les lames ont été mises à l'étuve à 37°C pendant 30 min, puis lavées sous agitation deux fois au PBS ( Phosphate Buffered Saline, PH 7,35) pendant 10 min, séchées et recouvertes de 2 à 3 gouttes de glycérine tamponnée et d'une lamelle. Les lames sont ainsi prêtes à être observées. Dans certains cas elles ont été stockées à 4°C à l'abri de la lumière en attendant d'être observées au microscope à fluorescence au grossissement 400X (Fig 5).

Le degré d'infection dans chacun des spots a été estimé et classé en 3 catégories: peu infecté: 1 - 50 spirochètes, moyennement infecté: 50 - 500 spirochètes et très infecté: supérieur à 500 spirochètes.

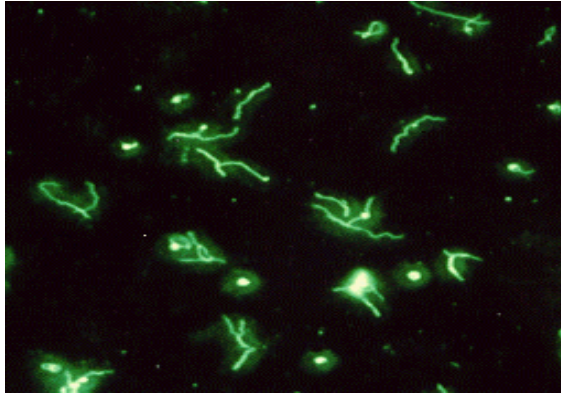


Fig 5: Spirochètes en immunofluorescence

### III.2.3 Mise en culture

L'autre moitié de la tique a été introduite dans un tube contenant 1 ml du milieu BSK II (Sinsky et Piesman, 1989). Après une incubation à 34°C à l'étuve pendant 10 jours, les cultures de spirochètes ont été observées au microscope à fond noir à grossissement 500X et réinspectées pendant 1 mois.

Les tubes où les spirochètes se sont multipliés, sont repiqués. On ajoute alors 0.3 ml de culture positive à 4 ml de milieu BSKII. Ces repiquages sont incubés à l'étuve et contrôlés chaque 4 jours puis stockés en chambre froide. Les cultures positives seront utilisées ultérieurement pour l'identification de *B. burgdorferi* sl.

### III.2.4 Identification de *B. burgdorferi* sl

Réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction: PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique de biologie moléculaire, elle permet une amplification génétique. Elle est utilisée dans de nombreux domaines tels que par exemple le diagnostic de maladies infectieuses.

Le but de cette technique est de détecter de faibles quantités d'ADN. Pour cela on utilise une réaction en chaîne en utilisant des oligonucleotides ou amorces complémentaires de l'ADN qu'on veut amplifier, on ajoute ensuite des nucléotides et de l'ADN polymérase (Taq Polymérase). Cette réaction est cyclique, le nombre de cycles est généralement entre 30 et 40, et elle se fait en trois étapes.

Dénaturation: consiste à chauffer à 94°C pour séparer l'ADN à double brin en brisant les liaisons hydrogènes.

Hybridation: Une fois l'ADN séparé on refroidit rapidement à 55°C pour que les amorces se fixent à chaque extrémité complémentaire de l'ADN à simple brin.

La polymérisation: Après la fixation des amorces, l'ajout de la Taq polymérase et de nucléotides permet la synthèse des nouveaux brins d'ADN. Cette opération se déroule à 72°C (Postic et al. 1994).

Dans le cadre de ce travail les amorces ont été choisies pour amplifier une séquence d'ADN spécifique aux Borréliés, elle est située entre l'extrémité 3' terminal de l'unité 5S rRNA (rrf) et 5' terminal de l'unité 23S rRNA (rrl). Cette espace inter génique comporte un nombre de bases qui varie entre 226 pb à 256 pb selon les espèces de borréliés.

Les PCR ont été effectuées avec les contrôles positifs selon la technique décrite par Postic et al. (1994) :

Les cultures positives ont été centrifugées à 10' 000 tours/min pendant 15 min, et les culots suspendus dans le tampon de lavage (PBS+MgCl<sub>2</sub>) et centrifugés deux fois à 10' 000 tours/min durant 15 min, chauffés à 100°C pendant 15min. Les thermolysats ainsi préparés sont congelés à - 20°C et sont prêts pour l'amplification d'ADN.

Les solutions d'amplification ont été préparées pour un volume total de 50µl par échantillon, contenant de l'eau pure, le tampon Taq, Primer 1 et 2 à une concentration de 1 µM, 1,5 µl de Taq polymérase, 200 µM d'NTP 's et 10 µl de la solution bactérienne. La réaction d'amplification s'est faite en 30 cycles selon trois étapes successives : dénaturation à 94°C pendant 1min, l'hybridation à 55°C pendant 1 min, la polymérisation à 72°C pendant 2min. Après la PCR, la présence d'ADN de Borrélie a été révélée sur gel d'agarose soumis à une migration de 100 volts durant 40min. L'ADN présent dans le gel a été visualisé à l'aide de bromure d'éthidium sous lumière UV. Une enzyme de restriction, *MseI*, a été ajoutée aux échantillons d'ADN amplifié. Cette enzyme va digérer l'ADN et donne un nombre et une taille de fragments spécifiques pour chaque espèce de Borrélie. Nous avons ensuite effectué une migration de ces échantillons sur un gel de polyacrylamide à 16%, à 100 volts durant 100 min.

L'analyse des profils de restriction permet d'identifier les espèces de *B. burgdorferi* correspondant à chaque échantillon d'ADN amplifié.

### III.3 Western blot

#### III.3.1 Préparation de l'antigène pour le Western blot.

Quatre espèces de *Borrelia* ont été utilisées comme antigènes:

- *B. burgdorferi* ss: NE 608
- *B. garinii*: NE 2626
- *B. afzelii* : NE 632
- *B. lusitaniae*: NE 2627

Ces souches ont été isolées à l'Université de Neuchâtel à partir de tiques libres et identifiées par PCR et RFLP (Postic et al. 1994).

Les spirochètes ont été maintenus en culture dans le milieu BSKII modifié (Sinsky and Piesman, 1989). Pour la préparation de l'antigène, les cultures ont été centrifugées à 10'000g, pendant 15 min. Le culot a été ensuite suspendu dans la solution de lavage (PBS pH 7.4 + MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O), et centrifugé 2 fois à 10'000 g pendant 15 min. Le culot ainsi obtenu a été concentré 100 x par rapport au volume total, puis centrifugé 10 min à 3'000 tours/min. La moitié du surnageant a été enlevée et remplacée par du tampon de solubilisation (PBS+ MgCl<sub>2</sub>). L'antigène, concentré 15 µg/ml, est prêt à être testé ou à être stocké à -20°C.

### III.3.2 Sérums

Dans le cadre de l'étude effectuée au Maroc, des sérums provenant de deux origines différentes ont été analysés: des sérums humains et des sérums provenant de chiens.

Les sérums humains ont été fournis par le Dr. A. Chakib de l'hôpital CHU Ibn Rouchd à Casablanca. Dans cette étude, on a choisi deux collectifs chez lesquels les anticorps anti - *B. burgdorferi* si ont été analysés. Un groupe de contrôle consistant en 30 sérums provenant d'une population âgée de 0 à 20 ans et qui n' a pas eu de contact avec (les piqûres) des tiques. Un groupe de patients consistant en 12 patients présentant des manifestations variées de la borréliose de Lyme. Le détail des manifestations cliniques présentées ne nous est pas connu. Le sérum de référence POS-G-02 a été fourni par le laboratoire de diagnostic parasitaire de l'Université de Neuchâtel par Mr Yves Moosmann.

Des sérums de chiens ont été inclus dans cette étude en raison du contact fréquent des chiens avec des tiques. Vingt cinq sérums ont été fournis par l'Institut Pasteur de Casablanca par Mme M. El Amranie, qui a récolté ces sérums dans le cadre d'une étude sur la leishmaniose chez les chiens. Le sérum de référence P1 a été fourni par le laboratoire de diagnostic vétérinaire de l'Université de Neuchâtel par Mme Emmanuelle Medjitna.

### III.3.3 SDS PAGE et Western Blot

Dans cette étude, on a utilisé un système de grand gel: la taille des gels est de 9,5-11 cm sur 10-14 cm.

- Gel de séparation. On prépare des gels de polyacrylamide de 12,5% et on les fait couler à une hauteur de 12 cm, et on attend 1h pour la polymérisation.

- Gel de concentration. Il contient 6% de polyacrylamide, la polymérisation dure 20 min.

La migration des protéines se fait sous un courant de 30 mA pendant 1h pour le gel de concentration et 20 mA et environ 1h pour le gel de séparation, à température ambiante.

Après transfert des protéines sur une feuille de nitrocellulose sous un courant constant de 0,8 mA/cm<sup>2</sup> pendant 1h, la feuille de nitrocellulose est colorée par le rouge ponceau pendant 5 à 10 min pour contrôler l'efficacité et l'homogénéité du transfert protéique. La nitrocellulose est alors rincée brièvement et découpée en bandes que nous avons dénombrées, dénommées et stockées à température ambiante. Avant de les utiliser avec les sérums des différents groupes, on a contrôlé, pour chaque gel, les 2 bandes externes de la feuille de nitrocellulose à l'aide d'un sérum positif de contrôle (pool de sérums positifs en IgG POS-G-02, sérum positif humain, pool de sérums positifs en IgG P1, sérum positif de chien). Après saturation des sites actifs libres sur la nitrocellulose par du PBS-lait 5% durant 30 min sur le shaker à 50-70 RPM (en changeant le bain 3 fois), les bandes sont placées dans des plaques avec 2 ml de PBS-lait 1% et 10 µl de sérum à tester. L'incubation dure toute la nuit sous agitation à température ambiante. Le lendemain, les bandes sont rincées par du PBS-lait 5% pendant 5 min, puis incubées avec dix µl d'anti-IgG humain marqué à la phosphatase (Phosphatase labeled Goat anti-humain IgG, Microtec Produkte Ag, Suisse) ou d'anti-IgG Dog marqué à la phosphatase dans le cas de sérums de chiens (Phosphatase labeled Goat anti-dog IgG, KPL, Grande - Bretagne) dilués dans 10 ml de PBS-lait 1% pendant 2h. Après un rinçage rapide, puis des rinçages de 2 min et 5 min dans du PBS- lait 5%, on rince les bandes 5 min dans du PBS pur en changeant 3 fois le PBS. On rince alors rapidement les bandes dans le tampon de réaction pour le substrat de la phosphatase alcaline (tampon AP). La réactivité des anticorps est visualisée par incubation avec le substrat bromo-chloro-indyl phosphate (BCIP) + nitro blue tetrasolium (NBT), à raison de 50 µl de BCIP + 100 µl de NBT dilués dans 10 ml de tampon AP. On arrête la réaction une fois l'intensité de la coloration atteinte après 20 min. Les bandes sont alors rincées à l'eau courante, puis séchées et collées sous une feuille plastique, en attendant d'être lues et interprétées (Dressler et al. 1993).

#### III.3.4 Interprétation des résultats de Western blot

Dans un premier temps, un sérum contrôle positif a été utilisé pour chacune des souches de *Borrelia*, et les bandes apparaissant sur le profil de réaction ont été codées. Un certain nombre de ces bandes ont été caractérisées dans des travaux précédents à l'aide d'anticorps monoclonaux comme caractéristiques de certains stades de la borreliose de

Lyme (Assous et al 1993, Dressler et al. 1993, Hauser et al. 1997). Les différentes bandes ont été analysées à l'œil, et l'intensité de la réaction a été déterminée par comparaison avec le sérum de contrôle positif de la manière suivante : les bandes dont l'intensité très faible sont interprétées comme négatives, celles dont l'intensité est faible, forte et très forte sont interprétées comme positives.

## IV Résultats

### IV.1 Publication I

Distribution and Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* Ticks of Canton Ticino (Switzerland).

European Journal of Epidemiology 2003. 18:907-912.

### IV.2 Publication II

Influence of altitude on *Ixodes ricinus* density, and on distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection.

Submitted to the Journal of Medical Entomology, 2003.

### IV.3 Publication III

First isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks in Morocco.

Vector borne and Zoonotic Diseases 2003, 3:133-139

### IV.4 Publication IV

Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale.

Submitted to Vector Borne and Zoonotic Diseases, 2003

### IV.5 Etudes sérologiques au Maroc

#### IV.1 Publication I

Distribution and Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* Ticks of Canton Ticino (Switzerland).

European Journal of Epidemiology 2003. 18:907-912

INFECTIOUS DISEASES

## Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of canton Ticino (Switzerland)

Fatima Jouda, Mara Crippa, Jean-Luc Perret & Lise Gern

Institut de Zoologie, University of Neuchâtel, Emile Argand 11, Neuchâtel 7, Switzerland

Accepted in revised form 4 December 2002

**Abstract.** Free-living *Ixodes ricinus* ticks were collected from 12 different sites of canton Ticino, south of the Alps (Switzerland). Each tick was examined for the presence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl), the etiologic agent of Lyme borreliosis using direct fluorescent antibody assay, and isolation of the bacteria. *Borreliae* were characterized by PCR followed by RFLP. The abundance and infection rates of *I. ricinus* ticks varied greatly between the areas. Two localities were found free of *Borrelia*. The

prevalence of infected ticks ranged from 5 to 19%. Most ticks (96%) were found infected by < 50 spirochetes. Three *B. burgdorferi* sl species were successfully isolated: *B. garinii* dominated, followed by *B. lusitaniae* and *B. valaisiana*. Additionally, a mixed infection with *B. garinii* and *B. valaisiana* was observed. The distribution of the various *Borrelia* species in the different areas was heterogeneous. This is the first report of the presence of *B. lusitaniae* in *I. ricinus* in Switzerland.

**Key words:** *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Borrelia lusitaniae*, *Ixodes ricinus*, Switzerland

### Introduction

In Europe, the etiologic agent of Lyme borreliosis, *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl) is transmitted by the bite of *Ixodes ricinus* ticks [1]. Five different *Borrelia* species have been found associated with *I. ricinus*: *B. garinii* [2], *B. burgdorferi* [2], *B. afzelii* [3], *B. valaisiana* [4] and *B. lusitaniae* [5]. In Switzerland, the infection rate of *I. ricinus* ticks collected in various areas varied between 5 and 47.5% [6]. South of the Alps, in canton Ticino, various studies have demonstrated the presence of *B. burgdorferi* sl in *I. ricinus* ticks [7]. However, no *Borrelia* isolate has been obtained till now from ticks collected in this part of Switzerland and only *B. valaisiana* DNA was detected by PCR [8] in ticks.

In the present study, we investigated the prevalence of *Borrelia* infection in *I. ricinus* ticks collected from vegetation and determined the presence and the geographic distribution of the various *Borrelia* species in different areas of Ticino.

### Material and methods

#### Collection of ticks

During 3 years from 1999 to 2001, late May or early June, free-living ticks were collected by flagging a 1 m<sup>2</sup> cotton cloth through the vegetation at 12 localities in canton Ticino (Switzerland) (Figure 1). The

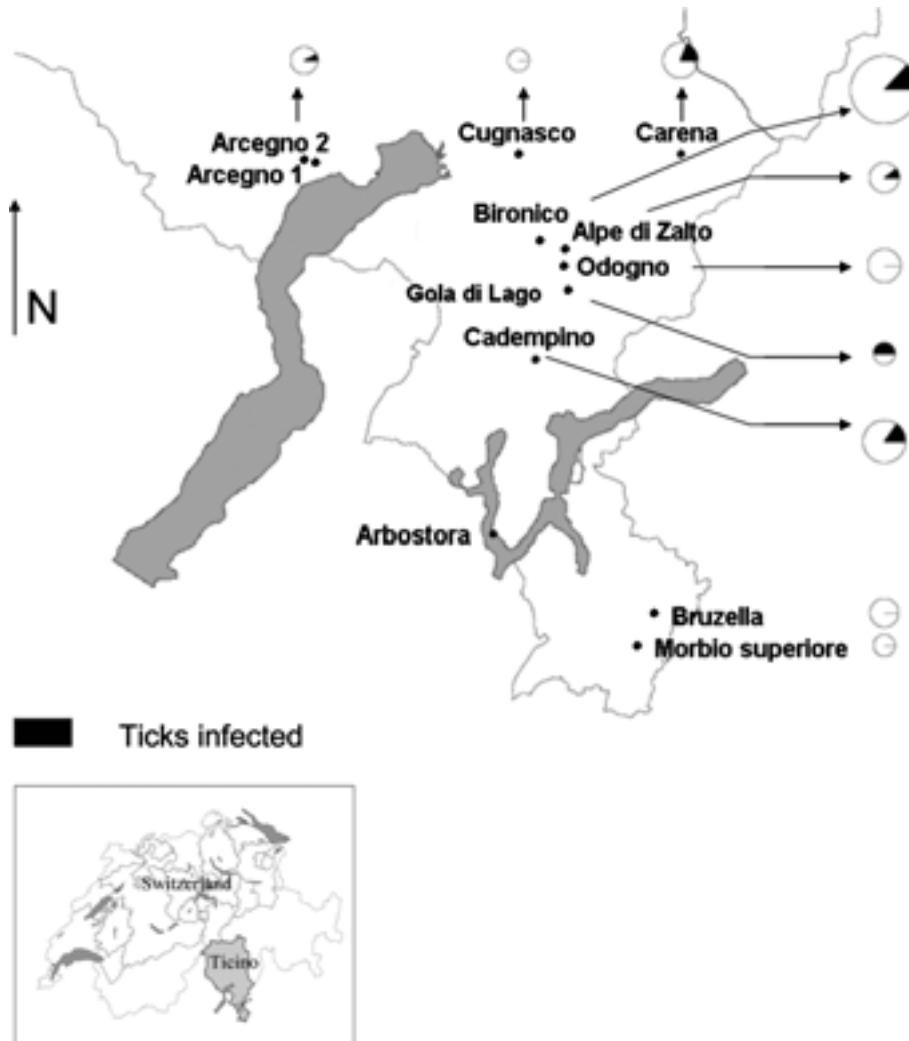
number of ticks attached to cloth was counted every 18 m, and ticks were maintained in tubes containing grass until species determination and examination for *Borrelia* infection.

#### *Borrelia* infection and isolation

Each *I. ricinus* tick was dropped in 70% ethanol and was cut into two pieces, one half was examined by direct Immunofluorescence (IF) and the other half was incubated in BSKII medium modified according to Sinsky and Piesman [9] for *B. burgdorferi* sl isolation as described previously [10].

For IF, one half of the tick was spread on a glass slide, dried overnight at 37 °C and fixed in acetone for 10 min. Fluorescein isothiocyanate-conjugated antibodies prepared from a pool of Lyme borreliosis patient sera which detect all *Borrelia* species were used [11]. Slides were incubated in a humid chamber for 30 min at 37 °C. They were examined for *Borrelia* by fluorescence microscopy. Spirochete numbers were estimated as described by Gern et al. [10] and the degree of infection was expressed as low: 1–50 spirochetes, medium: 50–500 spirochetes, and high: more than 500 spirochetes.

The other half of the tick was individually transferred into culture tubes containing BSKII medium [9, 10] and was examined by dark-field microscopy for *Borrelia* after 1 week of incubation at 34 °C and every week for 1 month.



**Figure 1.** Distribution of *I. ricinus* infected by *Borrelia burgdorferi* s.l. in Ticino. The graphics (Sectors) represent the infection rate by *Borrelia burgdorferi* s.l. according to density of *I. ricinus* ticks collected in different sites of study (Direct immunofluorescence).

#### PCR and RFLP

Identification of *Borrelia* species infecting *I. ricinus* ticks was done by PCR followed by RFLP [12]. Primers were selected to amplify the variable spacer region between the 3' end of the 5S rRNA (*rrf*) and the 5' end of the 23S rRNA (*rrl*). PCR products were digested by *Mse* I endonuclease. In 1999 and 2001, all initial culture tubes containing ticks were examined by PCR and RFLP. In 2000, *Borrelia* DNA detection by PCR was made only in initial culture tubes containing ticks found infected by IF, and PCR/RFLP was used for characterization of *Borrelia* isolates.

#### Statistical analysis

Fisher's exact test for count data and  $\chi^2$  tests were calculated using R version 0.90.0 [12] on a Linux 2.2.5 computer. Correlation between tick infection rate and the altitude was calculated using SPSS version 10.00.

#### Results

Altogether, 460 ticks were collected from the study sites. All collected ticks belonged to the species *I. ricinus*. No tick was found at two out of 12 sites (Arcegno 1 and Arbostora): nymphs were collected in 10 sites whereas adults were collected in 7/10 sites (Figure 1). Tick density varied between 0 and 66 ticks/100 m<sup>2</sup> (Table 1). The highest densities were observed in Bironico and Cadempino (Figure 1). The density of collected nymphs did not differ in 1999, 2000 and 2001, the same observation was made for adult ticks, except for females collected in 2000, when only one female was collected (data not shown). A total of 460 *I. ricinus* ticks, 415 nymphs, 17 females and 28 males, were examined for *Borrelia* infection. The overall prevalence of *B. burgdorferi* s.l. in ticks by IF was 11% (50/460) (Table 2). A higher infection rate occurred in females (24%, 4/17) followed by males (11%, 3/28) and nymphs (10%, 43/415) (Table 2). However, there was no significant difference

**Table 1.** Tick densities in study sites in canton Ticino

Sites	Total length of drag (m <sup>2</sup> )	Total number of ticks collected	Tick density (no. of ticks/100 m <sup>2</sup> )
Bironico	378	249	66
Cadempino	324	66	20
Odogno	306	22	1
Gola di Lago	360	34	9
Alpe di Zalto	558	31	6
Morbio Superiore	360	1	<1
Bruzella	504	24	5
Arcegno 1	514	0	0
Arcegno 2	450	15	4
Arbostora	414	0	0
Carena	144	16	11
Cugnasco	432	2	<1
Total	4744	460	10

between the prevalence in nymphs and adults ( $p = 0.3103$ ), and between females and males ( $p = 0.3986$ ). The highest infection prevalence in nymphs was obtained in 1999 with 14% (22/165) whereas in 2000 and 2001 the observed prevalences in nymphs were 7% (7/103) and 10% (14/143), respectively (Table 2). However, these differences were not significant ( $p = 0.25362$ ,  $\chi^2$ ).

*Borrelia* infected nymphs were collected only in 6/10 localities where nymphs were collected, with an infection prevalence varying between 5% (1/22) and 19% (3/16) (detailed data not shown). Infected adults were found in only 2/7 sites (Bironico and Cadempino) where adults were collected, with an infection rate of 29% (4/14) and 19% (3/16), respectively. In 2000, none of seven adults examined revealed any *Borrelia* infection.

As mentioned before, each tick was examined for *Borrelia* infection using IF and isolation. A total of 460 ticks were examined and 57 (12%) were found infected by IF and/or isolation (Table 3). Among them 4/57 (7%) by IF and isolation, 46/57 (81%) were observed infected by IF only and 7/57 (12%) by isolation only.

A total of 11 *Borrelia* isolates were obtained from the 460 (2.4%) ticks placed in culture tubes (Table 3). These isolates were characterized by PCR/RFLP: they belonged to *B. garinii* ( $n = 7$ ), *B. lusitaniae* ( $n = 1$ ), *B. valaisiana* ( $n = 1$ ), and 2 could not be characterized.

**Table 3.** Detection of *Borrelia burgdorferi* sl in *I. ricinus* ticks using IF and culture

	IF +/ Culture +	IF +/ Culture -	IF -/ Culture +	IF -/ Culture -
1999	2	23	4	157
2000	0	7	2	101
2001	2	16	1	145
Total	4	46	7	403

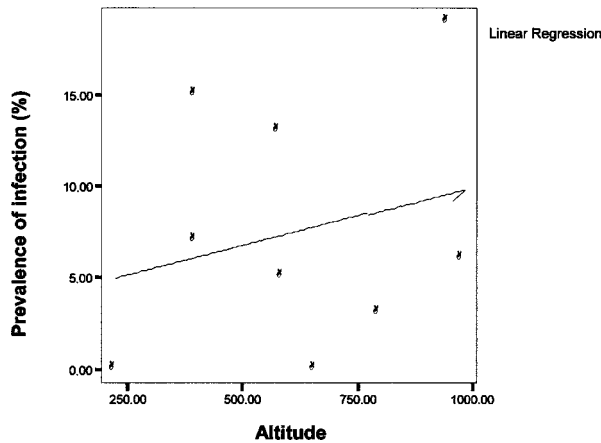
In addition, *Borrelia* DNA could be detected in eight tubes containing ticks found negative in culture and collected in 1999 and 2001: five of them were positive only by IF and three were positive only by detection of DNA by PCR. In 2000, *Borrelia* DNA detection by PCR was done only in culture tubes containing ticks found infected by IF ( $n = 7$ ) and DNA was detected in 1/7. Among these nine positive PCR, RFLP allowed to identify DNA of *B. garinii* ( $n = 5$ ), *B. lusitaniae* ( $n = 2$ ) and *B. valaisiana* ( $n = 1$ ) and one mixed infection with *B. garinii* and *B. valaisiana*.

Spirochete numbers were estimated in all 460 ticks examined by IF: 48/50 (96%) were infected by < 50 spirochetes and two (4%) by more than 500 spirochetes. Four *Borrelia* isolates were obtained from ticks found infected by < 50 spirochetes and *Borrelia* DNA was detected by PCR in six culture tubes containing ticks infected by < 50 spirochetes. All other isolates were obtained from ticks negative in IF.

*Borrelia* characterization by RFLP was possible in 20 ticks (11 from *Borrelia* isolates and 9 from *Borrelia* DNA detected in culture medium): *B. garinii* was the most frequent identified species with 65% (13/20) followed by *B. lusitaniae* (15%, 3/20) and *B. valaisiana* (10%, 2/20). A mixed infection with *B. garinii* and *B. valaisiana* was observed in one nymph (5%, 1/20). Nymphs were mainly infected by *B. garinii* (63%, 10/16), followed by *B. lusitaniae* (13%, 2/16) and *B. valaisiana* and a mixed infection (6%, 1/16). In females ( $n = 3$ ), all three genospecies were present. The only isolate obtained from males was *B. garinii*. The highest variety of *Borrelia* species was observed in Bironico (*B. garinii*: 6/10, *B. lusitaniae*: 3/10, and *B. valaisiana*: 1/10), and in Cadempino (*B. garinii*: 2/5 (40%), *B. valaisiana*: 1/5 (20%) and one unidentified). In Odogno, *B. garinii* ( $n = 1$ ) and one unidentified *Borrelia* were observed. In all other localities only

**Table 2.** *Borrelia* infection in *I. ricinus* ticks in Ticino (using direct immunofluorescence)

	1999	2000	2001	Total
Tick stadium	Nb inf/examined	Nb inf/examined	Nb inf/examined	Nb inf/examined
Nymphs	22/169 (14%)	7/103 (7%)	14/143 (10%)	43/415 (10%)
Females	1/8 (13%)	0/1	3/8 (38%)	4/17 (24%)
Males	2/9 (22%)	0/6	1/13 (19%)	3/28 (11%)
Adults	3/17 (18%)	0/7	4/26 (15%)	7/45 (16%)



**Figure 2.** Prevalence of *Borrelia* infection in *I. ricinus* ticks in relation to the altitude (using Immunofluorescence).

*B. garinii* was present in ticks: two ticks were infected by *B. garinii* in Alpe di Zalto and one in Gola di Lago.

Since collection site altitude varied from 224 to 980 m, we examined whether there was a relationship between infection in ticks and altitude. The data showed that the prevalence of infection in ticks was not correlated by altitude (Figure 2).

## Discussion

Various studies have been realized in canton Ticino, south of the Alps, in Switzerland on ticks and tick-borne pathogens [7]. Different tick species have been described in this canton, among them *I. ricinus*. In our study, only *I. ricinus* ticks were collected by flagging vegetation in the studied areas.

The density of questing ticks collected varied greatly between the different areas. The highest density of ticks was observed in Bironico with 66 ticks/100 m<sup>2</sup> (62 nymphs/100 m<sup>2</sup> and 4 adults/100 m<sup>2</sup>). Miserez et al. [7] also observed the highest number of *I. ricinus* ticks in Bironico, whereas no tick was collected in Odogno and Morbio Superiore. In our study, *I. ricinus* ticks were collected in these two localities. A study realized in Europe by Gray et al. [13] on tick densities showed that most studied areas displayed similar tick densities as those observed in Ticino.

*Borrelia* infection rate using IF was 16% in *I. ricinus* adults and 10% in nymphs. These infection rates are lower than those previously reported by Miserez et al. [7] (25% in adults, 36.2% in nymphs) using IF but in this study ticks were collected both from vegetation and attached to hosts. Other infection rates using PCR (2%) and Real Time PCR (31, 65%) were reported in ticks collected in Ticino by Bernasconi et al. [8] and by Wicki et al. [14], respectively. A variation among results might be explained in part by differences in methodology used to determine the infection rate in ticks. In three localities, Bruzella, Morbio Superiore and Cugnasco, *I. ricinus* ticks were

found free of *Borrelia* when tested by three different methods (IF, isolation and DNA detection by PCR of culture medium). Some other studies have also revealed a heterogeneous geographical distribution of *I. ricinus* and of the *Borrelia* infection prevalence in Switzerland [1].

Aeschlimann et al. [1] have demonstrated that the prevalence of *Borrelia* in ticks was correlated with altitude, but in our study this phenomenon is not observed. This might be due to the fact that the studied sites were geographically dispersed, this was not the case in the previous study [1], where ticks were collected at various altitudes on the slope of a single mountain.

IF was found to be more efficient than culture for detection of *Borrelia* in ticks. Similar observations were reported by Gern et al. [10]. Different hypotheses might explain this. The higher infection rate by IF than isolation might be related to heterogeneous distribution of the spirochetes in the ticks [15] and the fact that we used only one halved tick for isolation procedure could influence spirochete growth in BSK medium. In addition, the low number of spirochetes harbored in ticks as observed by IF can also explain this phenomenon. In fact, 96% of *I. ricinus* ticks examined were harboring < 50 spirochetes, only two ticks (4%) were infected by more than 500 spirochetes. This result can partly be responsible for the low isolation rate (2.4%) observed in *I. ricinus* ticks in canton Ticino. Comparison with results of another study performed in our laboratory using the same techniques [10] where the isolation rate reached 33%, allows to understand this low isolation rate. In fact, in this study, 36% of ticks were infected by a high density of spirochetes (more than 50 spirochetes) compared to 4% in the present study. Moreover, among the three *Borrelia* species observed in Ticino, two (*B. lusitaniae* and *B. valaisiana*) of them are recognized as difficult to isolate from ticks.

The use of IF and *Borrelia* isolation for each tick allows to count *Borrelia* in ticks, to isolate the bacteria, to characterize the *Borrelia* species and to detect and characterize *Borrelia* DNA in culture medium when no isolate has been obtained.

In the present study we observed that three genospecies of *B. burgdorferi* s.l. are present in canton Ticino: *B. garinii*, *B. valaisiana* and *B. lusitaniae*. In contrast, in a previous study in this part of Switzerland only DNA of *B. valaisiana* (VS116) had been detected by PCR in ticks collected from hosts [8]. Our data show that *B. garinii* and *B. lusitaniae* are also infecting ticks in canton Ticino, and *Borrelia* isolates from the three species could be obtained from ticks in the present study. Apparently *B. afzelii* and *B. burgdorferi* s.s. are absent from the studied sites. Additional studies are needed to confirm this especially because a study in canton Valais (in alpine valleys) by Péter et al. [6] showed the presence of *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* and *B. valaisiana*.

*B. garinii* is the most frequent species observed in the studied areas, the same result was reported in Belgium [16], in Germany [17] and in various areas in Europe [18]. In contrast, in Slovakia [10] and in Finland [19], *B. afzelii* was the predominant genospecies, whereas in Ireland [20], in Portugal [21] and in Tunisia [22] *B. valaisiana* and *B. lusitaniae*, respectively were the most prevalent species. The heterogeneous distribution of *B. burgdorferi* sl could be associated with the diversity of reservoir hosts. A mixed infection with *B. garinii* and *B. valaisiana* has been found in one nymphal tick. De Michelis et al. [21] have reported that *B. garinii* and *B. valaisiana* constituted the majority of multiple infections. Additionally these two species have been described to infect the same reservoir host and to present a similar distribution [17, 23, 24]. *B. lusitaniae* has been previously reported in Portugal [25], in the Czech Republic, Moldavia, Ukraine [26], Slovakia [10], Tunisia [27] and Poland [28]. In our study, this species is described and isolated for the first time in Switzerland.

#### Acknowledgements

This work was financially supported by the Swiss National Science Foundation (32-57098.99) and Hoffman-la Roche Foundation. We would like to thank Olivier Rais for his technical assistance, and Chang Min Hu and Yves Cheminade for their help. This paper is part of the PhD thesis of one of the author F.J.

#### References

- Aeschlimann A, Chamot E, Gigon F, Jeanneret JP, Kessler D, Walther C. *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. *Zbl Bakt Hyg A* 1986; 263: 450–458.
- Baranton G, Postic D, Saint Girons I, et al. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov.; and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42: 378–383.
- Canica MM, Nato F, Du Merle L, Mazie JC, Baranton G, Postic D. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis* 1993; 25: 441–448.
- Wang G, Van Dam AP, Le Fleche A, et al. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 926–932.
- Le Fleche A, Postic D, Girardet K, Péter O, Baranton G. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 921–925.
- Péter O, Bretz AG, Bee D. Occurrence of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ixodid ticks of Valais, Switzerland. *Eur J Epidemiol* 1995; 11: 463–467.
- Miserez V, Gern L, Aeschlimann A. *Borrelia burgdorferi* in ticks of the Canton Tessin (Switzerland). *Parassitologia* 1990; 32: 293–299.
- Bernasconi MV, Valsangiacomo C, Balmelli T, Péter O, Piffaretti JC. Tick zoonoses in the southern part of Switzerland (Canton Ticino): Occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Rickettsia* sp. *Eur J Epidemiol* 1997; 13: 209–215.
- Sinsky RJ, Piesman J. Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1723–1727.
- Gern L, Hu CM, Kocianova E, Vyrostekova V, Rehacek J. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *Eur J Epidemiol* 1999; 15: 665–669.
- Postic D, Assous MV, Grimont PAD, Baranton G. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44: 743–752.
- Ihaka R, Getleman RR. A language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Stat* 1996; 5: 299–314.
- Gray JS, Kahl O, Robertson JN, et al. Lyme borreliosis habitat assessment. *Zbl Bakt* 1998; 287: 211–228.
- Wicki R, Sauter P, Mettler C, et al. 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* 2000; 19: 427–432.
- Lebet N, Gern L. Histological examination of *Borrelia burgdorferi* infections in unfed *Ixodes ricinus* nymphs. *Exp Appl Acarol* 1994; 18: 177–183.
- Misonne MC, Van Impe G, Hoet PP. Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in Belgium. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3352–3354.
- Richter D, Endepols S, Ohlenbusch A, Eiffert H, Spielman A, Matuschka FR. Genospecies diversity of Lyme disease spirochetes in rodent reservoirs. *Emerging Infect Dis* 1999; 5: 291–296.
- Kurtenbach K, De Michelis S, Sewell HS, et al. Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl Env Microbiol* 2001; 67: 4926–4929.
- Junttila J, Peltomaa M, Soini H, Marjamäki M, Viljanen MK. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1361–1365.
- Kirstein F, Rijpkema S, Molkenboer M, Gray JS. Local variations in the distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes*. *Zbl Bakt* 1998; 287: 205–210.
- De Michelis S, Sewell HS, Collares-Pereira M, et al. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2118–2133.
- Younsi H, Postic D, Baranton G, Bouattour A. High prevalence of *Borrelia lusitaniae* in *Ixodes ricinus* ticks in Tunisia. *Eur J Epidemiol* 2001; 17: 53–56.
- Humair PF, Rais O, Gern L. Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: Differential transmission pattern

- and overwintering maintenance. *Parasitology* 1999; 118: 33–42.
24. Olsen B, Jaenson TGT, Bergström S. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Appl Env Microbiol* 1995; 61: 3082–3087.
25. Nuncio MS, Péter O, Alves MJ, Bacellar F, Filipe AR. Isolemento e caracterizaáao de Borrélias de *Ixodes ricinus* L. em Portugal. *Rev Portug Doencas Infec* 1993; 16: 175–179.
26. Postic D, Korenberg E, Gorelova N, Kovalevski YV, Bellenger E, Baranton G. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighbouring countries: High incidence of mixed isolates. *Res Microbiol* 1997; 148: 691–702.
27. Zhioua E, Bouattour A, Hu CM, et al. Infection of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in North Africa. *J Med Entomol* 1999; 36: 216–218.
28. Mizak B, Krol J. Analysis of polish isolates of *Borrelia burgdorferi* by amplification of rrf (5S)–rrl (23S) intergenic spacer. *Bull veterinary Inst Pulawy* 2000; 44: 147–154.

*Address for correspondence:* Lise Gern, Institut de Zoologie, University of Neuchâtel, Emile Argand 11, 2007 Neuchâtel 7, Switzerland  
Phone: +41327183000; Fax: +41327183001

## IV.2 Publication II

Influence of altitude on *Ixodes ricinus* density, and on distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection.

Journal of Medical Entomology 2003, In press

Journal of Medical Entomology, 2003, In press

**INFLUENCE OF ALTITUDE ON *IXODES RICINUS* DENSITY, AND ON DISTRIBUTION AND PREVALENCE OF *BORRELIA BURGDORFERI* SENSU LATO INFECTION.**

JOUDA Fatima, PERRET Jean-Luc and GERN Lise  
Institut de Zoologie, University of Neuchâtel, Switzerland

Corresponding author :Institut de Zoologie Emile Argand 11, 2007 Neuchâtel 7, Switzerland  
Phone no 41 32 718 3000. Fax no 41 32 718 30001.E-mail : [lise.gern@unine.ch](mailto:lise.gern@unine.ch)

Institut de Zoologie, University of Neuchâtel, Switzerland

## Abstract

In this study we measured the phenology of *Ixodes ricinus* ticks and their infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl) simultaneously along an altitude gradient to assess the impact of climate on the phenology of ticks and on their infection with *B. burgdorferi* sl.

From 1999 to 2001 free - living *I. ricinus* ticks were collected monthly by flagging vegetation at three different altitudes (620m, 740m and 900 m above sea level) on the slope of a mountain in Chaumont (Neuchâtel, Switzerland). *I. ricinus* ticks were examined for the presence of *B. burgdorferi* sl using direct fluorescent antibody assay and isolation of spirochetes. *Borreliae* were characterized by PCR followed by RFLP. Tick density and tick phenology varied with altitude. While the peak tick density decreased and the onset of ticks was delayed with altitude, the phenology was much more stable among years at the highest altitudes than at the lowest. The prevalence of *B. burgdorferi* infection in nymphs and adults decreased with altitude. The prevalence of infection differed significantly among years, and it was significantly higher in adults (30%) than in nymphs (21%). *B. burgdorferi* infection in adults was positively related with adult density but this was not observed for nymphs. Five *B. burgdorferi* sl genospecies were successfully isolated: *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*. Mixed infections were obtained from 5 ticks. The greatest diversity in *Borrelia* species was observed at the lowest altitude where all 5 *Borrelia* species were present whereas at the 2 highest altitudes, *B. lusitaniae* was not observed.

Key words: *Ixodes ricinus*, tick density, climate, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, phenology

## INTRODUCTION

In Europe the main vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl), a complex of *Borrelia* species which includes the agent of Lyme Borreliosis, is *Ixodes ricinus* (Burgdorfer et al., 1983). This tick is broadly distributed from North Africa to Scandinavia and from Ireland to Central Russia (Gern and Humair, 2002) and has been described up to an altitude of 1450m in Switzerland (Cotty et al., 1986). The annual pattern of the questing tick density of this tick changes widely over its geographic distribution (Korenberg, 2000) and also in the same area according to year as shown for example in Ireland (Gray, 1984), in the UK (Randolph et al., 2002) and in Switzerland (Perret et al., 2000).

*B. burgdorferi* sl is genetically heterogeneous. Five different *Borrelia* genospecies have been found associated with *I. ricinus*: *B. garinii* (Baranton et al., 1992), *B. burgdorferi* ss (Johnson et al., 1984), *B. afzelii* (Canica et al., 1993), *B. valaisiana* (Wang et al., 1997) and *B. lusitaniae* (Le Fleche et al., 1997). In Europe *B. burgdorferi* sl has been described in 26 countries (Hubalek and Halouzka, 1997) with an average prevalence of *Borrelia* infection of 10.8% in nymphs and 17.4% in adults (Hubalek and Halouzka, 1998). In Switzerland, *Borrelia* infection in *I. ricinus* ticks collected in various areas varies between 5% and 47.5% (Aeschlimann et al., 1986, Péter et al., 1995).

The impact of climate on *I. ricinus* ticks in the context of global climate change is a matter of debate. While the distribution of *I. ricinus* has been shown to extend northwards and westwards within Sweden in relation with climate-warming (Tälleklint and Jaenson, 1998, Lindgren et al., 2000), the impact of climate changes in central Europe where *I. ricinus* is present may rather affect the tick patterns of seasonal dynamics (Randolph, 2001, Randolph et al. 2002). Climate may also affect tick abundance over one year and its evolution over the year. While tick abundance over one year can be expressed as a single number (cumulative tick density, Eisen et al (2003)), the evolution of questing tick density is a periodic function which we define here as tick phenology. Tick phenology is characterized by annual cyclic events like onset, peak(s) and fall of questing tick density.

As temperature globally decreases with altitude, studying phenology of ticks within a short horizontal distance on the slope of a mountain is like studying phenology of ticks under different climatic scenarios.

Therefore in this study we measured the phenology of ticks and their infection with *Borrelia* sp. simultaneously along an altitude gradient to assess the impact of climate on the phenology of ticks and on their infection with *B. burgdorferi* sl.

## MATERIAL AND METHODS

### *Collection of ticks.*

Free-living ticks were collected every month, during three years from March 1999 to November 2001, by flagging a 1m<sup>2</sup> cotton cloth on the low vegetation. The surface flagged by month and site was 150m<sup>2</sup>. The study site is a mixed forest (deciduous dominant) situated on the slope of a mountain (Chaumont) north of Neuchâtel (Switzerland) ranging from 500 to 1000m in altitude with a southern exposition. Ticks were collected at three different altitudes: Chaumont high (H) (900m), Chaumont middle (M) (740m) and Chaumont low (L) (620m). Different tick developmental stages and sexes were maintained separately in tubes containing grass until species determination and examination for *Borrelia* infection.

Air temperature was recorded continuously at both ends of the altitude gradient by two Météosuisse automatic weather stations: "Chaumont" located at 1073m above sea level, approximately 1 km from the Chaumont High sampling location, and "Neuchâtel" at 487m above sea level, located approximately 1 km from Chaumont Low sampling location. Data were published by Wuetrich (2000), Wuetrich and Jornod (2001) and Baniewicz (2002). To estimate the annual average temperature at our sampling sites we assumed that air temperature decreased linearly as altitude increases along the slope.

Questing tick density was expressed as the number of ticks found per 100m<sup>2</sup>. An annual value for tick density called cumulated tick density (CTD) was obtained by integrating the linearly interpolated curve of questing tick density over one year (Eisen et al., 2003) (figure 1). The maximal tick density over one year was called the peak tick density (PTD, figure 1). The date of onset of significant questing tick activity in spring was calculated from the questing tick density curve as the date when tick density exceeded 10% of the peak tick density (O10, figure 1) (Eisen et al. 2002). Similarly, the end of tick activity was calculated as the last date when tick density decreased below 10% of the peak tick density (F10, figure 1). Nymphs and adults were treated separately within all calculations.

We calculated the density of infected ticks (nymphs and adults) per 100m<sup>2</sup> when tick density was maximal (PTDi) for each year and for each altitude by multiplying PTD by the % of infected ticks.

### *Borrelia infection and isolations*

Each *I. ricinus* adult tick collected and 10 nymphs were examined every month by direct immunofluorescence (IF) and cultivation. Ticks were dropped in 70% ethanol and cut into two pieces, one half was examined by IF and the other half was used for *B. burgdorferi* sl isolation as described previously (Gern et al., 1999). In order to test the effect of cutting ticks into two pieces and of examining only halved tick by IF, ten additional nymphs were examined each month by IF only.

For IF, one half or the entire tick was spread on a glass slide, dried overnight at 37°C and fixed in acetone for 10 min. Fluorescein isothiocyanate - conjugate which was prepared from a pool of Lyme borreliosis patient sera which detects all *Borrelia* species was used (Gern et al., 1999). Slides were incubated in humid chambers for 30 min at 37°C and were examined for *Borrelia* by fluorescence microscopy. Spirochetes were counted per 1/2 tick and infection degree was classified into three categories: low: 1 - 50 spirochetes, medium: 50 - 500 and high: more than 500 spirochetes.

The other half of the tick was individually transferred into culture tubes containing BSKII medium (Sinsky and Piesman, 1989). Culture medium was examined by dark-field microscopy for *Borrelia* after one week of incubation at 34°C and then every week for one month.

#### *PCR and RFLP.*

*Borrelia* species infecting *I. ricinus* ticks placed in culture tubes were identified by PCR followed by RFLP according to Postic et al. (1994). Primers used to amplify the variable spacer region between two repeated genes encoding for ribosomal 23S and 5S were: primer 1 (5'-CTGCGAGTTCGCGGGAGA-3') and primer 2 (5'-TCCTAGGCATTCACCATA-3'). Each amplification reaction was carried out for 35 cycles with following modification: denaturation was performed for 1 min at 94°C, annealing at 55°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. PCR products were digested with *Mse*I restriction endonuclease.

#### *Statistical analysis*

The relation between PTD, CTD, O10, F10 (Figure 1) and altitude (considered as an ordered factor) was evaluated with the Jonckheere test (Siegel and Castellan, 1988). The relation between the variance of maximum tick density and altitude was evaluated by linear regression with altitude expressed in meters above sea level.

The relation between altitude and tick infection rates with *B. burgdorferi* sI or altitude and the degree of infection in ticks, was calculated by logistic regressions. In these regressions, altitude was considered as an ordered factor while the year was considered as a regular factor. Infection rates between nymphs and adults were compared using Fisher's exact test. Logistic regressions and variance analysis were calculated with Splus 6 from Windows (Insightful Corporation, Seattle, Washington). All other statistics were calculated with R for Linux V 0.90.0 (Ikaha and Gentleman, 1996).

#### Results:

Questing tick density expressed as the CTD (the integral over one year of the questing tick density) decreased with altitude for both nymphs and adults (Figure 2, Jonckheere test: n=9,

p=0.017 for nymphs and p=0.0098 for adults). The phenology of ticks also varied with altitude (Figure 2). The onset of tick activity in spring (O10) was inversely related to altitude, especially in nymphs (Jonckheere test: n=9, p=0.007 for nymphs and p=0.0590 for adults) whereas the end of tick activity (F10) was not related to altitude (Jonckheere test: n=9; p=0.85 for nymphs and p=0.25 for adults). The density of ticks reached a main spring peak in April-May. The time of the peak did not vary with altitude (Jonckheere test: n=9, p=0.18 for nymphs and p=0.13 for adults). However the peak tick density decreased with increasing altitude (Jonckheere test: n=9, p=0.0098 for nymphs and p=0.035 for adults). A noticeable exception occurred in 2001 when the highest density of adults was recorded at the medium altitude. Variance among years of the questing nymph density during the spring peak was linearly and inversely related to altitude (F-test: p=0.0135).

A secondary peak of questing nymphs was sometimes observed in autumn. The nymphal density during this autumn peak (PTD2) decreased with increasing altitude (Jonckheere test: n=9, p=0.005). During 2000 the autumn peak of nymphs at the two lowest altitudes reached 70% of the spring peak (PTD1). Autumn peaks for adult ticks were not very important at any altitude.

Air temperature was recorded at both ends of the altitude gradient by automatic weather stations (Table 1). The average annual temperature from 1999 to 2001 decreased by 4.23°C between 487 and 1073 meters altitude. This means a temperature gradient of 0.72°C per 100 meters. By assuming a linear temperature gradient along the slope of the Chaumont mountain, we can estimate the average annual temperature at our sampling sites (Table 1). The temperatures recorded in Neuchâtel from 1999 to 2001 were higher than the average annual temperature calculated over the 20<sup>th</sup> century which was 9.4°C (Baniewicz, 2002). The warmest year of all three years studied was 2000 when the autumn peak of nymphs also reached its maximum value.

Since parts of nymphs were examined for *B. burgdorferi* sI infection by IF alone and other nymphs were examined by IF and isolation, we compared infection rates in both groups of ticks and found no significant difference for ticks examined by IF and culture (130/608, 21%), and for ticks examined by IF alone (96/504, 19%, Fisher test, p=0.369). Therefore IF results for all nymphs - examined by IF alone or by IF and culture - were pooled.

A total of 1619 *I. ricinus* ticks (1112 nymphs and 507 adults) were examined for *Borrelia* infection (Table 2). The overall prevalence of *B. burgdorferi* sI in these ticks was 24% (382/1619) (IF and/or isolation). Adults were significantly more infected (30%) than nymphs (21%, Fisher test: p<0.0001). No seasonal variations in the infection prevalence could be found at any altitude (detailed data not shown). Nymphal and adult infection prevalence with *Borrelia* sI decreased with increasing altitude and varied among years (Table 2, logistic

regression for nymphs:  $t = 2.354$ ,  $p=0.01$  for altitude, and  $t=4285$ ,  $p<0.001$  for year, logistic regression for adults:  $t = 2.122$ ,  $p=0.034$  for altitude and  $t=2.307$ ,  $p=0.022$  for year).

Since in 2001 more adults were found in Chaumont M than at the two other altitudes, we tested whether the adult infection prevalence was related to the adult density. Indeed, we found a significant positive relation between adult density and infection prevalence (logistic regression with monthly density and monthly prevalence:  $t=2.465$ ,  $p=0.0137$ ).

During the 3 studied years, the peak tick density of infected ticks (PTDi) varied from 7.4 to 68.64 infected nymphs per 100m<sup>2</sup> and from 1.4 to 16.72 infected adults per 100m<sup>2</sup> (Table 3). PTDi for nymphs decreased with increasing altitude (Table 3, variance analysis:  $df=2$ ,  $f=14.497$ ,  $p=0.0146$  (model coefficient of altitude,  $L = 20.6$ ,  $M=-6.04$ ,  $H=-14.6$ ), and slightly varied among years (Table 3, variance analysis:  $df=2$ ,  $f=4.737$ ,  $p=0.0881$ ), with a higher density of infected nymphs in 2001 than in 1999 and 2000 (Table 3). In adults the fluctuations among years and altitudes were not very important (Table 3, variance analysis  $df=2$ ,  $f=0.5023$ ,  $p=0.638$  for years and  $df=2$ ,  $f=0.5023$ ,  $p=0.446$  for altitudes).

A total of 120 *Borrelia* isolates were obtained from 1115 ticks (11%) placed in culture tubes. PCR/RFLP allowed to identify 5 genospecies of *B. burgdorferi* sl. Since half-ticks were examined both by IF and culture, we amplified *Borrelia* DNA from 20 ungrown cultures of 70 ticks, collected in 2001, found infected by IF. These ungrown cultures contained DNA from *B. garinii* ( $n=5$ ), *B. afzelii* ( $n=11$ ), *B. valaisiana* ( $n=2$ ) and *B. burgdorferi* ss ( $n=2$ ).

Globally, *Borrelia* characterization by RFLP allowed to identify *Borrelia* species in 140 ticks (Table 4): *B. garinii* was the most frequent species in nymphs (61%) and adults (53%) at all three altitudes. *B. lusitaniae* was isolated only from 3 females (two females had mixed infection, see below) collected at Chaumont L. No *B. lusitaniae* isolates were obtained from nymphs, and no *B. lusitaniae* were obtained at the two highest altitudes.

Mixed infections were identified at Chaumont L ( $n=3$ ), at Chaumont M ( $n=1$ ) and at Chaumont H ( $n=1$ ). Two mixed infections were obtained from nymphs at Chaumont H and L (*B. garinii* and *B. valaisiana*) and 3 mixed infections were observed in adults: two at Chaumont L (*B. valaisiana* and *B. lusitaniae*, and *B. garinii* and *B. lusitaniae*), and one at Chaumont M (*B. afzelii* and *B. burgdorferi* ss).

Spirochete numbers were estimated in all 348 ticks found infected by IF. Most ticks, 78%, ( $n=271$ ) were weakly infected (less than 50 spirochetes), while 16% ( $n=55$ ) were moderately infected (50 to 500 spirochetes) and 6% ( $n=22$ ) were highly infected (more than 500 spirochetes). For further processing, ticks were classified into two groups: weakly infected (less than 50 spirochetes) and highly infected (50 or more spirochetes). Using this classification, we observed that the degree of infection in ticks was not related to altitude (logistic regression: nymphs:  $p=0.24$  and adults:  $p=0.48$ ). Isolation success was significantly increased when the number of spirochetes (determined by IF) was high in nymphs: 14

isolates were obtained from 24 highly infected nymphs (58%) while only 14 isolates were obtained from 92 weakly infected nymphs (15%, Fisher test,  $p=0.00005$ ). The same was not true for adults. Indeed isolation success from weakly infected adults already reached 50% (53/105) while isolation success from highly infected adults reached 67% (16/24, Fisher test,  $p=0.18$ ).

## Discussion

In this study we examined the effect of altitude on *I. ricinus* density (CTD), phenology and on its infection with *B. burgdorferi* sl. We observed that the onset of tick activity in spring was delayed with increasing altitude. As temperature is decreasing with higher altitude, this observation can be explained by delayed development of ticks in spring at higher altitude, and/or by the delayed activation of already moulted individuals. This is consistent with previous observations in a nearby area showing that onset of tick activity varied among years according to temperature in spring (Perret et al. 2000).

Tick density decreased with increasing altitude. This was true for the density over the whole year as well as for the peak tick density in spring. While the maximum tick density in spring was highly variable among years at lower altitude, it was very stable at the highest altitude. In addition to these results we observed that the proportion of ticks collected in the second half-year varied among years and decreased with altitude.

A study on the development potential of *I. ricinus* at altitudes ranging from 650 to 1550 meters in Bohemia (Daniel, 1993) showed that the establishment of ticks at high altitudes was limited by delayed development of ticks due to colder temperature (especially the number of days below development threshold) and to desiccation. At high altitude, those ticks which managed to complete their development started to be active in late spring or summer only while conditions are the most desiccating. In a recent note Daniel et al. (2003) showed that *I. ricinus* distribution in Sumava National Park extended towards higher altitudes during the last decades, probably in relation with climate warming. In our observation, the tick population was not only established at 900 meters but was also much more stable than at the lower altitudes: the maximum tick density was very stable among years, and no autumn peak occurred. Delays in development associated with lower temperatures in early summer were used by Randolph et al. (2002) to explain the non occurrence of autumn peaks of ticks in Great-Britain. In our conditions, lower temperature during summer at higher altitude could also have reduced the development speed of spring-fed ticks, especially larvae, thus preventing the occurrence of an autumn peak of nymphs, while higher temperature at lower altitudes may allow the occurrence of an autumnal peak. In 2000 for example which was the warmest of the three year under study, the autumn peak of nymphs reached the highest

value. The warmer temperature may have allowed spring-summer-fed ticks to moult and emerge the same year as reported by Chmela (1969).

During the last decade *I. ricinus* distribution extended northwards and westwards within Sweden (Tälleklint and Jaenson, 1998, Lindgren et al. 2000). In continental Europe *I. ricinus* is broadly distributed, but the question of the evolution of tick phenology within continental Europe under warming climate remains controversial. We might expect more instability in tick phenology. Indeed, increased winter temperature might permit an early onset of tick activity in spring and increased summer temperature might increase tick development speed inducing an autumn peak of activity (Randolph et al. 2002). On the other hand, increased temperature, in spring and summer, inhibits the questing behaviour of ticks, as shown in nature and under experimental conditions (Perret et al. 2000, Perret et al. 2003), thus reducing questing tick density. Therefore we expect more instability in *I. ricinus* phenology under warmer conditions at low altitude, depending not only upon global changes, but also upon the synchrony of weather conditions with the tick life cycle, for example in spring when many ticks quest warmer temperature would reduce questing duration (Perret et al. 2003) and in summer when those ticks moult warmer temperature would enhance their development (Campbell 1948 cited in Randolph et al. 2002, Chmela 1969). At higher altitudes however, increased temperatures may lead to an increase in tick density through an earlier onset of tick activity in spring and through reduced development duration from one instar to the next one. Increased temperature might also induce the occurrence of an autumn peak at higher altitudes (Steele and Randolph 1985, Randolph et al. 2002), as long as the host community is not affected by temperature changes and as long as ticks can quest for long enough to grab a host before dying of desiccation and/or energy exhaustion.

The overall prevalence of *B. burgdorferi* sl in *I. ricinus* ticks was 24% with a higher prevalence in adults than in nymphs. This is in line with what is usually reported for Europe (Hubalek and Halouzka 1998). Infection prevalences in nymphs and adults are similar to the prevalences reported by Aeschlimann et al. (1986) in Neuchâtel for ticks collected in 1984 and 1985. This indicates a long term stability in tick infection prevalence, even if fluctuations among years are possible, as shown in the present study. In nymphs, the lowest prevalence of infection was observed in 1999 and the highest in 2001 at all altitudes. In adults, the fluctuation of the infection prevalence was slightly marked, probably due to the lower number of adults examined.

In the same study, Aeschlimann et al. (1986) compared infection in ticks, all collected the same day, at different locations ranging from 400 to 700m altitude and found a decrease in prevalence of nymphal tick infection with increasing altitude. Similarly, Rizzoli et al. (2002) have demonstrated that the density of *Borrelia* infected nymphs collected in different locations in Italian Alps, decreased up to an altitude of 1300 m. Here we observed that this

decrease is stable over time (3 years). We found that the prevalence of infection in adult ticks was related to altitude, but also to adult density. This might be due to the low number of adults examined and to the fact that in 2001, most adults were collected at middle altitude. We did not find any seasonal variation in the infection prevalence of ticks at any altitude. Similar results have been reported in Sweden (Mejlon et al. 1993) and in Poland (Wegner et al. 1997).

Studies on spatial variation in density of *I. ricinus* ticks infected with *B. burgdorferi* s.l. are rather rare. In southern part of Sweden, densities reaching 7.68 infected *I. ricinus* nymphs per 100 m<sup>2</sup> (Mejlon and Jaenson 1993, Tälleklint and Jaenson 1996) have been reported. In our study, when during the year questing tick density reaches its maximum, the risk to encounter an infected tick greatly varies among years and altitudes. The densities of infected nymphs observed in our study at the lowest altitude are particularly high ranging between 36 and 68.6 infected nymphs per 100m<sup>2</sup> and remain high at 900 m (range 7.4 to 16.5).

All five European *Borrelia* species, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* ss, *B. valaisiana* and *B. lusitaniae*, have been observed in *I. ricinus* adults in our study. The simultaneous presence of the 5 *Borrelia* species in an endemic area has never been described in Switzerland before. In this country, *B. lusitaniae* was only observed in locations South of the Alps (Jouda et al. in press). This species is usually not very frequent in endemic areas in Europe and has been reported only in a few countries: Czech Republic, Moldavia, Ukraine (Postic et al., 1997), Slovakia (Gern et al., 1999), Poland (Mizak et al., 2000), Spain (Escudero et al. 2000, Barral et al. 2002) and France (Richter et al. 2003). However, in some areas this species may be very frequent in ticks like in Portugal, and North Africa (De Michelis et al. 2000, Nuncio et al., 1993, Younsi et al., 2001, Zhioua et al., 1999). In our study *B. lusitaniae* was found associated with *B. garinii* in one adult and with *B. valaisiana* in another one. *B. lusitaniae* was not detected in nymphs. The reservoir hosts for *B. lusitaniae* have not yet been identified. However, it is interesting to notice that, in the present study, *B. lusitaniae* was associated with *B. garinii* and *B. valaisiana*, two *Borrelia* species infecting birds (Humair et al. 1998, Kurtenbach et al. 1998, Gern and Humair, 2002).

*B. garinii* was largely predominant indicating that birds are the main reservoirs at all altitudes (Gern and Humair, 2002). The rodent-associated *B. garinii* OspA serotype 4 (Huegli et al. 2002) has not been detected in this forest (unpublished data).

Most *I. ricinus* ticks in Chaumont were infected by less than 50 spirochetes. In nymphs the success of isolation was related to degree of infection whereas in adults, *Borrelia* isolates were equally obtained from ticks infected by few, or many spirochetes. These results may be explained by the difference in the midgut size between adults and nymphs incubated in BSKII medium, and also by the heterogeneous distribution of *Borrelia* in ticks (Lebet and Gern, 1994).

Global warming has been predicted to increase vector-borne diseases (Epstein, 2001). However some controversy exists. Since variable phenologies and variable *Borrelia* infections of ticks were observed simultaneously at different altitudes, under different temperature conditions, within the same forest at a short distance, this area is suitable to follow the impact of different climatic scenarios on tick phenology. Further surveys of this area may help to understand the evolution of tick density, phenology and Lyme borreliosis risk induced by global warming.

## Acknowledgements

We would like to thank Jacqueline Moret for her help to statistically analyse our data and Olivier Rais for his technical help. This study was financially supported by the Swiss National Science Foundation (32-57098.99). This paper is part of the PhD thesis of F. Jouda and J.-L. Perret.

## References

- Aeschlimann, A., Chamot, E., Gigon, F., Jeanneret, J. P., Kessler, D. and Walther, C. 1986. *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. Zbl Bakt Hyg A. 263: 450-458.
- Baniewicz, J. 2002. Observations météorologiques faites en 2001 à l'observatoire cantonal de Neuchâtel. Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences naturelles., 125: 155-162
- Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J. C., Assous, M. and Grimont, P. A. D. 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov.; and group VS461 associated with Lyme borreliosis. Int J Syst Bacteriol. 42: 378-383.
- Barral, M., Garcia-Perez, A.L., Juste, R.A., Hurtado, A., Escudero, R., Sellek, R.E. and Anda, P. 2002. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* (Acari:Ixodidae) ticks from the Basque Country, Spain. J. Med. Ent. 39: 177-184.
- Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S., Péter, O. and Aeschlimann, A. 1983. Erythema migrans – A tick-borne spirochetosis. Acta tropica, 40: 79-83.
- Canica, M. M., Nato, F., Du Merle, L., Mazie, J. C., Baranton, G. and Postic, D. 1993. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. Scand J Infect Dis. 25: 441-448.
- Chmela, J. 1969. On the developmental cycle of the common tick (*Ixodes ricinus* L.) in the North-Moravian natural focus of tick-borne encephalitis. Folia Paras. 16: 313-319.
- Cotty, A., Aeschlimann, A. and Schneeberger, S. 1986. Distribution et fluctuation d' *Ixodes ricinus* (L.), *Haemaphysalis punctata* (Can & Franz.) et *Dermacentor marginatus* (Sulzer) (Acarina, Ixodoidea) en Suisse. Mitt. Schweiz. Entomol. Ges. 59: 139-150.
- Daniel, M. 1993. Influence of the microclimate on the vertical distribution of the tick *Ixodes ricinus* (L.) in Central Europe. Acarologia, XXXIV: 105-113.
- Daniel, M., Danielova, V., Kriz, B., Jirsa, A. and Nozicka, J. 2003. Shift of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne encephalitis to higher altitudes in Central Europe. Eur. J. Clin. Infect. Dis. 22: 327-328.
- De Michelis, S., Sewell, H.S., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Schouls, L.E., Benes, V., Holmes, E.C. and Kurtenbach, K. 2000. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal J Clin Microbiol. 38: 2118-2133.
- Eisen, L., Eisen, R.J. and Lane, R.S. 2002. Seasonal activity patterns of *Ixodes pacificus* nymphs in relation to climatic conditions. Med. vet. Entom. 16: 235-244.

- Eisen R. J., Eisen L., Castro M. C., Labe R. S. 2003. Environmentally related variability in risk of exposure to Lyme disease spirochetes in northern California: Effect of climatic conditions and habitat type. *Environmental Entomology* 32, in press.
- Escudero, R., Barral, M., Perez, A. Vitutia, M.M., Garcia-Perez, A.L., Jimenez, S., Sellek, R.E. and Anda, P. 2000. Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. *J. Clin. Microb.* 38: 4026-4033.
- Epstein, R.T. 2001. Climate change and emerging infectious diseases. *Microbes and Infection*, 3: 747-754.
- Gern, L., Hu C. M., Kocianova, E., Vyrosteckova, V. and Rehacek, J. 1999. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *Eur. J. Epidemiol.* 15: 665-669.
- Gern, L. and Humair, P.F. 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In: *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control* (ed. Gray, J., Kahl, O., Lane, R.S. & Stanek, G.), p. 149- 174. CABI International, Wallingford, Oxon, U.K.
- Gray, J.S. 1984. Studies on the dynamics of active populations of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. in Co. Wicklow, Ireland. *Acarologia*, XXV, 167-178.
- Huegli, D., Hu, C.M., Humair, P.F., Wilske, B. and Gern L. 2002. *Apodemus* species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4735-4737.
- Ikaha, R. and Gentleman, R. 1996. A language for data analysis and graphics. *J. comput. Graph. Stat.*, 5: 299-314.
- Hubalek, Z. and Halouzka, J. 1997. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Europ. J. Epid.* 13: 951-957.
- Hubalek, Z. and Halouzka, J. 1998. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit. Res.* 84: 167-172.
- Humair, P.F., Postic, D., Wallich, R. and Gern, L. 1998. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. *Zentbl. Bakt.* 287: 521-538.
- Johnson, R.C., Schmid, G.P., Hyde, F.W., Steigerwalt, A.G. and Brenner, D.J. 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov: etiologic agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 496-497.
- Jouda, F., Crippa, M., Perret J.L. and Gern L. In press. Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of Canton Ticino (Switzerland). *Eur. J. Epid.*
- Korenberg, E.I. 2000. Seasonal population dynamics of *Ixodes* ticks and tick-borne encephalitis virus. *Exp. Appl. Acar.* 24: 665-681.

- Kurtenbach, K., Carey, D., Hoodless, A.N., Nuttall, P.A. and Randolph, S.E. 1998. Competence of pheasants as reservoirs for Lyme disease spirochetes. *J. Med. Entomol.* 35: 77-81.
- Lebet, N. and Gern, L. 1994. Histological examination of *Borrelia burgdorferi* infections in unfed *Ixodes ricinus* nymphs. *Exp. Appl. Acarol.* 18: 177-183.
- Le Fleche, A., Postic, D., Girardet, K., Péter, O. and Baranton, G. 1997. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 921-925.
- Lindgren, E., Tälleklint, L. and Polfeldt, T. 2000. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ. Health Perspect.* 108: 119-123.
- Mejlon, HA, Jaenson, TGT. Seasonal prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* in different vegetation types in Sweden. *Scand J Infect Dis* 1993; 25: 449-456.
- Mejlon, H.A. and Jaenson, T.G.T. 1997. Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari:Ixodidae). *Exp. Appl. Acar.* 21: 747-754.
- Mizak B. and Krol, J. 2000. Analysis of Polish isolates of *Borrelia burgdorferi* by amplification of (5S)-rrl (23S) intergenic spacer. *Bull veterinary Inst Pulawy.* 44:147-154.
- Nuncio, M. S., Péter, O., Alves, M. J., Bacellar, F. and Filipe, A. R. 1993. Isolemento e caracterizaáao de Borrélias de *Ixodes ricinus* L. em Portugal. *Rev Portug Doencas Infec.* 16: 175-179.
- Perret , J.L., Guigoz, E., Rais, O. and Gern L. 2000. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasit. Res.* 86: 554-557.
- Perret, J.L., Guerin, P.M., Diehl, P.A., Vlimant, M. and Gern L. 2003. Darkness induces mobility and saturation deficit limits questing duration in the tick *Ixodes ricinus*. *The J. Exp. Biol.* 206:1809-1815
- Péter, O., Bretz, A. G. and Bee D. 1995. Occurrence of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ixodid ticks of Valais, Switzerland. *Eur. J. Epidemiol.* 11: 463-467.
- Postic, D., Assous, M. V., Grimont, P. A. D. and Baranton G. 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 743-752.
- Postic, D., Korenberg, E., Gorelova, N., Kovalevski, Y. V., Bellenger, E. and Baranton, G. 1997. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates. *Res. Microb.* 148: 691-702.
- Randolph, S.E. 2001. The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Phil. Trans. Roy. Soc. B* 356: 1045-1056.

- Randolph, S.E., Green, R.M., Hoodless, A.N. and Peacey, M.F. 2002. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.* 32: 979-989.
- Richter, D., Schlee, D.B., and Matuschka, F.R. 2003 Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent. *Emerg Infect Dis.* 9: 697-701
- Rizzoli, A., Merler, S., Furlanello, C. and Genchi, C. 2002. Geographical information systems and bootstrap aggregation (bagging) of tree-based classifiers for Lyme disease risk prediction in Trentino, Italian Alps. *J. Med. Entomol.* 39: 485-492.
- Siegel, S and Castellan, N.J. 1988. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences* (ed. Mc Graw-Hill international). Statistics series New-York: second edition.
- Sinsky, R. J. and Piesman, J. 1989. Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. *J. Clin. Microb.* 27: 1723-1727.
- Steele, G.M. and Randolph, S.E. 1985. An experimental evaluation of conventional control measures against the sheep tick, *Ixodes ricinus* (L.) (Acari: Ixodidae). I. A unimodal seasonal pattern. *Bull. ent. Res.* 75: 489-499.
- Tälleklint, L. and Jaenson, T.G.T 1996. Relationship between *Ixodes ricinus* density and prevalence of infection with *Borrelia* – like spirochetes and density of infected ticks. *J. Med. Entomol.* 33: 805-811
- Tälleklint, L. and Jaenson, T.G.T 1998. Increasing geographical distribution and density of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in central and northern Sweden. *J. Med. Entomol.* 35: 521-526.
- Wang, G., Van Dam, A. P., Le Fleche, A., Postic, D., Péter, O., Baranton, G., De Boer, R., Spanjaard, L. and Dankert, J. 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int. J. Syst. Bact.* 47: 926-932.
- Wegner, Z., Stanczak, J., Racewicz, M., Kubica-Biernat, B. and Kruminis-lozowska, W. 1997. The etiological agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*, in ticks (Acari: Ixodidae) from Eastern Poland. *Zentbl.Bakt.* 286: 93-106
- Wuetrich S. 2000. Observations météorologiques faites en 1999 à l'observatoire Cantonal de Neuchâtel. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences naturelles*, 123 : 167-174
- Wuetrich S. and Jornod G. 2001. Observations météorologiques faites en 2000 à l'observatoire Cantonal de Neuchâtel. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences naturelles*, 124: 221-228
- Younsi, H., Postic, D., Baranton, G. and Bouattour, A. 2001 High prevalence of *Borrelia lusitaniae* in *Ixodes ricinus* ticks in Tunisia. *Eur. J. Epidemiol.* 17: 53-56

Zhioua, E., Bouattour, A., Hu, C. M., Gharbi, M., Aeschlimann, A., Ginsberg, H. S. and Gern, L. 1999. Infection of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in North Africa. J. Med. Entomol. 36: 216-218.

Table 1: Annual average temperatures recorded in Neuchâtel and at the top of the Chaumont mountain, and calculated values for our sampling sites assuming a linear temperature gradient

Location	Altitude (meters above sea level)	Annual mean temperature (°C)			
		1999	2000	2001	1999-2001
Chaumont *	1073	6.30	6.80	6.10	6.40
Neuchâtel *	487	10.20	11.10	10.60	10.63
Chaumont High **	900	<b>7.45</b>	<b>8.07</b>	<b>7.43</b>	<b>7.65</b>
Chaumont Middle **	740	<b>8.52</b>	<b>9.24</b>	<b>8.66</b>	<b>8.81</b>
Chaumont Low **	620	<b>9.31</b>	<b>10.12</b>	<b>9.58</b>	<b>9.67</b>

**Table 2.** Proportion of *B. burgdorferi* infected *I. ricinus* ticks at 3 different altitudes on the slope of the Chaumont Mountain from 1999 to 2001

Altitudes	Proportion of infected nymphs (%)				Proportion of infected adults (%)			
	1999	2000	2001	Total	1999	2000	2001	Total
H (900m)	9/109 (8)	24/130 (18)	19/115 (17)	52/354 (15)	2/10 (20)	12/43 (28)	13/55 (24)	27/108 (25)
M (740m)	17/112 (15)	28/130 (22)	41/145 (28)	86/387 (22)	2/10 (20)	17/60 (28)	64/149 (43)	83/219 (38)
L (620m)	17/124 (14)	27/108 (25)	46/139 (33)	90/371 (21)	3/9 (33)	21/110 (19)	20/61 (33)	44/180 (24)
Total	43/345 (12)	79/368 (21)	106/399 (27)	228/1112 (21)	7/29 (24)	50/213 (23)	97/265 (37)	154/507 (30)

H : Chaumont high

M: Chaumont middle

L : Chaumont low

**Table 3.** Peak tick density of infected *I. ricinus* nymphs and adults at 3 different altitudes on the slope of the Chaumont Mountain from 1999 to 2001

	PTDi Nymphs*	PTDi Adults**	PTDi Nymphs*	PTDi Adults**	PTDi Nymphs*	PTDi Adults**
Altitudes	1999		2000		2001	
H (900m)	7.4	1.4	16.38	4.48	16.49	2.75
M (740m)	17.4	3.2	13.2	5.04	35.28	16.72
L (620m)	41.3	7.92	36	7.22	68.64	4.8

PTDi : Peak tick density of infected ticks.

\* expressed as the number of infected nymphs per 100 m<sup>2</sup>

\*\* expressed as the number of infected adults per 100 m<sup>2</sup>

**Table 4.** Proportion of *Borrelia* genospecies identified in *I. ricinus* ticks collected in Chaumont

	<i>B. garinii</i>	<i>B. afzelii</i>	<i>B. burgdorferi</i> ss	<i>B. valaisiana</i>	<i>B. lusitaniae</i>	Mixed infections
Nymphs	28/46 (61%)	9/46 (20%)	7/46 (15%)	0/46	0/46	2/46 (4%)
Adults	50/94 (53%)	16/94 (17%)	11/94 (12%)	13/94 (14%)	1/94 (1%)	3/94 (3%)
Total	78/140 (56%)	25/140 (18%)	18/140 (13%)	13/140 (9%)	1/140 (1%)	5/140 (4%)

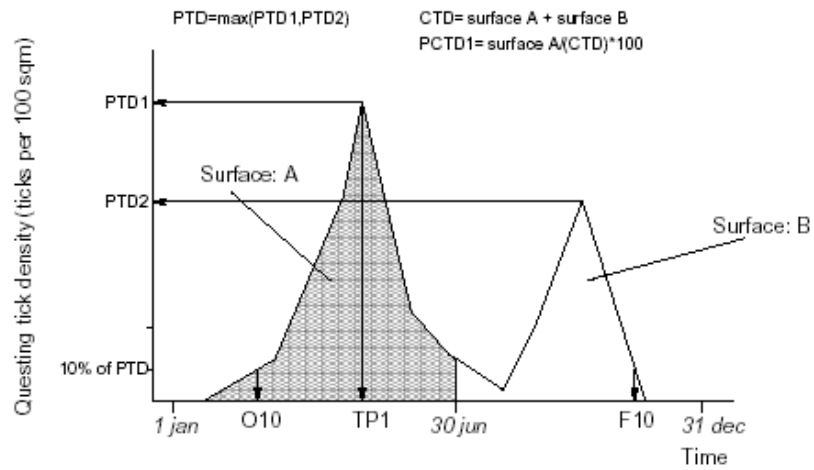


Figure 1: Descriptive statistics for questing tick density timeplots (PTD: Peak tick density; PTD1: peak tick density in spring; PTD2: peak tick density in autumn; TP1: time of the spring peak; CTD: cumulated tick density; PCTD1: proportion of activity in the first half-year; O10: first date when questing tick density increases over 10% of the PTD; F10: timepoint when questing tick density decreases below 10% of the PTD)

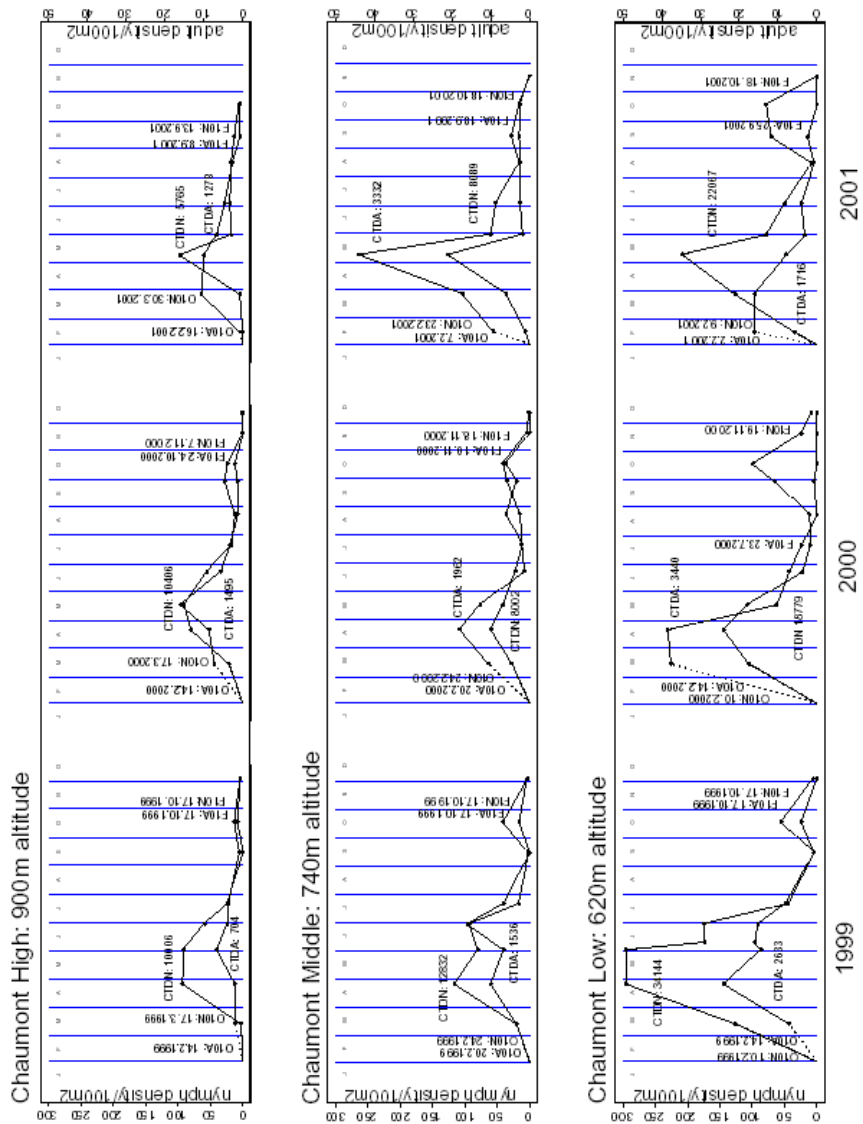


Figure 2: Questing *I. ricinus* density (**thin line**: nymphs, **bold line**: adults) at three altitudes on the Chaumont Mountain from 1999 to 2001. **CTD**: cumulated tick density (ticks/100 square meters/year, **CTDN**: nymphs, **CTDA**: adults), **O10**: date when the questing tick density reached 10% of the yearly peak tick density (**O10N**: nymphs, **O10A**: adults), **F10**: date when the questing tick density reached 10% of the yearly peak tick density for the last time.

#### IV.3 Publication III

First isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks in Morocco.

Vector borne and Zoonotic Diseases 2003. 3:133-139.

## Research Paper

# First Isolation of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato from *Ixodes ricinus* Ticks in Morocco

M'HAMMED SARIH,<sup>1</sup> FATIMA JOUDA,<sup>2</sup> LISE GERN,<sup>2</sup> and DANIELE POSTIC<sup>3</sup>

### ABSTRACT

To determine the infection rate of *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sl) and to assess the frequency of the individual *Borrelia* species in this tick species, a total of 295 *I. ricinus* were collected in Taza region (Northeast of Morocco), from January to June 2002. The presence of *B. burgdorferi* sl was determined by direct fluorescence antibody assay (DFA) and by PCR after culture. *B. burgdorferi* sl isolates were identified at the species level by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified products. The mean rate of *I. ricinus* infection with *B. burgdorferi* sl was 47.8%. Isolation attempts in BSK II medium resulted in 26 pure isolates. However, PCR performed on culture medium allowed to identify 82 *Borrelia* DNAs. *B. lusitaniae* has been identified from 76 out of 82 infected *I. ricinus* ticks (92.7%). Three ticks were infected by *B. burgdorferi* ss, and three other ticks were infected by *B. garinii*. This is the first report of the presence of *B. burgdorferi* sl in Morocco and more specifically of *B. burgdorferi* ss in North Africa. Key Words: *Borrelia burgdorferi* sensu lato—*Ixodes ricinus*—Morocco. Vector-Borne Zoonotic Dis. 3, 133–139.

### INTRODUCTION

LYME BORRELIOSIS (LB) is a zoonosis due to a spirochete belonging to the species complex, *B. burgdorferi* sl transmitted by *I. ricinus* ticks in Europe (Burgdorfer et al. 1982, Barbour et al. 1983). The causative agent *Borrelia burgdorferi*, initially considered as a single species (Johnson et al. 1984), now comprises at least 11 species irregularly distributed in different parts of the world (Baranton et al. 1992, Canica et al. 1993, Kawabata et al. 1993, Marconi et al. 1995, Fukunaga et al. 1996, Le Flèche et al. 1997, Wang et al. 1997, Postic et al. 1998, Masuzawa et al. 2001). Among the species whose pathogenicity for man is unquestion-

able, *B. burgdorferi* ss is found in North America and in Europe, *B. garinii* and *B. afzelii* occur in Europe but are absent from North America. Recently *B. garinii* has been reported in North Africa (Younsi et al. 2001). The clinical symptoms of LB in humans vary from an expanding skin rash (erythema migrans) at the site of the tick bite to severe arthritic, neurological, dermatological or cardiac manifestations. The clinical outcome seems to depend on the infecting *B. burgdorferi* sl species. Lyme arthritis has been attributed to infection by *B. burgdorferi* ss, neuroborreliosis has been attributed to *B. garinii* and acrodermatitis chronica atrophicans has been attributed to *B. afzelii* (Assous et al. 1993, Van Dam et al. 1993, Demaerschalck et al. 1995,

<sup>1</sup>Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco.

<sup>2</sup>Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel, Switzerland.

<sup>3</sup>Unité de Bactériologie Moléculaire et Médicale, Institut Pasteur, Paris, France.

Péter et al. 1997). The presence of the European vector *I. ricinus* has been recently reported in Tunisia (Zhioua et al. 1999, Younsi et al. 2001). These latter studies have revealed a high *B. burgdorferi* sl prevalence in *I. ricinus* ticks and the isolation of *B. lusitaniae* (Zhioua et al. 1999, Younsi et al. 2001) and *B. garinii* (Younsi et al. 2001). *I. ricinus* has also been observed in Morocco (Bailly-Choumara et al. 1974, Bailly-Choumara et al. 1976, Bailly-Choumara et al. 1979–80), but the last report dates back to 1979 and describes ticks collected only from humans and wild animals. No documented study has ever been conducted in Morocco. Based on clinical and serological features, two cases of facial palsy were reported in Morocco (Ouhabi et al. 1994). The incidence of *B. burgdorferi* sl in tick populations is an essential part of the epidemiological survey of LB. Our aims were to determine the frequency and distribution of *I. ricinus* ticks in Morocco, and their infection rate by different species of *B. burgdorferi* sl. We report the identification of 82 *Borrelia* DNAs and the first isolation of 26 pure isolates of *B. burgdorferi* sl from 218 *I. ricinus* ticks collected in the Taza region (north-east of Morocco) in 2002.

## MATERIALS AND METHODS

### Study sites and tick collection

Collection of ticks was conducted over five humid and sub-humid regions of Morocco (Chefchaouen, Ifrane, Taza, Mehdia, and El Harcha), where climatic and vegetation conditions appeared to be suitable for *I. ricinus* ticks. Free-living ticks were collected by the flagging method and engorged ticks were collected from sheep between January and June 2002.

### Preparation of tick samples

Ticks were identified at the species level and sorted by development stage. They were processed individually, dipped in 70% ethanol for 1 min, rinsed in distilled water and then cut into two pieces, one for use in direct fluorescence antibody assay and one for inoculation into 1 mL of BSK-H medium as described by Gern et al. (1999).

### Direct Fluorescent Antibody (DFA) assay

The presence of spirochetes was examined by direct fluorescent antibody assay as described in Gern et al. (1999). Briefly, antigens were deposited on slides, desiccated by keeping slides in a dry environment for at least 18 h at 37°C and subsequently fixed with acetone for 15 min. Preparations were stained directly with a fluorescein isothiocyanate conjugate prepared from a pool of Lyme borreliosis patient sera which detect all *Borrelia* species and examined with epi-fluorescence microscopy.

### Spirochete cultivation

Live field-collected *I. ricinus* were used for spirochete isolation attempts in BSK-H medium (Sigma) (Pollack et al. 1993) supplemented with 7% gelatin, 0.015% DL-dithiothreitol, 0.023% L-cysteine, 1 µg/mL L-glutamine, and 1% antibiotic mixture for *Borrelia* (Sigma) as described previously (Sinsky and Piesman 1989). Cultures were incubated at 34°C for 1 month. They were screened weekly using dark-field microscopy. Positive cultures were transferred into fresh tubes of BSK-H medium, and bacteria were incubated at 34°C for additional growth.

The presence of *Borrelia* was checked by PCR from all cultures after 1 month, whatever the results of dark-field microscopic examination. Cultures were centrifuged at 10,000g for 15 min at 25°C. The resulting pellets were washed with PBS and resuspended in distilled water. These preparations were heated at 100°C for 15 min and stored at –20°C until use for PCR experiments.

### DNA amplification and identification

DNA amplification was performed as described previously (Postic et al. 1994). Briefly, oligonucleotides at the 3' end of the first 5S rRNA gene (*rrfA*) and at the 5' end of the second 23S rRNA gene (*rrlB*) were used as primers. The reaction mixture (50 µL) contained 5 µL of bacterial thermolysate. PCR was carried out for 35 cycles, under the usual conditions (denaturation at 94°C, annealing at 50°C and elongation at 72°C for 1 min each). Positive and negative controls were included

TABLE 1. *I. ricinus* TICKS COLLECTED ON VEGETATION AND LIVESTOCK USED FOR ESTIMATION OF THE INFECTION PREVALENCE

	Vegetation		Sheep		Ticks screened for the infection by <i>B. burgdorferi</i> sl
	Male	Female	Male	Female	
March 2002	7	4	10	47	68
April 2002	40	65	7	30	142
May 2002	4	4	0	0	8
	124		94		218

in each run. Amplified DNA was electrophoretically separated in 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

PCR products were digested separately by *Mse*I (Biolabs, Beverly, MA) and *Dra*I (Amersham) restriction enzymes under conditions prescribed by the manufacturer, and subjected to electrophoresis in 16% acrylamide 0.8% N,N'-methylene-bis-acrylamide gel for 2 h at 120 V. DNA restriction fragments obtained from reference strains were used as molecular size markers.

## RESULTS

### Tick species collected

*I. ricinus* ticks were found only in the Taza region. No *Ixodes* was found in any of the four other visited sites, except only one nymph in the Ifrane region. Taza is situated in the north-east of Morocco, in the humid bio-climatic zone (rainfall of more than 800 mm/year). Vegetation is characterized by oak forests. The fauna is composed of domestic ruminants (cattle, sheep, and goats) and wild animals such as lizards, small rodents, birds, and wild boars.

Two hundred and ninety-five adult *I. ricinus*

ticks and one nymph were collected from January to June 2002, and 218 adult ticks were used for estimation of the infection rate by *B. burgdorferi* sl. The collection of *I. ricinus* adult ticks was maximal in March and April (95%). However, the maximum of other tick species was obtained in March and June (61%).

### Prevalence of infected *Ixodes ricinus*

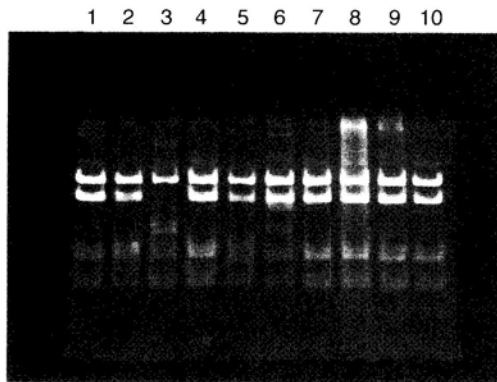
Two hundred and eighteen adult *I. ricinus* were used to determine the infection rate of ticks with *B. burgdorferi* sl. Among them, 124 (73 females, 51 males) were collected on vegetation and 94 (77 females, 17 males) were collected on sheep (Table 1). These ticks were used for determination of infection rate by two methods: DFA and PCR on culture (Table 2). The two methods were concordant in 81%. The mean rate of *I. ricinus* infection with *B. burgdorferi* sl ranged from 35% in PCR to 41.6% in DFA (Table 2). Infected ticks have been detected more often by DFA than by the PCR method (chi-square,  $p < 0.001$ ). By using the two methods, 47.8% of ticks were found infected by *B. burgdorferi* sl. By using PCR alone on 38 ticks, 50% of ticks were found infected.

A high discrepancy was observed between unfed ticks collected on vegetation or engorged

TABLE 2. PREVALENCE OF TICK INFECTION BY *B. BURGdorFERI* SL, APPRECIATED BY TWO METHODS

	DFA on ticks and PCR on culture, n = 180				PCR alone, n = 38	
	DFA+, PCR+	DFA+, PCR-	DFA-, PCR+	DFA-, PCR-	PCR+	PCR-
Ticks collected on the vegetation	49/97	21/97	9/97	18/97	17	10
Ticks picked on sheep	3/83	2/83	2/83	76/83	2	9
Total	52 (29%)	23 (13%)	11 (6%)	94 (52%)	19	19

DFA, direct fluorescent antibody assay; PCR, polymerase chain reaction targeting on the *rrf-rrl* spacer.



**FIG. 1.** *MseI* restriction patterns of PCR products from *Borrelia sensu lato* strains isolated from *I. ricinus* ticks in Morocco. DNA was electrophoresed on a 16% acrylamide gel, stained with ethidium bromide, and UV illuminated. Lanes 1, 2, 5, 7, 9, 10: Moroccan strains of: *B. lusitaniae* type Poti B2; lane 3: Moroccan *B. burgdorferi* ss; lane 4: *B. lusitaniae* strain Poti B2<sup>1</sup>; lane 6: mixture of *B. lusitaniae* and *B. burgdorferi* ss.

ticks collected on sheep. Ninety-six out of 124 field-collected ticks (77.4%) were found infected, whereas only nine out of 94 engorged ticks (9.5%) were found to be infected (Table 2).

#### *Genotyping of isolates by PCR-RFLP analysis*

Analysis of restriction patterns of PCR products (Fig. 1) led to the identification of 82 *B. burgdorferi* sl DNAs. *B. lusitaniae* genotype Poti B2 has been identified from 68 *I. ricinus* ticks (82.2%); a mixture of *B. lusitaniae* genotypes Poti B2 and Poti B3 has been identified from six ticks. Two DNAs exhibited an atypical pattern (Fig. 1), which was confirmed as belonging to *B. lusitaniae* by sequencing and phylogenetic analysis. *B. garinii* and *B. burgdorferi sensu stricto* (*B. burgdorferi* ss) have been identified each from three ticks.

Twenty-six isolates (25 *B. lusitaniae* and one *B. burgdorferi* ss) were obtained in pure culture and stored for further studies.

## DISCUSSION

Our aim was to determine the frequency and distribution of *I. ricinus* in Morocco. Since this tick was present in the Mediterranean region

of Tunisia as well as in the oceanic climatic region of Portugal, and since it had been collected from humans and wildlife animals in 1979 in Morocco (Bailly-Choumara et al. 1979–80), we expected to find *I. ricinus* in this country. However, our first investigations in the different regions of Chefchaouen, Ifrane, Mehdia, and El Harcha in 2001 were all negative (excepted the unique nymph at Ifrane). The investigations were extended in 2002, and *I. ricinus* was found in the sole region of Taza. Various biotic and abiotic factors determine the density of tick populations in a particular habitat, such as vegetation cover, climate, and abundance of hosts. Although the investigated regions seemed to be suitable habitats for *I. ricinus* ticks and ticks had been previously collected in some of the investigated areas by Bailly-Choumara (Bailly-Choumara et al. 1974, Bailly-Choumara et al. 1976, Bailly-Choumara et al. 1979–80), our attempts to collect ticks in most areas remained unsuccessful. A slightly warmer and drier climate may explain the absence of *I. ricinus* in the regions explored in the north of Morocco. Climate change or human impact on tick habitat may have influenced the geographical distribution of *I. ricinus* ticks (Tälleklint and Jaenson 1998, Lindgren et al. 2000, Randolph 2001), or saturation deficit (integrates temperature and relative humidity to derive measure of the drying power of the atmosphere) may have punctually influenced the density of questing *I. ricinus* ticks in the investigated regions (Randolph and Storey 1999, Perret et al. 2000, Perret et al. 2003).

To investigate the prevalence and identification of *B. burgdorferi* sl in *I. ricinus*, we used two different methods: DFA and PCR after culture. Large variations in infection rates of *I. ricinus* by *B. burgdorferi* sl were reported in the literature (Hubalek and Halouzka 1998). These variations may correspond to actual regional differences in prevalence. However, they may be explained by methodologies used in different studies. As previously reported in another study using the same methodology (Gern et al. 1999), a significant difference was observed in our study between results obtained with the two approaches: DFA gave a higher infection rate in adult ticks than PCR after culture. Moreover, DFA also tended to detect more infected

ticks than the PCR did when DNA was directly extracted from ticks (Kahl et al. 1998).

A marked disparity was apparent in infection rates of ticks derived from sheep and those collected on the vegetation, whatever the method used. Sheep herds pastured in the flagging site, suggesting that the differences in infection rates were not explained by geographic variations. Moreover, flagging of vegetation and examination of sheep were performed at the same time. Lacombe *et al.* (1993) reported similar discrepancies between infection rates of adult *I. scapularis* ticks removed from deer and those collected from vegetation in Maine. Other workers have reported that spirochetes multiply more rapidly within *I. scapularis* when they are stimulated by the tick blood meal (Piesman et al. 1990, de Silva and Fikrig 1995, Hodzic et al. 2002). Our results suggest that no such phenomena occurs in *I. ricinus* feeding on sheep or that other factors influence spirochete detection in ticks fed on sheep. These data could be a result of a complement-mediated phenomenon occurring in the feeding tick as described in (Kurtenbach et al. 2002). *Borrelia* sensitive to the complement of sheep would be killed in the tick midgut before transmission. Thus, in our hands, ticks collected on livestock were not the suitable material to evaluate the prevalence of pathogens in *I. ricinus* ticks. However, the infestation level of livestock by ticks in a particular area is a good indicator of the presence of *I. ricinus*.

Nearly 49% of adult ticks collected in Morocco were found infected by *B. burgdorferi* sl. In Tunisia, 34% of 81 adult ticks were found positive by PCR (Younsi et al. 2001). It appears that infection prevalences in *I. ricinus* from North Africa are rather high compared to infection rates in Europe (Hubalek and Halouzka 1998). Very high infection prevalences have also been reported in Portugal (De Michelis et al. 2000) in areas where, similarly, *B. lusitaniae* was the dominant species.

We report for the first time the identification of *B. burgdorferi* sl in Morocco and the presence of *B. burgdorferi* ss in North Africa. The predominant species was, by far, *B. lusitaniae*. These data corroborated previous studies reporting a high rate of recovery of *B. lusitaniae* in Tunisia (Younsi et al. 2001). This species has been also isolated in Moldavia and Czech Re-

public (Le Flèche et al. 1997), in Slovakia (Gern et al. 1999), in Spain (Escudero et al. 2000, Baral et al. 2002), in Poland (Mizak and Krol 2000), and in Switzerland (Jouda et al. 2003), where only rare isolates were reported. In contrast, *B. lusitaniae* is the highly predominant *B. burgdorferi* sl species encountered in North Africa (Younsi et al. 2001) and Portugal (De Michelis et al. 2000), and thus appears to be present mainly in the southern part of the northern hemisphere. It is therefore possible that the diversity of *B. burgdorferi* sl decreases toward the south. However, two pathogenic species, *B. burgdorferi* ss and *B. garinii*, were also identified from *I. ricinus* collected in the northern Morocco. A preliminary sero-prevalence study did not reveal any immune status in the Moroccan population of the Taza region (personal unpublished data). Ouhabi et al. (1994) have reported two cases of Lyme borreliosis associated with facial palsy in Morocco. *B. garinii* could be involved in such cases.

Nevertheless, further studies are needed to determine the epidemiological and clinical importance of the disease in this region.

#### ACKNOWLEDGMENTS

M'Hammed Sarih and Fatima Jouda equally contributed to this work. This work is part of the Ph.D. dissertation of Fatima Jouda, who was financially supported by the Roche Research Foundation (Switzerland). This work was supported by the European Commission (grant ICA3-CT-2000-30009) and the Swiss Federal Office of Education and Science (99.0695). We thank Pr. Hassar, Director of the Pasteur Institute of Morocco, for his constant support.

#### REFERENCES

- Assous, MV, Postic, D, Paul, G, et al. Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12:261-268.
- Bailly-Choumara, H, Morel, PC, Perez, C. Deuxième contribution au catalogue des tiques du Maroc (Acari, Ixodoidea). *Bull Inst Sci Rabat* 1979-80; 4:1-12.
- Bailly-Choumara, H, Morel, PC, Rageau, J. Première contribution au catalogue des tiques du Maroc (Acari, Ixodoidea). *Bull Soc Sci ph nat Maroc* 1974; 54:71-81.

- Bailly-Choumara, H, Morel, PC, Rageau, J. Sommaire des données actuelles sur les tiques au Maroc (Acari: Ixodidae). *Bull Inst Sci, Rabat* 1976; 1:101-115.
- Baranton, G, Postic, D, Saint Girons, I, et al. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42:378-383.
- Barbour, AG, Burgdorfer, W, Hayes, SF, et al. Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. *Curr Microbiol* 1983; 8:123-126.
- Barral, M, Garcia-Perez, AL, Juste, RA, et al. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* (Acari:Ixodidae) ticks from the Basque Country, Spain. *J Med Entomol* 2002; 39:177-184.
- Burgdorfer, W, Barbour, AG, Hayes, SF, et al. Lyme disease: A tick-borne spirochetosis? *Science* 1982; 216:1317-1319.
- Canica, MM, Nato, F, du Merle, L, et al. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis* 1993; 25:441-448.
- De Michelis, S, Sewell, HS, Collares-Pereira, M, et al. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. *J Clin Microbiol* 2000; 38:2128-2133.
- de Silva, AM, Fikrig, E. Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53:397-404.
- Demaerschalck, I, Benmessouad, A, Dekesel, M, et al. Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33:602-608.
- Escudero, R, Barral, M, Pérez, A, et al. Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4026-4033.
- Fukunaga, M, Hamase, A, Okada, K, et al. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from Ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol Immunol* 1996; 40:877-881.
- Gern, L, Hu, CM, Kocianova, E, et al. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *Eur J Epidemiol* 1999; 15:665-669.
- Hodzic, E, Feng, SL, Freet, KJ, et al. *Borrelia burgdorferi* population kinetics and selected gene expression at the host-vector interface. *Infect Immun* 2002; 70:3382-3388.
- Hubalek, Z, Halouzka, J. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitol Res* 1998; 84:167-172.
- Johnson, RC, Schmid, GP, Hyde, FW, et al. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiological agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol* 1984; 34:496-497.
- Jouda, F, Crippa, M, Gern, L. Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of Canton Ticino (Switzerland). *Eur J Epidemiol* 2003;18 (in press).
- Kahl, O, Gern, L, Gray, JS, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks—immunofluorescence assay versus polymerase chain reaction. *Zent bl Bakteriell* 1998; 287:205-210.
- Kawabata, H, Masuzawa, T, Yanagihara, Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol* 1993; 37:843-848.
- Kurtenbach, K, De Michelis, S, Etti, S, et al. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato—the key role of host complement. *Trends Microbiol* 2002; 10:74-79.
- Lacombe, E, Rand, PW, Smith, RP. Disparity of *Borrelia burgdorferi* infection rates of adult *Ixodes dammini* on deer and vegetation. *J Infect Dis* 1993; 167:1236-1238.
- Le Flèche, A, Postic, D, Girardet, K, et al. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47:921-925.
- Lindgren, E, Tälleklint, L, Polfeldt, T. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ Health Persp* 2000; 108:119-123.
- Marconi, RT, Liveris, D, Schwartz, I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2427-2434.
- Masuzawa, T, Takada, N, Kudeken, M, et al. *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51:1817-1824.
- Mizak, B, Krol, J. Analysis of polish isolates of *Borrelia burgdorferi* by amplification of *rrf*(5S)-*rrl*(23S) intergenic spacer. *Bull Vet Inst Pulawy* 2000; 44:147-154.
- Ouhabi, H, Slassi, I, El Aloui-Frais, M, et al. Paralysie faciale et maladie de Lyme. *Arch Inst Past Maroc* 1994; 9:51-55.
- Perret, JL, Guerin, PM, Diehl, P.A. et al. Darkness induces mobility and saturation deficit limits questing duration in the tick *Ixodes ricinus*. *J Exp Biol* 2003; 206:1809-1815.
- Perret, JL, Guigoz, E, Rais, O, et al. 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.
- Péter, O, Bretz, AG, Postic, D, et al. Association of distinct species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with neuroborreliosis in Switzerland. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3:423-431.
- Piesman, J, Oliver, JR, Sinsky, RJ. Growth kinetics of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) in vector ticks (*Ixodes dammini*). *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42:352-357.
- Pollack, RJ, Telford III, SR, Spielman, A. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1251-1255.
- Postic, D, Assous, MV, Grimont, PAD, et al. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (5S) *rrl* (23S) intergenic spacer amplicons. *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44:743-752.
- Postic, D, Marti Ras, N, Lane, RS, et al. Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description

- of *Borrelia bissetii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). J Clin Microbiol 1998; 36:3497–3504.
- Randolph, SE. The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. Phil Trans Roy Soc 2001; B356:521–526.
- Randolph, SE, Storey, K. Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari:Ixodidae): implications for parasite transmission. J Med Entomol 1999; 36:741–748.
- Sinsky, RJ, Piesman, J. Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. J Clin Microbiol 1989; 27:1723–1727.
- Tälleklint, L, Jaenson, TGT. Increasing geographical distribution and density of *Ixodes ricinus* (Acari:Ixodidae) in central and northern Sweden. J Med Entomol 1998; 35:521–526.
- Van Dam, AP, Kuiper, H, Vos, K, et al. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. Clin Infect Dis 1993; 17:708–717.
- Wang, G, van Dam, AP, Le Flèche, A, et al. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). Int J Syst Bacteriol 1997; 47:926–932.
- Younsi, H, Postic, D, Baranton, G, et al. High prevalence of *Borrelia lusitaniae* in *Ixodes ricinus* ticks in Tunisia. Eur J Epidemiol 2001; 17:53–56.
- Zhioua, E, Bouattour, A, Hu, CM, et al. Infection of *Ixodes ricinus* (Acari:Ixodidae) by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in North Africa. J Med Entomol 1999; 36:216–218.

Address reprint requests to:

Dr. Danièle Postic

Unité de Bactériologie Moléculaire et Médicale

Institut Pasteur

28 rue du Dr. Roux

75724 Paris Cedex 15, France

E-mail: dpostic@pasteur.fr

#### IV.4 Publication IV

Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale.

Submitted to Vector borne and Zoonotic Diseases 2003.

Submitted to Vector borne and Zoonotic Diseases 2003.

**Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale.**

JOUDA Fatima, PERRET Jean-Luc AND GERN Lise

Institut de Zoologie, University of Neuchâtel, Switzerland

Running title: *Borrelia burgdorferi* infected ticks in Switzerland

Corresponding author :Institut de Zoologie Emile Argand 11, 2007 Neuchâtel 7, Switzerland  
Phone no +41 32 718 3000. Fax no +41 32 718 30001.E-mail : [lise.gern@unine.ch](mailto:lise.gern@unine.ch)

## ABSTRACT

Lyme borreliosis, the most important vector-borne disease in the Northern hemisphere, causes health problems for populations in endemic areas. In the present study, the density of questing *Ixodes ricinus* ticks and their infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl) was examined in 11 areas located on the Swiss Plateau and in an alpine valley. From 1999 to 2001 free-living *I. ricinus* ticks were collected on a monthly basis by flagging vegetation in these areas. Each tick was examined for the presence of *B. burgdorferi* sl using direct fluorescent antibody assay, and for isolation of the bacteria. *Borreliae* were characterized by PCR followed by RFLP.

Density of questing ticks varied greatly between studied areas. *Borreliae* were observed in ticks collected in all investigated sites. However, the prevalence of infection differed significantly among areas. Infection prevalence varied from 9% to 40% in nymphs and from 22% to 47% in adults. Adult ticks were significantly more infected (129/366, 35%) than nymphs (109/552, 20%). There was no correlation between nymphal density and infection prevalence as well as between adult density and infection prevalence, but there was a correlation between density of ticks and density of infected ticks. During the spring peak of questing tick density, a range of 2-30.3 infected ticks per 100 m<sup>2</sup> was observed.

*B. burgdorferi* sl isolates (n=129) were obtained from ticks collected in 10/11 areas. Five *Borrelia* species were identified: *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* and six mixed infections were also obtained. *Borrelia* species were heterogeneously distributed in the different areas.

## INTRODUCTION

Lyme borreliosis, a multisystemic disease caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl) (Burgdorfer et al. 1982), is an arthropod-borne disease distributed on the Northern hemisphere. *B. burgdorferi* sl spirochetes are mainly transmitted by some tick species of the *Ixodes ricinus* complex, and these ticks infest mammals, birds and reptiles (Gern and Humair 2002).

Different species have been assigned to the *B. burgdorferi* sl group: *B. burgdorferi* sensu stricto (ss) (Johnson et al. 1984), *B. garinii* (Baranton et al. 1992) and *B. afzelii* (Canica et al. 1993). These three species are consistently associated with clinical manifestations in humans. In addition, other *Borrelia* species included in the *B. burgdorferi* sl. group: *B. valaisiana* (Wang et al. 1997), *B. lusitaniae* (Le Fleche et al. 1997), *B. bissettii* (Postic et al. 1998), *B. andersonii* (Marconi et al. 1995), *B. turdi* (Fukunaga et al. 1996), *B. tanukii* (Fukunaga et al. 1996), *B. japonica* (Marconi et al. 1995) and *B. sinica* (Masuzawa et al. 2001) have been isolated from ticks or from their vertebrate hosts.

In Switzerland, various studies have described the infection prevalence in *I. ricinus* ticks in locations situated North and South of the Alps (Aeschlimann et al. 1986, Miserez et al. 1990, Péter et al. 1995, Wicki et al. 2000, Bernasconi et al. 1997, Jouda et al. 2003, Jouda et al. in press), however the density of ticks was investigated in only two of these studies (Jouda et al. 2003, in press). Since the risk for humans of acquiring an infection by a tick-borne pathogen may be related to the local density of infected vectors, we determined the extent of variation in questing tick density and their infection by *B. burgdorferi* sl in various geographic areas located on the Swiss Plateau and in an alpine valley over 3 years.

## MATERIALS AND METHODS

### **Studied Areas and Tick Collection.**

The study was carried out in the Western part of the Swiss Plateau (Switzerland), as well as in an alpine valley. We selected 11 areas (coordinates using the Swiss grid system CH-1903 as defined by the Swiss Topographic Office): Aigle (altitude: 420m, 563994/128790), Bavois (altitude: 440m, 531907/171132), Bière (altitude: 800m, 513845/1555263), Eclépens (altitude 485m, 531336/168437), St-Livres (altitude 680m, 517778/152534), Bois-de-Portes (altitude: 480m, 499894,130664), Bois-du-Château (altitude:475 m, 493108/118283), Brochus-Creuson (altitude: 440m, 498900/128450), Vaumarcus (altitude: 480m, 546669/190400), Viège (altitude: 780m, 634552/125852) and Interlaken (altitude: 620m, 63243/171149) (Fig. 1).

Host-seeking adult and nymphal ticks were collected on a monthly basis from March 1999 through November 2001, representing 28 sampling sessions. Questing ticks were collected by flagging vegetation using a 1m<sup>2</sup> flag over a distance of 150 m. The flag was examined for ticks every 25m. Questing tick density was expressed as the number of ticks per 100m<sup>2</sup>. An annual value for tick density called cumulated tick density (CTD) was obtained by integrating the linearly interpolated curve of the measured questing tick densities over one year (Eisen et al. 2003, Perret 2003, Jouda et al. in press). Nymphs and adults were treated separately. Peak tick density (PTD) was defined as the maximal tick density (Jouda et al. in press, Perret 2003).

Collected ticks were maintained in plastic vials containing a few blades of grass and transported to the laboratory where they were identified to species and developmental stages and analysed for the presence of *Borrelia* infection.

### ***Borrelia burgdorferi* Infection in Host-Seeking ticks.**

Each tick was cut into two pieces. One half was examined by Immunofluorescence (IF) using a fluorescein isothiocyanate-conjugated polyclonal antibody which was prepared from a pool of Lyme borreliosis patient sera and which detects all European *B. burgdorferi* sl species (Gern et al. 1999). Spirochete number was estimated and infection degree was

classified into three categories (Jouda et al. 2003, in press). Degree of infection in each tick was expressed as low: 1 – 50 spirochetes, medium: 50 – 500 and high: more than 500 spirochetes.

The other half of the tick used for *Borrelia* isolation was placed in culture tube containing BSK II medium (Sinsky and Piesman 1989), incubated at 34° C and examined by dark field microscopy every 10 days for 2 months.

To evaluate the spatial variation in density of *I. ricinus* ticks infected with *B. burgdorferi* sl, we calculated the peak tick density of infected nymphs (PTD<sub>Ni</sub>) and adults (PTD<sub>Ai</sub>) by multiplying PTD by the percentage of infected ticks.

#### **Identification of *Borrelia* species by PCR/RFLP.**

Isolates were typed with a restriction fragment length polymorphism on the PCR product according to Postic et al. (1994). Briefly, 1 ml of culture medium were centrifuged and washed two times, then the pellet was suspended in 50 µl of ultrafiltered water. After incubation at 100°C for 10 min the thermolysates were stored at –20°C until use for PCR reaction. Primers used to amplify the variable spacer region between two repeated genes encoding for ribosomal 23S and 5S were: primer 1 (5'-CTGCGAGTTCGCGGGAGA-3') and primer 2 (5'-TCCTAGGCATTCACCATA-3'). Each amplification reaction was carried out for 35 cycles. Denaturation was performed for 1 min at 94°C, annealing at 55°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. PCR products were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. PCR products were first digested with *Mse*I restriction endonuclease for at least 2h at 37°C, and then separated by electrophoresis in a 16% acrylamide gel for 1h30 at 120V. Digested DNA was stained with ethidium bromide.

#### ***Statistical analysis***

Chi square tests, Fisher's exact test, correlation between tick density and infection prevalence and correlation between tick density and density of infected ticks were calculated

by using Splus version 6 for Windows (Insightful Corporation Seattle, Washington). The correlations between CTD and year were calculated with R for Linux V 0.90.0.

## RESULTS

### **Abundance of Host-Seeking Ticks.**

Ticks belonging to *I. ricinus* only were collected by flagging vegetation at the different sampling areas. Altogether 6768 *I. ricinus* ticks were collected: 1260 adults and 5508 nymphs. There was considerable variation in tick density among areas (Table 1, a and b). Tick density in Bois-du-Château was not recorded because this site was visited only three times during the study. The highest mean questing nymph and adult densities (CTD) for the three years were observed in St Livres and Eclépens, respectively. In Vaumarcus, the forest at the study site was cut down during winter 1999-2000 to build a highway. This explains why the following year tick density, particularly density of nymphs, was drastically reduced. This site was the site with the highest PTD for nymphs in 1999 with 166 nymphs/100m<sup>2</sup> and one with the lowest PTD in 2000 with 6 nymphs/100m<sup>2</sup>. Comparison of CTDs in nymphs among the 3 years showed that CTDs were the highest in 1999 in all sites and the lowest in 2000 in most sites (Table 1, a and b). In adults, highest CTDs were not related to specific year. Locations with high CTD in 1999 were also those with high CTD in 2000 and similarly between 2000 and 2001 (Fig. 2).

### ***Borrelia burgdorferi* sI in Host-Seeking Ticks.**

The results on *Borrelia* infection in ticks are for years 2000 and 2001 except for Interlaken and Viège, where data from 1999 to 2001 are included. *Borrelia* infection analysis of ticks was performed on a randomly chosen number of ticks collected in each study site. Altogether, 918 ticks (552 nymphs and 366 adult ticks) were analysed. *B. burgdorferi* sI infected ticks were recorded from all 11 sampled areas (Table 2). Overall, *B. burgdorferi* was infecting 109 (20%) of the 552 *I. ricinus* analysed nymphs and 129 (35%) of the 366 adult ticks (Table 2). For all studied areas grouped, the infection rate in adults was higher than in nymphs (Table 2) (Fischer's test,  $P < 0.001$ ). The infection prevalences varied in nymphs from 9% in Viège to 40% in Bavois, and from 22% in Viège to 47% in St Livres in adult ticks

(Table 2). Among studied areas, infection prevalences differed significantly (data from Bois-du-Château were not considered because this site was visited only 3 times during the study) (Chi-square test,  $p=0.0338$ ). Infection prevalences in nymphs and adults in the same site may be very similar like in Eclépens (34% vs 35%) or very different like in St Livres (14% vs 47%) although tick densities in both areas are high.

During the spring peak of questing tick density, mean peak density (calculated for the 3 years) of infected ticks greatly varied among areas (Table 3). The lowest density reached 1.4 infected nymphs per 100 m<sup>2</sup> and 0.5 infected adults per 100 m<sup>2</sup> in Bière whereas the highest densities were observed in Eclépens with 30.3 infected nymphs per 100 m<sup>2</sup> and in St Livres with 7.4 infected adults per 100 m<sup>2</sup> (Table 3).

There was no correlation between nymphal density and infection prevalence (Spearman's rank correlation,  $r^2 = 0.13982$ ,  $p=0.6882$ ) as well as between adult density and infection prevalence (Spearman's rank correlation,  $r^2 = 0.1823$ ,  $p = 0.5719$ ). However there was a correlation between nymphal density and density of infected nymphs (Spearman's rank correlation,  $r^2 = 0.9166$ ,  $p = 0.0102$ ) and adult density and density of infected adults (Spearman's rank correlation,  $r^2 = 0.9666$ ,  $p = 0.0067$ ).

Spirochetes were isolated from 39 nymphs and 90 adults (35 males and 55 females) collected in 10 areas (no isolate was obtained from ticks collected in Bois-du-Château). Five *Borrelia* species were identified among isolates based on results of PCR/RFLP. *B. garinii* was the most frequently isolated species ( $n = 59$ ) followed by *B. afzelii* ( $n = 28$ ), *B. burgdorferi* ss ( $n = 22$ ), *B. valaisiana* ( $n = 12$ ) and *B. lusitaniae* ( $n = 2$ ) (Table 2). In addition, 5 mixed infections with two *Borrelia* species: *B. afzelii* and *B. garinii* ( $n = 2$ , from a nymph and an adult), *B. garinii* and *B. valaisiana* ( $n = 2$ , from female ticks) and *B. burgdorferi* ss and *B. afzelii* ( $n = 1$ , from a male tick) were obtained, as well as a mixed infection with 3 *Borrelia* species (*B. valaisiana*, *B. garinii* and *B. lusitaniae*) from a male tick. *B. lusitaniae* was observed in three ticks all collected in the same site (St Livres).

Spirochetes were counted in ticks and we observed that 75% (82/109) and 77% (99/129) of infected nymphs and infected adults, respectively, were infected by less than 50 spirochetes. We observed that *B. afzelii*, *B. garinii* and *B. valaisiana* spirochetes were often present in high numbers in ticks, whereas *B. burgdorferi* ss spirochetes usually infect ticks with a low load of spirochetes (Fig. 3). Interestingly, ticks presenting mixed infections by 2 or 3 *Borrelia* species ( $n = 6$ ) were often (4/6) infected by less than 50 spirochetes.

## DISCUSSION

Studies that address the epidemiology of human exposure to Lyme borreliosis must address the ecology and temporal distribution of nymphs and females of *I. ricinus*, the developmental stages which most often bite humans. Measurement of seasonal and annual changes in *I. ricinus* density with respect to the annual prevalence of *B. burgdorferi* sI in *I. ricinus* ticks is epidemiologically important. Therefore, we investigated *I. ricinus* density and the prevalence of *B. burgdorferi* sI in various areas in Switzerland over 3 years. Our data show that *I. ricinus* is the most common exophilic tick in this country and confirm that *B. burgdorferi* sI is widespread (Aeschlimann et al. 1986, Miserez et al. 1990, Péter et al. 1995, Wicki et al. 2000, Bernasconi et al. 1997, Jouda et al. 2003, in press). In fact, all tick populations examined for *Borrelia* infection were infected. Infection prevalences varied from 9% to 40% in nymphs and from 22% to 47% in adults. Viège is the site showing the lowest infection prevalences (9% for nymphs and 22% for adults). This site is the only one located in the Alps. In most areas, the infection prevalences are among the highest recorded across Europe (Gray et al. 1998, Hubalek and Halouzka, 1998a). Infection prevalences in adults and in nymphs were not significantly related to tick densities. This is not surprising since it has been shown that within endemic areas in Europe, over the usual nymph density (range of 4-100 nymphs 100m<sup>2</sup>) – which is the case in our study sites- there is no significant correlation between prevalences and nymph densities (Randolph 2001).

Mean infection prevalences recorded for *I. ricinus* among the various sites showed a 4.4-fold difference in nymphs and 2.1-fold difference in adults. The higher prevalence of *B. burgdorferi* infection in adults compared to nymphs has to be related to the higher number of bloodmeals ingested by adults. However, differences in infection prevalences between nymphs and adults in tick populations with similar densities were observed in Eclépens and St Livres. This indicates that larval and nymphal hosts contribute differentially to *Borrelia* infection in ticks. Different species composition of mammal hosts in these areas such as the relative proportions of reservoir-competent and incompetent hosts, in the two areas or climatic conditions forcing larvae and nymphal ticks to feed on similar hosts (Randolph and Storey 1999) may lead to this situation. In Viège, very low infection rate in nymphs has been

observed. This site as mentioned before is located in the Alps and in this area biotopes for reservoir hosts like *Apodemus* sp and *Clethrionomys* sp on which larval ticks abundantly feed, are less frequent (Hausser 1995). It has been suggested that low prevalence of spirochetal infection in *I. ricinus* nymphs result from larval ticks feeding abundantly on reservoir-incompetent hosts such as deer (Jaenson and Tälleklint 1992, Matuschka et al. 1993, Gray et al. 1992, 1995, Tälleklint and Jaenson 1996). This might explain the lower *Borrelia* prevalence observed in Viège.

Studies on spatial variation in density of *I. ricinus* ticks infected with *B. burgdorferi* s.l are rather rare. In southern part of Sweden, densities reaching 7.68 infected *I. ricinus* nymphs per 100 m<sup>2</sup> (Mejlon and Jaenson 1993, Tälleklint and Jaenson 1996) have been reported. In North America, densities of infected nymphs reached 0.77 infected *I. scapularis* nymphs per 100 m<sup>2</sup> in Connecticut (Stafford et al. 1998), 11.6 infected *I. scapularis* nymphs per 100 m<sup>2</sup> in New York (Daniels et al. 1998) and 22.17 infected *I. pacificus* nymphs per 100 m<sup>2</sup> in California (Tälleklint-Eisen and Lane 1999). In our study, these densities were higher reaching 30.3 infected nymphs (range 1.4-30.3 infected nymphs per 100 m<sup>2</sup>) and 7.4 infected adults per 100 m<sup>2</sup> (range 0.5-7.4 infected adults per 100 m<sup>2</sup>). However, we have to remind that our data represent the maximum risk reached in the areas, when questing tick densities are the highest. Our data also showed that the risk to encounter an infected tick greatly varies among areas and even between very close sites.

Our results document the presence of *B. lusitaniae* in an additional location in Switzerland (Jouda et al. 2003, Jouda et al. in press). *B. lusitaniae* has been first isolated from *I. ricinus* ticks in Portugal (Nuncio et al. 1993) and has then been reported in the Czech Republic, Moldavia, Ukraine (Postic et al. 1997), Slovakia (Gern et al. 1999), Tunisia (Zhioua et al. 1999), Poland (Mizak et al. 2000), Spain (Escudero et al. 2000, Barral et al. 2002), France (Richter et al. 2003), and Switzerland (South of the Alps (Jouda et al. 2003) and North of the Alps (Jouda et al. in press and present data). *B. lusitaniae* is very frequent in *I. ricinus* ticks in Portugal (De Michelis et al. 2000), in Tunisia (Younsi et al. 2001) and in Morocco (Sarih et al. 2003) and is only sporadically reported in other areas. Interestingly, in

the present study, *B. lusitaniae* was isolated from 3 ticks all collected at St Livres. Reservoir hosts for all *Borrelia* species infecting *I. ricinus* have been identified except for *B. lusitaniae* (Gern and Humair 2002). The presence of *B. lusitaniae* associated with 2 *Borrelia* species (*B. garinii* and *B. valaisiana*) usually associated with birds (Gern and Humair 2002) is striking.

One of the main criticism of culturing *Borrelia* from ticks or vertebrate hosts is that culturing may select *Borrelia* in culture medium. The fact that mixed infections represented 5% of all obtained isolates and that 67% of them were obtained from ticks with a low load of spirochetes show that isolation of mixed infection is nevertheless possible. Higher mixed infection rates are usually detected in studies where *Borrelia* DNA is detected in ticks. However, PCR has been found to amplify DNA fragments of non viable organisms (Varde et al. 1999) whereas by culturing we show that mixtures of various *Borrelia* species can survive in tick environment as well as in BSK medium.

The intensity of spirochetal infection in ticks may allow to forecast the annual incidence of Lyme borreliosis in an area as recently described by Hubalek et al. (2003). These authors reported a good correlation between annual incidence of Lyme borreliosis and ticks infected by > 50 borreliae. Our survey confirms that most *I. ricinus* ticks are infected with low load of spirochetes (Hubalek et al. 1998b, Gern et al. 1999, Hubalek et al. 2003). Interestingly, we observed that *B. burgdorferi* ss spirochetes usually infect *I. ricinus* with a low load of spirochetes, whether this is linked with the fact that *I. ricinus* is not a good vector for *B. burgdorferi* ss compared to *B. afzelii* as shown recently (Crippa et al. 2002) remains open.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Emmanuelle Medjitna and Olivier Rais for their technical help and J. Moret for her help in statistical analysis. The work was financially supported by the

Swiss National Science Foundation (grant no 32-57098.99) and the Roche Foundation and is part of the PhD thesis of Jouada F. and Perret J.-L.

## REFERENCES

- Aeschlimann, A, Chamot, E, Gigon, F, Jeanneret, JP, Kessler, D, Walther, C. *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. Zbl Bakt Hyg A 1986; 263: 450-458.
- Baranton, G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont, PAD. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov.; and group VS461 associated with Lyme borreliosis. Int J Syst Bacteriol 1992; 42: 378-383.
- Barral, M, Garcia-Perez, AL, Juste, RA, Hurtado, A, Escudero, R, Sellek, RE, Anda, P. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks from the Basque Country, Spain. J Med Ent 2002; 39: 177-184.
- Bernasconi, MV, Valsangiacomo, C, Balmelli, T, Péter, O, Piffaretti, JC. Tick zoonoses in the southern part of Switzerland (Canton Ticino): occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Rickettsia* sp. Eur J Epidemiol 1997; 13: 209-215.
- Burgdorfer, W, Barbour, AG, Hayes, SF, Benach, JL, Grunwaldt, E, Davis, JP. Lyme disease. A tick-borne spirochetosis? Science 1982; 216: 1317-1319.
- Canica, MM, Nato, F, Du Merle, L, Mazie, JC, Baranton, G, Postic, D. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. Scand J Infect Dis 1993; 25: 441-448.
- Crippa, M, Rais, O, Gern, L. Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* ss and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. Vect Borne Zoon Dis 2002; 2: 3-9.
- Daniels, TJ, Broccia, TM, Varde, S, Marcus, J, Le, J, Bucher, DJ, Falco, RC, Schwartz, I. Geographic risk for Lyme disease and human granulocytic ehrlichiosis in southern New York State. Appl. Environm. Microbiol. 1998; 64: 4663-4669.

- De Michelis, S, Sewell, HS, Collares-Pereira, M, Santos-Reis, M, Schouls, LE, Benes, V, Holmes, EC, Kurtenbach, K. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal J Clin Microbiol 2000; 38: 2118-2133.
- Eisen, RJ, Eisen, L, Castro, MC, Labe, RS. Environmentally related variability in risk of exposure to Lyme disease spirochetes in northern California: Effect of climatic conditions and habitat type. Environm Entomol 2003; 32, in press.
- Escudero, R, Barral, M, Perez, A, Vitutia, MM, Garcia-Perez, AL, Jimenez, S, Sellek, RE, Anda, P. Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. J Clin Microb 2000; 38: 4026-4033.
- Fukunaga, M, Hamase, A, Okada, K, Nakao, M. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from Ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. Microbiol Immunol 1996; 40: 877-881.
- Gern, L, Hu CM, Kocianova, E, Vyrosteckova, V, Rehacek, J. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. Eur J Epidemiol 1999; 15: 665-669.
- Gern, L, Humair, PF. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In: *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control* (ed. Gray, J., Kahl, O., Lane, R.S. & Stanek, G.), 2002; p. 149- 174. CABI International, Wallingford, Oxon, U.K.
- Gray, JS, Kahl, O, Janetzki, C, Stein, J. Studies on the ecology of Lyme disease in a deer forest in County Galway, Ireland. J Med Entomol 1992; 29: 915-920.
- Gray, JS, Kahl, O, Janetzki, C, Stein, J, Guy, E. The spatial distribution of *Borrelia burgdorferi*-infected *Ixodes ricinus* in the Connemara region of County Galway, Ireland. Exp Appl Acarol 1995; 19: 163-172.
- Gray, JS, Kahl, O, Robertson, JN, Daniel, M, Estrada-Pena, A, Gettinby, G, Jaenson, TGT, Jensen, P, Jongejan, F, Korenberg, E, Kurtenbach, K, Zeman, P. Lyme borreliosis habitat assessment. Zbl Bakt 1998; 287: 211-228.
- Hausser, J. Mammifères de la Suisse (ed. Commission des mémoires de l'Académie Suisse des Sciences Naturelles) 1995 Basel, Switzerland: Birkhäuser, Verlag.

- Hubalek, Z, Halouzka, J. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. Parasit Res 1998a; 84: 167-172.
- Hubalek, Z, Halouzka, J, Juricova, Z. Investigation of haematophagous arthropods for borreliae--summarized data, 1988-1996. Folia Parasit 1998b; 45: 67-72.
- Hubalek, Z, Halouzka, J, Juricova, Z. Longitudinal surveillance of the tick *Ixodes ricinus* for borreliae. Med Vet Entomol 2003; 17: 46-51.
- Jaenson, TGT, Tälleklint, L. Incompetence of roe deer as reservoirs of the Lyme borreliosis spirochete. J Med Entomol 1992; 29: 813-817.
- Johnson, RC, Schmid, GP, Hyde, FW, Steigerwalt, AG, Brenner, DJ. *Borrelia burgdorferi* sp. nov: etiologic agent of Lyme disease. Int J Syst Bacteriol 1984; 34: 496-497.
- Jouda, F, Crippa, M, Perret, JL, Gern, L. Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of Canton Ticino (Switzerland). Eur J Epid 2003; 18: 907-912.
- Jouda, F, Perret, JL, Gern, L. Influence of altitude on *Ixodes ricinus* density, and on distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection. J Med Entomol In press
- Le Fleche, A, Postic, D, Girardet, K, Péter, O, Baranton, G. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. Int J Syst Bacteriol 1997; 47: 921-925.
- Marconi, RT, Liveris, D, Schwartz, I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. J Clin Microbiol 1995; 33: 2427-2434.
- Masuzawa, T, Takada, N, Kudeken, M, Fukui, T, Yano, Y, Ishiguro, F, Kawamura, Y, Imai, Y, Ezaki, T. *Borrelia sinica* sp nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51: 1817-1824.
- Matuschka, FR, Heiler, M, Eiffert, H, Fischer, P, Lotter, H, Spielman, A. Diversionary role of hoofed game in the transmission of Lyme disease spirochetes. Am J Trop med Hyg

- 1993; 48: 693-699.
- Mejlon, HA, Jaenson, TGT. Seasonal prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* in different vegetation types in Sweden. Scand J Infect Dis 1993; 25: 449-456.
- Miserez, V, Gern, L, Aeschlimann, A. *Borrelia burgdorferi* in ticks of the Canton Tessin (Switzerland). Parassitologia 1990; 32: 293-299.
- Mizak, B, Krol, J. Analysis of polish isolates of *Borrelia burgdorferi* by amplification of (5S)-rrl (23S) intergenic spacer. Bull veterinary Inst Pulawy. 2000; 44: 147-154.
- Nuncio, MS, Péter, O, Alves, MJ, Bacellar, F, Filipe, AR. Isolemento e caracterizaáao de Borrélias de *Ixodes ricinus* L. em Portugal. Rev Portug Doencas Infec. 1993; 16: 175-179.
- Perret, JL. 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. PhD Thesis, University of Neuchâtel, Switzerland. 2003.
- Péter, O, Bretz, AG, Bee, D. Occurrence of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ixodid ticks of Valais, Switzerland. Eur. J. Epidemiol. 1995; 11: 463-467.
- Postic, D, Assous, MV, Grimont, PAD, Baranton, G. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. Int J Syst Bacteriol 1994; 44: 743-752.
- Postic, D, Korenberg, E, Gorelova, N, Kovalevski, YV, Bellenger, E, Baranton, G. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates. Res Microb 1997; 148: 691-702.
- Postic, D, Marti Ras, N, Lane, RS, Hendson, M, et al. Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov (formerly *Borrelia* group DN127). J Clin Microbiol 1998; 36: 3497-3504.
- Randolph, SE, Storey, K. Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. J Med Entomol 1999; 36: 741-748.

- Randolph, SE. The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Phil Trans Roy Soc* 2001; B 356: 1045-1056.
- Richter, D, Schlee, DB, and Matuschka, FR. Relapsing Fever–Like Spirochetes Infecting European Vector Tick of Lyme Disease Agent. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 697-701.
- Sarih, M, Jouda, F, Gern, L, and Postic, D. First isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks in Morocco. *Vector-Borne Zoon Dis* 2003; 3: 133-141.
- Sinsky R. J., Piesman J. Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1723-1727.
- Stafford, KC, Cartter, ML, Magnarelli, LA, Ertel, SH, Mshar, PA. Temporal correlations between tick abundance and prevalence of ticks infected with *Borrelia burgdorferi* and increasing incidence of Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1240-1244.
- Tälleklint, L, Jaenson, TGT. Relationship between *Ixodes ricinus* density and prevalence of infection with *Borrelia* – like spirochetes and density of infected ticks. *J Med Entomol* 1996; 33: 805-811.
- Tälleklint-Eisen, L, Lane, RS. Variation in the density of questing *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) nymphs infected with *Borrelia burgdorferi* at different spatial scales in California. *J Parasitol* 1999; 85: 824-831.
- Varde, S, Wormser, GP, Nowakowski, J, Nadelman, RB, Bittker, S, Cooper, D, Schwartz, I. Lyme disease: disparity between culture and polymerase chain reaction detection of *Borrelia burgdorferi* after exposure to Ceftriaxone *in vitro*. *Connecticut Med.* 1999; 63: 589-591.
- Wang, G, Van Dam, AP, Le Fleche, A, Postic, D, Péter, O, Baranton, G, De Boer, R, Spanjaard, L, Dankert, J. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 926-932.
- Wicki, R, Sauter, P, Mettler, C, Natsch, A,ENZLER, T, Pusterla, N, Kuhnert, P, Egli, G, Bernasconi, M, Lienhard, R, Lutz, H, Leutenegger, CM. 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 2000; 19: 427-432.

Younsi, H, Postic, D, Baranton, G, Bouattour, A. High prevalence of *Borrelia lusitaniae* in *Ixodes ricinus* ticks in Tunisia. Eur J Epidemiol 2001; 17: 53-5614.

Zhioua, E, Bouattour, A, Hu, CM, Gharbi, M, Aeschlimann, A, Ginsberg, HS, Gern, L. Infection of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in North Africa. J Med Entomol 1999; 36: 216-218.

**Figure 1.** Tick sampling areas in Western Switzerland (*Support cartographique OFS/OFT*).

**Figure 2.** Correlation of the cumulated tick density (CTD) between 1999 and 2000 (top row), 2000 and 2001 (bottom row) for nymphs (left column) and adults (right column). (CTDN: cumulated nymph density; CTDA: cumulated adult density).

**Table 1.** Cumulated Tick Density (CTD) and Peak Tick Density (PTD) of *I. ricinus* ticks (a: nymphs, b: adults) in 10 sites in Switzerland from 1999 to 2001.

a)

Nymphs	CTD*				PTD**			
	1999	2000	2001	Mean	1999	2000	2001	Mean
Aigle	2193	804	2025	1674	17	7	21	15
Bavois	6861	1485	773	3040	85	11	9	35
Bière	1378	537	813	909	13	4	8	8
Bois-de-Portes	1550	455	331	779	17	3	4	8
Brochus Creuson	2174	2150	2722	2349	20	16	20	17
Eclépens	12113	4645	7168	7975	160	44	63	89
Interlaken	9432	2479	3764	5225	101	21	37	53
St Livres	12152	10270	8667	10363	127	95	105	109
Vaumarcus	17880	531	nd	***	166	6	nd	***
Viège	4680	1190	2135	2668	43	18	17	26

b)

Adults	CTD*				PTD**			
	1999	2000	2001	Mean	1999	2000	2001	Mean
Aigle	564	204	293	354	6	2	2	3
Bavois	731	1172	522	808	7	11	5	8
Bière	54	214	358	209	1	2	2	<2
Bois-de-Portes	137	87	115	113	1	1	2	<2
Brochus Creuson	418	642	1141	734	3	5	10	6
Eclépens	2279	3041	2380	2567	18	23	17	19
Interlaken	791	1372	1539	1234	6	15	16	12
St Livres	1277	2082	1859	1739	13	23	24	20
Vaumarcus	1943	1224	nd	***	19	18	nd	***
Viège	928	567	162	552	8	7	3	3

\* Number of ticks per 100 m<sup>2</sup> and per year

\*\* Number of ticks per 100 m<sup>2</sup>

\*\*\* mean can not be calculated because of destruction of biotopes in 2000

**Table 2.** *Borrelia* infection rates of *I. ricinus* ticks collected by flagging vegetation at 11 sites

Areas	Infection rate <sup>a</sup>		Isolates						
	nymphs	adults	Ba	Bg	Bb	Bv	Bl	Mixed	Total
Aigle	16/47 (34%)	6/13 (46%)	0	4	2	3	0	0	9
Bavois	6/15 (40%)	9/20 (45%)	0	0	0	1	0	0	1
Bière	4/24 (17%)	3/11 (27%)	0	3	2	0	0	0	5
Bois-de-Portes	1/10	1/2	0	0	1	1	0	0	2
Bois-du-Château	2/11	0/4	0	0	0	0	0	0	0
Brochus Creuson	6/31 (19%)	6/25 (24%)	2	3	0	1	0	0	6
Eclépens	15/44 (34%)	24/69 (35%)	7	12	4	1	0	2	26
Interlaken	24/95 (25%)	41/112 (37%)	11	18	9	2	0	1	41
St Livres	15/108 (14%)	15/32 (47%)	3	12	2	2	2	1	22
Vaumarcus	11/69 (16%)	15/37 (41%)	3	6	0	1	0	2	12
Viège	9/98 (9%)	9/41 (22%)	2	1	2	0	0	0	5
Total	109/552 (20%)	129/366 (35%)	28	59	22	12	2	6	129

<sup>a</sup> Number of ticks infected/ number of ticks examined (%)

Ba: *B. afzelii*, Bg: *B. garinii*, Bb: *B. burgdorferi* ss, Bv: *B. valaisiana*, Bl: *B. lusitaniae*

**Table 3.** Peak tick density of *I. ricinus* nymphs and adults infected by *B. burgdorferi* sI in different sampling areas on the Swiss Plateau and Alpine area

Area	PTDNI*	PTDAI**
Aigle	5.1	1.5
Bavois	14.0	3.5
Bière	1.4	0.5
Brochus Creuson	3.5	1.4
Eclépens	30.3	6.8
Interlaken	13.3	4.6
St Livres	15.3	7.4
Viège	2.3	1.3

PTDNI: Peak tick density of *I. ricinus* infected nymphs

PTDAI: Peak tick density of *I. ricinus* infected adults

\*infected nymphs/100m<sup>2</sup>

\*\*infected adults/100m<sup>2</sup>

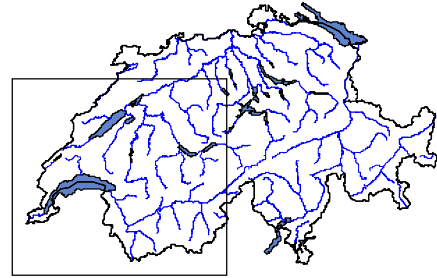
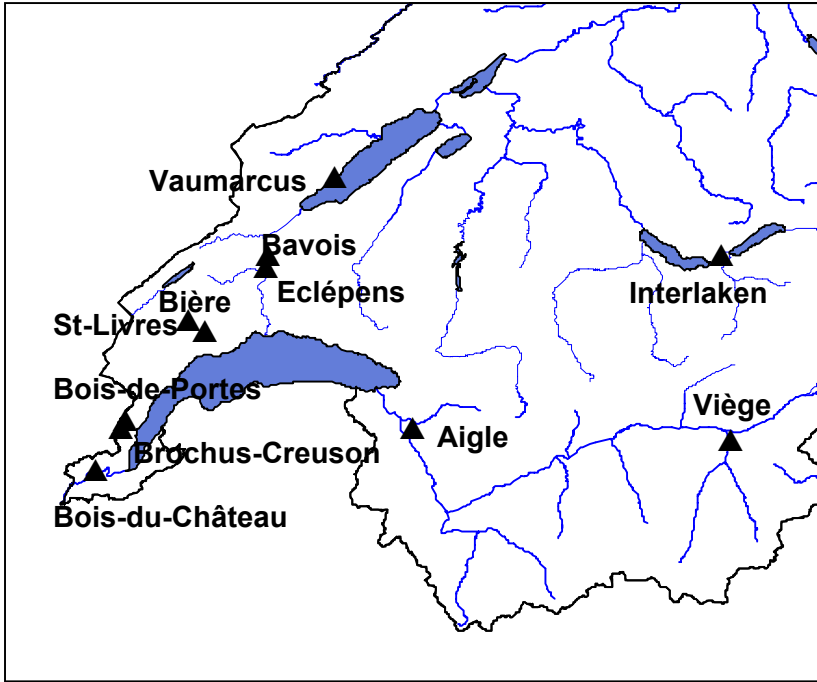


Figure 1

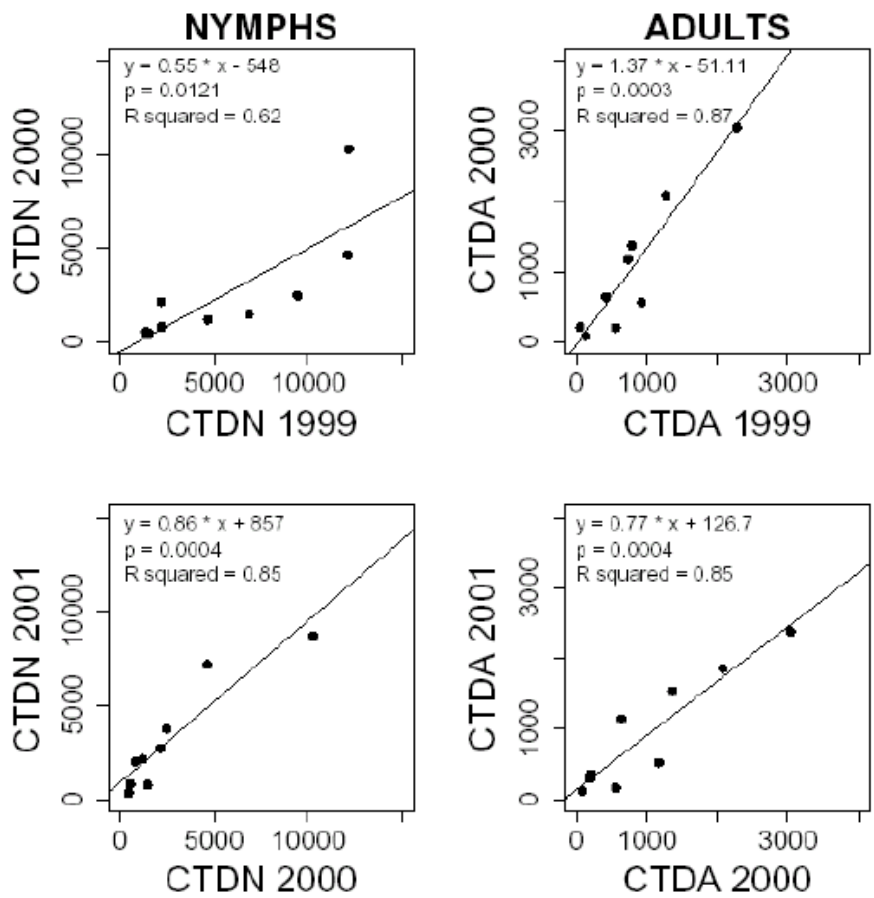
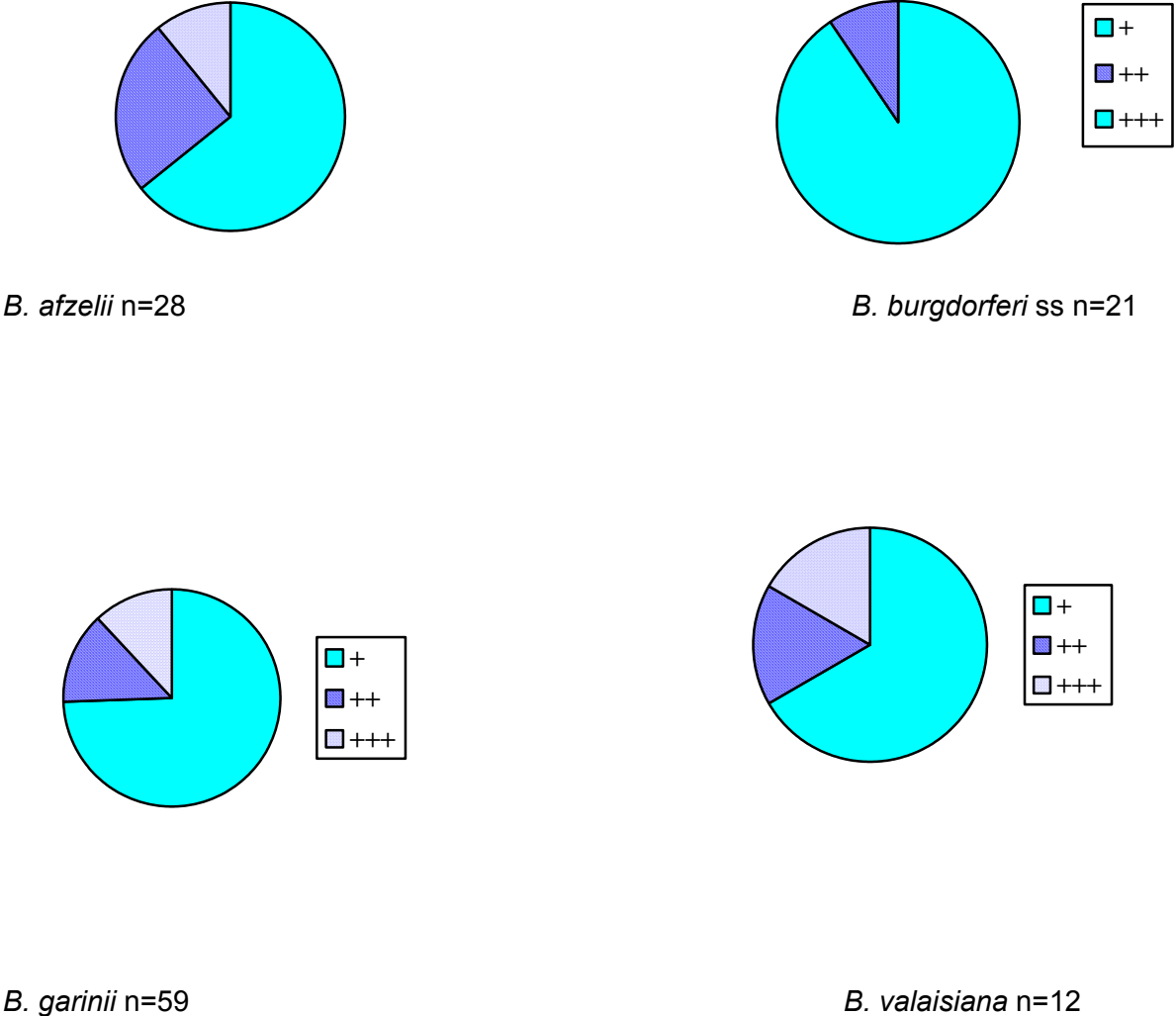


Figure2

**Figure 3:** Relation between *Borrelia* species and infection degree in *I. ricinus* ticks collected in the 11 sites.



## IV.5 Etudes sérologiques au Maroc

### a) Introduction

Dans le cadre de l'étude de la borréliose de Lyme au Maroc, nous avons testé deux types de sérums : des sérums humains et des sérums de chiens à la recherche d'anticorps anti-*Borrelia*.

### b) Matériel et méthodes

Tous les sérums ont été testés par le Western blot, on a utilisé un système de grand gel détectant les IgG contre *B. burgdorferi* ss (NE 608), *B. garinii* (NE 2626), *B. afzelii* (NE 632) et *B. lusitaniae* (NE 2627). Pour la positivité du Western blot, nous avons tenu compte des bandes spécifiques à *B. burgdorferi* si rapportées par d'autres études telles que la P100 dans notre étude la P90, la P39, la P41 et l'OspC (Assous et al. 1993, Dressler et al. 1993, Hauser et al. 1997).

## IV.5.1 Sérums Humains

### IV.5.1.1 Identification des bandes qui ont réagi avec le sérum de référence pour les quatre espèces.

Les protéines suivantes, communes aux quatre espèces de *Borrelia* utilisées comme antigènes (*B. burgdorferi* ss (NE 608), *B. garinii* (NE 2626), *B. afzelii* (NE 632) et *B. lusitaniae* (NE 2627)) ont été identifiées (Fig 5) : Un polypeptide de 90 kDa (P90), la protéine flagellaire P41, la protéine P72, P43 et P39. Ces bandes ont montré une forte intensité chez *B. afzelii* (NE 632), *B. garinii* (NE 2626) et *B. burgdorferi* ss (NE 608), les protéines P65, P60, P58, l'OspA et l'OspC ont aussi réagi avec le sérum de référence. En ce qui concerne *B. lusitaniae* à l'exception de la P41 toutes les autres bandes ont montré une réaction très faible.

Pour les souches *B. afzelii* (NE 632), *B. garinii* (NE 2626) et *B. burgdorferi* ss (NE 608), la protéine P58 apparaît au même site que la protéine P60. L'OspA se situe dans le même endroit que la protéine P30 et peut clairement en être différenciée. De même, il existe une claire distinction entre la protéine P41 et la protéine P39. Au-dessous de la protéine P39, on peut trouver la protéine P37.

### IV.5.1.2 Résultats des Western blots des différents groupes de sérums étudiés

Au total, 42 sérums ont été récoltés à Casablanca et environs : 30 représentent des sérums de sujets contrôles, 12 sérums proviennent de patients présentant des manifestations cliniques.

Pour les sujets contrôles, il existe une réponse fréquente contre l'antigène flagellaire P41 et contre les protéines P72, P60 et P43 de *B. afzelii* et *B. garinii*, *B. burgdorferi* ss (Fig 6). Pour *B. lusitaniae*, on a observé fréquemment des réponses dirigées uniquement contre la protéine P41.

Quand les 12 sérums de patients ont été testés par Western blots en utilisant chacune des souches : *B. burgdorferi* ss (NE 608), *B. garinii* (NE 2626), *B. afzelii* (NE 632) et *B. lusitaniae* (NE 2627), des différences de réactions ont été observées entre les quatre espèces de *B. burgdorferi* sl, au niveau de l'intensité et du nombre de protéines immuno-dominantes (Fig 7). En utilisant *B. garinii* (NE 2626) comme antigène, 42% (5/12) de sérums de patients ont montré une réponse contre plus de sept bandes par contre avec *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii* aucun sérum n' a réagi avec plus de cinq bandes. 67% (8/12) et 25 % (3/12) de sérums humains ont réagi contre plus de cinq protéines de *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii*, respectivement (Tableau 1). Les sérums de patients ont montré une réponse fréquente seulement à la P41 de *B. lusitaniae*. En plus des protéines qui ont été reconnues par les sérums des sujets contrôles, les sérums de patients ont montré une réponse contre les protéines immuno- dominantes caractéristiques de la borréliose de Lyme, à savoir la P90 et P39 de *B. garinii* dans 42% (5/12) et 25% (3/12) des cas respectivement, contre l'OspA de *B. garinii*, *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss dans 67% (8/12), 50% (6/12) et 92% (11/12) des cas, contre l'OspB de *B. garinii* et *B. afzelii* dans 67% (8/12) et 25% (3/12) des cas respectivement et contre l' OspC de *B. burgdorferi* ss dans 8% (1/12) (Tableau 2).

#### IV.5.2 Sérums de chiens

IV.5.2.1 Identification des bandes qui ont réagi avec le sérum de référence de chien pour les trois espèces de *Borrelia*.

Pour tester les sérums de chiens nous avons utilisé uniquement trois espèces de *Borrelia* comme antigènes: *B. garinii* (NE 2626), *B. afzelii* (NE 632) et *B. lusitaniae* (NE 26279) (Fig 8). Quatre protéines communes aux trois espèces ont été identifiées: la protéine P90, la protéine flagellaire P41 et la protéine P72, P39. Ces bandes ont montré une intensité de réaction forte chez *B. afzelii* et *B. garinii*. Pour *B. lusitaniae* la protéine P41 présente la même intensité de réaction que chez les deux autres espèces de *Borrelia* utilisées comme antigènes tandis que les protéines P90, P72 ont montré une intensité moins forte. Une

réaction contre l'OspA a été observée mais à une intensité très faible pour les trois espèces de *Borrelia*. Une réaction contre l'OspC n'a été observée que chez *B. garinii*.

#### IV.5.2.2 Résultats des Western blots des différents sérums de chiens

Dans cette étude les sérums de chiens ont été récoltés dans le cadre d'une étude sur la leishmaniose. Mais aucune information concernant la borréliose de Lyme n'est disponible. Notre choix s'est porté sur des sérums de chiens car les chiens, qui présentent une grande liberté de mouvement peuvent de ce fait être fréquemment exposés aux piqûres de tiques. Au total, 25 sérums ont été testés par Western blot (Fig 9). Comme pour les sérums humains les sérums de chiens ont plus réagi avec *B. garinii* que contre les antigènes de *B. afzelii* et *lusitaniae*: 25% (9/25) des sérums de chiens ont montré une réponse contre plus de six bandes avec *B. garinii*, contre uniquement 16% (4/25) chez *B. afzelii* (Tableau 3). En utilisant *B. garinii* comme antigène, nous observons une réponse contre les protéines P72, P60, P58, P43, P41, P30 et OspA. Une réaction contre P90 et l'OspC n'a été observée qu'à des intensités très faibles. Pour *B. afzelii*, nous avons observé une réponse contre tous les antigènes identifiés chez *B. garinii*, mais avec des intensités faibles. En plus, nous avons également observé une réponse contre l'OspB qui était absente chez *B. garinii*. En ce qui concerne *B. lusitaniae*, les sérums ont montré une réponse fréquente contre la protéine P41 et l'OspB. Les sérums de chiens ont montré une réponse contre les protéines immunodominantes caractéristiques de la borréliose de Lyme (Tableau 4): P90 de *B. garinii* et *B. afzelii* dans 8% des cas, contre la P39 de *B. garinii* dans 16% des cas, contre l'OspA de *B. garinii* et *B. afzelii* dans 48% des cas, contre l'OspC de *B. garinii* et *B. afzelii* dans 4% des cas.

Tableau 1. Protéines antigéniques des trois souches de *B. burgdorferi* si ayant réagi avec les différents sérums de patients

Patients	<i>B. garinii</i> (NE 2626)	<i>B. afzelii</i> (NE 632)	<i>B. burgdorferi</i> ss (NE 608)
Patient 1	P72, P60, P58, P43, P41, OspB, OspA, P30	P72, P60, P41	P72, P60, P43, P41, OspA
Patient 2	P90, P60, P43, P41, P39, OspB, OspA, P30	P72, P60, P41, OspA, P30	P60, P41, P43, OspA, OspC
Patient 3	P90, P72, P60, P41, OspB, OspA, P30	P72, P60, P41, OspA	P72, P60, P41, P43, OspA,
Patient 4	P60, P58, P41, OspB, OspA	P60, P41	P60, OspA
Patient 5	P60, P41	P60, P41	P72, P60, P41, P43, OspA
Patient 6	P72, P60, P41, OspB, OspA, P30	P72, P60, OspB	P72, P60, P41, P43, OspA, P30
Patient 7	P60, P41	P72, P60, P41, OspB, OspA, P30	P72, P60, P43, P41, OspA
Patient 8	P60, P41	P60, P41, OspA	P60, P43, P41, OspA
Patient 9	P90, P72, P60, P58, P43, P41, P39, OspB, OspA, P30	Aucune bande	P72, P60, P43, P41, OspA
Patient 11	P90, P72, P60, P58, P43, P41, OspB, OspA, P30	P72, P60, P58, P41, OspA	P72, P60, P41, P43, OspA
Patient 12	P90, P72, P60, P58, P43, P41, P39, OspB, OspA, P30	P72, P60, P41	P41, OspA
Patient 23	P60, P41	P41, OspA	P41

Tableau 2. Fréquence de réactions des différents sérums de patients avec les différentes protéines antigéniques de *B. garinii*, *B. afzelii* et *B. burgdorferi*

Bandes	<i>B. garinii</i> (NE 2626)	<i>B. afzelii</i> (NE 632)	<i>B. burgdorferi</i> ss (NE 608)
P90	5/12 (42%)	0	0
P72	6/12 (50%)	7/12 (58%)	7/12 (58%)
P60	12/12 (100%)	9/12 (75%)	10/12 (83%)
P58	5/12 (42%)	1/12 (8%)	0
P43	4/12 (33%)	10/12 (83%)	9/12 (75%)
P41	12/12 (100%)	10/12 (83%)	11/12 (92%)
P39	3/12 (25%)	0	0
OspB	8 (67%)	2/12 (17%)	0
OspA	8/12 (67%)	6/12 (50%)	11/12 (92%)
P30	7/12 (58%)	2/12 (17%)	0
OspC	0	0	1/12 (8%)

Tableau 3. Protéines antigéniques des deux souches de *B. burgdorferi* si ayant réagi avec les différents sérums de chiens

N°de chien	<i>B. garinii</i> (NE 2626)	<i>B. afzelii</i> (NE 632)
1	P72, P60, P58	P72, P43, P41, OspA, OspB
2	Aucune bande	OspA
3	P41	Aucune bande
4	Aucune bande	Aucune bande
5	P72, P60, P43, P41, P37, OspA	P72, P43,P41
6	Aucune bande	Aucune bande
7	P60, P43, P41, P39, OspA	P41
8	P60, P43, P41, OspA	P41,OspA, OspB
9	P72, P60, P43, P41	P60, P41
10	P72, P60, P43, P41, P29	P60, P43
11	P72, P60, P43, P29	P60, P41
12	P72, P60, P43, P41, OspA	P72, P60, P43, P4 1, OspB, OspA
13	P60, P41, OspA	P72, P60, P43, P41, OspB, OspA
14	P72, P60, P43, P41, P39, OspA, P30, P29	P90, P72, P60, P43, P29, OspC
15	P72, P60, P58, P43, P41	P72, P60, P43, P41 , OspB, OspA
16	P72, P60, P41, OspA, P30	P72, P60, P43, P41, P37, OspB, OspA
17	P60, P43, P41	P41
18	P90, P72, P60, P43, P41, P37, OspA, P30	P72, P43, OspB, OspA
19	P90, P72, P60, P58, P43, P41, P37, OspA, P30, OspC	P72, P60, P41, OspB, OspA
20	P72, P60, P43, P41	P72, P60, P41, OspA, P30
21	P72, P60, P43, P41, OspA, P30	P72 ,P60, P41 , OspB, OspA
22	P72 P60, P43, P41, P39, OspA, P30	P72, P60, P43, P41, OspB, OspA
23	P72, P60, P43, P41, P39, P37,OspA, P30	P90, P72, P60, P41, P37, OspA, P30
24	P60 ,P58, P43,P41,P37,OspA, P30	P60, P41, P37
25	Aucne bande	Aucune bande

Tableau 4. Fréquence de réactions des différents sérums de chiens avec les différentes protéines antigéniques de *B. garinii* et *B. afzelii*

Bandes	<i>B. garinii</i> (NE 2626)	<i>B. afzelii</i> (NE 632)
P90	2/25 (8%)	2/25 (8%)
P72	13/25 (52%)	12/25 (48%)
P60	18/25 (72%)	14/25 (56%)
P58	2/25 (8%)	2/25 (8%)
P43	17/25 (68%)	10/25 (40%)
P41	19/25 (76%)	15/25 (60%)
P39	4/25 (16%)	0
P37	5/25 (20%)	3/25 (12%)
OspB	0	11/25 (44%)
OspA	12/25 (48%)	12/25 (48%)
P30	7/25 (28%)	2/25 (8%)
OspC	1/25 (4%)	1/25 (4%)
P29	2/25 (8%)	1/25 (4%)

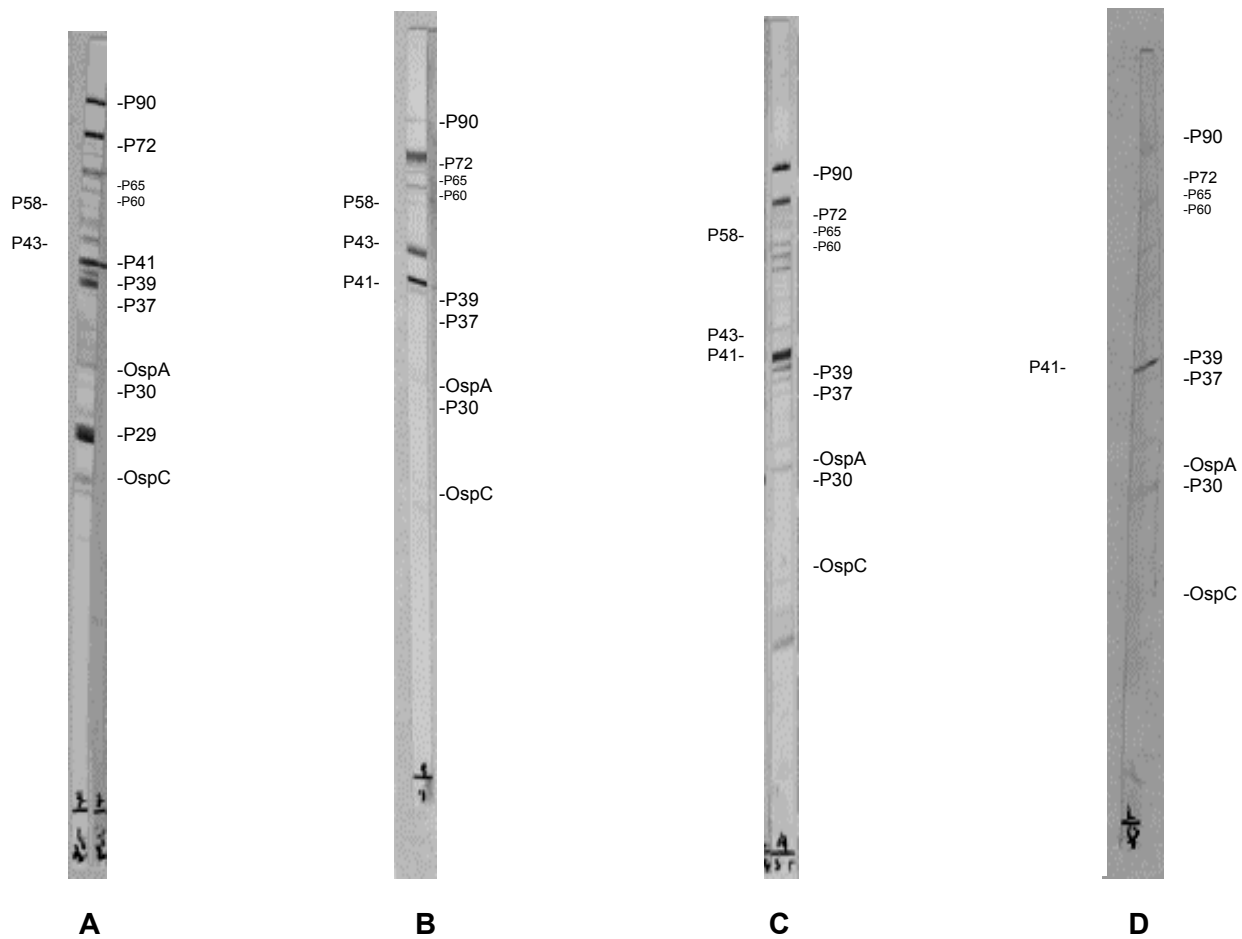


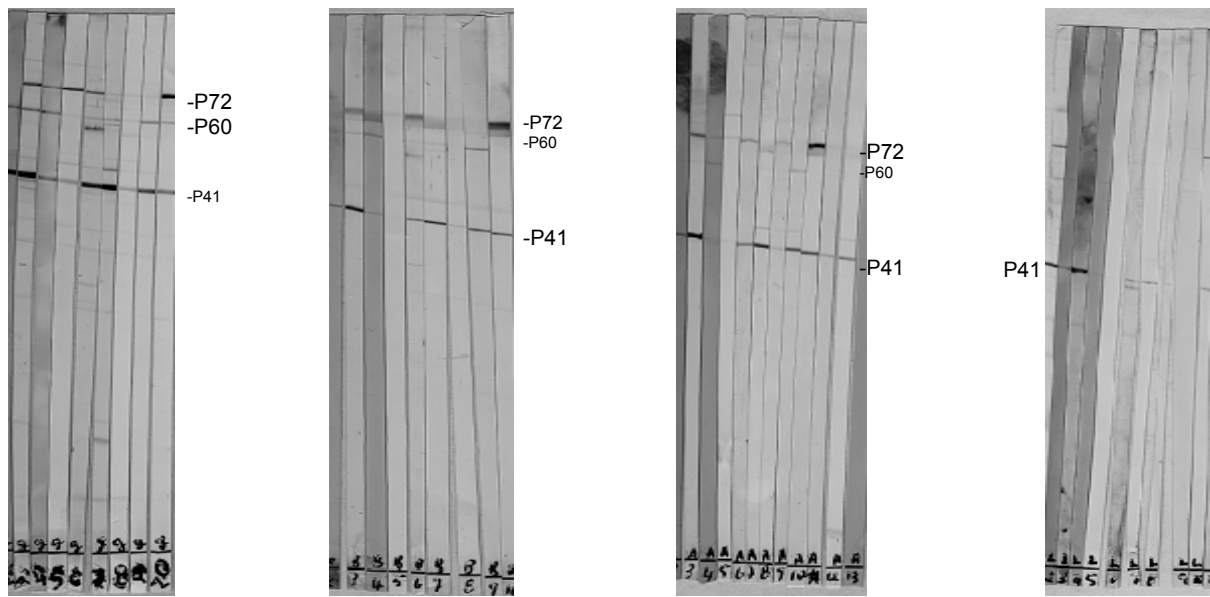
Figure 5. Analyse par Western blot de sérum de référence humain en utilisant comme antigène quatre espèces de *B. burgdorferi* sl.

**A :** *B. garinii*

**B :** *B. burgdorferi*

**C :** *B. afzelii*

**D :** *B. lusitaniae*



**A**

**B**

**C**

**D**

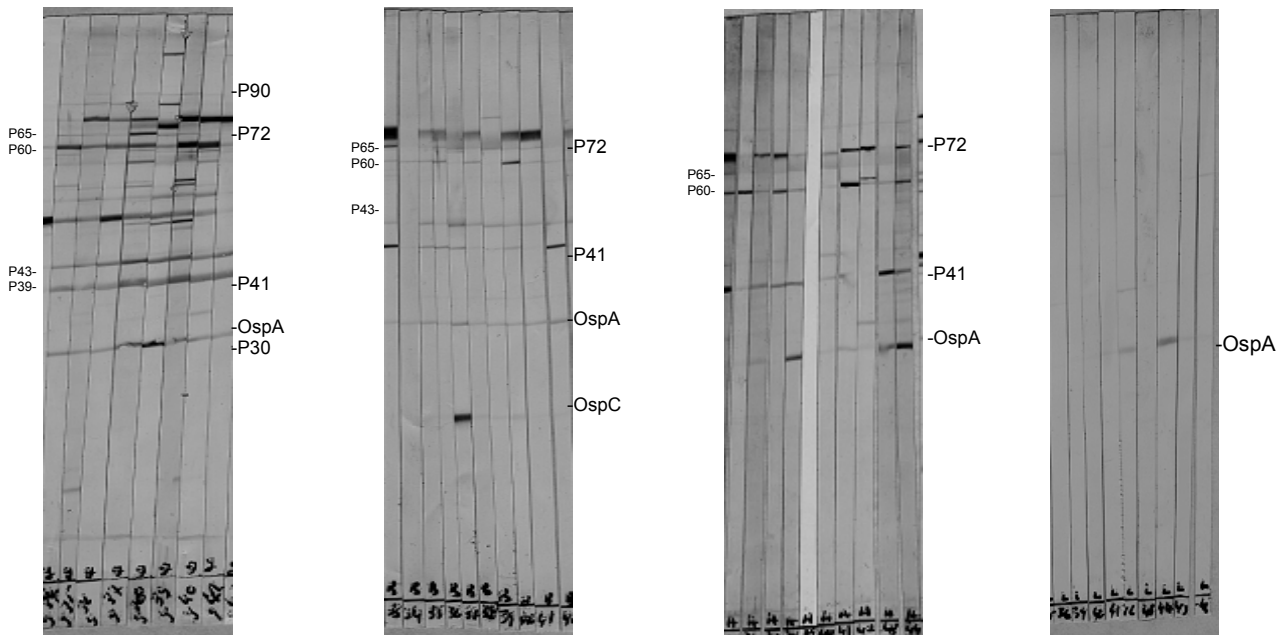
Figure 6. Analyse par Western blot de quelques sérums de sujets contrôle en utilisant comme antigènes quatre espèces de *B. burgdorferi* sl.

**A** : *B. garinii*

**B** : *B. burgdorferi*

**C** : *B. afzelii*

**D** : *B. lusitaniae*



**A**

**B**

**C**

**D**

Figure 7. Analyse par Western blot des sérums de patients en utilisant comme antigènes quatre espèces de *B. burgdorferi* sl.

**A** : *B. garinii*

**B** : *B. burgdorferi*

**C** : *B. afzelii*

**D** : *B. lusitaniae*

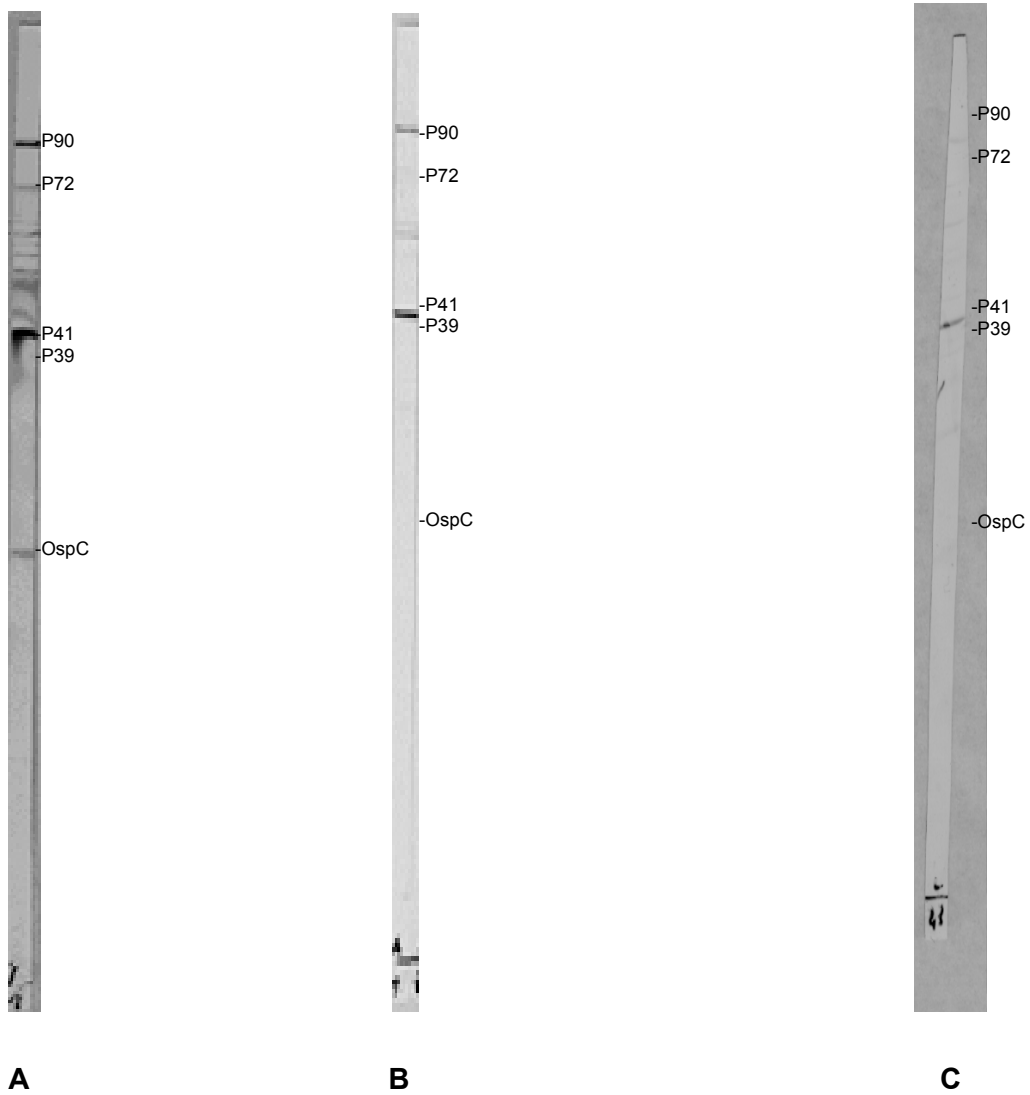


Figure 8. Analyse par Western blot de sérum de référence de chien en utilisant comme antigènes trois espèces de *B. burgdorferi* sl.

**A** : *B. garinii*

**B** : *B. afzelii*

**C** : *B. lusitaniae*

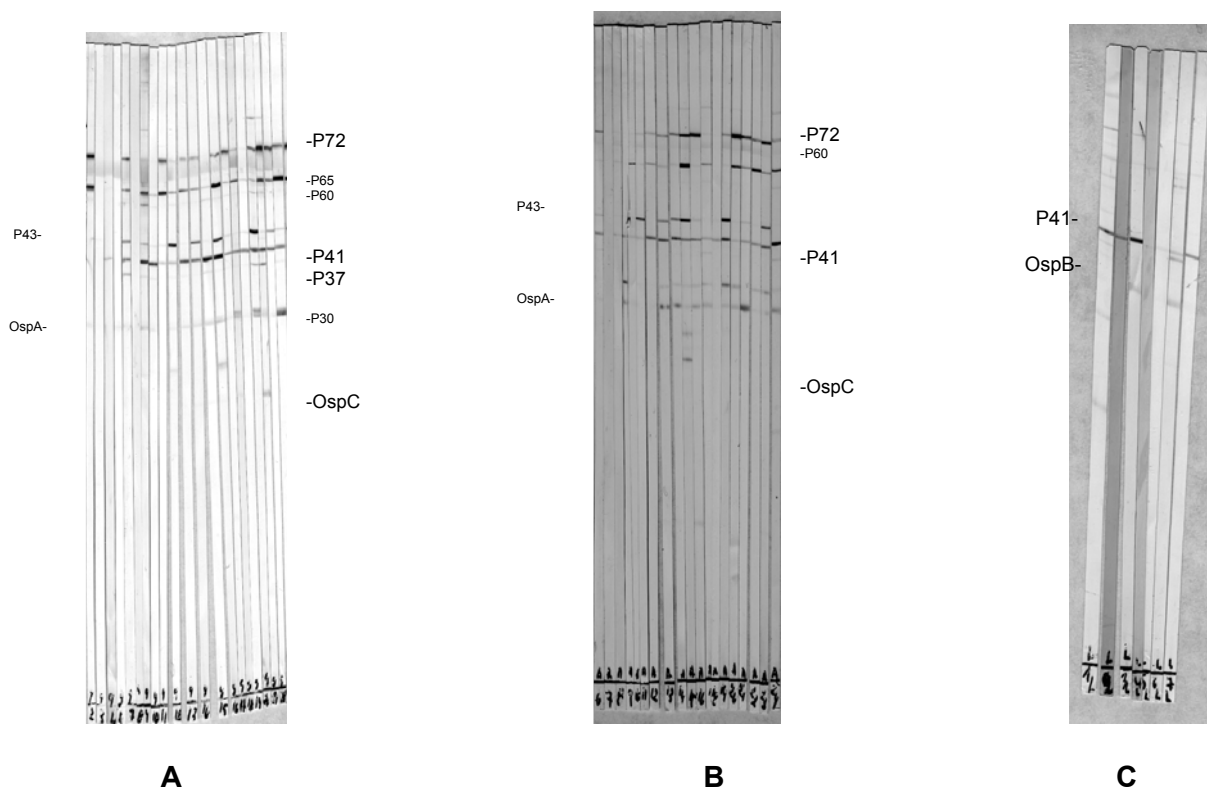


Figure 9. Analyse par Western blot des sérums de chiens en utilisant comme antigènes trois espèces de *B. burgdorferi* si

**A** : *B. garinii*

**B** : *B. afzelii*

**C** : *B. lusitaniae*

## V. Discussion

### V.1 *I. ricinus* et *B. burgdorferi* sl en Suisse.

Dans cette étude trois paramètres importants pour comprendre l'épidémiologie de la borréliose de Lyme en Suisse à savoir, la densité des tiques, leur prévalence d'infection par *B. burgdorferi* sl et les différentes espèces de *Borrelia* qui les infectent sont considérés.

#### V.1.1 Densité des tiques.

En Suisse, *I. ricinus* est connu comme vecteur principal de la maladie de Lyme (Aeschlimann et al. 1986, Miserez et al. 1990, Péter et al. 1995, Wicki et al. 2000, Bernasconi et al. 1997, Humair et al. 1998). Cette tique se rencontre principalement sur le Plateau suisse, et dans les vallées jurassiennes et alpines (Aeschlimann et al. 1986, Gigon, 1985, Kaltenrieder et al. 1985, Péter et al. 1995, Miserez et al. 1990). Dans notre étude, la densité de tiques *I. ricinus* en quête varie considérablement entre les différentes régions d'études situées en Suisse occidentale et au Tessin. En effet au Tessin la densité d'*I. ricinus* en quête est faible, et varie entre 0 et 66 tiques par 100m<sup>2</sup>, alors qu'au nord de la Suisse elle culmine entre 28 et 387 tiques/100m<sup>2</sup>. Ceci peut être expliqué par les variations climatiques entre le Nord et le Sud de la Suisse. Ce résultat concorde avec celui de Gilot et al. (1994). Ces auteurs ont rapporté que la densité d'*I. ricinus* varie considérablement entre le Nord et le Sud de la France. Au Nord de l'Europe *I. ricinus* montre une distribution très large, contrairement à certains pays du Sud comme la Tunisie et le Maroc où la distribution d'*I. ricinus* est très limitée et ponctuelle et sa densité est faible (Zhioua et al. 1999, Younsi et al. 2001, Sarih et al. submitted). Cependant la distribution d'*I. ricinus* reste large en Espagne et en Italie (Barral et al. 2002, Rizzoli et al. 2002) par rapport à l'Afrique du Nord. La densité d'*I. ricinus* en quête a montré également des différences entre des lieux rapprochés. En Europe plusieurs études ont rapporté que la variation de la distribution géographique de la densité d'*I. ricinus* est influencée principalement par la végétation et la densité des hôtes (Wegner et al. 1997, Gray et al. 1999, Gray et al. 1992 Kirstein et al. 1997a, Mejlou et al. 1993, Jensen, 2000, Barral et al. 2002). De même Merler et al. (1996), Rizzoli et al. (2002) ont démontré que la variation de la densité d'*I. ricinus* entre les différentes régions d'études en Italie est liée à la végétation, au type de sol, à la densité des hôtes, à l'altitude et à la position géographique. Malgré la grande distribution d'*I. ricinus* en Suisse, l'altitude constitue un facteur limitant. Kaltenrieder et al. (1985) dans une étude faite dans 76 biotopes différents en Suisse occidentale ont démontré que la densité de tiques diminue avec l'altitude qui augmente et ont aussi constaté la présence de tiques à des altitudes au-dessous de 700m où la

température moyenne annuelle est de 8° C ou plus, mais jamais ils n'ont trouvé de tiques dans des biotopes au-dessus de 900 m où la température moyenne annuelle est de 6° C au moins. Dans notre étude la densité de tiques a été examinée à trois altitudes différentes, le long de la même montagne à Chaumont (Neuchâtel). On a constaté que la densité de quête d'*I. ricinus* diminue avec l'altitude qui augmente, un résultat semblable a été rapporté par Rizzoli et al. (2002). Ce résultat montre l'effet du climat sur la densité de tiques comme il a été montré par Perret et al. (2000). L'un de ces auteurs a aussi rapporté que le début et l'augmentation de l'activité des tiques au printemps dépendaient de la température en hiver, alors que l'apparition d'un pic en automne dépendait de la température à la fin du printemps et au début de l'été (Perret, 2003).

#### V.1.2 Prévalence d'infection par *B. burgdorferi* s.l.

La prévalence d'infection d'*I. ricinus* par *B. burgdorferi* s.l varie considérablement entre la Suisse occidentale et le Tessin. En Suisse occidentale, la prévalence d'infection est plus élevée qu'au Tessin. Ceci peut être expliqué par la distribution et la densité des hôtes qui maintiennent et infectent la population des tiques dans ces régions. La prévalence d'infection d'*I. ricinus* a montré aussi des différences locales entre des lieux rapprochés, comme on l'a constaté à Chaumont. Zeman et al. (1999) ont rapporté que la prévalence d'infection varie aussi au sein du même site. En Europe plusieurs études ont démontré que la variation dans la distribution géographique de la prévalence d'infection par *B. burgdorferi* s.l chez les tiques *I. ricinus* est liée à la distribution et la densité d'hôtes réservoirs compétents à savoir les petits rongeurs et les lièvres (Junttila et al. 1999, Mejlon et al. 1993, Tälleklint et al. 1993) et à celle d'hôtes prophylactiques tels que les cerfs (Mejlon et al. 1993, Jensen, 2000, Tälleklint et al. 1996). De même Rizzoli et al. (2002) ont démontré que la variation de la prévalence d'infection d'*I. ricinus* entre les différentes régions d'étude est liée à la végétation, à la densité des hôtes et à l'altitude.

Au contraire, en Belgique Misonne et al. (1998) ont rapporté une stabilité de la prévalence d'infection entre quatre régions d'études bien éloignées.

En Suisse la prévalence d'infection d'*I. ricinus* par *B. burgdorferi* s.l reste similaire, voire supérieure à celle observée en Irlande (11.5% à 28,9%) (Kirstein et al. 1997), en Finlande (19% à 55%) (Junttila et al. 1999), en Belgique (20% à 28.8%) (Misonne et al. 1998). Par contre la prévalence d'infection en Suisse reste supérieure à celle signalée en France (7.06%) (Gilot et al. 1996), en Pologne (8.8%) (Wegner et al 1997), et au Danemark (0% à 12%) (Jensen et al. 2000). Mais cette prévalence d'infection reste inférieure à celle rapportée au Sud de l'Europe comme c'est le cas en Italie (0% à 70%) (Cinco et al. 1998) et au Portugal (75%) (De Michelis et al. 2000). Il est important de noter que dans les pays

Nordiques la prévalence d'infection est faible par rapport au sud de l'Europe où le taux d'infection d'*I. ricinus* atteint les 75%. En effet en Afrique du Nord au Maroc et en Tunisie la prévalence d'infection d'*I. ricinus* atteint les 50%, malgré que dans ces pays la densité d'*I. ricinus* est faible. Il est fort possible que les différences de prévalences constatées à travers l'Europe sont, en partie, dues aux méthodes utilisées pour détecter l'infection dans les tiques.

Tälleklint et al. (1996) et Rizzoli et al. (2002) ont démontré que la prévalence d'infection de nymphes est positivement associée à la faible densité, et négativement associée à la haute densité des nymphes. Ceci a été expliqué par la densité des cerfs qui affecte à la fois l'abondance des tiques et la prévalence d'infection. Dans notre étude en Suisse occidentale aucune corrélation significative n'a été observée entre la densité des tiques et la prévalence d'infection par *B. burgdorferi* s.l.

Dans toutes les régions d'études en Suisse occidentale, la prévalence d'infection chez les adultes d'*I. ricinus* est très significativement plus élevée que celle des nymphes. Ceci peut être expliqué par la présence des hôtes compétents dans nos régions d'études qui permettent le maintien et l'infection des tiques. Plusieurs auteurs ont fait les mêmes observations. On peut citer Mejlou et al. (1993), Miserez et al. (1990), Gustafson et al. (1995) et Wegner et al. (1997). Ce phénomène est essentiel pour le maintien de l'infection chez les *I. ricinus* à cause de la faiblesse de la transmission transovarienne, en effet le taux d'infection chez les larves est très faible et varie entre 0 et 4.8% (Miserez et al. 1990, Zhioua et al. 1994, Mejlou et al. 1993, Gustafson et al. 1995). Cependant au Tessin la différence de prévalence d'infection chez les adultes et les nymphes n'est pas significative, ceci peut être dû à la quantité limitée de tiques examinées.

L'influence de l'altitude sur la prévalence d'infection a été étudiée à Chaumont à trois altitudes différentes. On a constaté que la prévalence d'infection des nymphes d'*I. ricinus* diminue avec l'altitude qui augmente, et elle est stable selon les années, alors que pour les adultes, la prévalence d'infection n'était pas directement liée à l'altitude, mais diminuait avec la diminution de la densité. Rizzoli et al. (2002) ont démontré que la prévalence d'infection des nymphes dans différents endroits dans les Alpes italiennes diminuait avec l'altitude qui augmente, ceci a également été rapporté par Aeschlimann et al. (1986) sur le Plateau Suisse. Au contraire, au Tessin, la prévalence d'infection des tiques n'a pas montré de corrélation avec l'altitude. Ceci pourrait être lié au faible nombre d'*I. ricinus*.

Dans toutes les régions d'études en Suisse occidentale, *I. ricinus* a montré fréquemment un degré d'infection très faible avec moins de 50 spirochètes par tique, contrairement à une étude faite au Maroc, où la majorité des *I. ricinus* a montré une infection avec plus de 500 spirochètes. Ceci peut être expliqué par la grande hétérogénéité d'hôtes réservoirs en Suisse et aussi par la grande diversité des espèces de *Borrelia* dans ce pays. L'existence d'

une spécificité de certaines espèces de *B. burgdorferi* *sl* vis-à-vis de leurs hôtes pourrait entraîner une dilution des spirochètes dans la tique bien que cela n'ait jamais été démontré. Kurtenbach et al. (1998b) ont montré que le sérum de certains hôtes réservoirs tuent l'espèce de *Borrelia* non spécifique et entraîne une perte des spirochètes. Kurtenbach et al. (2002c) ont rapporté que les tiques infectées par *B. garinii*, *B. burgdorferi* *ss* et *B. valaisiana* gardent leur infection au cours du repas sanguin sur les faisans, alors que les tiques infectées par *B. afzelii* perdent leur infection en se nourrissant sur ces oiseaux.

### V.1.3 Espèces de *Borrelia*.

Six espèces de *B. burgdorferi* *sl* ont été décrites en Europe, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* *ss*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* et *B. bissettii*. Toutes les espèces de *B. burgdorferi* *sl* ont été identifiées en Suisse sauf *B. bissettii* (Jouda et al. in press).

*B. burgdorferi* *sl* présente une grande diversité dans la distribution géographique entre la Suisse Occidentale et le Tessin. Au Tessin uniquement trois espèces de *Borrelia* ont été identifiées Ceci montre que *B. burgdorferi* *sl* est très hétérogène en Suisse occidentale et que au Sud de la Suisse, au Tessin, *B. afzelii* et *B. burgdorferi* *ss* sont absentes. Ceci peut être expliqué par la variation des facteurs écologiques qui déterminent le rôle des hôtes vertébrés dans le maintien et la distribution géographique de *B. burgdorferi* *sl* entre le Nord et le Sud de la Suisse. Au Sud de l'Europe et en Afrique du Nord la distribution de *B. burgdorferi* *sl* devient moins hétérogène avec la disparition de certaines espèces surtout *B. afzelii* qui est rarement isolée des tiques surtout en Espagne et en Italie (Escudero et al. 2000, Barral et al. 2002, Cinco et al. 1998) ou même absente dans le cas du Portugal et de l'Afrique du Nord (De Michelis et al. 2000, Zhioua et al. 1999, Younsi et al. 2001, Sarih et al. submitted). Au Portugal et en Afrique du Nord la distribution de *B. burgdorferi* *sl* a une tendance à être homogène avec la nette dominance d'une seule espèce, *B. lusitaniae*.

La distribution de *B. burgdorferi* *sl* a montré aussi des variations entre les régions d'étude au Tessin et en Suisse Occidentale, cependant cette variation a été constatée en plus au sein de la même forêt à Chaumont à trois altitudes différentes, avec une grande hétérogénéité d'espèces de *Borrelia* qui diminue avec l'altitude qui augmente.

En général, en Europe *B. garinii* est l'espèce la plus fréquemment isolée d'*I. ricinus*, suivie par *B. afzelii* (Hubalek et Halouzka 1997). *B. burgdorferi* *ss* est rarement isolée en Europe de l'Est (Hubalek et Halouzka 1997, Gern et al. 1999). *B. valaisiana* a été identifiée dans certains pays d'Europe : l'Irlande (Kirstein et al. 1997a et b), la Suisse (Péter et al. 1995, Humair et al. 1998, Jouda et al. in press), la France (Quessada et al. 2003), l'Angleterre (Kurtenbach et al. 1998a), l'Italie (Cinco et al. 1998), les Pays-Bas (Schouls et al. 1999), et la Russie (Korenberg et al. 2002). Cependant cette espèce reste dominante chez *I. ricinus* en Irlande

(Kirstein et al. 1997a et b). *B. lusitaniae* a été décrite dans de rares pays d'Europe: au Portugal (De Michelis et al. 2000), en Espagne (Barral et al. 2002, Escudero et al. 2000), en Slovaquie (Gern et al. 1999), en République Tchèque, Moldavie, en Ukraine (Postic et al. 1997), en Pologne (Mizak et al. 2000), en France ( Richter et al 2003), et en Suisse (Jouda et al. in press). Cette espèce reste prévalente au Portugal (De Michelis et al. 2000) et en Afrique du Nord (Younsi et al. 2001, Zhioua et al. 1999, Sarih et al. submitted).

En plus des facteurs écologiques cités précédemment, des facteurs biologiques règlent la transmission de *B. burgdorferi* si de la tique à l' hôte et de l'hôte à la tique. Ces facteurs se manifestent sous la forme d'une spécificité vis-à-vis de l'hôte vertébré. Comme il a été rapporté par plusieurs études, les rongeurs, par exemple, constituent les principaux réservoirs pour *B. afzelii* ( Humair et al 1995, Richter et al. 1999), pour *B. garinii*, ce sont les oiseaux qui jouent ce rôle (Olsen et al. 1995 et Humair et al 1995). *B. burgdorferi* ss est principalement associée aux petits rongeurs (Kurtenbach et al 1998a, Humair 1998, Nelson et al 2000), *B. valaisiana* a été décrite chez les oiseaux (Gern et al. 1998 et Humair, 1998), au contraire, pour *B. lusitaniae* l'hôte réservoir n'est pas connu. Kurtenbach et al. (1998b) ont démontré que le sérum des rongeurs est bactéricide pour *B. garinii* et *B. valaisiana* et pas pour *B. afzelii*, le sérum des oiseaux est favorable pour *B. garinii* et *B. valaisiana* et non pour *B. afzelii*, les sérums de lièvres, porc et chats favorisent la multiplication de *B. burgdorferi* ss. Cette spécificité des différentes espèces de *B. burgdorferi* si vis-à-vis de l'hôte réservoir entraîne une spécificité aux différents stades d'*I. ricinus*. Humair et Gern, (2000) ont rapporté que *B. afzelii* est très fréquente chez les nymphes alors que *B. burgdorferi* ss et *B. garinii* sont très abondantes chez les adultes. Cette spécificité dans le maintien des cycles de *B. burgdorferi* si peut donc être expliquée par l'effet de résistance des différentes souches de *B. burgdorferi* si vis-à-vis du complément. Toutes les espèces de *Borrelia* sont capables d'activer la voie classique et/ou alternative du système complément de l'hôte réservoir. Mais elles diffèrent par leur résistance vis-à-vis du système complément (Kurtenbach et al. 2002a et b, Kraiczy et al. 2001). Ceci est dû à la capacité qu'ont certaines espèces de *Borrelia* à fixer les facteurs inhibiteurs du complément, le facteur H ou Fhl-1 (Alitalo et al 2001). Alitalo et al (2001) ont démontré que *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii* peuvent favoriser l'inactivation de C3b et échapper de ce fait à l'attaque du complément, tandis que *B. garinii* n'a pas cette activité parce qu'elle est incapable de lier l'un ou l'autre facteur H ou Fhl-1. Kurtenbach et al. (2002a et b) distinguent trois groupes écologiques de *B. burgdorferi* si : (1) les espèces de *B. burgdorferi* si adaptées à de petits mammifères, ce groupe contient *B. garinii* (sérotypé 4) , *B. afzelii*, *B. bissettii*, *B. japonica*, (2) les espèces de *B. burgdorferi* si adaptées aux oiseaux, à ce groupe appartiennent *B. garinii* (sérotypes 3, 5, 6, 7) *B. valaisiana* et *B. turdii*, (3) les espèces de *B. burgdorferi* si non spécialisées à qui appartient *B. burgdorferi* ss. Vu

que l'hôte réservoir de *B. lusitaniae* n'a pas été identifié sa spécificité vis-à-vis de l'hôte n'a pas encore été clarifiée.

Différentes combinaisons d'infections mixtes avec deux ou trois espèces de *Borrelia* ont été identifiées dans plusieurs pays d'Europe: en Angleterre ( Kurtenbach et al. 1998a), en France (Pichon et al. 1999, Quessada et al. 2003), en Belgique (Missone et al. 1998), en Suisse (Humair et al. 1998, Jouda et al. in press ), en Italie (Cinco et al. 1998), en Finlande (Junttila et al. 1999), en Irlande ( Kirstein et al. 1997a, b), en Hollande ( Schouls et al. 1999) et en Russie (Postic et al. 1997). La majorité des infections mixtes associent *B. garinii* et *B. valaisiana*, de même que *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss. Ceci peut être expliqué par l'existence des associations spécifiques entre les espèces de *Borrelia* et les types d'hôtes. Ceci supporte la suggestion que *B. burgdorferi* sl est maintenu dans la nature à travers des cycles de transmission différents, impliquant les petits mammifères et les oiseaux (Humair, 1998).

Des infections mixtes par *B. garinii* et *B. lusitaniae*, *B. valaisiana* et *B. lusitaniae*, *B. lusitaniae* et *B. burgdorferi* ss ont été rapportées et observées dans notre travail (Jouda et al. in press, Postic et al. 1997). Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat, soit les oiseaux et les rongeurs sont des hôtes réservoirs pour *B. lusitaniae* ou bien l'hôte réservoir pour *B. lusitaniae* peut être infecté par *B. garinii* et *B. valaisiana*. De Michelis et al. (2000) ont identifié *B. lusitaniae* (Poti-B1) à partir de tiques *Hyalomma marginatum* qui infestent principalement les oiseaux et les rongeurs. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer l'hôte réservoir pour *B. lusitaniae*.

## Conclusion

En Suisse occidentale, la densité de tiques en quête et la prévalence d'infection d'*I. ricinus* varient selon les régions et selon les années. Aucune corrélation significative n'a été rapportée entre la densité des tiques et la prévalence d'infection par *B. burgdorferi* sl. Nous avons aussi constaté que *B. burgdorferi* sl montre une distribution hétérogène entre les différents régions d'études.

Au Tessin la densité de tiques en quête et la prévalence d'infection d'*I. ricinus* varient selon les régions, mais elles restent plus faibles qu' en Suisse occidentale. La distribution des espèces de *Borrelia* y est moins hétérogène avec l'absence de *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss. La densité d'*I. ricinus* en quête est influencée par l'altitude: elle diminue avec l'altitude qui augmente et varie selon les années. De même la prévalence d'infection des nymphes d'*I. ricinus* diminue avec l'altitude qui augmente, et elle est stable au cours des années, alors que pour les adultes, la prévalence d'infection n'est pas directement liée à l'altitude, mais

diminue avec la diminution de la densité. La plus grande diversité des espèces de *Borrelia* a été observée à basse altitude et elle diminue avec l'altitude qui augmente.

Finalement, nous avons mis en évidence la présence de *B. lusitaniae*, espèce dominante dans certains pays d'Europe de Sud et d'Afrique du Nord, dans plusieurs régions endémiques en Suisse, même si sa fréquence y est peu élevée.

La diversité des géoespèces de *B. burgdorferi* et la grande variété d'hôtes, la spécificité de certaines espèces de *B. burgdorferi* vis-à-vis de l'hôte et la transmission d'une ou de plusieurs espèces de *B. burgdorferi* contribuent à la complexité de l'écologie de la borréliose de Lyme. Il est important de poursuivre la recherche afin d'améliorer la connaissance des phénomènes qui influencent le cycle de maintien et de transmission de *B. burgdorferi* et sa pathogénicité.

#### V.2 *I. ricinus* et *B. burgdorferi* au Maroc.

Le but de cette étude était de démontrer l'existence de foyers de l'agent de la Borréliose de Lyme au Maroc, et d'évaluer les risques pour la population humaine d'entrer en contact avec des tiques infectées et de développer la maladie, de même que d'attirer l'attention des médecins et des biologistes sur l'existence de cette maladie au Maroc par la recherche d'anticorps anti-*Borrelia* dans les sérums de malades.

Différents aspects ont donc été abordés dans cette thèse:

- La répartition géographique d'*I. ricinus* libres au Maroc dans les régions sélectionnées.
- La prévalence d'infection par *B. burgdorferi* et l'identification des espèces de *Borrelia* présentes dans ces tiques.
- La prévalence d'anticorps contre les agents de la borréliose de Lyme chez les populations humaines et chez les chiens

##### V.2.1 Densité de tiques

Au Maroc *I. ricinus* a été rapporté à l'étage bioclimatique méditerranéen sub humide et semi-aride. En effet sa présence a été décrite dans le passé principalement au Moyen Atlas occidental, Haut Atlas central, Plateau central, Haut Rif et à Zear (Bailly et al. 1974, Bailly et al. 1976, Bailly et al. 1979).

Dans notre travail, *I. ricinus* n'a été récoltée qu'à l'étage bioclimatique humide et sub humide, et pour la première fois à Taza et à Ifrane. Ceci peut être dû au réchauffement climatique qui entraîne une modification de la répartition géographique des tiques en la remontant vers le nord et vers des altitudes plus élevées ce qui a entraîné une limitation de l'activité d'*I. ricinus*

au nord du Maroc. Les conditions climatiques particulières, c'est-à-dire les périodes successives de sécheresse qu'a connues le Maroc ces dernières années peuvent également expliquer l'absence d'*I. ricinus* observée dans les régions décrites par Bailly et al. (1974 – 1979) lors de nos visites. En effet, *I. ricinus* est très sensible à l'humidité (Gigon, 1985), ainsi la faible pluviosité due à la sécheresse associée à la pauvreté du sous-bois dans ces régions ont certainement rendu difficiles la survie et l'activité des *I. ricinus* dans ces forêts. Il est important de signaler qu'au cours de nos sorties dans ces forêts, on a constaté un fort déboisement. En plus, ces régions sont utilisées pour le pâturage des troupeaux, en l'occurrence des bovins, ce qui a rendu le sous-bois très peu dense. Par contre, à Taza où *I. ricinus* a été récolté, le biotope est différent, même s'il y a du surpâturage par des troupeaux, le sous-bois est riche en fougères, espèces non appétissantes pour le bétail (Bouattour, 2001). De plus, dans cette région, le sol est couvert de feuilles mortes tombées des chênes, ce qui donne une litière favorable, un refuge pour *I. ricinus*. La présence de troupeaux, pouvant servir d'hôtes à *I. ricinus*, est également un facteur favorisant la présence de cette tique. En effet, Gray et al. (1995a) ont montré qu'*I. ricinus* est extrêmement abondant particulièrement dans les régions où il est associé aux moutons, bétails et cerfs. En effet, ces espèces servent principalement d'hôtes aux tiques adultes et contribuent ainsi au maintien de la population de tiques et à son abondance dans une région.

Au Maroc, la majorité des collectes d'*I. ricinus* adultes a été observée entre mars et avril, mais aucune tique n'a été récoltée en juin. *I. ricinus* au Maroc présente un cycle d'activité très court, apparaissant en décembre pour disparaître en juin. Nos résultats contrastent avec les travaux de Yousfi et al. (1986), en Algérie dans la région de Tlemcen. En effet, ces auteurs ont montré qu'*I. ricinus* apparaît sur le bétail en novembre pour disparaître en mars. Senevet et Rossi (1924) dans une étude faite dans ce même pays ont signalé qu'*I. ricinus* est nombreux en janvier et février, diminue en avril pour disparaître en mai. De même, Bouattour (2001) et Younsi et al. (2001) en Tunisie ont observé que l'activité des adultes d'*I. ricinus* se situe entre octobre et mars, avec un pic en novembre, alors que pour les nymphes et les larves l'activité se situe entre mars et mai. Donc l'activité saisonnière apparaît plus tôt ou plus tard selon le pays et apparemment aussi selon les années. Ceci peut être dû à des facteurs climatiques, tels que des fluctuations de température, comme nous l'avons montré (Jouda et al. submitted) en Suisse dans une étude faite à trois altitudes différentes. En effet dans cette étude le début du pic d'activité saisonnière d'*I. ricinus* apparaît un peu plus tard dans l'année quand l'altitude augmente, c'est-à-dire à des températures plus basses. En Afrique du Nord, *I. ricinus* montre une activité en hiver. La haute température estivale diminue certainement l'activité et le développement des tiques (Perret et al. 2000, Randolph et al. 2002). *I. ricinus*, en Afrique du Nord, semble donc avoir adopté une activité hivernale, avec une diapause estivale (Yousfi et al. 1986).

En Europe tempérée, l'activité d'*I. ricinus* est estivale, cette tique apparaît en général fin février et disparaît vers novembre et présente souvent deux pics, un au printemps et un autre en automne (Perret et al. 2000, Jouda et al. submitted). *I. ricinus* semble donc s'être adapté au climat méditerranéen en inversant son rythme d'activité saisonnière par rapport à l'Europe et est géographiquement localisée dans les stations humides, ce qui peut expliquer sa rareté (Yousfi et al. 1986). On pense que les conditions climatiques présentes au Nord de l'Afrique ont entraîné une variation physiologique de la tique, comme on a pu observer surtout au niveau des pores et poils qui par comparaison aux tiques *I. ricinus* de Suisse sont bien plus nombreux chez les tiques du Maghreb. Une étude complémentaire comparant la physiologie des *I. ricinus* d'Afrique du Nord et de l'Europe permettrait de répondre à cette question. En étudiant la génétique des populations d'*I. ricinus* De Meeûs et al. (2002) ont trouvé qu'*I. ricinus* récolté en Tunisie montre une différenciation génétique hautement significative par rapport aux tiques d'*I. ricinus* récoltées en Suisse. Notons par ailleurs que ces auteurs n'ont détecté pratiquement aucune différenciation entre les populations d'*I. ricinus* récoltées en Suisse au Nord et au Sud des Alpes. Mais il faut encore signaler ici que pour les *I. ricinus* récoltés au Maghreb, l'identification des tiques a été confirmée par le Dr. Jim Keirans de l' US National Tick Collection à Statesboro, USA.

Dans notre étude, seuls les adultes d'*I. ricinus* ont pu être récoltés à l'exception d'une nymphe à Ifrane au mois de mai 2001, ces observations ne correspondent pas à ce qui est observé en Tunisie où les nymphes et les larves ont été collectées sur la végétation entre septembre et mai (Bouattour, 2001). Les conditions climatiques locales ainsi que la végétation rencontrées à Taza pourraient expliquer ces différences. En effet, les tiques sont très sensibles à ces facteurs qui peuvent influencer leur hauteur de quête sur la végétation. Lorsque les conditions sont trop desséchantes, elles vont rester au sol et seront ainsi difficilement capturées par la drague. En effet, Gigon (1985) a montré que les nymphes se soustraient à l'influence directe du soleil et préfèrent les faces Nord et Est du support, par contre les adultes restent indifférents. La hauteur de la végétation peut également ne pas être adéquate pour la quête des nymphes et des larves, comme l'ont rapporté Mejlou et al. (1997). Ces auteurs ont montré que la distribution verticale des adultes est moins dépendante de la structure de la végétation, que celle des nymphes et des larves. A Taza, les adultes ont montré un comportement exophile, attendant le passage de l'hôte sur la végétation, comme l'ont montré les récoltes d'adultes. A Taza les adultes d'*I. ricinus* gorgés ont été récoltés sur des moutons, cependant aucune nymphe n'a été prélevée sur les moutons observés, bien que tous les stades d'*I. ricinus* peuvent prendre un repas sanguin sur ces derniers (Travnicek et al. 2002). Ceci peut être dû à l'activité saisonnière des nymphes dans cette région. Bouattour (2001) a rapporté des larves et des nymphes d'*I. ricinus* sur des lézards dans la région d' El Jouza en Tunisie. Ceci peut confirmer notre

hypothèse que les nymphes et les larves restent tout près du sol pour ne pas perdre de l'énergie et subir une dessiccation. Une étude complémentaire à Taza est nécessaire pour identifier les hôtes associés à l'abondance d'*I. ricinus* dans cette région, et tout particulièrement les hôtes des stades immatures.

#### V.2.2 Prévalence d'infection par *B. burgdorferi* sl.

La prévalence d'infection par *B. burgdorferi* sl chez *I. ricinus* au Maroc est similaire à celle trouvée dans certains pays d'Europe (Junttila et al. 1999, Hubalek et Halouzka 1998). *I. ricinus* au Maroc reste parmi les tiques les plus infectées d'Afrique du Nord (Zhioua et al. 1999 et Younsi et al. 2001) mais elles ne représentent cependant pas le plus haut taux d'infection observé dans le sud de l'Europe. En effet, les *I. ricinus* au sud du Portugal montrent des prévalences d'infection qui atteignent 75% détectées par PCR (De Michelis et al. 2000). Ces différences peuvent être liées aux méthodes utilisées pour détecter *Borrelia* dans les tiques.

Les adultes *I. ricinus* récoltés sur les moutons au Maroc montrent une prévalence d'infection très faible par rapport à celle observée chez les tiques collectées sur la végétation. Ce résultat peut être dû au fait que les moutons constituent des hôtes prophylactiques, des hôtes non significatifs pour le maintien des borrelies dans une région (Gern et al. 1998, Gray et al. 1995a), le sérum des moutons induisant une destruction partielle des borrelies dans les tiques entraînant une dilution de l'infection chez les adultes gorgées (Kurtenbach et al. 2002). Les mâles *I. ricinus* récoltés sur les moutons montrent une prévalence d'infection plus élevée que les femelles. Cette différence d'infection entre les sexes, n'est, par contre, pas présente chez les adultes collectés sur la végétation. Ceci renforce l'hypothèse précédente selon laquelle le sérum des moutons éliminerait les borrelies dans les tiques se gorgeant sur les moutons. En effet, les mâles ne font qu'accompagner les femelles et ils prennent peu ou pas de sang. Cependant, il faut signaler que dans certains cas les moutons peuvent amplifier l'infection par *B. burgdorferi* sl chez les nymphes qui se nourrissent en même temps que des tiques infectées sur les moutons, par un phénomène appelé "co-feeding transmission", ainsi que l'ont montré les travaux de Ogden et al. (1994). Plusieurs auteurs ont rapporté la présence d'anticorps anti – *Borrelia* chez les moutons (Trávnicek et al. 2002, Ciceroni 1996, 1997). Trávnicek et al. (2002) ont suggéré que les moutons constituent une menace pour l'Homme en agissant comme hôtes réservoirs pour *B. burgdorferi* sl particulièrement par le moyen de la transmission par co-feeding. On ne sait pourtant pas si ce phénomène se produit également avec des tiques infectées par *B. lusitaniae*.

La variation saisonnière de la prévalence d'infection d'*I. ricinus* par *B. burgdorferi* si en Afrique du Nord n'a, à notre connaissance, encore jamais été signalée. Même dans notre étude, elle reste mal connue à cause du faible nombre de tiques qui ont été collectées, mais le mois d'avril reste le mois où le taux d'infection est le plus élevé. Chez les adultes c'est au mois d'avril que plus de 50% des tiques ont montré un degré d'infection avec plus de 50 spirochètes. Les tiques de Taza hébergent beaucoup de spirochètes, ceci laisse penser que dans la région, il existe des hôtes compétents sur lesquels les larves et les nymphes se nourrissent et s'infectent pour donner des adultes hautement infectés.

### V.2.3 Les espèces de *Borrelia* au Maroc.

Des études précédentes en Afrique du Nord, plus particulièrement en Tunisie, ont rapporté une très faible hétérogénéité de *B. burgdorferi* si (Zhioua et al. 1999, Younsi et al. 2001), avec une forte dominance de *B. lusitaniae* et la présence rare de *B. garinii*. Notre étude confirme ces résultats .

Une autre géoespèce de *Borrelia* a été identifiée chez les adultes récoltés au Maroc: *B. burgdorferi* ss. De même des infections mixtes ont été identifiées chez *I. ricinus* au Maroc impliquant *B. burgdorferi* ss avec *B. lusitaniae* ou des infections avec 2 types différents de *B. lusitaniae*. *B. garinii* et *B. burgdorferi* ss ont cependant été observées à des taux très faibles. En Tunisie, *B. garinii* et *B. valaisiana* ont été signalées, mais ni *B. burgdorferi* ss, ni des infections mixtes n'ont été rapportées (Zhioua et al. 1999, Younsi et al. 2001, Gern et al. 2002, poster).

Si on compare nos résultats à ceux de l'Europe du Sud, *B. lusitaniae* est également dominante au Portugal (De Michelis et al. 2000), par contre en Espagne, *B. lusitaniae* n'est pas fortement dominante (Barral et al. 2002). En Europe tempérée, *B. lusitaniae* n'est reportée que dans peu de pays, en Slovaquie (Gern et al. 1999), en République Tchèque, Moldavia, en Ukraine (Postic et al. 1997), en Pologne (Mizak et al. 2000), en France (Richter et al. 2003), et en Suisse ( Jouda et al. in press, submitted) mais à des taux très faibles. Il semble donc que *B. lusitaniae* est plus fréquente dans la partie sud de l'hémisphère Nord (Zhioua et al. 1999 et Younsi et al. 2001), et que la diversité des espèces diminue vers le sud.

*B. garinii* et *B. afzelii* sont les géoespèces les plus fréquemment identifiées chez *I. ricinus* en Europe (Hubalek et Halouzka 1997). En Afrique du Nord, *B. afzelii* n' a pas été identifiée chez *I. ricinus*. Ces résultats confirment les travaux de Zhioua et al. (1999) et Younsi et al. (2001), cette espèce semble limitée à la partie nord de l'hémisphère comme il a été montré par d'autres travaux en Espagne où cette espèce est également absente (Barral et al. 2002), en Italie où elle a été observée à des taux faibles (Cinco et al. 1998) ou encore en Suisse, au

Sud des Alpes, où elle semble être absente (Jouda et al. in press). Par contre Ciceroni et al. (2001) en Italie ont identifié cette espèce à des taux élevés chez des patients. En Europe, *B. valaisiana* n'a été identifiée que dans peu d'endroit (Hubalek et Halouzka1997), mais avec un taux plus élevé en Irlande (Kirstein et al. 1997a et b). En Afrique du Nord, *B. valaisiana* a été identifiée pour la première fois chez une seule tique en Tunisie. Il est important de signaler que *B. burgdorferi* ss la génoespèce isolée en Amérique du Nord (Piesman, 2002), en Europe (Gern et al. 2002, Hubalek et Halouzka1997) et en Asie, (Shih et al. 1998, Shih et al. 2002) a été aussi identifiée en Afrique du Nord. Cette espèce montre une très grande distribution géographique qui est due probablement à sa faible spécificité vis-à-vis des hôtes réservoirs (Kurtenbach et al. 2002a).

*B. garinii*, *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss, les trois génoespèces liées à la maladie de Lyme en Europe, ont été aussi isolées chez des patients, différentes espèces d'oiseaux et rongeurs (Ciceroni et al. 2001, Olsen et al. 1995, Humair et al. 1995, 1998, Richter et al. 1999, Hubálek et al. 1996, Kirstein et al. 1997). Par contre, la pathogénicité de *B. valaisiana* et *B. lusitaniae* reste mal connue. *B. valaisiana* a été isolée des oiseaux (Humair et al. 1998, Kurtenbach et al. 1998, Olsen et al. 1995). En ce qui concerne *B. lusitaniae* l'hôte réservoir doit encore être identifié. Les travaux de Zeidner et al. (2001) ont montré que *B. lusitaniae* induit une pathologie chez les souris de laboratoire, mais rien n'est connu en ce qui concerne la pathogénicité de cette espèce pour l'homme.

L'isolement de deux génoespèces pathogènes connues en Europe (*B. burgdorferi* ss et *B. garinii*) en Afrique du Nord laisse donc suspecter la présence de la borréliose de Lyme dans ces pays. Cependant, l'implication clinique et épidémiologique de ces espèces dans cette région doit encore être clarifiée, d'autant plus que certains travaux en Afrique du Nord ont signalé la présence de paralysies faciales et de méningites chez des patients en Tunisie, Algérie et au Maroc (Rousselle et al. 1989, Aoun et al. 1992 et Ouhabi et al. 1994).

Dans cette étude nous avons identifié quatre infections mixtes qui présentent un profil RFLP suggérant soit une infection par *B. lusitaniae* Poti-B2 et Poti-B3 soit par *B. lusitaniae* Poti-B2 et *B. burgdorferi* ss. Si nos infections mixtes appartiennent à la première catégorie, cela signifie la présence de 2 types de *B. lusitaniae*, Poti-B2 et Poti-B3, au Maroc. Si nos infections mixtes appartiennent à la deuxième catégorie, cela laisse penser que *B. lusitaniae* peut infecter les rongeurs, *B. burgdorferi* ss étant souvent associé aux rongeurs (Sinsky et Piesman 1989, Humair et al.1995, Hu et al.1997), ce qui confirmerait la suggestion de De Michelis et al. (2000).

### V.3 Sérodiagnostic de la borréliose de Lyme au Maroc.

Quand les réactivités des sérums récoltés au Maroc, que ce soit les sérums de patients ou de chiens, ont été comparées, on a constaté que les sérums des différents groupes sont de manière générale plus réactifs avec les antigènes de *B. garinii* (NE 2626), suivi de *B. burgdorferi* ss (NE 608) et *B. afzelii* (NE 632) qu'avec *B. lusitaniae* (NE 2627). Dans notre étude, l'isolat de *B. lusitaniae* utilisé comme antigène est une souche isolée d'*I. ricinus* de Suisse (NE2627) ce qui peut expliquer une réactivité faible, bien que cette espèce soit la plus fréquemment identifiée chez *I. ricinus* au Maroc et en Tunisie (Sarih et al. submitted, Zhioua et al. 1999 et Younsi et al. 2001). Comme Norman et al. (1996) ont suggéré que les examens sérologiques doivent être validés avec des espèces de *Borrelia* représentant la région géographique à étudier, il serait bon d'effectuer des tests sérologiques en utilisant les isolats locaux comme antigène. *B. garinii* n'a été identifiée qu'à des prévalences faibles chez les tiques d'Afrique du Nord, mais cette espèce a montré une grande réactivité avec les sérums de patients par rapport aux autres espèces de *B. burgdorferi* sl. *B. garinii* peut provoquer donc une infection et le développement d'anticorps chez l'homme, alors que *B. lusitaniae* pourrait être non pathogène et peut-être non infectieuse pour l'homme. Cela pourrait aussi être dû aux contacts des patients avec des stades immatures surtout les nymphes qui sont peut-être, au Maroc, plus infectées par *B. garinii* que les adultes. Mais notons que ceci n'a pas été observé en Tunisie. Younsi et al. (2001) ont montré que le DNA des spirochètes identifiés chez les nymphes et les larves appartient à *B. lusitaniae*. Donc des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle épidémiologique des stades immatures d'*I. ricinus* au Maroc.

Plusieurs auteurs ont démontré que selon les stades cliniques de la maladie, les sérums des patients présentent des réactions variées face aux différents antigènes (Wilske et al. 1991, Ma et al. 1992, Assous et al. 1993, Zöller et al. 1993, Hauser et al. 1997). Malheureusement dans le cas de nos sérums de patients l'information concernant les manifestations cliniques n'a pas été communiquée.

Zöller et al. (1993) ont rapporté que la réponse immune précoce de la maladie de Lyme est principalement déclenchée contre la P41, alors que dans le stade tardif, un grand nombre de protéines immunogènes entre en jeu, avec entre autres, la P94 qui correspond dans notre étude à la P90. Dans notre étude la P41 apparaît chez les sujets de contrôle avec une fréquence d'apparition qui atteint 100%. Elle est accompagnée d'un certain nombre de bandes chez les sérums de patients qui varie selon la souche utilisée. Pour *B. garinii*, en plus de la P41 s'ajoute pour les sérums de patients une réactivité contre la P90, P39. Zöller et al. (1993) ont constaté que la réactivité de P39 augmente continuellement du premier

stade au troisième stade de la borréliose de Lyme. Selon Ma et al. (1992), cette protéine a été reconnue par 84.2% des patients avec manifestations cliniques de la borréliose de Lyme. Nos sérums de patient ont réagi, mais avec une intensité faible contre la P90 de *B. garinii* uniquement. Cette protéine est considérée comme l'un des marqueurs du stade tardif de la borréliose de Lyme, généralement, elle est non détectable avant la 8<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> semaine après le début de la maladie (Hauser et al. 1997).

L'Osp A et l'OspB ont réagi avec 67% des cas en utilisant *B. garinii* comme antigène, et avec 50% et 17% respectivement des cas en utilisant *B. afzelii* comme antigène. Lorsque *B. burgdorferi* ss a servi d'antigène 92 % des patients ont réagi contre l'OspA uniquement. Dressler et al. (1994) ont démontré que les patients atteints d'arthrite ont une réactivité forte avec l'OspA ou l'OspB ou les deux à la fois. De même, Assous et al. (1993) ont rapporté que les patients atteints d'arthrite ont une réactivité forte avec l'OspA et l'OspB de *B. burgdorferi* ss. L'OspC, ne se rencontre que dans de rares cas, chez *B. burgdorferi* ss uniquement, elle a été rapportée dans 8% des cas. Cette protéine est considérée comme une des premières protéines reconnues par le système immunitaire au cours de la maladie (Cinco et al. 1996, Wilske et al. 1991 ). Pour *B. lusitaniae*, les sérums de nos patients ont réagi dans la majorité des cas avec P41 et l'OspB, alors que dans une étude Zeidner et al. (2001) ont démontré que les souris de laboratoire infectées par *B. lusitaniae* montrent une réactivité contre l'OspC et la P41.

Plusieurs auteurs ont démontré que les sérums qui proviennent des patients souffrant de neuroborréliose et/ou de paralysie faciale ont une réactivité préférentielle avec *B. garinii*, alors que les patients avec symptôme cutané ou arthrite réagissent contre *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss respectivement (Cinco et al. 1996, Norman et al. 1996, Assous et al. 1993, Péter et al. 1997, Demaerschalck et al. 1995, Van Dam et al. 1993). Ceci peut confirmer le travail de Ouhabi et al. (1994) qui a rapporté la présence de paralysies faciales au Maroc qui sont peut être dues à l'infection par *B. garinii*, antigène qui dans notre étude a montré une grande réactivité avec les sérums de patients.

Le diagnostic sérologique canin contre la borréliose de Lyme reste compliqué à cause de l'exposition des chiens à une variété d'antigènes qui montrent des réactions croisées avec ceux de la borréliose de Lyme, on peut citer les Tréponèmes et les leptospires. De manière similaire, signalons que le diagnostic sérologique peut être compliqué par un vaccin contre la borréliose de Lyme qui permet aux chiens de développer des réponses d'anticorps contre l'OspA, l'OspB (Guerra et al. 2000), même si ce cas de figure ne se présente pas au Maroc. Dans notre étude, les sérums de chiens ont montré une réponse contre les protéines immuno - dominantes caractéristiques de la borréliose de Lyme (Hauser et al. 1997, Zöller et al. 1993).

Hovius et al. (2000) dans une étude comparant la réactivité des sérums de chiens asymptomatiques avec celle de sérums de chiens symptomatiques en utilisant les trois espèces pathogènes de *B. burgdorferi* sl: *B. garinii*, *B. afzelii* et *B. burgdorferi ss* ont constaté que les protéines P41 et P39 apparaissent à la fois chez les chiens asymptomatiques et symptomatiques et ces auteurs considèrent ces deux protéines comme marqueurs d'exposition à la borréliose de Lyme. Ces mêmes auteurs ont rapporté que pour les sujets symptomatiques, la réponse est surtout dirigée contre les antigènes P75 (qui correspond à P72 dans notre cas), P58, P50, P30 et l'OspC pour *B. garinii*. Dans le cas de nos sérums de chiens l'information concernant les manifestations cliniques n'est pas connue. En revanche avec *B. garinii* comme antigène 52% des cas ont montré une réactivité contre la P72, 8% des cas contre la P58 et 28% des cas contre la P30 respectivement et 4% des cas ont montré une réponse contre l'OspC.

Guerra et al. (2000) dans une étude comparant la réactivité des sérums de chiens naturellement infectés par *B. burgdorferi* avec celle de sérums de chiens vaccinés contre la Borréliose de Lyme ont rapporté que la P58 et P37 et la P30 sont très fréquentes avec les sérums de chiens naturellement infectés par contre la réactivité de la P93 (qui correspond à la P90 dans notre étude) P34, P31 et P28 augmentent fréquemment chez les chiens vaccinés.

Des cas humains de la maladie de Lyme ont été diagnostiqués en Afrique du Nord, (Rousselle et al. 1989, Aoun et al. 1992, Ouhabi et al. 1994), mais aucun cas de borréliose de Lyme chez les animaux n'a été rapporté. En revanche Bouattour et al. (2001) dans une étude en Tunisie ont inoculé expérimentalement trois chiens avec *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. burgdorferi ss* afin de déterminer le pouvoir pathogène de deux souches isolées en Tunisie : *B. garinii* et *B. lusitaniae*. Ils ont constaté une absence de manifestation clinique chez ces trois chiens, par contre, ils ont observé une variation au niveau hématologique et biochimique surtout avec *B. lusitaniae*.

Cette enquête sérologique montre que les sérums humains et ceux des chiens présentent des anticorps anti-*Borrelia*, surtout contre *B. garinii*. Benjelloun (1985) dans une étude au Maroc a rapporté la présence de la fièvre récurrente sur tout le territoire marocain à l'exception de quatre régions avec le plus de cas à Taza et Kenitra. Ceci peut causer un problème pour la spécificité de diagnostic de la borréliose de Lyme au Maroc. Donc une étude sur les réactions croisées entre la fièvre récurrente et la borréliose de Lyme serait nécessaire.

## Conclusion

Ce travail a permis de démontrer la présence du risque de contracter une borréliose de Lyme au Maroc, et a également apporté des informations sur la dynamique des agents de la maladie dans ce pays d' Afrique du Nord.

- *I. ricinus* est le vecteur de la borréliose de Lyme au Maroc. Sa répartition spatiale est limitée au Nord du Maroc, au moyen Atlas occidental dans des foyers où le climat est humide et la végétation est favorable à la quête. *I. ricinus* montre une activité hivernale, avec une diapause estivale.
- La prévalence d'infection par *B. burgdorferi* si est similaire à celle rapportée en Europe.
- Trois espèces de *Borrelia* ont été isolées dans le même foyer au Maroc, *B. garinii*, *B. burgdorferi* ss et *B. lusitaniae*. Mais *B. lusitaniae* reste dominante.
- L'étude sérologique a démontré la présence d'anticorps anti-*borrelia* dans les sérums de patients et de chiens

Bien que cette étude ait contribué à apporter des informations importantes sur les risques de la borréliose de Lyme au Maroc plusieurs points restent à clarifier pour bien comprendre l'épidémiologie de cette maladie, son cycle de transmission et la relation entre les trois principaux protagonistes de la maladie: le pathogène, le vecteur et l'hôte dans les régions endémiques du Maroc.

Il est désormais important de poursuivre des recherches surtout en ce qui concerne :

- La densité et la distribution géographique des stades immatures d'*I. ricinus* et leur infection par *B. burgdorferi* si et surtout pour les nymphes parce que ce stade pique souvent les humains.
- La variation saisonnière des tiques infectées puisque la transmission de la borréliose de Lyme est étroitement associée avec les périodes d'apparition d'*I. ricinus* infectés.
- Les hôtes réservoirs qui permettent d'amplifier et de maintenir les populations d'*I. ricinus* infectées au Maroc doivent encore être identifiés, ainsi il faudrait absolument trouver l'hôte réservoir de *B. lusitaniae* espèce dominante au Maroc.
- De même, il est impératif d'avertir les médecins et les biologistes sur la présence de *B. burgdorferi* dans les tiques au Maroc, et de demander des tests sérologiques aux patients suspects de borréliose de Lyme afin de mieux dépister et diagnostiquer cette maladie au Maroc.

## RESUME.

La borréliose de Lyme est une maladie multisystémique chez l'homme, due à des spirochètes appartenant à *Borrelia burgdorferi* sensu lato transmise par des tiques du genre *Ixodes ricinus*. Cette maladie est répandue en Amérique du Nord, en Europe, en Asie et en Afrique du Nord. Onze espèces de *Borrelia* ont été décrites dans le complexe *B. burgdorferi* sl. Celles-ci sont distribuées dans différentes régions du globe et maintenues dans la nature à travers différents cycles de transmission.

Dans notre étude, l'agent pathogène de la borréliose de Lyme a été isolé à partir d'*I. ricinus* de différentes régions en Suisse occidentale et du Tessin. La densité des tiques en quête ainsi que la prévalence d'infection d'*I. ricinus* varient considérablement selon les régions d'études mais elles restent plus faibles au Tessin qu'en Suisse occidentale. *B. burgdorferi* sl a montré une distribution hétérogène entre les différentes régions d'études. Les cinq espèces rencontrées en Europe : *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* ss, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, ont été isolées des tiques en Suisse. Au Tessin cette hétérogénéité est moins importante avec l'absence de *B. afzelii* et *B. burgdorferi* ss.

Dans la forêt de Chaumont (Neuchâtel) nous avons observé que la densité d'*I. ricinus* en quête est influencée par l'altitude: elle diminue avec l'altitude qui augmente et varie selon les années, à l'exception du site le plus haut où elle reste stable. De même la prévalence d'infection des nymphes d'*I. ricinus* diminue avec l'altitude qui augmente, et elle est stable au cours des années, alors que pour les adultes, la prévalence d'infection n'a pas été directement liée à l'altitude, mais diminue avec la diminution de la densité. La plus grande diversité des espèces de *Borrelia* a été observée à basse altitude et elle diminue avec l'altitude qui augmente.

Dans la dernière partie du travail, une étude de la borréliose de Lyme a été réalisée au Maroc. Elle a révélé qu'*I. ricinus* est le vecteur principal de la maladie. Sa prévalence d'infection par *B. burgdorferi* sl est similaire à celle rapportée en Europe, et nous avons identifié pour la première fois la présence de *B. burgdorferi* sl au Maroc, et de *B. burgdorferi* ss en Afrique du Nord.

En outre, nous avons pu montrer la présence d'anticorps anti-*borrelia* dans les sérums de patients et dans ceux de chiens provenant du Maroc.

## REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements à toutes les personnes qui par leur aide, soutien confiance et générosité, ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements au Dr Lise Gern pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour la réalisation de ce projet, pour sa disponibilité, sa patience, ses conseils, ses encouragements et son soutien permanent.

Je tiens à remercier infiniment le Pr. Bruno Betschart de m'avoir offert la possibilité de travailler dans le cadre du laboratoire de parasitologie et de contribuer à ce projet de recherche, et d'avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse.

J'aimerais aussi remercier infiniment le Dr Olivier Péter et le Dr Daniel Postic d'avoir accepté d'être membres du jury de cette thèse

Je tiens aussi à exprimer mes vifs remerciements à :

Olivier Rais pour son aide, sa disponibilité, sa gentillesse et pour m'avoir appris des techniques.

Chang Min Hu et Yves Cheminade pour leurs aides, et leurs assistances concernant la technique de la PCR.

M. Yves Moosmann pour sa sympathie, son aide et aussi pour ses conseils dans le diagnostic sérologique.

Mme Emmanuelle Medjitna pour son aide et sa gentillesse.

Dr Jim Keirans pour l'identification d' *I. ricinus* du Maroc.

Dr Hamid Sarih pour la récolte des tiques au Maroc.

Dr Abdelfattah Chakib pour nous avoir fourni aimablement des sérums humains.

Dr Mariam El Amranie pour nous avoir fourni aimablement des sérums de chiens.

Toutes les personnes qui nous ont aidée dans les sorties sur le terrain au Maroc.

Mme Jaqueline Moret pour sa précieuse collaboration lors de traitement statistique de données.

Dr Mahmoud Bouzelboudjen pour son aide en cartographie.

Jean-Luc Perret pour sa sympathie et pour ses aides en statistique et en informatique et les discussions scientifiques et autres.

Pierre-Francois Humair, Mara Crippa, Véronique Douet et Francisca Moran, Ferial Aladine, Naceur pour leurs aides, sympathies, leurs encouragements et leurs amitiés.

Brigitte Cattin et Natacha Schneiter pour leurs sympathies et leurs aides administratives.

Josiane Pont pour son aide dans la recherche bibliographique.

M. Marcial Renaud, pour son aide et sympathie.

Tous mes collègues de parasitologie et d'immunologie.

Tous mes amis de l'Institut de chimie et hydrogéologie à Neuchâtel

Je dirai merci aussi à tous les membres des laboratoires de parasitologie et d'immunologie pour toute l'aide et les conseils qu'ils m'ont donnés.

Enfin j'aimerais exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude à mes parents et à ma famille pour leur affection et leur soutien.

A mon mari Luca Curato pour son aide et ses encouragements.

A ma belle famille pour sa sympathie et son soutien.

Cette thèse a été effectuée avec l'aide de la Fondation Hoffmann-La Roche et L' Office fédéral de l'éducation et de la Science, La Commission fédérale des bourses pour étudiants étrangers et le Fonds National suisse de la Recherche scientifique.

## BIBLIOGRAPHIE

**Ackermann, R., Kabatzki, J., Boisten, H. P., Steere, A. C., Grodzicki, R. L., Hartung, S. and Runne, U.** 1984. *Ixodes ricinus* spirochete and European Erythema chronicum migrans disease. Yale. J. Biol. Med. 57:123-30.

**Aeschlimann, A.,** 1972. *Ixodes ricinus* L, Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse. Acta. Trop. 29:321-340.

**Aeschlimann, A., Chamot, E., Gigon, F., Jeanneret, J. P., Kesseler, D. and Walther, C.** 1986. *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. Zbl. Bakt. Hyg. A. 263:450-458.

**Aeschlimann, A., Brossard, M., Haug, T., and Rutti, B.** 1990. A survey of tick vaccines. Animal Research & Development 32: 52-189.

**Afzelius, A.,** 1910. Verhandlung der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. Arch. Dermatol. Syphilis. 101:405-6.

**Alitalo, A., Meri, T., Rämö, L., T. Jokiranta, S., Heikkilä, T., Seppälä, J. J. T., Oksi, J., Viljanen, M., and Meri, S.** 2001. Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resistant strains promote C3b inactivation. Infect. Immun. 69:3685-3691.

**Aoun, K., Kechrid, A., Lagha, N., Zarrouk and A., Bouzouaia, N.** 1998. La maladie de Lyme en Tunisie, résultats d'une étude clinico-sérologique (1992-1996). Santé, 8:98-100.

**Assous, M. V., D. Postic, G. Paul, P. Névoit, and Baranton G.** 1993. Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12:261-268.

**Bailly-Choumara, H., Morel, P. C. and Rageau, J.** 1974. Première contribution au catalogue des tiques du Maroc (*Acari, Ixodoidea*). Bull. Soc. Sci. ph. nat. Maroc. 54:71-81.

**Bailly-Choumara, H., Morel, P. C. and Rageau, J.** 1976. Sommaire des données actuelles sur les tiques au Maroc (*Acari: Ixodidae*). Bull. Inst. Sci., Rabat. 1:101-115.

**Bailly-Choumara, H., Morel, P. C. and Perez, C.** 1979-80. Deuxième contribution au catalogue des tiques du Maroc (*Acari, Ixodoidea*). Bull. Inst. Sci., Rabat. 4:1-12.

**Bannwarth**, A. 1941. Chronische lymphocytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und 'Rheumatismus'. Arch. Psychiatr. Nervenkr. 187:25.

**Baranton**, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J. C., Assous, M. and Grimont, P. A. D. 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov.; and group VS461 associated with Lyme borreliosis. Int. J. Syst. Bacteriol. 42:378-383.

**Barker**, I. K., Surgeoner, G. A., Artsob, H., Mcewen, S. A., Elliott, L. A., Campbell, D. and Robinson, J. T. 1992. Distribution of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) and isolation of *Borrelia burgdorferi* in Ontario, Canada. J. Med. Entomol. 29:1011-22.

**Barral**, M., Garcia-Perez, A. L., Juste, R. A., Hurtado, A., Escudero, R., Sellek, R. E. and Anda, P. 2002. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks from the Basque Country, Spain. J. Med. Ent. 39:177-184.

**Bellet-Edimo**, O. R., 1997. Importance de la transmission transstadiale et de la transmission transovarienne du spirochète *Borrelia burgdorferi* (spirochètales : Spirochaetaceae) chez la tique *Ixodes ricinus* (Acari : Ixodidae) dans l'épidémiologie de la borréliose de Lyme. Thèse, Université de Neuchâtel.

**Benjelloun**, T. J. E. 1985. Contribution à l'étude des borrélioses de Lyme au Maroc de 1964 à 1984). Thèse, Université de Hassan II à Casablanca.

**Bergström**, S., Noppa, L., Gylfe, A, and Östberg, Y. 2002. Molecular and cellular biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato In Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control, (ed. CAB International), pp. 47-90

**Bernasconi**, M. V., Valsangiacomo, C., Balmelli T., Péter O. and Piffaretti J. C. 1997. Tick zoonoses in the southern part of Switzerland (Canton Ticino): occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Rickettsia* sp. Eur. J. Epidemiol. 13: 209-215.

**Bouattour**, A., 2001. Les tiques de Tunisie : Rôle de *Hyalomma detritum* dans la transmission de *Theileria annulata*, Thèse, Université de Tunis El Manar, faculté des Sciences

**Bouattour**, A, Chabchoub, A, Sahli, J., Younsi, H., Landolsi, F., Ghorbel, A. and Messadi, L. 2001. Contribution à l'étude de l'effet pathogène, après inoculation expérimentale chez le chien de 2 souches de *Borrelia* (*Borrelia lusitaniae* et *Borrelia garinii*) isolées en Tunisie. Rev. Med. Vet. 152:291-296.

**Burgdorfer**, W., Barbour, A. G., Hayes, S. F., Benach, J. L., Grundwald, E. and J. P. Davis. 1982. Lyme disease: A tick-borne spirochetosis? Science. 216:1317-1319.

**Burgdorfer**, W., Barbour, A. G., Hayes, S., Péter, O. and Aeschlimann, A. 1983. Erythema migrans – A tick-borne spirochetosis. Acta tropica. 40:79-83.

**Canica**, M. M., Nato, F., Du Merle, L., Mazie, J. C., Baranton, G. and Postic, D. 1993. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. Scand. J. Infect. Dis. 25:441-448.

**Ciceroni**, L., Simeoni, J., Pacetti, A. I., Ciarrocchi, S., Cacciapuoti, B. 1996. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in sheep and goats. Alto Adige-South Tyrol, Italy. New. Microbiol. 19:171-4.

**Ciceroni**, L., Bartoloni, A., Ciarrocchi, S., Pinto, A., Guglielmetti, P., Valdez V. C., Gamboa B. H, Roselli M, Paradisi F. 1997. Serologic survey for antibodies to *Borrelia burgdorferi* in sheep, goats and dogs in Cordillera Province, Bolivia. Zentralbl. Veterina.rmed. B44:133-7.

**Ciceroni**, L, Ciarrochi, S, Ciervo, A., Mondarini, V.,Guzzo, F., Caruso, G., Murgia, R. and Cinco, M. 2001. Isolation and characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in an area of Italy where Lyme borreliosis is endemic. J.Clin.Microbiol. 39:2254-60.

**Cinco**, M., Padovan, D., Murgia, R., Poldini, L., Frusteri, L., van de Pol, I., N. Verbeek-De Kruif , Rijpkema, S. and Maroli, M. 1998. Rate of infection of *Ixodes ricinus* ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* and Group VS116 in an endemic focus of Lyme disease in Italy. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 17:90-94

**Cinco** M., Murgia R., Ruscio M. and Andriolo, B. 1996. IgM and IgG significant reactivity to *Borrelia burgdorferi* sensu sticto, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* among italian patients affected by Lyme arthritis or neuroborreliosis. FMS. Immun. and Medical Microbiol 14:159-166.

**Cotty, A.**, 1985. Clé de détermination des *Ixodidae* et *Amblyommidae* de Suisse, Université de Neuchâtel.

**Crippa, M., Rais, O., and Gern, L.** 2002. Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vect. Borne Zoon. Dis.* 2:3-9.

**Crippa, M.** 2003. Evolution de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, agent de la borréliose de Lyme dans la tique *Ixodes ricinus* et étude de sa transmission à l'hôte. Thèse, Université de Neuchâtel.

**Demaerschallck, I., Benmessaoud, A., Dekesel, M., Hoyois, B., Lobet, Y., Hoet, P., Bigaignon, G., Bollen, A. and Godfroid, E.** 1995. Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J. Clin. Microbiol.* 33:602-608.

**De Meeûs, T., Beati, L., Delaye, C., Aeschlimann A. and Renaud F.** 2002. Sex biased genetic structure in the vector of lyme disease, *Ixodes ricinus*. *Evolution*, 56:1802-1807

**De Michelis, S., Sewell, H. S., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Schouls, L. E., Benes, V., Holmes, E.C. and Kurtenbach, K.** 2000. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal *J. Clin. Microbiol.* 38:2118-2133.

**De Silva, A. M., and E. Fikrig.** 1995. Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53:397-404.

**De Silva, A. M., Zeidner, N. S., Zhang, Y., Dolan, M. C., Piesman, J. and Fikrig, E.** 1999. Influence of outer surface protein A antibody on *Borrelia burgdorferi* within feeding ticks. *Infect. Immun.* 67: 30-5.

**Dressler, F., Walen A. J., Reinhardt N. B., and Steere C. A.,** 1993. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 167:392-400.

**Dressler, F., Akermann R., and Steere C. A.** 1994. Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme borreliosis. *J. Infect. Dis.* 169:13-8.

- Eisen**, L. and Lane, R. S. 2002. Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control, (ed. CAB International), pp. 91-115.
- Escudero**, R., Barral, M., Perez, A. Vitutia, M. M., Garcia-Perez, A. L., Jimenez, S., Sellek, R.E. and Anda, P. 2000. Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. J. Clin. Microb. 38:4026-4033.
- Fingerle**, V., Hauser, U., Liegl, G., Petko, B., Preac-Mursic, V. and Wilske, B. 1995. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. J.Clin.Microbiol. 33:1867-9.
- Fraser**, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K. A., Dodson, R., Hickey, E. K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J. F., Fleischmann, R. D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A. R., Quackenbusch, J., Salzberg, S., Hanson, M., Van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M. D., Et Al. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. Nature. 11: 580-6.
- Fukunaga**, M., A. Hamase, K. Okada, and Nakao, M. 1996. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from *Ixodid* ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. Microbiol. Immunol. 40:877-881.
- Garin**, C. et Bujadoux R. 1922. Paralyse par les tiques. J. Méd. Lyon 71:765-767.
- Gern**, L., Lebet, N. and Moret, J. 1996. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* infection in nymphal *Ixodes ricinus* ticks during feeding. Exp. Appl. Acarol. 20:649-58.
- Gern**, L., Estrada-Pena, A., Frandsen, F., Gray, J. S., Jaenson, T. G. T, Jongejan, F., Kahl, O., Korenberg, E., Mehl, R., Nuttall, P. A. 1998. European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Zbl. Bakt. 287:196-204.
- Gern**, L., Hu, C. M., Kocianova, E., Vyrosteckova, V. and Rehacek, J. 1999. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. Eur.J . Epidemiol. 15:665-669.
- Gern**, L., Humair, P. F. 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In: *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control* (ed. Gray, J., Kahl, O., Lane, R.S. & Stanek, G.) p. 149- 174. CABI International, Wallingford, Oxon, U.K.

**Gern**, L., Bouattour, A., Younsi, H., Jouda, F., Godfroid, E., Alem, A., Sarih, M., Nuncio, S. and Postic, D. 2002. Lyme borreliosis in North Africa. Poster , IX International conference on Lyme Borreliosis and other tick-borne diseases, New York.

**Gigon**, F. 1985. Biologie d' *Ixodes ricinus* L. sur le Plateau Suisse – Une contribution à l'écologie de ce vecteur. Thèse, Université de Neuchâtel.

**Gilot**, B., Guiguen, C., Degeilh, B., Doche, B., Pichot, J. and Beaucournu, J. C. 1994. Phytoecological mapping of *Ixodes ricinus* as an approach to the distribution of Lyme borreliosis in France. In:JS Axford, DHE Rees(ed), Lyme Borreliosis,Plenum Press New York, pp 105-112.

**Gilot**, B., Degeilh, B., Pichot, J., Doche, B. and Guiguen, C. 1996. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) in *Ixodes ricinus* (L.) populations in France, according to a phytoecological zoning of the territory. Eur. J. Epidemiol. 12:395-401.

**Gray**, J. S., Kahl, O., Janetzki C., and Stein J. 1992. Studies on the ecology of Lyme disease in a deer forest in County Galway, Ireland. J. Med. Entomol. 29:915-920.

**Gray**, J. S., Cutler, S., Robertson, J. and O'connell, S. 1995a. Lyme disease in the Republic of Ireland. WHO Workshop on Lyme Borreliosis Diagnosis and Surveillance.Warsaw, Poland. pp. 6.

**Gray**, J. S., Kahl, O., Janetzki, C., Stein, J.and Guy, E. 1995b. The spatial distribution of *Borrelia burgdorferi*-infected *Ixodes ricinus* in the Connemara region of County Galway, Ireland. Exp. Appl. Acarol. 19:163-172.

**Gray**, J. S., Kahl, O., Robertson, J. N., Daniel, M., Estrada-Pena ,A., Gettinby, G., Jaenson, T. G., Jensen, P., Jongejan, F., Korenberg, E., Kurtenbach, K. and Zeman, P. 1998. Lyme borreliosis habitat assessment. Zbl. Bakt. 287:211-228.

**Gray**, J. S., Kirstein, F., Robertson, J. N., Stein, J., and Kahl, O. 1999. *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in a recreational park in south-western Ireland. Exp. Appl. Acarol. 23:717-729.

**Guerra, M. A., Walker, E. D. and Kitron, U. 2000.** Quantitative approach for the serodiagnosis of canine Lyme disease by the immunoblot procedure. *J. Clin. Microbiol.* 38:2628-32.

**Gustafson, R., Jaenson, T.G.T., Gardulf, A., Mejlom, H. and Svenungsson, B. 1995.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu late infection in *Ixodes ricinus* in Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.* 27:597-601.

**Hauser, U., Lehnert G., Lobentanzer R., and Wilske, B. 1997.** Interpretation criteria for standardized Western blot for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *J. clin. Microbiol.* 35 :1433-1444.

**Hilton, E., Devoti, J., and Sood, S. 1996,** Recommendation to include OspA and OspB in the new immunoblotting criteria for serodiagnosis of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 34:1353-1354.

**Hoogstraal, H., 1956.** African *Ixodoidea*. Ticks of the Soudan. Edit. Dep. Navy. Washington, DC.

**Hoogstraal, H., 1985.** *Argasidae* and *Nutalliellidae* parasites and vectors. *Adv. Parasitol.* 24: 135-238.

**Hovius, J. W. R., Hovius, K. E., Oei, A., Houwers D. J. and Van Dam, A. P. 2000.** Antibodies against specific proteins of and immobilizing activity against three strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato can be found in symptomatic but not infected asymptomatic dogs. *J. Clin. Microbiol.* 38:2611-21.

**Hu, C. M., Simon, MM., Kramer MD. and Gern, L. 1996.** Tick factors and *in vitro* cultivation influence the protein profile, antigenicity and pathogenicity of a cloned *Borrelia garinii* isolate from *Ixodes ricinus* hemolymph. *Infect.* 24:251-7.

**Hu, C. M., Humair, PF., Wallich R. and Gern, L. 1997.** *Apodemus* sp. rodents, reservoir hosts for *Borrelia afzelii* in an endemic area in Switzerland. *Zbl. Bakt.* 285:558-64.

**Hu, CM., Wilske, B., Fingerle, V., Lobet, Y. and Gern, L. 2001.** Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. *J. Clin. Microbiol.* 39:1169-71.

**Hubalek, Z.** and Halouzka, J. 1997. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Europ.J.Epid.* 13: 951-957.

**Hubalek, Z.** and Halouzka, J. 1998. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit. Res.* 84:167-172.

**Huegli, D.,** Hu, C. M., Humair, P. F., Wilske, B. and Gern, L. 2002. *Apodemus* species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 40:4735-7.

**Humair, P. F.,** Turrian, N., Aeschlimann, A. and Gern, L. 1993a. *Ixodes ricinus* immatures on birds in a focus of Lyme borreliosis. *Folia Parasitol.* 40:237-42.

**Humair, P. F.,** Turrian, N., Aeschlimann, A. and Gern, L. 1993b. *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: epizootiologic contribution of small mammals. *Folia Parasitol.* 40:65-70.

**Humair, P. F.,** Péter, O., Wallich, R. and Gern, L. 1995. Strain variation of Lyme disease spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in two endemic areas in Switzerland. *J. Med. Entomol.* 32:433-8.

**Humair, P. F.,** Postic, D., Wallich, R. and Gern, L. 1998. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. *Zentbl. Bakt.* 287:521-538.

**Humair, P. F.,** 1998. Circulation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato between its hosts and its vector, *Ixodes ricinus*, Thèse, Université de Neuchâtel.

**Humair, P. F.** and Gern, L. 2000. The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. *Microb. Infect.* 2:915-922.

**Jensen, P. M.** 2000. Seasonal and geographical abundance of *Ixodes ricinus* and Lyme borreliosis risk assessment in Denmark. PhD thesis, Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Denmark.

**Johnson, R. C.,** Schmid, G.P., Hyde, F.W., Steigerwalt, A.G. and Brenner, D.J. 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. etiologic agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:496-497.

**Jouda, F., Crippa, M., Perret, J. and Gern L.** 2003. Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of Canton Ticino (Switzerland). Eur. J. Epid. 18:907-912

**Jouda, F., Perret, J. and Gern, L.** 2003, In press. Influence of altitude on *Ixodes ricinus* density, and on distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection.

**Junttila, J., Peltomaa, M., Soini, H., Marjamäki, M. and Viljanen, M. K.** 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. J. Clin. Microbiol. 37:1361-1365.

**Kaltenrieder, M., Hess, E., and Aeschlimann, A.** 1985. Zum Vorkommen der Zecke *Ixodes ricinus* L. (*Ixodoidea, Ixodidae*) in der Schweiz. Revue suisse Zool. 92:685–692.

**Kawabata, H., T. Masuzawa, and Y. Yanagihara.** 1993. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. Microbiol. Immunol. 37:843-848.

**Kirstein, F., Rijpkema, S., Molkenboer, M. and Gray J. S.** 1997a. The distribution and prevalence of *B. burgdorferi* genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Ireland. Eur. J. Epidemiol. 13:67-72.

**Kirstein, F., Rijpkema, S., Molkenboer, M. and Gray, J. S.** 1997b. Local variations in the distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks. Appl. Env. Microbiol. 63:1102-6.

**Korenberg, E. I.** 2000. Seasonal population dynamics of *Ixodes* ticks and tick-borne encephalitis virus. Exp. Appl. Acar. 24: 665-681.

**Korenberg, E.I., Kovalevskii Y.V., Levin M. L., Shchyogoleva T.V.** 2001. The prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes persulcatus* and *I. ricinus* ticks in the zone of their sympatry. Folia Parasitol (Praha), 48:63-8.

**Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Zipfel, P.F. and Brade, V.** 2001. Mechanism of complement resistance of pathogenic *Borrelia burgdorferi* isolates. Int. Immunopharmacology, 1:393-401.

**Kurtenbach**, K., Peacey, M., Rijpkema, S. G. T., Hoodless, A. N., Nuttall, P. A., and Randolph, S. E. 1998a. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl. Env. Microbiol.* 64:1169-74.

**Kurtenbach**, K., Sewell, H. S., Ogden, N. H., Randolph, S. E. and Nuttall, P. A. 1998b. Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infect. Immun.* 66:1248–1251.

**Kurtenbach**, K., Carey, D., Hoodless, A. N., Nuttall, P. A. and Randolph, S. E. 1998. Competence of pheasants as reservoirs for Lyme disease spirochetes. *J. Med. Entomol.* 35:77-81.

**Kurtenbach**, K., De Michelis, S., Sewell, H. S., Etti S., Schäfer, SM., Hails R., Collares-Pereira M., Santos-Reis M., Haniçová K., Labuda M., Bormane A., and Donaghy M. 2001. Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl. Env. Microbiol.* 67:4926-4929.

**Kurtenbach**, K., De Michelis, S., Etti, S. et al. 2002a. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato - the key role of host complement. *Trends Microbiol.* 10:74-9.

**Kurtenbach**, K. Schäfer, S. M., De Michelis, S., Etti, S. and Sewell, H. 2002b. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the vertebrate host. In *Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control*, (ed. CAB International), pp. 117–148.

**Kurtenbach**, K. Kurtenbach, K., Schafer, S. M., Sewell, H. S., Peacey, M., Hoodless, A., Nuttall, P. A. and Randolph, S. E. 2002c. Differential survival of Lyme borreliosis spirochetes in ticks that feed on birds. *Infect. Immun.* 70 :5893-5895

**Le Fleche**, A., Postic, D., Girardet, K., Péter, O. and Baranton, G. 1997. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:921-925.

**Leuba-Garcia** S., Kramer M. D., Walich, R. and Gern, L. 1994. Characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from different organs of *Ixodes ricinus* ticks collected in nature. *Zentralbl. Bakt.* 280:468–475.

**Li, M. Q., Masuzawa, T., Takada, N., Ishiguro, F., Fujita, H., Iwaki, A., Wang, HP., Wang, J. C., Kawabata, M. and Yanagihara, Y. 1998.** Lyme disease *Borrelia* species in northeastern China resemble those isolated from far eastern Russia and Japan. *Appl. Env. Microbiol.* 64 :2705-2709.

**Lipschütz, B. 1913.** Über eine seltene Erythemform (Erythema chronicum migrans). *Arch.Dermatol. Syphilis* 118:349-56.

**Ma, B., Christen, B., Leung, D., and Pelfery, V. C., 1992.** Serodiagnosis of Lyme borreliosis by Western immunoblot : Reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. *J. clin. Microbiol.* 30:370-376 .

**Marconi, R. T., Liveris D. and I. Schwartz. 1995.** Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J. Clin. Microbiol.* 33:2427-2434.

**Masuzawa, T., Takada, N., Kudeken, M., Fukui, T., Yano, Y., Ishiguro, F., Kawamura, Y., Imai, Y., and Ezaki, T. 2001.** *Borrelia sinica* sp nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1817-1824.

**Mejlon, H. A. and Jaenson, T. G. T. 1993.** Seasonal prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* in different vegetation types in Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.* 25:49-456.

**Mejlon, H. A. and Jaenson, T. G. T. 1997.** Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (*Acari: Ixodidae*). *Exp. Appl. Acar.* 21:747-754.

**Merler, S., Furlanello, C., Chemini, C. and Nicolini, G., 1996.** Classification tree methodes for analysis of mesoscale distribution of *Ixodes ricinus* (*Acari: Ixodidae*) in Trentino, Italian Alps. *J. Med. Entomol.* 33:888-893.

**Miserez, V., Gern, L. and Aeschlimann, A. 1990.** *Borrelia burgdorferi* in ticks of the Canton Tessin (Switzerland). *Parassitologia,* 32:293-299.

- Misonne**, M. C., Van Impe, G. and Hoet, P. P. 1998. Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in Belgium. J. Clin. Microbiol. 36:3352-3354.
- Miyamoto**, K. and Masuzawa, T. 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Japan and East Asia. In Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control, (ed. CAB International), pp. 201-222.
- Mizak**, B. and Krol, J. 2000. Analysis of polish isolates of *Borrelia burgdorferi* by amplification of (5S)-rrl (23S) intergenic spacer. Bull veterinary Inst Pulawy. 44:147-154.
- Nahimana** I., Gern L., Péter O., Praz G., Moosmann Y. and Francioli P. 2000. Epidémiologie de la borréliose de Lyme en Suisse romande. Schweiz. Med. Wochenschr. 130:1456-61.
- Nakao**, M., Miyamoto, K. and Fukunaga M. 1994. Lyme disease spirochetes in Japan: enzootic transmission cycles in birds, rodents, and *Ixodes persulcatus* ticks. J. Infect. Dis. 170:878-82.
- Nelson**, D. R., Rooney, S., Miller, N. J. and Mather, T. N. 2000. Complement-mediated killing of *Borrelia burgdorferi* by nonimmune sera from sika deer. J. Parasitol. 86:1232-8.
- Norman**, L. G., Antig, M. J., Bigaignon, G. , and Hogrefe R. W. 1996. Serodiagnosis of Lyme borreliosis by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* and *B. afzelii* Western blots (Immunoblots), J. Clin. Microbiol. 34:1732-1738.
- Ogden**, N. H., Carter, S. D. and Nuttall, P. A., 1994. Evidence for the transmission of the Lyme disease spirochete to sheep in Cumbria. Vet. Rec. 135:383-4.
- Olsen**, B., Jaenson T. G. T. and Bergström, S. 1995. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. Appl. Env. Microbiol. 61:3082-3087.
- Ouhabi**, H., I. Slassi, M. El Aloui-Frais, R. Mossadaq, M. Yahyaoui, and T. Chkili. 1994. Paralysie faciale et maladie de Lyme. Arch. Inst. Past. Maroc. 9:51-55.
- Pal**, U., De Silva, A. M., Montgomery, R. R., Fish, D., Anguita, J., Anderson, J. F., Lobet, Y., Fikrig, E. 2000. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. J. Clin. Invest. 106: 561-569.

**Papadopoulos**, B., Humair, P. F., Aeschlimann, A., Vaucher C., and Büttiker W. 2002. Ticks on birds in Switzerland. *Acarologia*, 42 :3-19.

**Peacock**, M., Burgdorfer, W. and Ormsbee R. A. 1971. Rapid fluorescent-antibody conjugation procedure. *Infect. Immun.* 3:355-7.

**Perret**, J. L., Guigoz, E., Rais, O. and Gern, L. 2000. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasit. Res.* 86:554-557.

**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.

**Péter**, O. and Bretz, G. 1992. Polymorphism of Outer Surface Proteins of *Borrelia burgdorferi* as a Tool for classification. *Zbl. Bakt.* 277:28-33.

**Péter**, O., Bretz, A. G. and Bee D. 1995. Occurrence of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodid* ticks of Valais, Switzerland. *Eur.J.Epidemiol.* 11:463-467.

**Péter**, O., Bretz, A. G., Postic D., Dayer E. 1997. Association of distinct species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with neuroborreliosis in Switzerland. *Clin. Microbiol. Infect.* 3: 423-431.

**Pichon**, B., Mousson, L., Figureau, C., Rodhain, F. and Perez-Eid, C. 1999. Density of deer in relation to the prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* nymphs in Rambouillet forest, France. *Exp. Appl. Acarol.* 23:267-75.

**Piesman**, J. 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in North America. In Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control, (ed. CAB International), pp. 223-249

**Postic**, D., Assous, M. V., Grimont, P. A. D. and Baranton G. 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:743-752.

**Postic**, D., Korenberg, E., Gorelova, N., Kovalevski, Y. V., Bellenger, E. and Baranton, G. 1997. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates. Res. Microb. 148: 691-702.

**Postic**, D., N. Marti Ras, R. S. Lane, M. Hendson, and G. Baranton. 1998. Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov (formerly *Borrelia* group DN127). J. Clin. Microbiol. 36:3497-3504.

**Quessada**, T., Martial-Convert, F., Arnaud, S., Leudet de la Vallee, H., Gilot, B. and Pichot, J. 2003. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Species and Identification of *Borrelia valaisiana* in Questing *Ixodes ricinus* in the Lyon Region of France as Determined by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 22 :165-173.

**Ramamoorthy**, R. and Scholl-Meeker, D. 2001. *Borrelia burgdorferi* proteins whose expression is similarly affected by culture temperature and pH. Infect. Immun. 69:2739-42.

**Randolph**, S. E., Green, R. M., Hoodless, A. N. and Peacey, M. F. 2002. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. Int. J. Parasitol. 32:979-989.

**Richter**, D., Endepols, S., Ohlenbusch, A., Eiffert H., Spielman, A. and Matuschka, F. R. 1999. Genospecies diversity of Lyme disease spirochetes in rodent reservoirs. Emerging. Infect. Dis. 5:291-296.

**Richter**, D., Schlee, D.B., and Matuschka, F.R. 2003. Relapsing Fever-Like Spirochetes Infecting European Vector Tick of Lyme Disease Agent. Emerg. Infect. Dis. 9:697-701

**Rizzoli**, A., Merler, S., Furlanello, C. and Genchi, C. 2002. Geographical information systems and bootstrap aggregation (bagging) of tree-based classifiers for Lyme disease risk prediction in Trentino, Italian Alps. J. Med. Entomol. 39:485-492.

**Robertson**, J., Guy, E., Andrews N., Wilske B., Anda P., Granström ., Hauser U., Moosmann Y., Sambri V., Schellekens J., Stanek G. and Gray J. 2000. A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. J. Clin. Microbiol. 38:2097-2102.

**Rousselle**, C., Floret, D., Cochat, P., Reignier, F., Wright, C. 1989. Encéphalite aiguë à *Borrelia burgdorferi* (maladie de Lyme) chez un enfant algérien. *Pédiatrie* 44: 265-9.

**Sarih**, M., Jouda, F., Gern, L., and Postic D. 2003. First isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks in Morocco. *Vect. Borne Zoon. Dis* 3:133-139.

**Schouls**, L. M., Van De Pol, I., Rijpkema, S. G. T. and Schot, C. S. 1999. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J. Clin. Microbiol.* 37:2215-22.

**Schwan**, T. G., Piesman, J. 2002. Vector interactions and molecular adaptations of Lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 115-121.

**Senevet**, G. et Rossi, P. 1924. Contribution à l'étude des Ixodidés (XII<sup>e</sup> note ) étude saisonnière des *Ixodidés* de la région de Bouira (Algérie). *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, 11 :223 - 232.

**Shanafelt**, C. M., Handersson, P., Soderberg, C., Mensi, N., Turck, W. C., Webb, D., Yssel, H., and Petelz G., 1991. T cell and antibody reactivity with the *Borrelia burgdorferi* 60-kda heat shock protein in Lyme arthritis. *J. Immun.* 146:3985-3992.

**Shih**, C. M. , Chang, H. M. , Chen S. L. and Chao, L. L. 1998. Genospecies identification and characterization of Lyme disease spirochetes of genospecies *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated from rodents in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 36:3127-32.

**Shih**, C. M. and Chao, L. L., 2002. An OspA-based genospecies identification of Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) isolated in Taiwan. *Am. J.Trop. Med. Hyg.* 66:611-5

**Simpson** W. J. , Cieplak, W., Schrumph, M. E., Barbour, A. G. and Schwan, T. G., 1994 Nucleotide sequence and analysis of the gene in *Borrelia burgdorferi* encoding the immunogenic P39 antigen. *FEMS Microbiol.Lett.*, 119:381-388.

**Sinsky**, R. J. and Piesman, J. 1989. Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. *J. Clin. Microb.* 27:1723-1727.

**Steele**, G. M. and Randolph, S. E. 1985. An experimental evaluation of conventional control measures against the sheep tick, *Ixodes ricinus* (L.) (*Acari: Ixodidae*). I. A unimodal seasonal pattern. Bull. ent. Res. 75:489-499.

**Steere**, A. C., Malawista, S. E., Hardin, J. A., Ruddy, S., Askenase, P. W., and Andiman, W. A. 1977. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: the enlarging clinical spectrum. Ann. Intern. Med. 86: 685-98.

**Steere**, A. C. and Malawista, S.E. 1979 Cases of Lyme disease in the United States: locations correlated with distribution of *Ixodes dammini*. Ann Intern. Med. 91: 730-3.

**Strle**, F., J. A. Nelson, E. Ruzic-Sabljić, J. Cimperman, V. Maraspin, S. Lotric-Furlan, Y. Cheng, M. M. Picken, G. M., Trenholme, and Picken, R. N. 1996. European Lyme borreliosis: 231 culture-confirmed cases involving patients with erythema migrans. Clin. Infect. Dis. 23:61-65

**Tälleklint**, L. and Jaenson, T. G. T., 1993. Maintenance by hares of European *Borrelia burgdorferi* in ecosystems without rodents. J. Med. Entomol. 30:273-6.

**Tälleklint**, L. and Jaenson, T. G. T., 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.

**Tälleklint**, L. and Jaenson, T.G.T 1996. Relationship between *Ixodes ricinus* density and prevalence of infection with *Borrelia* – like spirochetes and density of infected ticks. J. Med. Entomol. 33:805-811

**Trávnicek**, M., Stefancikova, A., Nadzamova D. Stanko, M., Cislakova, L., Pet'ko, B., Mardzinova, S., and Bhide, M. 2002. Seroprevalence of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in sheep and goats from mountainous areas of Slovakia. Ann. Agricult. Environm.Med. 9:153-5.

**Van Dam**, A. P., H. Kuiper, K. Vos, A. Widjojokusumo, B. M. de Jongh, L. Spanjaard, A. C. P. Ramselaar, Kramer, M. D. and Dankert, J. 1993. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. Clin. Infect .Dis. 17:708-717.

**Wang, G., Van Dam, A. P., Le Fleche, A., Postic, D., Péter, O., Baranton, G., De Boer, R., Spanjaard, L. and Dankert, J. 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). Int. J. Syst. Bact. 47:926-932.**

**Wang, G. Van Dam, A. P., Schwartz, I. and Dankert, J. Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications. 1999. Clin. Microbiol. Rev. 12:633-653.**

**Wegner, Z., Stanczak, J., Racewicz, M., Kubica-Biernat, B. and Kruminis-Lozowska, W. 1997. The etiological agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*, in ticks (*Acarini: Ixodidae*) from Eastern Poland. Zentbl. Bakt. 286:93-106**

**Wicki, R., Sauter P., Mettler C., Natsch A., Enzler T., Pusterla N., Kuhnert P., Egli G., Bernasconi M., Lienhard R., Lutz H., Leutenegger C.M. 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.**

**Wilske, B., Preac. M., V., Fuchs, R. and Soutschek, E. 1991. Immunodominant proteins of *Borrelia burgdorferi*, the etiological agent of Lyme borreliosis. World J. Microbiol. Biothechnol. 7:130-6.**

**Younsi, H., Postic, D., Baranton, G. and Bouattour, A. 2001. High prevalence of *Borrelia lusitaniae* in *Ixodes ricinus* ticks in Tunisia. Eur. J. Epidemiol. 17:53-56**

**Yousfi, M. R., and Aeschlimann, A. 1986 . Recherches sur les tiques (*Acarina, Ixodidea*), parasites de bovidés dans l'ouest Algérien. Ann. Parasit. Hum. Comp. 61:341-358.**

**Zeidner, N. S., Nuncio, M. S., Schneider, B. S., Gern, L., Piesman, J., Brandao, O. and Filipe, A. R. 2001. A Portuguese isolate of *Borrelia lusitaniae* induced disease in C3H/HeN mice. J. Med. Microbiol. 50:1055-60.**

**Zeman, P. and Daniel, M., 1999. Mosaic pattern of *Borrelia* infection in a continuous population of the tick *Ixodes ricinus* (*Acarini: Ixodidae*). Exp. Appl. Acarol. 23:327-335**

**Zhioua, E., Gern, L. and Aeschlimann, A. 1989. Isolement d'un spirochète à partir d'*Ixodes ricinus* de Tunisie. Bull. Soc. Franç. Parasitol. 7:107-10.**

**Zhioua**, E., Gern, L. and Aeschlimann A. 1990. Serological findings in relation with risk factors: a two year follow-up a population at risk. *Rev. Suisse Zool.* 97:783.

**Zhioua**, E., 1993. Enquête séroépidémiologique de la borréliose de Lyme chez une population Suisse à risques (coureurs d'orientation). Thèse, Université de Neuchâtel.

**Zhioua**, E., Aeschlimann, A. and Gern, L. 1994. Infection of field-collected *Ixodes ricinus* (*Acari: Ixodidae*) larvae with *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. *J. Med. Entomol.* 31:763-6.

**Zhioua**, E., Bouattour, A., Hu, C. M., Gharbi, M., Aeschlimann, A., Ginsberg, H. S. and Gern, L. 1999. Infection of *Ixodes ricinus* (*Acari: Ixodidae*) by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in North Africa. *J. Med. Entomol.* 36:216-218.

**Zöller**, L. , Cremer, J. and Faulde, M. 1993, Western blot as a tool in the diagnosis of Lyme borreliosis. *Electrophoresis*, 14:937-944.