

Etude sur la diversité génétique des tiques *Rhipicephalus sanguineus*
et *Ixodes ricinus*, et des agents pathogènes *Rickettsia* sp, *Coxiella*
sp, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Babesia* sp et le virus de
l'encéphalite à tique en Suisse.

Thèse présentée à la Faculté des Sciences
Laboratoire d'Eco-Epidémiologie de l'Institut de Zoologie
Université de Neuchâtel

Pour l'obtention du grade de docteur ès sciences

Par

Simona Casati

Acceptée sur proposition du jury:
Prof. Jean-Claude Piffaretti, directeur de thèse
Dr Lise Gern, directrice de thèse
Prof. Bruno Betschart, rapporteur
Prof. Peter Deplazes, rapporteur

Soutenue le 27 septembre 2005

Université de Neuchâtel

2005

IMPRIMATUR POUR LA THESE

Etude sur la diversité génétique des tiques *Rhipicephalus sanguineus* et *Ixodes ricinus*, et des agents pathogènes *Rickettsia* sp, *Coxiella* sp, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Babesia* sp et le virus de l'encéphalite à tique en Suisse

Simona CASATI

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

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

Mme L. Gern (directrice de thèse),
B. Betschart,
J.-C. Piffaretti (co-directeur de thèse) (Bellinzona)
et P. Deplazes (Zürich)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 14 novembre 2005

Le doyen :



J.-P. Derendinger

ABREVIATIONS	6
1. INTRODUCTION	7
1.1. Présentation des tiques <i>Ixodes ricinus</i> et <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.	7
1.1.1. Systématique	7
1.1.2. Cycle de vie (famille: <i>Ixodidae</i>)	9
1.1.3. <i>Ixodes ricinus</i>	11
1.1.3.1. Ecologie	11
1.1.3.2. Hôtes	11
1.1.4. <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato	11
1.1.4.1. Ecologie	11
1.1.4.2. Hôtes	12
1.2. Présentation des agents pathogènes	13
1.2.1. <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	13
1.2.1.1. Systématique et définition	13
1.2.1.2. Epidémiologie	16
1.2.1.3. Hôtes réservoirs	19
1.2.1.4. Transmission	20
1.2.1.5. Manifestations cliniques	20
1.2.1.6. Traitement et prévention	21
1.2.2. <i>Babesia</i> sp.	21
1.2.2.1. Systématique et définition	21
1.2.2.2. Epidémiologie	22
1.2.2.3. Hôtes réservoirs	23
1.2.2.4. Transmission	23
1.2.2.5. Manifestations cliniques	24
1.2.2.6. Traitement et prévention	24
1.2.3. Virus de l'encéphalite à tique	24
1.2.3.1. Systématique et définition	24
1.2.3.2. Epidémiologie	26
1.2.3.3. Hôtes réservoirs	26
1.2.3.4. Transmission	27
1.2.3.5. Manifestations cliniques	27
1.2.3.6. Traitement et prévention	28
1.2.4. <i>Rickettsia</i> sp.	28
1.2.4.1. Systématique et définition	28
1.2.4.2. Epidémiologie	29
1.2.4.3. Hôtes réservoirs	32
1.2.4.4. Transmission	32
1.2.4.5. Manifestations cliniques	32
1.2.4.6. Traitement et prévention	32

1.2.5.	<i>Coxiella burnetii</i>	33
1.2.5.1.	Systématique et définition	33
1.2.5.2.	Epidémiologie	33
1.2.5.3.	Hôtes réservoirs	34
1.2.5.4.	Transmission	34
1.2.5.5.	Manifestations cliniques	35
1.2.5.6.	Traitement et prévention	35
2.	BUTS	36
3.	MATERIEL ET METHODES	37
3.1.	Récolte des tiques et zones d'étude	37
3.2.	Récolte des <i>I. ricinus</i> en Suisse	37
3.3.	Récolte des <i>I. ricinus</i> hors de Suisse	39
3.4.	Récolte des <i>Rhipicephalus</i> sp. au Tessin	39
3.5.	Souches de référence	41
3.5.1.	<i>Rickettsia</i> sp.	41
3.5.2.	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	41
3.5.3.	<i>Babesia</i> sp.	43
3.5.4.	Virus TBE	43
3.6.	Extraction de l'ADN total des tiques	43
3.7.	Extraction de l'ARN total des tiques	43
3.8.	Extraction de l'ADN des micro-organismes	44
3.8.1.	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	44
3.8.2.	<i>Babesia</i> sp.	44
3.9.	PCR	44
3.9.1.	Principe de la PCR "classique"	44
3.9.2.	RT-PCR (transcriptase inverse PCR)	44
3.9.3.	RT-PCR (real-time PCR)	45
3.9.4.	Réactions PCR utilisées dans cette étude	45
3.10.	Electrophorèse sur gel d'agarose	46
3.11.	Purification des produits PCR	46
3.12.	Séquençage	46
3.13.	Analyse et comparaison des séquences obtenues	47
3.14.	Analyses phylogénétiques	47
4.	RESULTATS	49
4.1.	Publication I	50
	<i>Rhipicephalus</i> ticks infected with <i>Rickettsia</i> and <i>Coxiella</i> in Southern Switzerland (Canton Ticino)	

4.2. Publication II	61
Population genetics of <i>Ixodes ricinus</i> sensu stricto (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial DNA sequences	
4.3. Publication III	77
Diversity within <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato genospecies in Switzerland by <i>recA</i> gene sequence	
4.4. Publication IV	87
Presence of human pathogenic <i>Babesia</i> sp. in <i>Ixodes ricinus</i> in Switzerland	
4.5. Publication V	105
Diversity of tick-borne encephalitis virus population infecting <i>Ixodes ricinus</i> ticks in an endemic area of the central Switzerland (Canton Bern)	
5. DISCUSSION	121
5.1. La tique <i>R. sanguineus</i> sensu lato au Tessin vecteur de <i>R. Bar29</i> et de <i>Coxiella</i> endosymbionte	121
5.2. Etude de la population d' <i>I. ricinus</i> sensu stricto en Europe sur la base de l'ADN mitochondrial	124
5.3. Les populations de <i>B. burgdorferi</i> s.l. en Suisse	125
5.4. Présence de trois espèces de <i>Babesia</i> pathogènes pour l'homme en Suisse	127
5.5. La population du virus TBE chez <i>I. ricinus</i> dans le foyer naturel de Belp (canton Bern)	129
5.6. La variabilité des populations étudiées	130
RESUME	134
REMERCIEMENTS	135
BIBLIOGRAPHIE	136
ANNEXES	152

ABREVIATIONS

A	adulte
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
Ba	<i>B. afzelii</i>
Bb	<i>B. burgdorferi</i>
Bg	<i>B. garinii</i>
Bl	<i>B. lusitaniae</i>
Bv	<i>B. valaisiana</i>
Cp	plasmide circulaire
Da	Dalton
dNTP	désoxyribonucléosides-5'-triphosphates
ddNTP	didésoxy-ribonucléosides-5'-triphosphates
g	gramme
H ₂ O	eau
H ₂ O dem	eau déminéralisée
H ₂ O mst	eau filtrée (0.22 µm; Millipore) stérile
J	major
KDa	KiloDalton
L	larve
LC	LightCycler
Lp	plasmide linéaire
m ²	mètre carré
M	molaire
min	minute
mg	milligramme
ml	millilitre
mM	millimolaire
Mol	mole
mtDNA	ADN mitochondrial
N	minor
µg	microgramme
µl	microlitre
µm	micromètre
N	nymphé
ng	nanogramme
nm	nanomole
bp	paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
rDNA	ADN ribosomique
rRNA	ARN ribosomique
RT-PCR	reverse transcriptase - polymerase chain reaction
rpm	tours par minute
sec	seconde
SEQ	séquençage
s.l.	sensu lato
SN	surveillance
sp.	espèce
SR	souche de référence
s.s.	sensu stricto
TA	température ambiante
UV	ultraviolet
V	volt
°C	degré Celsius

1. INTRODUCTION

Les tiques sont couramment considérées comme le vecteur de maladies infectieuses pour l'homme le plus important dans le monde entier, juste après les moustiques (Parola et Raoult, 2001). En Europe, *Ixodes ricinus* peut transmettre plusieurs organismes pathogènes comme la bactérie *Borrelia burgdorferi* sensu lato (responsable de la borréliose de Lyme), le protozoaire *Babesia* sp. (responsable de la babésiose) et le virus TBE (responsable de l'encéphalite à tique). Cette tique est largement répandue en Suisse (Aeschlimann, 1972).

Probablement en raison de changements climatiques, un nouveau vecteur, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, a colonisé le sud de la Suisse, et plus précisément le Tessin (Bernasconi et al., 1997). Cette tique est connue pour transmettre *Rickettsia conorii* (bactérie responsable de la fièvre boutonneuse), d'autres *Rickettsia* pathogènes ou potentiellement pathogènes et *Coxiella burnetii* (bactérie responsable de la fièvre Q).

1.1. Présentation des tiques *Ixodes ricinus* et *Rhipicephalus* sp.

1.1.1. Systématique

Les tiques ne sont pas des insectes. Elles sont apparentées aux araignées et aux scorpions et appartiennent à l'ordre des *Acari*, plus précisément au sous-ordre *Ixodida* (*Metastigmata*). Ce dernier comprend 3 familles, les *Ixodidae*, les *Argasidae* et les *Nuttalliellidae* (Fig. 1). La famille des *Ixodidae* est la plus grande avec 13 genres et 694 espèces répandues dans le monde entier; elle est la plus importante du point de vue économique et joue un rôle médico-vétérinaire considérable. Cette famille est caractérisée par la présence d'une plaque sclérifiée (scutum) sur la partie dorsale du corps, d'où le nom de tiques dures; chez les larves, nymphes et femelles elle recouvre la partie antérieure du corps, tandis qu'elle recouvre toute la surface dorsale chez les mâles. Le corps est formé de deux parties: l'avant se nomme le capitulum et l'arrière l'idiosome. Les tiques *Ixodes* constituent le seul genre de la sous-famille *Ixodinae* et donc de la lignée des *Prostriata*. Le genre *Rhipicephalus* se situe dans la lignée des *Metastriata*, dans la sous-famille des *Rhipicephalinae*.

Les membres de la famille des *Argasidae*, 5 genres et 170 espèces, ne présentent pas un scutum sclérifié (tiques molles). De plus, le capitulum est situé en position ventrale et le corps a une forme ovale. L'intérêt médico-sanitaire n'est pas négligeable, bien que nettement moins important que celui des Ixodidés.

Seule une espèce qu'on retrouve en Afrique appartient à la dernière famille des *Nuttalliellidae*: elle n'a aucun intérêt en santé humaine (Parola et Raoult, 2001; Sonenshine, 1991a).

Embranchement *Arthropoda*

Classe *Chelicerata*

Sous-classe *Arachnida*

Ordre *Acari*

Sous-ordre *Ixodida (Metastigmata)*

Famille *Argasidae*
Nuttalliellidae
Ixodidae

Sous-famille

Genre

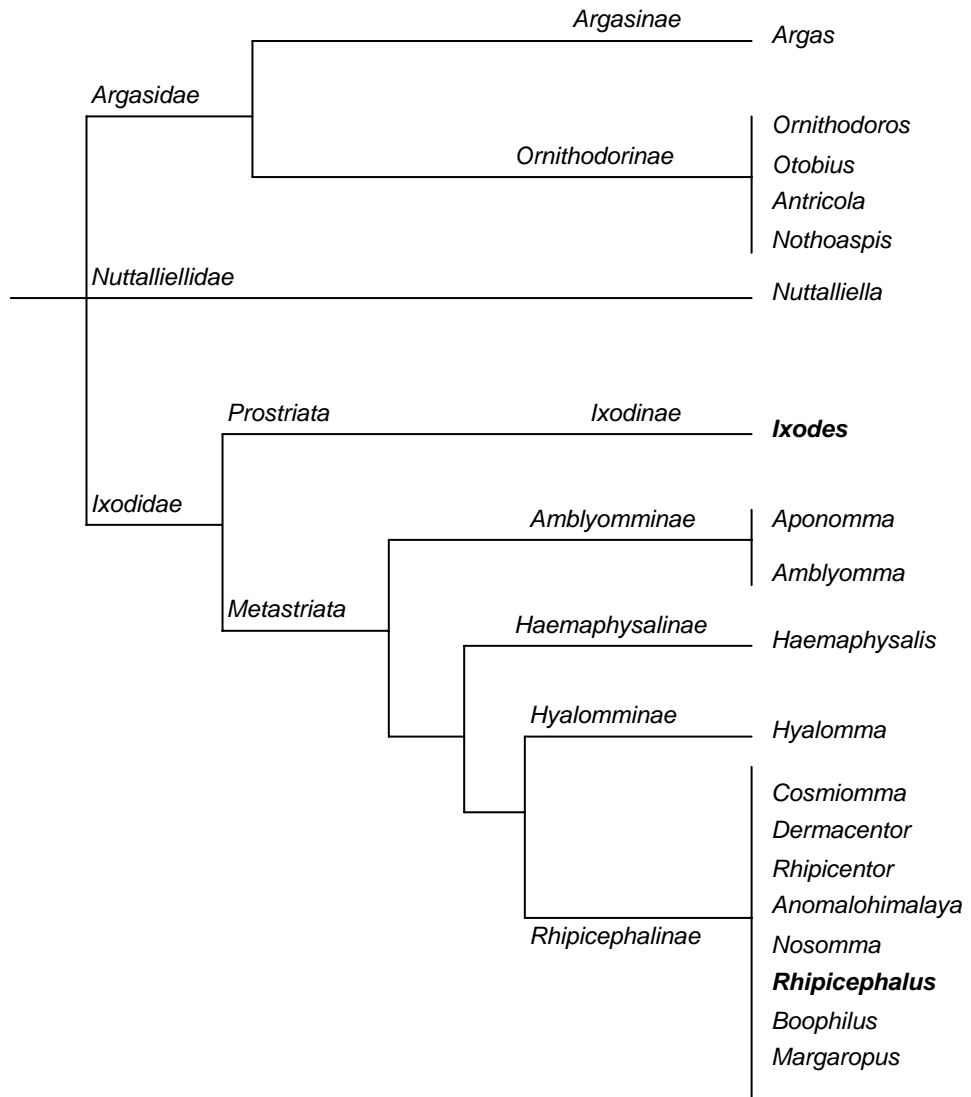


Fig.1. Classification des tiques selon Hoogstraal (Parola et Raoult, 2001; Sonenshine, 1991a).

Les tiques transmettent une grande variété de micro-organismes pathogènes: bactéries, virus et protozoaires. Une des raisons pour lesquelles ces arthropodes sont des bons vecteurs est leur mode d'alimentation. En fait, les tiques sont des ectoparasites hématophages obligatoires qui prennent leur repas sanguin à chaque état de leur vie (larve, nymphe, adulte) sur les hôtes vertébrés et accidentellement sur l'homme. Pendant la phase de nutrition, le repas de sang est concentré par un processus d'extraction de l'eau, rejetée dans l'hôte grâce à des glandes salivaires spécialisées. Ce processus a un rôle très important dans l'infection de l'hôte, car cette eau peut contenir des organismes pathogènes (Gray, 2002; Nuttall et

Labuda, 2003). De plus, les tiques peuvent transmettre les pathogènes par les selles (par ex. *Coxiella burnetii*) (Parola et Raoult, 2001).

1.1.2. Cycle de vie (famille: *Ixodidae*)

Le cycle de vie de la tique se décompose en trois phases (cycle triphasique): larve, nymphe et adulte. Le dimorphisme sexuel est évident seulement à l'état adulte, seul moment où on peut distinguer la femelle du mâle. En général, le cycle de vie des tiques *Ixodidae* est uniforme pour toute la famille (fig. 2 et 3). A chaque phase, pour effectuer son cycle de développement, la tique se nourrit de sang, élément indispensable à la transformation vers la phase suivante ou à la production et à la ponte des œufs chez les femelles. De ces œufs sortent les larves hexapodes qui vont chercher un hôte vertébré sur lequel prendre un repas de sang. Les larves gorgées se détachent de l'hôte et se laissent tomber au sol où a lieu la mue. Les nymphes octopodes, résultat de la mue, attendent le passage d'un hôte pour se nourrir. Après avoir pris le repas de sang, elles vont muer au sol en adultes, femelles ou mâles. Une dernière fois, les adultes prennent un repas de sang: les mâles se nourrissent très peu ou pas du tout, tandis que les femelles peuvent se dilater jusqu'à atteindre 100 fois leur poids. L'accouplement pour les *Ixodes* se fait généralement au sol; par contre pour les *Metastriata*, il se fait sur l'hôte et pendant le repas sanguin. Parmi les différences entre les tiques *Ixodes* et *Rhipicephalus*, on peut mentionner la préférence de *Rhipicephalus* pour le chien comme hôte (d'où le nom "brown dog tick") et le déroulement du cycle de vie à l'intérieur par exemple d'une maison ou d'une niche et non pas à l'extérieur dans la végétation.

Ce cycle de vie triphasique, sous des conditions environnementales favorables, peut être achevé en une année. Dans certains cas, les conditions climatiques et la diapause peuvent différer la recherche de l'hôte, le développement ou la ponte: ainsi un seul stade de vie peut être effectué par année. Ces limitations peuvent prolonger la durée du cycle de vie jusqu'à trois années ou même plus (2-6 années) (Eisen et Lane, 2002; Parola et Raoult, 2001; Sonenshine, 1991a).

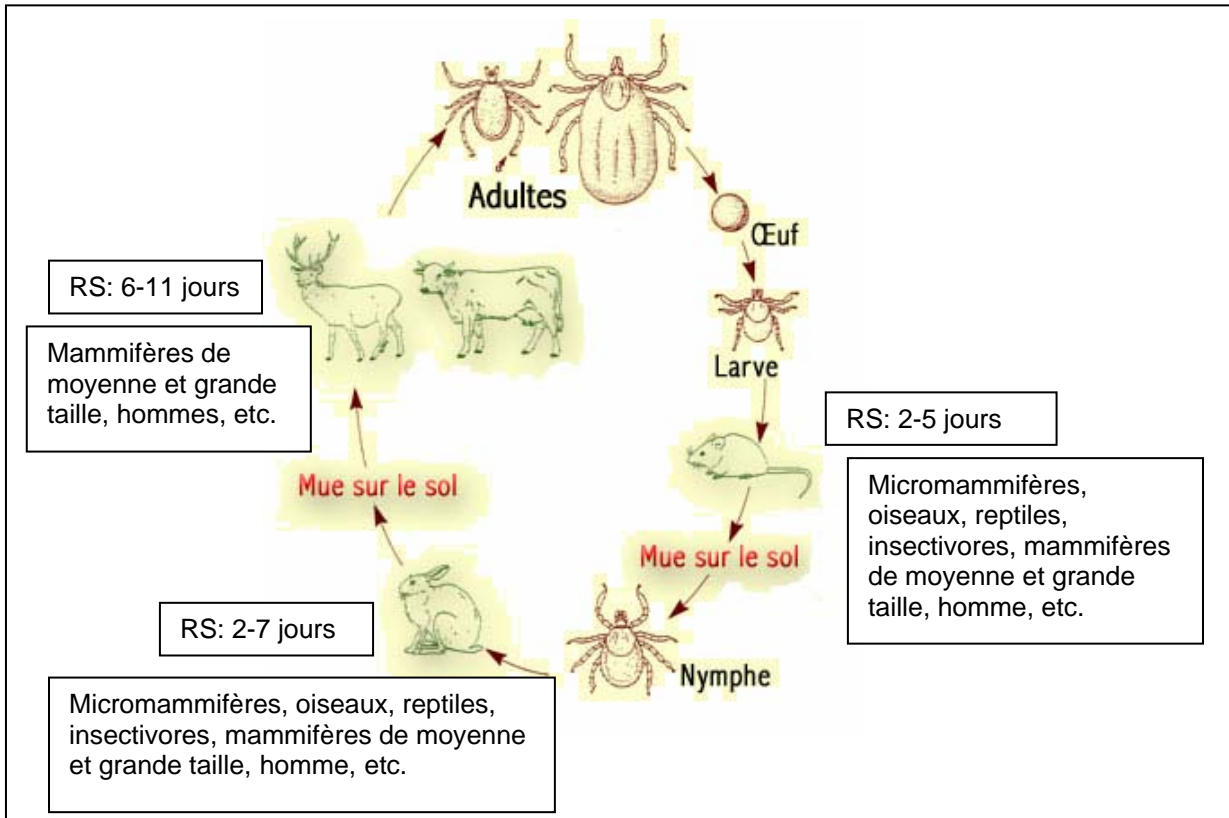


Fig.2. Cycle de vie de *I. ricinus* (RS= repas de sang; www.vet-lyon.fr).

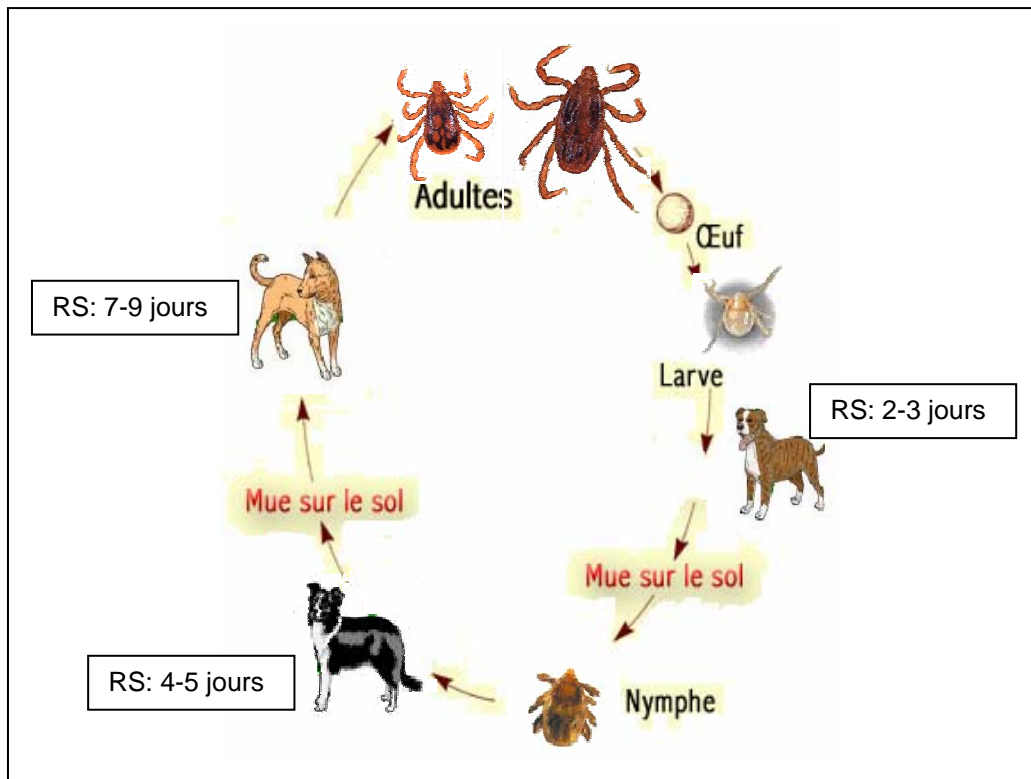


Fig.3. Cycle de vie de *R. sanguineus sensu stricto* (RS= repas de sang; www.vet-lyon.fr; <http://creatures.ifas.edu/urban/medical/browndog01.htm>).

1.1.3. *Ixodes ricinus*

1.1.3.1. Ecologie

I. ricinus est distribuée dans toute l'Europe, à l'exception de l'Islande (Hubalek et Halouzka, 1997). De plus, elle a été décrite en Afrique du Nord, en Tunisie (Younsi et al., 2001) et au Maroc (Sarih et al., 2003). La distribution géographique est limitée par l'humidité relative de l'environnement, la température et la végétation. Par conséquent, la distribution est discontinue. *I. ricinus* est très sensible à la dessiccation, surtout aux stades non gorgés, et ne peut pas survivre à une humidité relative inférieure à 80% (Gray, 2002). Cette tique abonde dans les sous-bois, lisières et bords de chemins de toutes les forêts de feuillus situées en dessous de 1'000-1'200 m. On ne la trouve plus au-dessus de 1'500 m d'altitude. Elle ne tombe pas des arbres, mais attend à l'affût sur des herbes, fougères, feuilles mortes, etc., qu'un hôte potentiel vienne la frôler. *I. ricinus* est généralement active de février à novembre, mais elle peut montrer deux pics principaux d'activité, un premier au printemps et un second en automne (Gern et Humair, 2002).

Le complexe *I. ricinus* est composé de 14 espèces (*I. ricinus* sensu stricto, *I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. granulatus*, *I. nuttallianus*, *I. minor*, *I. muris*, *I. affinis*, *I. pararicinus*, *I. jellisoni*, *I. gibbosus*, *I. nipponensis*, *I. persulcatus* et *I. pavlovskyi*) distribuées dans diverses régions géographiques du monde. Malgré cette délocalisation, les membres de ce complexe sont étroitement apparentés (Xu et al., 2003). Dans le passé, les relations phylogénétiques entre les membres du complexe *I. ricinus* ont été analysées (Caporale et al., 1995; Xu et al., 2003). Par contre, il y a peu d'informations sur la structure génétique de l'espèce *I. ricinus* s.s..

1.1.3.2. Hôtes

I. ricinus parasite un large spectre de vertébrés (plus de 300 espèces) comme les mammifères de taille différente, les oiseaux et certains reptiles (Aeschlimann, 1972; Gern et Humair, 2002; Sonenshine, 1991b). Cette espèce est considérée comme télotrope. Les individus aux stades immatures (larve et nymphe) sont plus ubiquistes et se nourrissent sur tous les vertébrés (micromammifères, insectivores, reptiles, oiseaux, mammifères de moyenne et grande taille) tandis que les adultes préfèrent les animaux de grande et moyenne taille (Gern et Humair, 2002). Tous les stades peuvent parasiter l'homme, qui est considéré comme un hôte accidentel.

1.1.4. *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato

1.1.4.1. Ecologie

La systématique des espèces appartenant au complexe *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato est difficile à déterminer avec les méthodes phénotypiques. Seuls les individus des stades immatures et les mâles présentent des caractères utiles à la classification. Les femelles sont souvent impossibles à identifier (Beati et Keirans, 2001). Pour cette raison, l'analyse phylogénétique peut être un outil utile à l'identification des différentes espèces.

R. sanguineus sensu stricto et *R. turanicus* appartiennent au complexe *R. sanguineus* (*R. sanguineus* sensu lato), lequel comprend des espèces endémiques dans les régions tropicales et subtropicales.

R. sanguineus s.s. est probablement la tique la plus largement distribuée dans le monde. On la trouve approximativement entre les latitudes de 50°N et 30°S, et sa préférence connue pour les chiens a sûrement facilité sa large distribution (Walker et al., 2000). Dans les régions tropicales et subtropicales, *R. sanguineus* peut être trouvée à l'intérieur et à l'extérieur des habitations. Dans les climats plus froids, on la trouve normalement à l'intérieur: dans les maisons, dans les appartements, dans les niches et dans d'autres structures liées aux chiens. Ces tiques sont bien adaptées aux conditions climatiques et à la végétation du bassin méditerranéen; elles sont absentes au nord de l'Europe où les conditions climatiques ne permettent pas leur survie (Parola et Raoult, 2001). Toutefois, occasionnellement on peut les trouver même à ces latitudes, par exemple en Suède, importées par les chiens, mais elles ne sont pas considérées comme indigènes (Jaenson et al., 1994). Depuis 1940, la présence de *R. sanguineus* a été signalée en Suisse, mais on l'a considérée comme occasionnelle et non permanente, étant importée par les chiens de retour des zones endémiques (Aeschlimann et al., 1965). Au début des années '80, elle a été répertoriée au Tessin (Aeschlimann et al., 1986; Miserez et al., 1990) et au début des années '90, son établissement probable dans cette région au sud des Alpes a été suggéré (Bernasconi et al., 1997).

R. turanicus est distribuée au sud-est et au nord de l'Afrique, au sud de l'Europe (pays du bassin méditerranéen) et au Moyen-Orient (Walker et al., 2000). Elle a été signalée en France (Beati et al., 1992) et au Portugal (Bacellar et al., 1995).

Dans les régions méditerranéennes, *R. sanguineus* s.s. peut être vecteur de *Rickettsia conorii* et de *R. conorii* Israël, bactéries responsables respectivement de la fièvre boutonneuse méditerranéenne (Mediterranean spotted fever) et de la fièvre boutonneuse d'Israël (tableau 7, page 31), et de *Coxiella burnetii*, responsable de la fièvre Q (Aeschlimann et Büttiker, 1975; Aeschlimann et al., 1986; Parola et Raoult, 2001; Péter et al., 1984). De plus, cette tique est connue pour être porteuse d'autres espèces de *Rickettsia* potentiellement pathogènes comme *R. massiliae*, Bar29 et *R. rhipicephali* (tableau 6, page 30). On peut donc s'attendre à ce rôle de vecteur de micro-organismes pathogènes ou considérés potentiellement pathogènes, mentionnés ci-dessus, même à nos latitudes.

En ce qui concerne *R. turanicus*, la seule espèce de *Rickettsia* isolée de cette tique est *R. massiliae* (Parola et Raoult, 2001).

1.1.4.2. Hôtes

R. sanguineus s.s., à tous ses stades de développement, montre une préférence pour le chien domestique (Walker et al., 2000). Occasionnellement, en absence de chiens, cette tique peut prendre son repas de sang sur d'autres animaux, comme par exemple les bovins et accidentellement même l'homme (Bernasconi et al., 1997). Par contre, *R. turanicus* ne montre pas la même préférence que *R. sanguineus* s.s., mais elle a un plus large spectre d'hôtes (micromammifères, bovins, chèvres et chiens) (Walker et al., 2000).

1.2. Présentation des agents pathogènes

1.2.1. *Borrelia burgdorferi* sensu lato

1.2.1.1. Systématique et définition

La maladie de Lyme ou borréliose de Lyme est provoquée par la spirochète *B. burgdorferi* s.l.. Cette maladie a été décrite en Europe au début du XX^e siècle, d'abord par l'observation de l'*erythema migrans* (EM) (Afzelius, 1910) et ensuite de la méningo-radculite (Garin et Bujadoux, 1922). Plus tard, en 1975, aux Etats-Unis, de nombreux cas d'arthrites inflammatoires et de lésions cutanées chez des enfants avaient inquiété les habitants de Lyme (Connecticut) (Steere et al., 1977). Une enquête épidémiologique permit d'établir une relation entre les symptômes et les morsures des tiques. En 1982, W. Burgdorfer découvrit des spirochètes dans l'intestin des tiques *I. scapularis* et émit l'hypothèse que ces bactéries pourraient être l'agent de la maladie de Lyme (Burgdorfer et al., 1982). Il démontra ensuite une forte réaction entre le sérum des patients et la bactérie, qui sera nommée ensuite *B. burgdorferi* en son honneur.

Le genre *Borrelia* est un membre du phylum des *Spirochaetes* qui est apparenté de façon éloignée aux bactéries Gram négatives. Il appartient à la famille des *Spirochaetaceae*, à l'ordre des *Spirochaetales* (voir tableau 1) (Rosa, 1997). Au niveau du genre, deux complexes sont présents, celui de *B. recurrentis* lié aux fièvres récurrentes et celui de *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.): une première diversité qui se reflète au travers de deux maladies distinctes.

Tableau 1. Classification de *Borrelia burgdorferi* s.l..

Phylum <i>Spirochaetes</i>	
Classe <i>Spirochaetes</i>	
Ordre <i>Spirochaetales</i>	
Famille <i>Spirochaetaceae</i>	
Genre <i>Borrelia</i>	- <i>Borrelia</i> du groupe <i>B. burgdorferi</i> sensu lato
	- <i>Borrelia</i> des fièvres récurrentes
<i>Treponema</i>	
<i>Brevinema</i>	
<i>Spirochaeta</i>	
<i>Cristispira</i>	
<i>Spirochaeta</i>	

L'agent étiologique de la maladie de Lyme est un spirochète possédant une membrane externe semblable à celle des bactéries Gram négatives; il est microaérophile, de forme hélicoïdale, avec 7-11 flagelles localisés dans l'espace périplasmique qui contribuent au mouvement de la cellule et à sa morphologie. Les dimensions peuvent varier de 10 à 30 µm de longueur et de 0.2 à 0.3 µm de diamètre. Le génome de la souche *B. burgdorferi* sensu stricto B31 a été entièrement séquencé. Il contient un chromosome linéaire de 910'725 bp, 9 plasmides circulaires (cp9, cp26 et cp32 x 7) et 12 plasmides linéaires (lp5, lp17, lp21, lp25, lp28 x 4, lp36, lp38, lp54 et lp56) ayant une taille cumulative de plus de 613,000 bp (Casjens et al., 2000; Fraser et al., 1997). Certains des plasmides sont très importants car ils

portent les gènes responsables de la pathogénicité ou de la persistance des spirochètes chez les tiques ou les hôtes, comme par exemple les plasmides circulaires cp26 et cp32 et les plasmides linéaires lp25, lp28-1 et lp54 (Fig. 4). L'organisation génétique de ce spirochète n'est donc pas habituelle parmi les procaryotes, car elle contient un chromosome linéaire et de nombreux plasmides linéaires et circulaires.

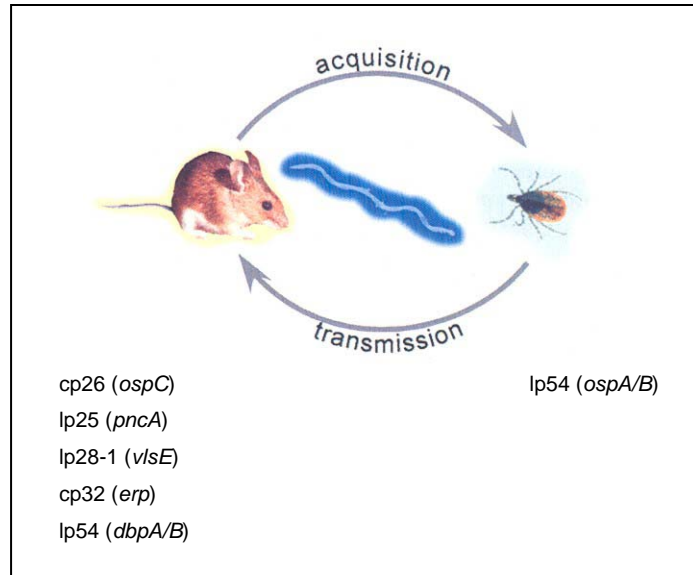


Fig. 4. Cycle infectieux de *B. burgdorferi* s.l. et liste des gènes localisés sur les plasmides linéaires (lp) ou sur les plasmides circulaires (cp) importants pour la survie des spirochètes chez l'hôte (à gauche) et chez la tique (à droite) (Stewart et al., 2005).

Parmi les différents produits codifiés par les gènes portés par ces plasmides, nous retrouvons les protéines membranaires de surface engagées d'une part dans l'évasion du système immunitaire de l'hôte et d'autre part dans l'adhésion et la colonisation chez la tique ou l'hôte:

- Plusieurs lipoprotéines ont été caractérisées chez *B. burgdorferi* s.l., y compris les protéines membranaires de surface OspA à OspF ("outer membrane proteins"). Les plus étudiées sont OspA (31-34 kDa) (Wilske et al., 1993) et OspB, dont les gènes sont localisés sur le plasmide linéaire de 49 kb (lp54), et OspC (20-25 kDa) (Wilske et al., 1995) codifié par le plasmide circulaire de 27 kb (cp26) (Bergström et al., 2002). OspA et probablement OspB sont exprimées au niveau de l'intestin moyen de la tique avec la fonction de retenir les bactéries dans ce milieu (Ohnishi et al., 2001; Yang et al., 2004). A ce stade, on trouve chez la tique infectée, mais pas encore gorgée, une population relativement homogène de spirochètes. Lors du repas sanguin, les bactéries se multiplient par division binaire, OspC est exprimée, tandis que OspA et OspB sont réprimées. Pal et al. ont montré que la fonction de OspC pourrait être de faciliter le déplacement des bactéries de l'intestin à l'hémocoel jusqu'aux glandes salivaires de la tique en vue de la transmission à l'hôte (Pal et al., 2004). Par contre dans une autre étude, Grimm et al. décrivent une fonction différente liée plutôt à l'infektivité dans l'hôte et non à celle dans la tique (Grimm et al., 2004b). D'autres études sont requises pour mieux comprendre les fonctions de la lipoprotéine de surface OspC. Dans la tique, la population bactérienne devient hétérogène au niveau des gènes codant pour ces Osp et donc aussi de ces lipoprotéines, ce qui conduit à une

variabilité des antigènes de surface. Ceci est dû à des réarrangements génétiques au niveau des gènes et à des mécanismes de régulation de l'expression ou de la répression de l'ensemble des lipoprotéines. Cette hétérogénéité de surface est une des armes qui permet aux borrelies d'échapper au système immunitaire de l'hôte vertébré. Une population uniforme est plus susceptible d'être éliminée par le système immunitaire (Ohnishi et al., 2001).

- OspE et OspF appartiennent à la famille des Erps (OspEF-related proteins) localisées sur les plasmides cp32. Plusieurs de ces protéines ont la fonction de se lier au facteur H du complément en inhibant ainsi l'activité de ce système de défense. De plus, la recombinaison des gènes codant pour les antigènes Erp semble contribuer à l'évasion de la réponse immunitaire, ainsi qu'à l'établissement et à la persistance de l'infection chez l'hôte (Bergström et al., 2002).
- L'adhésion et la colonisation des tissus de l'hôte sont des événements importants dans le processus de l'infection bactérienne. Deux protéines de surface membranaires, Dbpa et DbpB (decorin-binding protein) exprimées par les gènes BBA24/25 localisés sur le plasmide lp54 interviennent dans cette fonction importante (Stewart et al., 2005).
- La région vlsE est localisée sur le plasmide lp28-1 et codifie pour des lipoprotéines reliées à l'infektivité. Celles-ci sont en effet responsables de la variation antigénique lui permettant de persister chez l'hôte et d'échapper à son système immunitaire (Grimm et al., 2004a).
- Le gène *pncA* présent sur le plasmide lp25 codifie pour la nicotinamidase, enzyme essentielle pour la survie chez la souris et liée aussi à l'infektivité (Grimm et al., 2004a).

Au niveau de la phylogénie et de la taxonomie de *B. burgdorferi* s.l., nous retrouvons une diversité importante du point de vue clinique. En effet, le complexe *B. burgdorferi* s.l. est constitué par 12 génoespèces: *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. bissettii*, *B. japonica*, *B. turdii*, *B. tanuki*, *B. andersoni*, *B. sinica* et *B. spielmani* (Baranton et al., 1992; Bergström et al., 2002; Richter et al., 2004). En Europe, la maladie de Lyme est provoquée principalement par 3 de ces 12 génoespèces: *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, et *B. afzelii*. Occasionnellement, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, et *B. bissettii* ont été associées à des situations pathologiques, surtout des érythèmes migrants (EM) (Collares-Pereira et al., 2004; Picken et al., 1996; Rydkina et al., 1999).

L'association entre différentes manifestations cliniques de la maladie et les génoespèces pathogènes a été suggérée par le passé (Balmelli et Piffaretti, 1995). En général, *B. afzelii* est associée aux formes cutanées (*acrodermatitis chronica atrophicans*, ACA), *B. garinii* aux formes neurologiques et *B. burgdorferi* s.s. aux arthrites (Parola et Raoult, 2001). Les trois génoespèces pathogènes sont associées à la forme initiale de la maladie, l'érythème migrant (voir aussi: chapitre 1.2.1.5: Manifestations cliniques) (Wang et al., 1999b).

A l'intérieur des génoespèces, on découvre une surprenante hétérogénéité au niveau des génotypes [5S(*rrfA*)-23S(*rrlB*) intergenic spacer] (Derdakova et al., 2003). Deux études ont par ailleurs décrit l'association entre des aspects de la pathogénicité et des niveaux distincts de diversité génétique dans le complexe *B. burgdorferi* s.l., en particulier, pour les trois espèces pathogènes *B. burgdorferi* s.s. (Wang et al., 1999c), *B. afzelii* et *B. garinii* (Baranton et al., 2001). En effet, l'arbre phylogénétique construit sur la base du gène *ospC* a permis d'observer que les souches invasives se placent dans certains groupes uniquement

(10/58): dans 4 sur 17 groupes pour *B. burgdorferi* s.s. (Wang et al., 1999c), 2 sur 14 pour *B. afzelii* et 4 sur 22 pour *B. garinii* (Baranton et al., 2001).

En parallèle à la caractérisation moléculaire des souches, il existe aussi une caractérisation phénotypique basée sur le sérotypage. Les deux systèmes qui sont utilisés se basent sur l'hétérogénéité de OspA et de OspC. Il est intéressant d'observer qu'il existe une relation entre certains sérotypes et certaines manifestations cliniques, par exemple la souche *B. garinii* OspA sérotype 4 a été souvent isolée du liquide cérébro-spinal de patients atteints de neuroborréliose (Marconi et al., 1999) et la souche *B. afzelii* OspA sérotype 2 (VS461) de lésions cutanées (érythème migrant et acrodermatite chronique atrophique) (Wilske et al., 1993).

1.2.1.2. Epidémiologie

B. burgdorferi s.l. est distribuée partout en Europe, en Asie, en Amérique du Nord et en Afrique du Nord. Plus précisément, *B. burgdorferi* s.s. est présente en Amérique du Nord, au Canada (Barker et Lindsay, 2000) et en Europe. *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana* et *B. lusitaniae* ont été isolées en Europe et en Asie (sauf *B. lusitaniae*), mais elles sont absentes aux Etats-Unis. Par contre, *B. andersoni* a été exclusivement détectée dans le nouveau monde (Postic et al., 1998). De plus, *B. bissettii*, une génoespèce présente en Amérique du Nord a été isolée chez un patient en Europe aussi (Slovénie) (Picken et al., 1996) et *B. spielmani*, une nouvelle génoespèce, détectée la première fois dans une biopsie prélevée d'un patient avec EM aux Pays Bas (Wang et al., 1999a), a été recensée ensuite dans diverses régions d'Europe (voir tableau 2).

En Europe, les 6 génoespèces appartenant au complexe *B. burgdorferi* s.l. sont présentes chez *I. ricinus* avec un taux d'infection très variable selon la région considérée. Les génoespèces les plus abondantes semblent être *B. afzelii* et *B. garinii*, tandis que la présence des autres génoespèces est plus faible et différente selon la zone concernée. Plusieurs études ont décrit la prévalence importante de *B. afzelii* chez la tique *I. ricinus* au nord, au centre et à l'est de l'Europe (voir tableau 2). Par contre d'autres études ont répertorié *B. garinii* comme la génoespèce la plus commune en Europe centrale et au sud-ouest de l'Europe. *B. valaisiana* est la plus abondante génoespèce en Irlande (Kirstein et al., 1997); par contre plusieurs études ont montré sa faible présence dans le reste de l'Europe. *B. burgdorferi* s.s. a été isolée dans toute l'Europe, mais rarement à l'est. *B. spielmani* et *B. lusitaniae* sont les génoespèces les plus rares dans notre continent, mais *B. lusitaniae* est l'espèce dominante au Portugal.

Des études en Afrique du Nord ont montré que *B. lusitaniae* est l'espèce la plus fréquente en Tunisie (Younsi et al., 2001) et au Maroc (Sarih et al., 2003). Cependant, *B. burgdorferi* s.s. et *B. garinii* ont également été mises en évidence dans ces régions (Sarih et al., 2003; Younsi et al., 2001).

En Russie, *B. afzelii* et *B. garinii* sont les génoespèces les plus répandues (Postic et al., 1997): elles sont transmises par les tiques *I. ricinus*, *I. persulcatus* et *I. trianguliceps* (Korenberg et al., 2002). *B. valaisiana*, *B. burgdorferi* s.s. et *B. lusitaniae* ont été isolées seulement dans la partie européenne de la Russie (Korenberg et al., 2002).

Au Japon, en Chine et en Corée, *B. garinii* et *B. afzelii* sont les génoespèces les plus fréquemment isolées chez la tique *I. persulcatus*. *B. valaisiana* a été détectée chez *I. columnae* au Japon (souche Am501), tandis qu'en Chine, à Taiwan, en Corée, en Thaïlande elle a été mise en évidence chez *I.*

granulatus, et seulement en Corée chez *I. nipponensis*. D'autres borrélioses comme *B. turdii*, *B. tanukii* et *B. japonica* ont été trouvées respectivement chez les tiques *I. turdus*, *I. tanuki* et *I. ovatus* au Japon uniquement (Miyamoto et Masuzawa, 2002).

Tableau 2. Distribution géographique de *B. burgdorferi* s.l. en Europe.

Borrelia génoespèce	Distribution géographique en Europe	Répartition géographique	Référence
<i>B. afzelii</i>	nord centre est	Europe Finlande Suède Norvège Pays Baltes Lettonie Suisse Allemagne France Hollande Slovaquie Bulgarie République Tchèque	(Kurtenbach et al., 2001) (Junttila et al., 1999) (Fraenkel et al., 2002) (Jenkins et al., 2001) (Alekseev et al., 2001) (Etti et al., 2003) (Péter et al., 1995) (Schaarschmidt et al., 2001) (Quessada et al., 2003) (Schouls et al., 1999) (Gern et al., 1999) (Christova et al., 2003) (Derdakova et al., 2003)
<i>B. garinii</i>	centre sud-ouest	Europe Allemagne Belgique Suisse Espagne	(Saint Girons et al., 1998) (Hildebrandt et al., 2003) (Misonne et al., 1998) (Jouda et al., 2003) (Escudero et al., 2000)
<i>B. valaisiana</i>	centre est nord-ouest nord sud-ouest	Allemagne France Suisse Hollande Slovaquie Bulgarie République Tchèque Irlande Pays Baltes Lettonie Suède Espagne	(Hildebrandt et al., 2003) (Quessada et al., 2003) (Bernasconi et al., 1997) (Schouls et al., 1999) (Gern et al., 1999) (Christova et al., 2003) (Derdakova et al., 2003) (Kirstein et al., 1997) (Alekseev et al., 2001) (Etti et al., 2003) (Fraenkel et al., 2002) (Escudero et al., 2000)
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	centre nord nord-ouest est	Hollande Belgique France Allemagne Suisse Italie Suède Norvège Pays Baltes Lettonie Irlande Slovaquie	(Schouls et al., 1999) (Misonne et al., 1998) (Quessada et al., 2003) (Schaarschmidt et al., 2001) (Jouda et al., 2003) (Cinco et al., 1998) (Fraenkel et al., 2002) (Jenkins et al., 2001) (Alekseev et al., 2001) (Etti et al., 2003) (Kirstein et al., 1997) (Stepanova-Tresova et al., 2000)
<i>B. lusitaniae</i>	centre est sud-ouest	Suisse Pologne Slovaquie Moldavie Bulgarie Ukraine République Tchèque Turquie Espagne Portugal	(Jouda et al., 2003) (Wodecka et Skotarczak, 2005) (Gern et al., 1999) (Postic et al., 1997) (Postic et al., 1997) (Postic et al., 1997) (Le Fleche et al., 1997) (Guner et al., 2003) (Escudero et al., 2000) (De Michelis et al., 2000)
<i>B. spielmani</i>	nord centre est	Pays Bas Allemagne France République Tchèque	(Wang et al., 1999a) (Rauter et al., 2002) (Richter et al., 2004) (Derdakova et al., 2003)

1.2.1.3. Hôtes réservoirs

Les animaux sauvages (micromammifères et oiseaux) sont des réservoirs importants pour le maintien et la circulation de *B. burgdorferi* s.l. dans la nature. Les plus étudiés ont été les micromammifères du genre *Apodemus* (mulot) et *Clethrionomys* (campagnol) en Eurasie, et les genres *Neotoma* (rat) et *Peromyscus* (souris) en Amérique du Nord. Les rongeurs ont longtemps été considérés comme les principaux hôtes réservoirs de *B. burgdorferi* s.l.. Récemment, plusieurs études ont montré l'importance des oiseaux, surtout les oiseaux migrateurs: ceux-ci contribuent à une dispersion plus grande et importante de *B. burgdorferi* s.l. (Olsen et al., 1993).

D'autres micromammifères comme *Microtus agrestis* (campagnol agreste) en Suède (Tälleklint et Jaenson, 1994), *Rattus rattus* (rat noir) et *R. norvegicus* (surmulot) dans les environnements urbanisés en Europe continentale (Matuschka et al., 1996; Matuschka et al., 1997), *Glis glis* (loir gris) en Allemagne (Matuschka et al., 1994), *Eliomys quercinus* (lérot) en France (Matuschka et al., 1999), *Sciurus carolinensis* (écureuil gris) en Angleterre (Craine et al., 1997) et *S. vulgaris* (écureuil roux) en Suisse (Humair et Gern, 1998) ont été décrits comme des réservoirs pour *B. burgdorferi* s.l.. Parmi les insectivores, la compétence comme réservoir a été démontrée pour *Neomys fodiens* (musaraigne aquatique), *Sorex minutus* (musaraigne pygmée) et *Sorex araneus* (musaraigne carrelet) en Suède (Tälleklint et Jaenson, 1994) et pour *Erinaceus europaeus* (hérisson d'Europe) en Irlande (Gray et al., 1994), en Allemagne (Liebisch et al., 1996) et en Suisse (Gern et al., 1997). Les lagomorphes *Lepus europaeus* (lièvre commun) et *L. timidus* (lièvre variable) contribuent aussi au maintien de *B. burgdorferi* dans la nature (Tälleklint et Jaenson, 1994).

D'autres espèces de vertébrés (*Cervidae*) sont considérées comme des hôtes non compétents car ils sont incapables d'infecter les tiques (Kurtenbach et al., 2002).

De plus, des études ont montré une spécificité entre hôte et génoespèce. En effet les génoespèces du complexe *B. burgdorferi* s.l. comme *B. afzelii*, *B. garinii* et *B. valaisiana* infectent soit les mammifères soit les oiseaux, mais pas les deux en même temps (Kurtenbach et al., 2002). Par contre, *B. burgdorferi* s.s. se présente comme une génoespèce moins spécialisée et semble pouvoir infecter les deux types d'hôtes (Kurtenbach et al., 2002). A l'heure actuelle, le réservoir de *B. lusitaniae* demeure inconnu (De Michelis et al., 2000).

En 1998, deux études ont montré la relation entre les oiseaux et *B. burgdorferi* s.l.. En Suisse, Humair et al. ont démontré par xénodiagnose le rôle réservoir du merle noir (*Turdus merula*) pour *B. garinii* et *B. valaisiana* (Humair et al., 1998). En Angleterre, Kurtenbach et al. ont montré que plus de 50% des tiques *I. ricinus* qui infestaient les faisans (*Phasianus colchicus*) étaient infectées par ces deux mêmes génoespèces (Kurtenbach et al., 1998a). De plus, l'étude de Hanincova en Slovaquie a confirmé que les passereaux (*Parus major*, *T. philomelos*, *T. merula*) sont des hôtes réservoirs compétents (Hanincova et al., 2003b). En Suède, *B. garinii* a été isolée de *I. uriae*, une tique des oiseaux de mer (Olsen et al., 1993). Au Japon, Nakao et al. ont fait des observations similaires pour les oiseaux migrateurs du genre *Emberiza* et *Turdus*, porteurs de *B. garinii* (Nakao et al., 1994).

Plusieurs études ont montré que les rongeurs du genre *Apodemus* et *Clethrionomys* sont les réservoirs pour *B. afzelii* en Eurasie (Hanincova et al., 2003a; Huegli et al., 2002; Humair et al., 1995; Humair et al., 1999; Kurtenbach et al., 2001; Kurtenbach et al., 1998a; Nakao et al., 1994). De plus, Huegli et al. ont confirmé dans leur étude que la souris *Apodemus* peut être aussi le réservoir de *B. garinii* OspA sérotype 4 (Huegli et al., 2002).

Au Japon, les rongeurs transmettent principalement *B. japonica* (Nakao et al., 1994); en Amérique du Nord, les rongeurs du genre *Neotoma* sont fréquemment infectés par *B. bissettii* (Schneider et al., 2000) et dans le New England le genre *Peromyscus* surtout par *B. burgdorferi* s.s. (Donahue et al., 1987).

Une autre association a été décrite au Royaume Uni et en Suisse, entre les écureuils (*S. carolinensis* et *S. vulgaris*) et *B. burgdorferi* s.s. et *B. afzelii* (Craine et al., 1997; Humair et Gern, 1998).

En conclusion, certains hôtes réservoirs sont compétents pour une ou plusieurs génoespèces de *Borrelia* et non compétents pour d'autres génoespèces. Cette spécificité peut-être expliquée par le fait qu'une génoespèce non adaptée à un certain hôte (par ex. *B. afzelii* envers les oiseaux) sera lysée par le système du complément de cet hôte (dans ce cas les oiseaux). Par contre d'autres génoespèces transmises par les oiseaux comme *B. garinii* et *B. valaisiana* sont résistantes au complément de ces animaux (Kurtenbach et al., 1998b). Le système du complément semble donc être un élément clé dans le cycle de vie de *B. burgdorferi* s.l. (Kurtenbach et al., 1998a).

1.2.1.4. Transmission

La tique acquiert *B. burgdorferi* s.l. pendant le repas sanguin. Les spirochètes colonisent l'intestin et dans certains cas ils peuvent migrer dans d'autres organes provoquant une infection systémique du vecteur. L'infection persiste même après la mue (transmission transstadiale) (Gern et Humair, 2002). Les femelles peuvent contaminer leurs descendants par transmission transovarienne. Ce processus se manifeste rarement dans la nature chez *I. ricinus*: Bellet-Edimo a montré que seulement 1% des femelles infectées collectées pendant son étude transmettent *B. burgdorferi* s.l. aux larves (Bellet-Edimo, 1997). Par contre, quand ce phénomène se produit, le résultat de la prévalence de l'infection chez les œufs est très haute (43-100%) (Bellet-Edimo, 1997).

Une autre importante voie de transmission est le "co-feeding". Des tiques non infectées peuvent acquérir les spirochètes pendant le repas sanguin, effectué en même temps que des tiques infectées, sur un site localisé sur le même animal (Gern et Rais, 1996). De plus, si pendant le "co-feeding" les tiques infectées se détachent de l'animal, les tiques non infectées continuent à acquérir l'infection (Gern et Rais, 1996).

1.2.1.5. Manifestations cliniques

La maladie de Lyme est une infection systémique touchant essentiellement la peau, les articulations, le système nerveux, et le cœur. Elle peut évoluer, si elle n'a pas été soignée, en manifestations pathologiques graves et chroniques. Cette maladie est composée de 3 stades: le stade précoce localisé, le stade précoce disséminé et le stade tardif (Steere, 2001). Après la piqûre d'une tique (4-25 jours), *B. burgdorferi* diffuse localement au niveau de la peau et se manifeste en forme d'érythème migrant (EM), une lésion dermatologique annulaire très caractéristique. L'EM peut s'étendre jusqu'à 40 cm de la piqûre et il peut être accompagné par un syndrome grippal (céphalée, fièvre, adénopathie, myalgie, arthralgie, nausée). L'EM est un marqueur de l'infection, mais il n'apparaît pas dans 10-40% des cas même si la maladie évolue vers les états suivants. Le premier stade se résout en 3-4 semaines (Wilske et Schriefer, 2003).

Le deuxième stade débute de quelques semaines à quelques mois après la phase primaire. La maladie est caractérisée par des manifestations essentiellement cutanées (lymphocytome cutané bénin),

rhumatismales (arthrite) et neurologiques (neuropathie). Les manifestations rhumatologiques impliquent de nombreux épisodes douloureux et des problèmes articulaires dans différentes parties du corps. L'articulation la plus concernée est celle du genou. En moyenne 6 mois après le début de la maladie, avec une variabilité de 2 mois à 2 ans, les patients ont des attaques de mono et polyarthrite. Les manifestations neurologiques sont caractérisées par une triade symptomatique comprenant méningite, névrite crânienne et radiculonévrite, isolées ou associées, pour constituer les syndromes classiques de Bannwarth et de Garin-Bujadoux. Les atteintes cérébrales se traduisent par des troubles du sommeil, de la mémoire ou des difficultés de concentration, voire des modifications du comportement: elles persistent de quelques semaines à quelques mois. Fréquemment, on rencontre aussi des paralysies faciales surtout chez les enfants. Toutefois, des atteintes cardiaques (blocs atrio-ventriculaires), des atteintes pulmonaires (dyspnée), des atteintes ophtalmiques (cécité, paralysie des muscles), des douleurs abdominales accompagnées d'hépatomégalie, des syndromes grippaux peuvent aussi se manifester au cours de cette phase (Nadelman et Wormser, 1998; Stanek et al., 2002).

Le stade tertiaire survient des années après l'EM, ici aussi avec des atteintes dermatologiques (acrodermatite chronique atrophiante, ACA), neurologiques (neuroborréliose chronique) et rhumatologiques (arthrite chronique) (Stanek et al., 2002).

1.2.1.6. Traitement et prévention

Un traitement antibiotique est indiqué quel que soit le stade de la maladie (ceftriaxone, amoxicilline, doxycycline), mais ne se justifie pas à titre préventif lors de la piqûre par la tique (Nadelman et Wormser, 1998). La prévention vise à éviter les piqûres des tiques (utilisation des produits contre les tiques, port de vêtements appropriés, et inspection du corps) (OFSP, 2000).

Aux Etats-Unis, jusqu'en février 2002, le vaccin LYMERix™ était proposé. Ce vaccin se basait sur l'immunisation par OspA. Il a été retiré du marché à cause de la faible demande due à plusieurs facteurs: l'efficacité inférieure à 80% contre les infections à *B. burgdorferi* s.s. uniquement, les réactions autoimmunes possibles, le plan pour l'administration (0, 1^{er} et 12^{ème} mois) et les fréquents rappels nécessaires. On ne connaît pas l'efficacité de ce vaccin en Europe et en Asie. Le mécanisme du vaccin est unique et intéressant: lors du repas sanguin les anticorps anti-OspA détruisent les spirochètes dans l'intestin de la tique en bloquant ainsi la transmission des agents pathogènes à l'hôte (Hayes et Schriefer, 2002).

La mise au point d'un vaccin protégeant contre les trois espèces européennes ne semble plus d'actualité aujourd'hui.

1.2.2. Babesia sp.

1.2.2.1. Systématique et définition

La babésiose, appelée aussi piroplasmose en raison de l'aspect piriforme que prennent les parasites intraérythrocytaires, est une maladie provoquée par un sporozoaire appartenant au genre *Babesia*. La taxonomie place ce sporozoaire dans le phylum *Apicomplexa* (*Sporozoa*), dans l'ordre *Piroplasmida* et dans la famille *Babesiidae* (tableau 3) (Homer et al., 2000).

Tableau 3. Classification de *Babesia* sp..**Phylum** *Apicomplexa***Classe** *Aconoidasida***Ordre** *Piroplasmida***Famille** *Babesiidae***Genre** *Babesia**Theileridae***Genre** *Theileria*

Dans le monde entier, *Babesia* sp. représente un des pathogènes le plus fréquemment transmis par les tiques; ce parasite infecte les globules rouges de l'homme et des animaux (Inokuma et al., 2003). Depuis les travaux du roumain Babès en 1888, plus de 100 espèces de *Babesia* ont été décrites (Sharan et Krause, 2000).

Les babésies sont subdivisées en deux groupes: les "petites" *Babesia* (trophozoïtes de 1.0 à 2.5 µm) comprenant les espèces *B. gibsoni*, *B. microti* et *B. rodhaini* et les "grandes" *Babesia* (2.5-5.0 µm): *B. bovis*, *B. caballi* et *B. canis*. Cette classification morphologique est assez cohérente avec la classification génétique, sauf en ce qui concerne *B. divergens*, un pathogène qui peut toucher l'homme, qui morphologiquement ressemble à une petite *Babesia*, mais génétiquement appartient aux grandes *Babesia* (Homer et al., 2000). Certaines espèces que l'on retrouve dans les deux groupes sont responsables de la babésiose de l'homme, comme *B. microti*, *B. divergens*, *B. canis*, *B. bovis*, *B. odocoilei* et d'autres espèces sans nom: WA1, CA1, MO1 et EU1 (Gorenflot et al., 1998).

En Europe centrale, la babésiose est considérée surtout comme une maladie d'importance vétérinaire. Probablement sous-diagnostiquée chez l'homme (Hunfeld et Brade, 2004), elle a été récemment redécouverte et reconsidérée comme une possible zoonose émergente (Foppa et al., 2002; Homer et al., 2000).

1.2.2.2. Epidémiologie

Aux Etats-Unis, l'agent étiologique prédominant de la babésiose humaine est *B. microti* (Nord-Est et centre-Ouest), le parasite des rongeurs. D'autres espèces pathogènes ont été décrites, comme WA1 (Washington), CA1 (California) et MO1 (Missouri) (Gorenflot et al., 1998; Kjemtrup et Conrad, 2000). En Amérique du Nord, cette espèce est responsable de nombreux cas cliniques: le 95% des infections à *B. microti* a été diagnostiqué chez des patients ayant une rate normale. Par contre, les infections reportées pour les autres espèces (WA1, CA1 et MO1) concernaient des personnes splénectomisées (Gorenflot et al., 1998).

B. microti est présente en Europe aussi. Certaines études ont montré sa présence chez la tique *I. ricinus* en Pologne (Skotarczak et Cichocka, 2001), en Slovénie (Duh et al., 2001) et en Suisse (Foppa et al., 2002). D'autres études ont montré par la sérologie sa présence en Allemagne (Hunfeld et al., 2002) et en Suisse (Foppa et al., 2002) chez des habitants exposés aux tiques. Gorenflot et al. mentionnent deux cas d'infection pathologique à *B. microti*, l'un en Belgique et l'autre en Pologne (Gorenflot et al., 1998). Cependant, les deux cas ne sont pas bien documentés, de plus, celui de la Pologne a été importé du Brésil. En 2004, un autre cas européen a été signalé chez un patient suisse, mais ici également, le cas mériterait d'être mieux documenté (Meer-Scherrer et al., 2004).

En Europe, la babésiose humaine est provoquée principalement par *B. divergens*, un parasite du bétail. Depuis 1957, moins d'une trentaine de cas (France, Iles britanniques, Espagne, Iles Canaries, Portugal, Suède, Ex-Yougoslavie et Ex-Union Soviétique) ont été signalés (Gorenflot et al., 1998; Skrabalo et Deanovic, 1957). Des études épidémiologiques ont documenté la présence de cette espèce chez les bovins à travers l'Europe, y compris la Belgique (Fameree et al., 1977), la Suisse (Gern et al., 1982), l'Autriche, l'Allemagne et les Pays-Bas (Zintl et al., 2003). Sa distribution peut s'étendre jusqu'en Afrique du Nord (Bouattour et Darghouth, 1996). Aux Etats-Unis elle a été détectée chez des lapins (*Sylvilagus floridanus*) au Massachusetts (Goethert et Telford, 2003) et en 2002 le premier cas a été signalé chez un résident du Kentucky (Beattie et al., 2002).

En 2003, les premiers cas dus à une nouvelle espèce désignée *B. sp. EU1* (*Babesia* Europe 1) ont été signalés en Italie et en Autriche (Herwaldt et al., 2003). Cette espèce a aussi été détectée en Slovénie chez la tique *I. ricinus* (Duh et al., 2001).

La présence en Suisse de *B. divergens* et de *B. microti* a été documentée dans le passé. *B. divergens* a été décrite en Valais, au Tessin (Aeschlimann et Büttiker, 1975) et dans le Jura (Gern et al., 1982). Jusqu'à présent, il n'y a pas eu de cas cliniques autochtones chez l'homme dus à cette espèce. La présence de *B. microti* a été signalée dans le canton de Berne et en Suisse orientale (Foppa et al., 2002; Gern et Aeschlimann, 1986).

1.2.2.3. Hôtes réservoirs

Dans toute l'Europe, les micromammifères myomorphes constituent le réservoir de *B. microti* (Sonenshine, 1991a). Ce protozoaire est transmis par *I. trianguliceps* et *I. ricinus*, le premier vecteur ne parasitant jamais l'homme. Le principal réservoir de *B. divergens* est constitué par les bovins et elle est transmise par *I. ricinus* (Zintl et al., 2003). La prévalence sérologique de *B. divergens* chez les bovins en France est élevée, comprise entre 20 et 80% selon les exploitations, ce qui représente un réel problème économique (L'Hostis et Seegers, 2002).

1.2.2.4. Transmission

La transmission transstadiale de *B. microti* chez la tique *I. ricinus* advient facilement, mais le parasite ne persiste pas au-delà de la deuxième mue, par contre la transmission transovarienne ne semble pas avoir lieu (Gray et al., 2002). A cause de l'absence de la transmission transovarienne, le stade larvaire peut être considéré sans risque pour la transmission de l'infection à *B. microti*; par contre, la nymphe semble être le stade privilégié pour l'infection (Gray et al., 2002).

B. divergens présente les deux types de transmission: transstadiale et transovarienne. La femelle qui s'infecte lors d'un repas sanguin contamine sa descendance: ainsi les larves auront le pouvoir d'infecter leurs hôtes (Zintl et al., 2003).

1.2.2.5. Manifestations cliniques

En Amérique, l'infection à *B. microti* reste habituellement asymptomatique, mais peut être mortelle dans le 5% des cas, chez des patients fragiles ou lors d'une coinfection avec un autre pathogène (Gorenflot et al., 1998). En Europe, *B. divergens* affecte surtout des patients splénectomisés, le taux de mortalité étant de 42 % (Gorenflot et al., 1998). De plus, des études de surveillance sérologique ont mis en évidence chez des patients non splénectomisés la présence d'anticorps contre *B. divergens* (Gorenflot et al., 1998; Hunfeld et al., 2002). Cependant, tous ces cas restent asymptomatiques. La maladie se présente 1 à 3 semaines après la piqûre d'une tique. Elle est caractérisée par une hémolyse intravasculaire se traduisant cliniquement par l'émission d'urines rouges, voire même noires; le patient présente une fièvre importante, supérieure à 40 °C, associée à des frissons, des sueurs profuses, des lombalgies, des céphalées et myalgies, des douleurs abdominales et un ictère jaune (Boustani et Gelfand, 1996; Gorenflot et al., 1998). L'hémoglobulinémie due à l'hémolyse entraîne alors l'apparition d'une insuffisance rénale aiguë et par conséquent un œdème pulmonaire. La babésiose peut être très sévère, surtout celle due à *B. divergens* (Homer et al., 2000).

1.2.2.6. Traitement et prévention

Le traitement contre *B. divergens* doit être rapide et agressif. En un premier temps, il faut procéder à un remplacement du sang à l'aide d'une transfusion massive (2-3 fois le volume du sang), ensuite il est recommandé d'administrer au patient de la clindamycine pendant 10 jours. Au cas où la parasitémie serait inférieure à 1%, l'administration de clindamycine est suffisante. Le traitement contre *B. microti* est une combinaison entre la clindamycine et la quinine pendant 7 jours (Kjemtrup et Conrad, 2000).

En Europe, l'incidence de la maladie est très basse. Toutefois, les personnes splénectomisées et immunocompromises doivent prêter particulièrement attention aux zones à risque et aux périodes d'activité des tiques (février-novembre). Les mesures de prévention sont très simples à mettre en pratique: utilisation de vêtements appropriés, utilisation de produits contre les tiques et inspection du corps au retour à la maison. Actuellement, aucun vaccin contre la babésiose humaine n'est disponible sur le marché.

1.2.3. Virus de l'encéphalite à tique

1.2.3.1. Systématique et définition

Le virus de l'encéphalite à tique (TBEV ou "tick-borne encephalitis virus") a été cliniquement reconnu dans les années '30 dans la partie orientale de l'Union Soviétique où plusieurs cas humains d'encéphalite y ont été observés. En 1937, L.A. Zilber a organisé une expédition pour déterminer la cause de cette maladie. Les virus isolés ont été obtenus à partir du sang des patients et des tiques *I. persulcatus* (Zilber et Xoloviev, 1946). En 1948, en Europe (République Tchèque) s'est présentée une situation similaire à celle de l'Union Soviétique. Toutefois les patients étaient atteints d'une forme moins sévère d'encéphalite. Les virus isolés chez certains de ces patients et des tiques *I. ricinus* ont permis de lier ces cas à ceux survenus dans l'Union Soviétique (Rampas et Gallia, 1949). Depuis, le virus a été isolé dans plusieurs régions de l'Europe, de la Russie et de l'Extrême-Orient.

Le TBEV est responsable d'un ensemble de symptômes neurologiques: il appartient à la famille des *Flaviviridae*, laquelle comprend 3 genres: les *Flavivirus*, les *Pestivirus* et les *Hepacivirus*. Les *Flavivirus* peuvent être regroupés en virus transmis par les tiques (tick-borne virus), en virus transmis par les moustiques (mosquito-borne virus) et en virus transmis par des vecteurs arthropodes encore inconnus (unknown arthropod virus). Comme son nom l'indique, le TBEV se trouve dans le groupe des virus transmis par les tiques et il est génétiquement subdivisé en 3 types: celui provenant de l'Europe (Western subtype: W-TBEV, précédemment CEE: encéphalite d'Europe centrale), celui provenant de l'Extrême-Orient (Far-Eastern subtype: FE-TBEV, précédemment RSSE: encéphalite verno-estivale russe) et celui provenant de la Sibérie (Siberian subtype: S-TBEV, précédemment RSSE) (Calisher et Gould, 2003; Ecker et al., 1999) (Tableau 4). L'analyse antigénique a confirmé cette différenciation (Pagodina et al., 1981).

Tableau 4. Classification du virus TBE (Calisher et Gould, 2003).

Famille	<i>Flaviviridae</i>
Genre	<i>Flavivirus</i>
	Virus transmis par les tiques
	Virus de l'encéphalite à tique (TBEV)
	W-TBEV (provenant de l'Europe)
	FE-TBEV (provenant de l'Extrême-Orient)
	S-TBEV (provenant de la Sibérie)
	Virus Louping ill
	Complex de virus des mammifères
	Complex de virus des oiseaux
	Virus transmis par les moustiques
	Virus transmis par des vecteurs arthropodes inconnus
	<i>Pestivirus</i>
	<i>Hepacivirus</i>

Le W-TBEV provoque une maladie biphasique typique, de pronostic généralement favorable, tandis que le FE-TBEV provoque une maladie de type monophasique, mais caractérisée par une affection sévère du système nerveux central (SNC), les séquelles et les formes chroniques étant courantes (Dumpis et al., 1999). Le S-TBEV présente une symptomatologie moins grave que le FE-TBEV. Le taux de mortalité est de 1-2% pour le W-TBEV, de 20-40% pour le FE-TBEV et de 6-8% pour le S-TBEV (Gritsun et al., 2003). L'aire de répartition des 3 types du virus TBE recouvre celle de leurs principaux vecteurs, *I. ricinus* pour le W-TBE et *I. persulcatus* pour le FE-TBE et S-TBEV (Gritsun et al., 2003).

Les *Flavivirus* se présentent comme de petites particules sphériques ayant un diamètre d'environ 50 nm et contenant seulement 3 protéines structurales associées respectivement à l'enveloppe, à la membrane et à la capsid. Leur génome consiste en une molécule monocaténaire linéaire d'ARN de polarité positive d'environ 10.5 kb: il code un seul cadre de lecture (ORF). Le génome est flanqué de deux régions 5' et 3' non codantes (NCR) respectivement d'environ 100 et de 400 à 700 nucléotides. L'ORF montre pour tous les *Flavivirus* la même séquence de gènes (5'-C prM E NS1 NS2A NS2B NS3 NS4A NS4B NS5-5'), c'est-à-dire une partie structurale (C, M et E) suivie d'une partie non-structurale (Chambers et al., 1990).

1.2.3.2. Epidémiologie

Le virus occupe des zones d'endémie bien délimitées, appelées foyers naturels. Sa répartition recouvre la plupart des pays d'Europe, de Russie et d'Extrême-Orient. Des cas cliniques ont été signalés dans de nombreux pays (Charrel et al., 2004; Dumpis et al., 1999). En Suisse, les zones d'endémie se concentrent dans les cantons suivants: Argovie, Berne, Grisons, Lucerne, Schaffouse, Soleure, St. Gall, Thurgovie, Zoug et Zürich. Aucun foyer n'a été mis en évidence en Suisse romande (à l'exception de Fribourg) et dans la Suisse italienne; toutefois, des cas d'encéphalite peuvent y apparaître, mais ils sont consécutifs à des séjours dans des régions à risque (www.admin.ch/bag/infreporting/, Office Fédéral de la Santé Publique).

En Europe et dans les états baltes, l'infection des tiques dans les foyers naturels est de l'ordre de 0.1-5% (Randolph, 2001). Avec la formation des microfoyers à l'intérieur des foyers naturels, cette proportion peut varier considérablement, jusqu'à 10% de tiques pouvant porter le virus (Blaskovic et Nosek, 1972).

En Suisse, des cas d'encéphalite à tique sont déclarés chaque année à l'Office fédéral de la santé publique. Pendant les 20 dernières années, on a assisté à une augmentation des cas, encore plus marquée durant les 10 dernières années: de 30-70 à 60-120 par année. Cette variation est due à une augmentation dans les cantons de Thurgovie, d'Argovie et de St. Gall (Krech, 2002). La plupart des infections pathologiques présentent des manifestations neurologiques. Pour l'ensemble de la Suisse, l'incidence annuelle de l'encéphalite pour la période 1996-2002 est d'environ 1.2 cas/100,000 habitants. On trouve une incidence plus forte pour les cantons de Thurgovie (7.0/100,000), de Schaffouse (4.5), d'Argovie (2.2) et de Zürich (2.1). Le canton de Berne se situe sur la ligne de 1 cas/100'000 habitants (www.admin.ch/bag/infreporting/, Office Fédéral de la Santé Publique).

1.2.3.3. Hôtes réservoirs

La persistance d'un foyer naturel exige d'une part une haute densité de tiques *I. ricinus* et d'autre part une grande densité d'hôtes vertébrés comme les rongeurs pour maintenir la circulation du virus, et les grands mammifères pour maintenir la population des tiques (Labuda et al., 1996). On parle plutôt d'hôtes d'amplification que d'hôtes réservoirs, car la phase de virémie est très courte, généralement de 2-3 jours. De nombreuses espèces de rongeurs comme par ex. *Apodemus flavicollis*, *A. sylvaticus* (mulot) et *Clethrionomys glareolus* (campagnol roussâtre) et les insectivores *Talpa europaea* (taupe), *Erinaceus europaea* (hérisson) et *Muscardinus avellanarius* (loir) sont considérés comme des hôtes d'amplification et jouent un rôle important dans la transmission enzootique du virus. Par contre, les oiseaux ne contribuent pas à la transmission du TBEV (Nuttall et Labuda, 1994). D'ailleurs, les hôtes non compétents qui présentent une phase de virémie sont tués rapidement par le virus, tandis que les hôtes sur lesquels a lieu le "co-feeding" (transmission non virémique; voir chapitre 1.2.3.4: Transmission) sont importants pour la circulation du virus.

Enfin, les tiques, caractérisées par un cycle de vie relativement long, ont la capacité de maintenir le virus d'un stade à l'autre du développement: elles sont un réservoir efficace des *Flavivirus* (Nuttall et Labuda, 2003).

1.2.3.4. Transmission

Les tiques peuvent être infectées de manière chronique pendant toute leur vie par le TBEV: le virus peut être transmis par voie transstadiale et plus rarement par transmission transovarienne (chez environ 1% des tiques, (Gustafson, 1994)). A chaque état (larve, nymphe, adulte), la tique peut s'infecter par un repas sanguin pris sur un animal contaminé (transmission systémique ou virémique) ou par transmission transstadiale. Cependant, d'une part la plupart des hôtes n'atteignent pas un seuil virémique suffisamment élevé et d'autre part, l'infectivité de l'hôte est trop courte (2-3 jours) pour permettre une transmission systémique performante.

En effet, la circulation du virus est surtout garantie par la transmission non systémique ou non virémique, laquelle se traduit par le processus de "co-feeding". Ce phénomène permet la transmission du virus pendant le repas sanguin, des tiques infectées (généralement des nymphes) aux tiques non infectées (généralement des larves) qui se nourrissent en même temps sur l'animal (Labuda et al., 1993a; Labuda et al., 1993b). Pendant le repas, les tiques infectées transfèrent les virus des glandes salivaires aux cellules dendritiques de la peau de l'hôte, cellules qui se déplacent librement sous la couche superficielle de la peau. Les tiques non infectées le deviennent lorsque les cellules dendritiques infectées sont aspirées pendant le processus de nutrition (Gould et al., 2003). Ainsi, le fait de trouver des larves et des nymphes sur les rongeurs représente un facteur important pour le succès de la circulation du virus TBE (Randolph et al., 1999).

Les virus sont bien adaptés aux caractères physiologiques et comportementaux des tiques comme le repas sanguin, la digestion du repas et la mue (Nuttall et al., 1994).

1.2.3.5. Manifestations cliniques

Le virus TBE peut entrer dans le corps humain grâce à deux voies: la morsure d'une tique infectée et l'ingestion de lait non pasteurisé infecté. Au début, le virus commence à se multiplier au site d'inoculation. La propagation se fait au niveau du système lymphatique. La dissémination du virus dans le corps (phase virémique) est en corrélation avec la première phase. La deuxième phase est caractérisée par la propagation du virus dans le système nerveux central (SNC), où sa réplication est associée à l'inflammation, à la lyse et au mauvais fonctionnement des cellules nerveuses (Dumpis et al., 1999).

L'infection demeure asymptomatique chez 70-90% des personnes infectées. En cas de maladie, le premier stade, qui correspond à la phase virémique, débute 3 à 14 jours après l'infection. Pendant ce stade, le 10-30% des personnes infectées développent des symptômes pseudo-grippaux (fatigue accrue, céphalée, douleurs musculo-squelettiques, état fébrile) disparaissant après 1-8 jours. La maladie évolue alors le plus souvent vers une guérison définitive. Chez environ 10% des patients, cette première phase est suivie d'un intervalle d'environ 8 jours, puis d'une deuxième phase. Elle prend la forme d'une atteinte du SNC: méningite (maux de tête, fièvre jusqu'à 40 °C, nausée, vomissements, photophobie, suivis le plus souvent d'une guérison complète spontanée), méningocéphalite (aux manifestations méningées s'ajoutent des hyperkinésies au niveau du visage et des extrémités, une ataxie, des troubles de la déglutition et des organes sensoriels, des manifestations épileptiques; des séquelles sont fréquentes, le décès advient dans 1 à 5% des cas) et méningoencéphalomyélite (l'image clinique ressemble à la poliomyélite avec 64% de séquelles et 14% de létalité). Les formes sévères sont rares chez les enfants et leur proportion augmente

avec l'âge. Selon le type d'atteinte, les symptômes peuvent durer de quelques jours à plusieurs semaines et la convalescence plusieurs mois. Des troubles résiduels (maux de tête, paralysies, vertiges, problèmes sensoriels) peuvent persister quelques mois, voire des années (Dumpis et al., 1999; OFSP, 2000).

1.2.3.6. Traitement et prévention

L'immunoprophylaxie est recommandée pour les personnes ayant de fréquents contacts avec la forêt en zone d'endémie, car il n'existe aucune thérapie contre l'encéphalite à tique et les traitements sont purement symptomatiques. La vaccination comprend trois injections intramusculaires et induit une production d'anticorps protecteurs dans 99% des cas. Un rappel est ensuite nécessaire tous les trois ans. Une protection postexpositionnelle peut être apportée par l'administration rapide (dans les 48 heures) d'immunoglobulines spécifiques. Toutefois, l'efficacité de ce traitement est controversée (OFSP, 2000). On considère que le fait d'avoir été en contact avec le virus TBE, avec ou sans développement de la phase neurologique, confère une immunité définitive (Tsai et Chandler, 2003).

1.2.4. *Rickettsia* sp.

1.2.4.1. Systématique et définition

Les *Rickettsiae*, bactéries intracellulaires strictes possédant une paroi similaire à celle des bactéries Gram négatives, appartiennent à l'ordre des *Rickettsiales* et à la famille des *Rickettsiaceae* (tableau 5). Dans le passé, le genre *Rickettsia* a été divisé en 3 groupes: le groupe boutonneux ("spotted fever group", SFG), le groupe typhus (TG) et le groupe typhus des broussailles ("scrub typhus group", STG), comprenant la seule espèce *Orientia tsutsugamushi*, devenue aujourd'hui le genre *Orientia* (Tamura et al., 1995). Le groupe TG comprend deux espèces pathogènes, *R. prowazekii* et *R. typhi*, tandis que le groupe SFG inclut un plus large nombre d'espèces pathogènes ou potentiellement pathogènes, ces dernières ayant été isolées à partir de tiques uniquement (tableaux 5 et 6). Des études phylogénétiques ont montré que *R. canadensis* et *R. bellii* ne font pas partie des groupes TG et SFG (Roux et Raoult, 1995; Roux et al., 1997). A l'intérieur du groupe SFG, des sous-groupes ont été définis: *R. massiliae* (*R. massiliae*, Bar29, *R. rhipicephali* et *R. aeschlimannii*), *R. akari* (*R. akari* et *R. australis*), *R. rickettsii* avec le complexe *R. conorii* (*R. conorii*, *R. conorii* Astrakan et *R. conorii* Israel) et les autres espèces *R. africae*, Strain S, *R. sibirica*, *R. mongolotimonae*, *R. parkeri*, *R. slovaca*, *R. rickettsii*, *R. honei* et *R. japonica*. L'espèce *R. helvetica* reste isolée des autres espèces sur une branche séparée et l'espèce *R. montanensis* a une position ambiguë: selon le marqueur génétique choisi (*ompA*, *ompB*, *gltA*, *geneD*), elle est liée ou non au sous-groupe de *R. massiliae* (Sekeyova et al., 2001).

Tableau 5. Classification de *Rickettsia* sp..

Phylum *Proteobacteria*

Classe *Alphaproteobacteria*

Ordre *Rickettsiales*

Famille *Rickettsiaceae*

Genre *Rickettsia*

-groupe typhus (TG)

-groupe boutonneux (SFG)

Les *Rickettsiae* sont des bâtonnets de longueur de 0.8-2 µm et de diamètre de 0.3-0.5 µm et se multiplient par division binaire (Parola et Raoult, 2000). Leur génome est petit (1-1.6 Mb) et consiste en un seul chromosome circulaire (Roux et al., 1992).

1.2.4.2. Epidémiologie

Jusqu'à aujourd'hui, 12 *Rickettsiae* ont été décrites en Europe. *R. conorii*, l'agent de la fièvre boutonneuse méditerranéenne, a été isolé chez *R. sanguineus* et chez des patients atteints de la fièvre boutonneuse méditerranéenne dans des pays du pourtour méditerranéen (France, Italie, Espagne, Portugal, Maroc, Afrique et Turquie) et en Albanie, en Crimée et en Inde (tableau 7). En Suisse, entre les années 1980-1981, quatre cas ont été signalés dans la même famille et associés à des *Rhipicephalus sp.* importées d'Italie ou de France par le chien de la famille (Péter et al., 1984). *R. slovaca* a été isolée chez la tique *Dermacentor marginatus* pour la première fois en République Tchèque (Brezina et al., 1968) et ensuite dans d'autres régions y compris la Suisse (tableau 7). *R. helvetica* est distribuée de l'Europe (*I. ricinus*) jusqu'au Japon (*I. ovatus*) (tableau 7). D'autres espèces pathogènes moins répandues en Europe sont *R. sibirica* détectée chez *D. nuttali*, *D. marginatus* et *Haemaphysalis concinna* (partie européenne de la Sibérie), *R. akari* isolée chez l'acarien *Allodermomyssus sanguineus* appartenant au sous-ordre Mesostigmata (Ukraine et Slovénie), *R. conorii* Astrakan isolée chez *R. pumilio* (région de l'Astrakhan, Kosovo), *R. mongolotimonae* transmise par un vecteur non connu (France), et *R. conorii* Israël mise en évidence chez *R. sanguineus* (Portugal et Italie) (tableau 7). Les espèces considérées comme potentiellement pathogènes sont les suivantes: Bar29 et *R. massiliae* isolées chez *R. sanguineus*, *R. aeschlimanni* détectée chez *Hyalomma americanum* et *R. rhipicephali* isolée chez *R. sanguineus* et *D. andersoni* (tableau 6).

Tableau 6. *Rickettsia* sp. potentiellement pathogènes appartenant au groupe SFG.

<i>Rickettsia</i> sp. potentiellement pathogènes	Origine géographique	Vecteur	Référence
<i>R. aeschlimannii</i>	Maroc, Croatie, Espagne, France (Corse)	<i>Hyalomma marginatum</i>	(Punda-Polic et al., 2002) (Parola et Raoult, 2000) (Matsumoto et al., 2004) (Fernandez-Soto et al., 2003)
Bar29	Espagne	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	(Parola et Raoult, 2000)
<i>R. massiliae</i>	France, Grèce, Espagne, Portugal, Afrique centrale	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>Rhipicephalus turanicus</i>	(Dupont et al., 1994) (Babalis et al., 1994) (Parola et Raoult, 2000)
<i>Rickettsia</i> sp. (Thai tick typhus rickettsia)	Thaïlande	<i>Rhipicephalus</i> sp. ou <i>Ixodes</i> sp.	(Parola et Raoult, 2000)
<i>R. montana</i>	Etats-Unis	<i>Dermacentor variabilis</i> <i>Dermacentor andersoni</i>	(Weller et al., 1998)
<i>R. parkeri</i>	Etats-Unis	<i>Amblyomma maculatum</i>	(Parola et Raoult, 2000)
<i>R. rhipicephali</i>	Etats-Unis, France, Portugal, Afrique centrale	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>Dermacentor andersoni</i>	(Dupont et al., 1994) (Parola et Raoult, 2000)

Tableau 7: *Rickettsia* sp. pathogènes appartenant au groupe SFG.

<i>Rickettsia</i> sp. pathogène pour l'homme	Maladie provoquée	Répartition géographique	Vecteur	Référence
<i>R. rickettsii</i>	Fièvre pourprée des montagnes rocheuses	Amérique	<i>Dermacentor andersoni</i> <i>Dermacentor variabilis</i>	(Parola et Raoult, 2000)
<i>R. conorii</i>	Fièvre boutonneuse méditerranéenne	France, Italie, Espagne, Portugal, Maroc, Afrique, Inde, Turquie, Albanie, Crimée, Suisse (importée)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	(Christova et al., 2003) (Rydkina et al., 1999) (Dupont et al., 1994) (Péter et al., 1984) (Cardenosa et al., 2000) (Kuloglu et al., 2004)
<i>R. sibirica</i>	Typhus à tiques de Sibérie Typhus à tiques d'Asie du Nord	Sibérie, Pakistan, Chine du Nord, Mongolie	<i>Dermacentor nuttali</i> <i>Dermacentor marginatus</i> <i>Haemaphysalis concinna</i>	(Rydkina et al., 1999)
<i>R. australis</i>	Fièvre à tiques du Queensland	Queensland	<i>Ixodes holocyclus</i>	(Parola et Raoult, 2000)
<i>R. akari</i>	Fièvre vésiculeuse (rickettsial pox)	USA, Ukraine, Corée, Slovénie	<i>Allodermanyssus sanguineus</i>	(Parola et Raoult, 2000)
<i>R. japonica</i>	Fièvre boutonneuse orientale	Japon	<i>Dermacentor taiwanensis</i> <i>Haemaphysalis sp.</i> <i>Ixodes ovatus</i>	(Parola et Raoult, 2000)
<i>R. africae</i>	Fièvre à tiques africaine	Afrique	<i>Amblyomma variegatum</i> <i>Amblyomma hebraeum</i>	(Dupont et al., 1994)
<i>R. honei</i>	Fièvre boutonneuse des îles Flinders	Iles Flinders (Australie), Thaïlande	Vecteur inconnu (Australie) <i>Ixodes granulatus</i> (Thaïlande)	(Parola et Raoult, 2000)
<i>R. helvetica</i>	Fièvre	France, Suisse, Italie, Bulgarie, Turquie, Albanie, Suède, Spain Japon	<i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes ovatus</i>	(Beninati et al., 2002) (Christova et al., 2003) (Beati et al., 1994) (Parola et al., 1998) (Yano et al., 2004) (Nilsson et al., 1997) (Burgdorfer et al., 1979) (Fernandez-Soto et al., 2003)
<i>R. slovaca</i>	Fièvre avec escarre	France, Portugal, Suisse, Slovaquie, Croatie, Rép. Tchèque, Armenia, Crimée	<i>Dermacentor marginatus</i>	(Raoult et al., 1997) (Beati et al., 1994) (Beati et al., 1993) (Punda-Polic et al., 2002) (Brezina et al., 1968)
<i>R. conorii</i> Astrakan	Fièvre d'Astrakhan	Russie, Kosovo	<i>Rhipicephalus pumilio</i>	(Rydkina et al., 1999) (Tarasevich et al., 1991)
<i>R. conorii</i> Israël	Fièvre boutonneuse d'Israël	Israël, Portugal, Italie	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	(Parola et Raoult, 2000) (Bacellar et al., 1999)
<i>R. mongolotimonae</i>	Fièvre boutonneuse	Mongolie, France	<i>Hyalomma asiaticum</i> (Mongolie) Vecteur inconnu (France)	(Fournier et al., 2000)

1.2.4.3. Hôtes réservoirs

Les tiques sont les principaux vecteurs et réservoirs des *Rickettsiae* du groupe SFG (Raoult et al., 1997), comme par exemple *R. sanguineus* à l'égard de *R. conorii* et de *R. conorii* Israël (Gilot et al., 1990; Goldwasser et al., 1974). Les vertébrés, pour être des hôtes réservoirs, doivent respecter un certain nombre de critères : i) être un hôte habituel du vecteur, ii) être susceptible aux *Rickettsiae* et iii) développer une bactériémie assez longue (Raoult et al., 1997). Si ces critères ne sont pas respectés, la tique ne pourra pas être infectée. O. Péter a montré comment *R. helvetica* est pathogène pour certains rongeurs, inclus *Microtus pennsylvanicus*, *M. arvalis*, et *Apodemus flavicollis* (Péter, 1981).

1.2.4.4. Transmission

La tique infectée au niveau des glandes salivaires transmet aux hôtes vertébrés les *Rickettsiae* pendant le repas sanguin, lesquelles infectent presque tous les organes de l'hôte invertébré et s'y multiplient. (Raoult et al., 1997). Par conséquent, l'adulte femelle infecté transmet les *Rickettsiae* aux œufs par infection transovarienne et l'infection se maintiendra durant les stades suivants (transmission transstadiale). De plus, la transmission sexuelle entre tiques mâles et femelles a été suggérée pour *I. ricinus* avec le "Swiss agent" (*R. helvetica*) (Hayes et al., 1980) et *D. andersoni* avec *R. rickettsii* (Philip et Parker, 1933). Une autre voie de transmission entre les tiques est le processus de "co-feeding", lequel a été démontré chez la tique *D. andersoni* avec *R. rickettsii* (Philip, 1959).

1.2.4.5. Manifestations cliniques

Les symptômes se manifestent typiquement de 5 à 10 jours après la piqûre de la tique. Toutes les rickettsioses entraînent de la fièvre, des céphalées, des arthralgies, des myalgies, des adénopathies localisées; souvent une tache noire est retrouvée au point de la piqûre de la tique. Fréquemment, ces manifestations sont suivies quelques jours plus tard par une éruption exanthématique (lésions capillaires avec formation de thromboses et nécroses tissulaires). Selon les circonstances, des atteintes rénales et pulmonaires peuvent survenir, plus rarement des formes neurologiques. Ces signes cliniques varient selon l'espèce de *Rickettsia* impliquée dans l'infection.

La fièvre boutonneuse, la forme la plus répandue dans le pourtour de la Méditerranée, présente une évolution clinique le plus souvent bénigne avec un taux de mortalité de 2 à 3% (OFSP, 2000).

1.2.4.6. Traitement et prévention

La prophylaxie d'exposition joue un rôle de premier plan (protection contre les piqûres de tiques par le port de vêtements appropriés et l'utilisation de produits répulsifs). Les *Rickettsiae* étant des bactéries intracellulaires strictes, elles ne sont sensibles qu'aux antibiotiques à bonne pénétration intracellulaire: les tétracyclines, la josamycine (macrolide) et le chloramphénicol. Le traitement est d'autant plus efficace qu'il est appliqué précocement (OFSP, 2000).

1.2.5. *Coxiella burnetii*

1.2.5.1. Systématique et définition

Coxiella burnetii est une petite bactérie (0.2-0.4 µm de largeur et 0.4-1 µm de longueur), intracellulaire stricte, possédant une paroi semblable à celle des bactéries Gram négatives: c'est l'agent étiologique de la fièvre Q, une zoonose ubiquitaire. *C. burnetii* se présente sous deux formes distinctes: a) la phase I, virulente, isolée de l'homme, des animaux et des arthropodes et b) la phase II, avirulente qui apparaît après de multiples passages sur cultures de cellules ou œufs embryonnés. En 1935, *C. burnetii* a été isolée pour la première fois chez des employés d'un abattoir de Brisbane (Queensland, Australie) et en 1937, Edward Holbrook Derrick a proposé le terme fièvre Q (Q fever = query fever) pour décrire ce type d'infection (Maurin et Raoult, 1999).

Dans le passé, *C. burnetii* a été classifiée dans l'ordre des *Rickettsiales*, dans la famille des *Rickettsiaceae* et dans la tribu des *Rickettsieae* (Weiss et Moulder, 1984). Récemment, des études phylogénétiques basées sur l'analyse du 16S rRNA ont montré que le genre *Coxiella* appartient à la sous-division gamma du phylum des *Proteobacteria*, tandis que les bactéries du genre *Rickettsia* appartiennent à la sous-division alpha (Stein et al., 1993; Weisburg et al., 1989) (tableau 8).

Le chromosome est circulaire et a une taille, selon la souche considérée, comprise entre 1.5-2.4 Mb. L'analyse de l'ADN de 38 *C. burnetii* par la méthode RFLP ("restriction fragment length polymorphism") a permis de reconnaître 6 groupes génomiques (groupes I à VI). Les souches appartenant à ces différents groupes renferment des plasmides circulaires de taille différente (36-42 kb) et en nombre de copies différent (1-3). Le plasmide QpH1 (36 kb) a été trouvé dans les souches des groupes génomiques I, II et III, le plasmide QpRS (39 kb) dans le groupe génomique IV et enfin le plasmide QpDG (42 kb) dans le groupe génomique VI. Les souches du groupe génomique V sont dépourvues de plasmides libres, mais leur chromosome intègre des séquences analogues au plasmide QpRS (Maurin et Raoult, 1999).

Certaines études ont montré une corrélation entre les groupes génomiques et le pouvoir pathogène, mais d'autres études n'ont pas confirmé cette tendance. Des données récentes suggèrent que la variation génétique semble en rapport avec l'origine géographique des souches plutôt qu'avec le pouvoir pathogène (Maurin et Raoult, 1999).

Tableau 8. Classification de *C. burnetii*.

Phylum <i>Proteobacteria</i>
Classe <i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre <i>Legionellales</i>
Famille <i>Coxiellaceae</i>
Genre <i>Coxiella</i>

1.2.5.2. Epidémiologie

La fièvre Q est une maladie cosmopolite qui a été décrite dans tous les pays à l'exception de la Nouvelle Zélande (Hilbink et al., 1993).

En Europe, *C. burnetii* a été isolée chez les tiques surtout dans différents pays de l'est, en Autriche, en Allemagne et sur l'île de Chypre. Plusieurs études ont mis en évidence ce germe en Slovaquie chez *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *Haemaphysalis concinna*, *H. inermis* et *I. ricinus* (Rehacek, 1987; Rehacek et al.,

1991; Spitalska et Kocianova, 2003). Sa présence a été montrée aussi en Pologne (Tylewska-Wierzbanska et al., 1996), en République Tchèque chez *I. ricinus* (Sutakova et Rehacek, 1990), en Hongrie chez *D. marginatus*, *Haemaphysalis concinna* et *I. ricinus* (Spitalska et Kocianova, 2003), en Autriche chez *I. ricinus* (Rehacek et al., 1994), en Allemagne chez les tiques *Dermacentor* (Sting et al., 2004) et sur l'île de Chypre chez *R. sanguineus* et *Hyalomma* sp. (Spyridaki et al., 2002). *C. burnetii* a été isolée en Corée chez *Haemaphysalis longicornis* (Lee et al., 2004).

En 1983, une importante épidémie humaine de fièvre Q a été signalée dans le Val de Bagnes (Valais) (Dupuis et al., 1987). Cette épidémie a débuté 3 à 12 semaines après la descente des moutons (850-900 animaux) de l'alpage. Grâce à l'analyse sérologique, l'infection a été diagnostiquée chez 415 habitants sur les 3036 examinés. Une partie des cas était asymptomatique (224 sur 415), tandis que pour l'autre partie des patients (191 sur 415), le 75% présentait la forme aiguë de la maladie.

1.2.5.3. Hôtes réservoirs

Le réservoir est constitué par les mammifères domestiques et sauvages (vaches, chèvres, moutons, chevaux, porcs, buffles, chiens, chats, lapins, rongeurs, chameaux, etc.), les oiseaux (poules, dindes, oies, canards, pigeons, etc.) et plus de 40 espèces de 12 genres de tiques (*R. sanguineus*, *Haemaphysalis humerosa*, *H. leporis-palustris*, *H. bispinosa*, *H. concinna*, *Amblyomma triguttatum*, *A. americanum*, *D. occidentalis*, *D. andersoni*, *Otobius magnini* et *I. ricinus*, *I. dentatus*, *I. holocyclus*, *I. trianguliceps*, etc.) (Maurin et Raoult, 1999; Parola et Raoult, 2001; Spitalska et Kocianova, 2003).

Il a été suggéré que les amibes constituent un réservoir naturel de *C. burnetii*, de manière similaire à ce qui est décrit pour *Legionella* sp. (Maurin et Raoult, 1999).

1.2.5.4. Transmission

Plusieurs modes de transmission de *C. burnetii* sont connus. La tique ne joue pas un rôle important dans la transmission de ce germe à l'homme. En effet, le nombre de cas de fièvre Q dus à la piqûre d'une tique est très limité. Cependant, deux cas de coinfection entre *R. conorii* et *C. burnetii* ont été décrits en France, et plus précisément aux environs de Montpellier (Janbon et al., 1989). Par contre, la tique est essentielle dans la transmission de la bactérie entre les animaux sauvages tels que les rongeurs, les lagomorphes et les oiseaux (Marrie et al., 1986). Dans les premiers stades de l'infection, les animaux présentent souvent une bactériémie transitoire permettant une contamination des tiques. *C. burnetii* se multiplie dans les cellules de l'estomac et de l'intestin de l'arthropode et elle est éliminée par l'expulsion des selles (Parola et Raoult, 2001). Donc, la tique infectée peut contaminer l'hôte soit par piqûre soit par les selles qui entrent en contact avec la peau de l'animal (Maurin et Raoult, 1999). Les animaux infectés disséminent la bactérie dans l'environnement par les urines, les selles, le placenta et les annexes fœtales, éventuellement le lait. *C. burnetii* est très résistante et peut survivre plusieurs mois dans la nature (Greenfield et al., 2002). Les autres animaux sauvages et domestiques ainsi que l'homme peuvent se contaminer par l'inhalation des germes présents dans l'environnement (poussière contaminée) et par l'ingestion de lait infecté (rare). L'aérosol est donc le mode de transmission le plus important pour l'homme,

surtout pour les personnes qui travaillent avec les animaux (éleveurs, vétérinaires, marchands de bestiaux, employés d'abattoir, etc.).

Pour la tique, la transmission transstadiale et la transmission transovarienne ont été décrites (Parola et Raoult, 2001).

1.2.5.5. Manifestations cliniques

L'infection à *C. burnetii* peut se présenter sous forme aiguë ou chronique. Le 60% des cas sont asymptomatiques. Le 40% des patients restant sont symptomatiques et pour la majorité d'entre eux (38% de 40%), la maladie est modérée sans la nécessité d'une hospitalisation. Seulement dans le 0.2% des cas se manifestera la phase chronique de la maladie. En ce qui concerne la phase aiguë, la période d'incubation est de 2 à 3 semaines. Les patients symptomatiques sont sujets à des symptômes qui apparaissent brutalement avec une fièvre élevée, des céphalées intenses, de l'asthénie, des arthralgies, des myalgies, des nausées et des vomissements. Les manifestations cliniques peuvent varier d'une zone à l'autre. Par exemple en Suisse, en Nouvelle Ecosse et dans la région Basque de l'Espagne, on observe plus fréquemment des pneumonies, tandis qu'en France, dans l'Ontario, en Californie et en Andalousie, des atteintes hépatiques sont principalement décrites. Sans traitement, la durée de la maladie est d'au-moins 15 jours et la convalescence dure plusieurs mois. Dans la phase chronique, la forme la plus connue est l'endocardite qui peut apparaître plusieurs années après la phase aiguë. En absence d'un traitement spécifique, l'infection peut aboutir à la mort. L'infection se traduit en une altération de l'état général ou en une dégradation progressive de la fonction cardiaque. La fièvre Q pendant la grossesse peut provoquer des avortements spontanés ou des fausses couches (Maurin et Raoult, 1999; OFSP, 2000; Péter, 2003).

1.2.5.6. Traitement et prévention

La phase aiguë est habituellement traitée avec la doxycycline pendant 10-14 jours. En cas d'endocardite, un traitement antibiotique de très longue durée (années) est nécessaire, souvent combiné avec le remplacement de la valve infectée.

La prévention, sous forme de vaccin, s'adresse surtout aux personnes qui entrent en contact avec les animaux ou leurs produits comme les éleveurs, les vétérinaires et les employés d'abattoir ou qui entrent en contact avec la souche comme le personnel de laboratoire. Le vaccin n'est pas commercialisé en Suisse. La consommation de lait cru non pasteurisé est à éviter (OFSP, 2000).

2. BUTS

Les buts de ce travail sont divers:

- Confirmer la présence de *Rhipicephalus* sp. au Tessin, étudier la structure de sa population au niveau génétique et détecter la présence de *Rickettsia* sp. et *Coxiella* sp. Etant donné les changements climatiques dus au réchauffement du globe terrestre, il est important de revoir la répartition de la présence de cette tique d'origine tropicale et subtropicale et des agents pathogènes connus pour être transmis par ce vecteur.
- Etudier la variabilité génétique de la population des tiques *I. ricinus* s.s. en Europe par le séquençage et l'analyse phylogénétique de cinq gènes mitochondriaux (Control Region, 12S rDNA, cytb, COI et COII). En effet, dans le passé, les relations phylogénétiques entre les espèces du complexe *I. ricinus* ont été étudiées à plusieurs reprises, tandis qu'il existe peu d'informations sur la structure génétique à l'intérieur de l'espèce *I. ricinus* s.s..
- Déterminer la prévalence d'infection des tiques *I. ricinus* en Suisse par *B. burgdorferi* s.l. et étudier la diversité génétique de la population de borrélioses en Suisse. Actualiser et compléter les informations connues avec un regard particulier vers le Tessin et confronter les résultats obtenus pour les autres zones étudiées (Neuchâtel et Valais).
- Déterminer la prévalence d'infection des tiques *I. ricinus* en Suisse par *Babesia* sp. et identifier les différentes espèces. Actualiser et compléter les informations connues avec une attention particulière sur la situation au Tessin et confronter les résultats obtenus dans les autres zones étudiées (Neuchâtel, Valais et Zürich).
- Estimer le degré de risque du foyer naturel de Belp (canton Berne) et étudier la diversité génétique de la population de TBEV chez les tiques *I. ricinus* récoltées dans cette zone.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Récolte des tiques et zones d'étude

Nous avons collectionné des tiques provenant de différents cantons de la Suisse: Tessin (tout le canton), Valais (3 sites), Neuchâtel (1 site), Zürich (1 site) et Berne (1 site). De plus, nous avons reçu des tiques de différentes régions d'Europe du Nord, de l'Italie et d'Autriche.

3.2. Récolte des *I. ricinus* en Suisse

Plusieurs personnes ont collaboré à l'échantillonnage des tiques dans différentes régions de Suisse. Au Tessin, la récolte a été surtout réalisée sur les animaux (chiens, chats, vaches, chèvres et ânes) grâce à la collaboration avec les vétérinaires; quelques tiques ont aussi été prélevées de personnes. Pour les zones de Neuchâtel (récolte réalisée par Olivier Rais, Université de Neuchâtel), du Valais (par le Dr Olivier Péter, Institut Central des Hôpitaux Valaisans, Sion), de Belp (par le Dr Heinz Sager et le Prof. Bruno Gottstein, Université de Berne et par nous-mêmes) et à Zürich (par nous-mêmes) la récolte a été faite par la méthode du drapeau (Aeschlimann et al., 1972): celle-ci consiste à traîner à travers la végétation un linge blanc de 1 m² sur lequel les tiques en phase de quête vont s'accrocher.

Après l'identification à l'aide d'une clé de détermination morphologique (Senevet G., 1937), les tiques sont conservées dans de l'éthanol 100% à 4 °C (Tessin, Valais et Zürich) et à -80 °C (Neuchâtel et Belp). Les tiques provenant de Neuchâtel, du Valais et du Tessin ont été collectées au printemps et en automne 2002, celles de Belp au printemps 2004 et celles provenant de Zürich en automne 2003 (tableau 9).

Tableau 9. Description des localités et du nombre de tiques *I. ricinus* récoltées par région.

Zones d'étude	Localités	Description	No. de <i>I. ricinus</i>	Tiques examinées pour
Tessin	104 localités	Tableau 9a	294 (1L/9N/284A)	<i>B. burgdorferi</i> s.l. <i>Babesia</i> sp. Génétique de population
Valais	Mont d'Orge (Sion) Gueuroz (Val du Trient) Finges (Pfyn-Finges)	Annexe 1	286 (82N/204A)	<i>B. burgdorferi</i> s.l. <i>Babesia</i> sp. Génétique de population
Neuchâtel	Neuchâtel: forêt qui borde la ville de Neuchâtel, zone de 1049 m ²	Annexe 2	294 (155N/139A)	<i>B. burgdorferi</i> s.l. <i>Babesia</i> sp. Génétique de population
Zürich	Zürich: Zürichberg, zone du zoo	Annexe 3	285 (246N/39A)	<i>Babesia</i> sp. Génétique de population
Berne	Belp: Viehweid, près de la rivière Aar	Annexe 4	307 (75N/232A)	TBEV

L= larve, N= nymphes, A= adultes

Tableau 9a. Liste des localités de provenance des tiques *I. ricinus* collectées au Tessin et dans la région voisine des Grisons*.

104 localités au Tessin			
Acquarossa	Chironico	Lottigna	Piotta
Agno	Cima di Medeglia	Lugano	Pollegio
Airolo	Claro	Lumino	Porza
Arbedo	Corteglia (Leventina)	Madrano	Pregassona
Arcegno	Corzoneso	Massagno	Rivera
Arogno	Cresciano	Medeglia	Rodi
Arosio	Cureglia	Melano	Ronco s/Ascona
Arzo	Freggio	Mendrisio	Sagno
Ascona	Genestrerio	Meride	Sala Capriasca
Barbengo	Giornico	Mesocco	Sementina
Bassa Valle di Blenio	Gnosca	Mesolcina	Semione
Bellinzona	Gola di Lago	Minusio	Solduno
Biasca	Gordevio	Moghegno	Stabio
Borgnone	Gorduno	Montagnola	Sureggio
Bruzella	Grono*	Monte Carasso	S. Vittore*
Cabbio	Gudo	Monti di Cavagliano	Taverne
Cademario	Intragna	Monti di Mezzovico	Tegna
Cama*	Iragna	Monti di Semione	Tesserete
Camignolo	Isonne (Alpe Mürecc)	Morbio Inferiore	Torricella
Camorino	Lamone	Motto	Vacallo
Capolago	Lavertezzo	Mugena	Valle di Arbedo
Carena	Locarno	Muggio (Alpe Bolla)	Valle di Blenio
Cassina d'Agno	Lodano	Muggio	Valle Onsernone
Castel S. Pietro	Lodrino	Origgio	Verscio
Cevio	Losone	Osogna	Vezia
Chiasso	Lostallo	Piora	Viganello

3.3. Récolte des *I. ricinus* hors de Suisse

Nous avons reçu plusieurs tiques *I. ricinus* d'Europe du Nord grâce à un appel lancé par le Dr Marco Bernasconi sur le site web Evoldir et grâce à des collègues qui ont récolté des tiques en Autriche et en Italie (tableau 10). Après identification, les tiques ont été conservées dans de l'éthanol 100% à 4 °C.

Tableau 10. Origine géographique des tiques *I. ricinus* collectées hors de Suisse et utilisées pour l'étude de la diversité génétique de leur population en Europe.

Origine géographique	Description
Suède (Stockholm)	Annexe 5
Suède (Smaland)	
Finlande (Turku)	Annexe 6
Finlande (Helsinki)	
Danemark (Aebelø)	Annexe 7
Danemark (Sejerø)	
Danemark (Teglstrup Hegn)	
Autriche (Hammerfeld)	Annexe 8
Autriche (Höll)	
Italie (Genova)	Annexe 9

3.4. Récolte des *Rhipicephalus* sp. au Tessin.

La récolte de *Rhipicephalus* sp. a été faite en deux périodes, une première fois à partir du mois de juillet 1994 jusqu'au mois de juin 1995, et une deuxième fois du mois de juin au mois d'octobre 2001. La majorité des tiques a été récoltée au Tessin, sauf quelques exemplaires provenant de localités hors de Suisse (tableau 11).

Tableau 11. Liste des tiques *Rhipicephalus* sp. analysées pour l'étude de la structure génétique de leur population et la présence de *Rickettsia* sp. et *Coxiella burnetii*.

No. échantillon	Espèce	Source	Origine géographique	Date de récolte	Genbank (gène rDNA 12S, 309-311 bp)
46	<i>R. turanicus</i>	Chien	Toscana (Italie)**	30.05.2001	AF483243
127	<i>R. turanicus</i>	Chien	Chiasso*	13.06.2001	AF483244
150	<i>R. sanguineus</i>	Chat	Losone	23.05.2001	AF483219
163	<i>R. turanicus</i>	Maison	Solduno	22.05.2001	AF483245
165	<i>R. turanicus</i>	Chien	Costa Rica (Amérique du Sud)**	17.05.2001	AF483246
198	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Novazzano*	20.06.2001	AF483220
214	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Morbio Inferiore*	19.07.2001	AF483221
238	<i>R. sanguineus</i>	Chien ou maison	Rivera/Bironico*	10.07.1994	AF483222
239	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Monte Ceneri*	05.05.1995	AF483223
240	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Luganese*	14.06.1995	AF483224
241	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Castel S. Pietro*	14.06.1995	AF483225
242	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Piano di Magadino	01.06.1995	AF483247
243	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Vacallo*	09.06.1995	AF483226
244	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Gentilino*	27.06.1995	AF483227
245	<i>R. turanicus</i>	Chien	Sonlerto/Val Bavona	30.07.1995	AF483248
246	<i>R. turanicus</i>	Chien	Luganese*	30.07.1995	AF483249
247	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Lamone*	16.08.1995	AF483228
248	<i>R. turanicus</i>	Chien	Montagnola*	16.09.1995	AF483250
249	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Lugano*	23.03.1995	AF483229
250	<i>R. turanicus</i>	Chien	Pambio-Noranco*	24.04.1995	AF483251
251	<i>R. turanicus</i>	Chien	Arzo*	10.05.1995	AF483252
252	<i>R. turanicus</i>	Chien	Novazzano*	26.06.1996	AF483253
253	<i>R. turanicus</i>	Chien	Monte Bisbino (Italie)**	02.05.1995	AF483254
254	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Lamone*	27.06.1995	AF483230
255	<i>R. turanicus</i>	Chien	Mendrisiotto*	05.06.1995	AF483255
256	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Mendrisio*	20.04.1995	AF483231
257	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Neggio*	21.04.1995	AF483232
258	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Morbio Inferiore*	11.05.1995	AF483233
259	<i>R. turanicus</i>	Chien	Mendrisio*	27.06.1995	AF483256
260	<i>R. turanicus</i>	Chien	Molinazzo	30.06.1995	AF483257
261	<i>R. turanicus</i>	Chien	Vernate*	16.08.1995	AF483258
267	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Lostallo	1995	AF483234
560	<i>R. turanicus</i>	Chien	Lugano*	20.05.1995	AF483259
561	<i>R. sanguineus</i>	Chien ou chat	Rivera/Bironico*	10.07.1995	AF483235
562	<i>R. turanicus</i>	Chien	Monte Bisbino (Italie)**	02.05.1995	AF483260
563	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Inconnu	01.06.1995	AF483236
565	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Lamone*	16.08.1995	AF483237
566	<i>R. turanicus</i>	Chien	Lugano/Caslano*	27.06.1995	AF483261
567	<i>R. sanguineus</i>	Vache	Freggio	06.06.1995	AF483238
568	<i>R. sanguineus</i>	Homme	Val d'Osogna	23.08.1995	AF483239
569	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Bedano*	22.05.1995	AF483240
570	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Stabio*	02.06.1995	AF483241
571	<i>R. turanicus</i>	Chien ou chat	Barbengo*	15.05.1995	AF483262
573	<i>R. sanguineus</i>	Chien	Milano (Italie)**	20.05.1995	AF483242
574	<i>R. turanicus</i>	Chien	Luganese*	20.05.1995	AF483263
575	<i>R. turanicus</i>	Chien	Monte Bisbino (Italie)**	15.05.1995	AF483264

*localités au sud du Tessin

**localités hors de Suisse

3.5. Souches de référence

Elles servent d'une part comme contrôle positif pour la PCR, et d'autre part comme séquence de référence pour les analyses phylogénétiques.

3.5.1. *Rickettsia* sp.

Nous avons reçu de la part du Prof. Didier Raoult (Université de la Méditerranée, Marseille, France) de l'ADN de l'espèce *R. conorii*. L'ADN a été utilisé comme contrôle positif pour la méthode d'amplification génomique (PCR).

3.5.2. *B. burgdorferi* s.l.

Nous avons utilisé des souches de *B. burgdorferi* s.l. provenant de la collection disponible dans notre Institut. Les souches étaient conservées à -80°C dans le milieu de culture liquide BSK-H (Balmelli et Piffaretti, 1995). Les 33 souches choisies ont été utilisées comme référence (SR) pour l'analyse phylogénétique. En effet, dans GenBank, seules 3 séquences de *Borrelia* étaient disponibles pour le gène *recA*. Les 33 séquences du gène *recA* (162 bp) ont été déposées dans GenBank (tableau 12).

Tableau 12. Description de 33 souches de *B. burgdorferi* s.l. utilisées comme référence pour les analyses phylogénétiques.

Souches	Génoespèce	Origine géographique	GenBank (gène <i>recA</i> , 162 bp)
B31	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Etats-Unis	AY586362
NY1387	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Etats-Unis	AY586363
A44S	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Hollande	AY586364
P1G	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Suisse	AY586365
IP1	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	France	AY586366
IP2	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	France	AY586367
IP3	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	France	AY586368
VS219	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Suisse	AY586369
SIKA2	<i>B. garinii</i>	Japon	AY586370
SIKA1	<i>B. garinii</i>	Japon	AY586371
VSPB	<i>B. garinii</i>	Suisse	AY586372
P/Bi	<i>B. garinii</i>	Allemagne	AY586373
VS102	<i>B. garinii</i>	Suisse	AY586374
NT29	<i>B. garinii</i>	Japon	AY586375
Ip89	<i>B. garinii</i>	Russie	AY586376
A19S	<i>B. garinii</i>	Hollande	AY586377
Poti B1	<i>B. lusitaniae</i>	Portugal	AY585876
Poti B2	<i>B. lusitaniae</i>	Portugal	AY585877
Poti B3	<i>B. lusitaniae</i>	Portugal	AY586378
VS116	<i>B. valaisiana</i>	Suisse	AY586379
UK	<i>B. valaisiana</i>	Angleterre	AY586380
CA2	<i>B. burgdorferi</i> sensu lato	Etats-Unis	AY586381
VS461	<i>B. afzelii</i>	Suisse	AY586382
DK8	<i>B. afzelii</i>	Danemark	AY586383
A26S	<i>B. afzelii</i>	Hollande	AY586384
ECM1	<i>B. afzelii</i>	Suède	AY586385
BO23	<i>B. afzelii</i>	Allemagne	AY586386
HO14	<i>B. japonica</i>	Japon	AY586387
COW611A	<i>B. japonica</i>	Japon	AY586388
DN127	<i>B. bissettii</i>	Etats-Unis	AY586389
CA128	<i>B. bissettii</i>	Etats-Unis	AY586390
CA55	<i>B. bissettii</i>	Etats-Unis	AY586391
19952	<i>B. andersoni</i>	Etats-Unis	AY586392

3.5.3. *Babesia* sp.

De l'ADN de *B. divergens* et *B. canis* nous a été envoyé par le Prof. André Gorenflot (Université de Montpellier, Montpellier, France). De plus, l'Institut de Parasitologie de Berne (Université de Berne, Dr Heinz Sager) nous a fourni plusieurs échantillons de sang infectés avec 7 différentes souches de *Babesia* (tableau 13). Les 7 séquences du gène 18S rRNA (411-452 bp) ont été déposées dans GenBank (tableau 13).

Tableau 13. Description des 7 souches de *Babesia* sp.

Souches	Source	Provenance des souches	GenBank (18S rRNA, 411-452bp)
<i>B. equi</i>	Sang de cheval	Cas en Suisse (Bern)	AY648885
<i>B. canis</i>	Sang de chien	Cas en Suisse	AY648872
<i>B. divergens</i>	Sang de bovin	Souche de référence (Institute for Parasitology, Hannover Veterinary School)	AY648871
<i>B. major</i>	Sang de bovin	Souche de référence (Central Veterinary Laboratory, Weybridge)	AY648886
<i>B. bigemina</i>	Sang de bovin	Souche de référence (Central Veterinary Laboratory, Weybridge)	AY648884
<i>B. canis canis</i>	Sang de chien	Cas en Suisse (Aargau)	AY648874
<i>B. divergens</i>	Frottis de sang de bovin	Cas en Suisse (Fribourg)	AY648873

3.5.4. Virus TBE

L'ARN extrait d'un isolat du virus TBE nous a été envoyé par le Prof. Franz X. Heinz (Institut de Virologie, Université de Vienne, Autriche). L'ARN a été indispensable comme contrôle positif pour la RT-PCR et ensuite la nested PCR (voir plus loin).

3.6. Extraction de l'ADN total des tiques

Après avoir découpé une tique à l'aide d'un bistouri dans un tube stérile de 1.5 ml, nous avons procédé à l'extraction de l'ADN en utilisant le Dneasy Tissus kit (Qiagen AG) selon le protocole fourni par les producteurs. La phase de digestion avec la protéinase K (20 µg/ml) a été suivie par une série de lavages, puis par l'éluion finale de l'ADN dans 200 µl de tampon fourni avec le kit. L'ADN extrait a été conservé à -80 °C.

3.7. Extraction de l'ARN total des tiques

L'ARN total a été extrait de chaque tique en utilisant l'extracteur automatique MagnaPure (Roche) avec le MagNAPure LC Total Acid Isolation Kit (Roche) selon le protocole fourni par les producteurs. Tout

d'abord, les tiques ont été congelées avec de l'azote liquide et broyées à l'aide d'un pilon en plastic (Fisher scientific) dans un tube stérile de 1.5 ml. Ensuite le broyat de tique a été mélangé avec 600 µl de tampon de lyse et homogénéisé avec les colonnes QIAshredder (Qiagen AG). La suspension finale a été traitée par le MagNAPure. Par cette méthode, on extrait en même temps l'ARN total et l'ADN total. L'extrait est conservé à -80°C.

3.8. Extraction de l'ADN des micro-organismes

3.8.1. *B. burgdorferi* s.l.

L'ADN a été extrait à partir de 200 µl de culture liquide de BSK-H conservé à -80 °C avec le Instagene DNA extraction matrix (Biorad), selon les indications du fournisseur. L'extrait est conservé à -80 °C.

3.8.2. *Babesia* sp.

L'ADN des souches de *Babesia* utilisées pour valider la méthode de la PCR a été extrait à partir des échantillons de sang infectés avec le QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen AG) selon le protocole fourni par les producteurs. L'ADN a été conservé à -80 °C.

3.9. PCR

3.9.1. Principe de la PCR "classique"

La PCR (Polymerase Chain Reaction) ou amplification génomique est une technique très efficace applicable directement sur l'ADN extrait d'échantillons prélevés dans la nature. Elle permet de synthétiser de grandes quantités d'une région génétique choisie, même si la quantité de départ est très faible, à condition de connaître au moins une partie de la séquence (les extrémités appelées amorces ou "primers"). La répétition des cycles de synthèse assure une duplication exponentielle de chaque brin. En général, les étapes sont répétées 30-40 fois, ce qui correspond en principe à une amplification de 2^{30} à 2^{40} . Chaque cycle est divisé en trois parties avec des températures différentes: dénaturation du double-brin d'ADN (94 °C), hybridation des amorces sur les brins d'ADN (50 °C - 65 °C) et élongation du brin complémentaire par la Taq polymérase (ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*) qui ajoutent les nucléotides (dNTP) dans le sens 5' - 3' (72 °C). La synthèse et la multiplication des séquences choisies permettent d'accumuler suffisamment de matériel pour la suite des analyses.

3.9.2. RT-PCR (transcriptase inverse PCR)

RT-PCR signifie "Reverse Transcriptase PCR", soit une PCR "classique" après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc). De plus, la Tth DNA polymérase (ADN polymérase thermorésistante extraite de *Thermus thermophilus*) choisie permet d'effectuer la réaction de transcription inverse et la réaction de polymérisation en chaîne dans le même tube. En effet, elle a une

double activité: transcriptase inverse en présence d'ions manganèse et ADN polymérase en présence d'ions magnésium.

3.9.3. RT-PCR (real time PCR)

Le LightCycler est un thermocycleur rapide (à air pulsé), couplé à un fluorimètre et piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données ainsi que leur traitement. La détection des produits PCR est permise par l'utilisation du fluorochrome Sybr Green (longueur d'onde d'excitation 497 nm et d'émission 521 nm) capable de se lier à l'ADN double brin. Au début de l'amplification, le mélange réactionnel contient de l'ADN dénaturé, les primers et le fluorochrome non lié. Après l'hybridation des amorces, le fluorochrome se lie au double-brin. Cette liaison se traduit par une augmentation de la fluorescence, encore plus grande, lors de l'élongation. La fluorescence est mesurée à la fin de cette étape de chaque cycle.

Un autre aspect intéressant du LightCycler est l'analyse des produits PCR par "melting curve" (courbe de fusion). Le point de fusion d'un fragment d'ADN dépend de la longueur et du contenu en G/C. Ainsi, cette analyse différencie les produits PCR permettant l'identification du fragment d'ADN ou la détection de mutations en se référant à une ou plusieurs références utilisées pendant la réaction.

3.9.4. Réactions PCR utilisées dans cette étude

Pour chaque vecteur et agent pathogène considérés dans cette étude nous avons appliqué des réactions PCR différentes. Pour l'étude de la structure de la population au niveau génétique des vecteurs *R. sanguineus* s.l. et *I. ricinus* s.s., nous avons choisi des gènes mitochondriaux comme le rDNA 12S pour le premier vecteur et en plus la "Control Region", le cytochrome oxydase sous-unité b (*cytb*), le cytochrome oxydase sous-unité I (*COI*) et le cytochrome oxydase sous-unité II (*COII*) pour le deuxième vecteur. Nous avons dessiné les primers pour la "Control Region", le *cytb* et le *COI* et modifié des primers décrits par Simon et al. (1994) pour le *cytb*, le *COI* et le *COII* (annexe 10). Les réactions PCR sont reportées aux annexes 11 et 12.

Dans la littérature, nous avons trouvé des méthodes PCR très valides pour la recherche des quatre germes suivants: *Rickettsia* sp. (annexe 13), de *C. burnetii* (annexe 14), *B. burgdorferi* s.l. (annexe 15) et du TBEV (annexe 16). Pour la détection de *Rickettsia* sp. chez *R. sanguineus* s.l. trois gènes ont été utilisés: *gltA*, *ompA* et rDNA 16S (primers annexe 10). Ce dernier (rDNA 16S) a été employé aussi pour la mise en évidence de *C. burnetii* chez le même vecteur (primers annexe 10). Le gène *recA* a été choisi pour la recherche de *B. burgdorferi* s.l. chez *I. ricinus* par la méthode de la RT-PCR (primers annexe 10). Pour le TBEV, la méthode utilisée a été celle décrite par Schrader et al. (1999), c'est-à-dire une nested RT-PCR sur la région 5' terminal du cadre de lecture (ORF) du virus comprenant une partie de la région non codifiante (NCR) et de la région de la capsid (C) (primers annexe 10).

Pour le micro-organisme restant, *Babesia* sp., nous avons dessiné des primers (annexe 10) et mis au point la PCR (annexe 17) pour sa détection chez *I. ricinus* sur la base du gène rDNA 18S car dans la littérature nous n'avons pas trouvé une méthode satisfaisante.

3.10. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sépare les molécules d'ADN selon leur taille dans un gel d'agarose soumis à un champ électrique continu. Chaque nucléotide d'une molécule d'acide nucléique porte une charge négative unique, ce qui permet au fragment d'ADN de migrer à travers les mailles du gel vers l'électrode positive. Nous utilisons des gels horizontaux d'agarose 1.6% (EUROBIO, Brüenschwig) préparés avec le tampon TBE10X (annexe 18). Les échantillons sont chargés sur le gel à l'aide d'un tampon de charge (Loading buffer; annexe 18). Pour visualiser les acides nucléiques qui ont migré, on ajoute 1 µl/100 ml de solution de bromure d'éthidium (10 mg/ml; annexe 18) dans la composition du gel. Les fragments d'ADN sont visualisés à la lumière ultraviolette (UVP BlocDoc-It™ System) et photographiés (Video Graphic Printer, Sony).

3.11. Purification des produits PCR

La purification des produits amplifiés par PCR, donc visualisés sur le gel d'agarose, a été réalisée avec le kit Amicon Microcon (Millipore) ou le Kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN AG) selon le protocole du fournisseur.

3.12. Séquençage

Le séquençage de l'ADN détermine la succession des nucléotides qui le compose. Des molécules fluorescentes sont incorporées à l'ADN par l'intermédiaire des di-désoxyribonucléotides (ddNTP) marqués chacun avec un fluorochrome de couleur différente (dichloro [R6G] pour A, dichloro [ROX] pour C, dichloro [R110] pour G et dichloro [TAMRA] pour T). Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3' et provoquent ainsi l'arrêt aléatoire de la synthèse du brin d'ADN car l'ADN polymérase n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite. L'échantillon d'ADN à déterminer est injecté dans un capillaire contenant un polymère. Les deux extrémités du capillaire, plongées dans une solution tampon, sont soumises à un champ électrique qui provoque la migration des fragments vers l'anode. Le séquenceur est ensuite capable de reconnaître les extrémités fluorescentes des brins d'ADN par détection des différents signaux émis par les fluorochromes excités par un faisceau de rayon laser situé à la fin du capillaire. La fluorescence émise est lue grâce à une camera CCD ("charge-coupled device") à très haute résolution, laquelle révèle l'émission en fluorescence des échantillons analysés, en offrant en quelques minutes l'électrophérogramme (série de pics colorés) avec la relative séquence de bases.

Le séquençage des échantillons positifs, dans les deux directions, a été fait en utilisant le ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) selon les indications du fournisseur.

a) Primers et réaction de séquençage

Les primers utilisés sont décrits dans l'annexe 10 et le mode opératoire dans l'annexe 19.

b) Purification des séquences

La purification a été faite en utilisant des colonnes PERFORMA™ DTR Gel Filtration Cartridges (Edge BioSystem, Lyfe Systems Design) selon les indications des fournisseurs.

c) Chargement sur le séquenceur et lecture des résultats

Dans un tube de 0.5 ml propre au séquenceur, 5 µl de l'échantillon purifié sont mélangés avec 15 µl de H₂O filtrée (0.2 µm) stérile. Le séquenceur utilisé est un ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Après préparation de l'appareil et chargement selon les instructions du fournisseur, la lecture des séquences est faite automatiquement.

3.13. Analyse et comparaison des séquences obtenues

Les séquences obtenues ont été vérifiées manuellement, éventuellement corrigées et analysées grâce aux logiciels EditSeq et MegAlign (DNASTAR Inc., Madison, WI).

3.14. Analyses phylogénétiques

La phylogénie moléculaire est une branche de la systématique: elle consiste à déterminer l'arbre phylogénétique d'un ensemble de séquences homologues données, c'est-à-dire la configuration la plus probable pour rendre compte du degré de parenté existant entre ces séquences. Les analyses phylogénétiques ont été faites en utilisant 2 groupes de méthodes différentes (Hall, 2001):

1) les méthodes de distance ou phénétiques (quantitatives) se proposent de reconstruire des arbres en partant des ressemblances observées entre chaque paire d'unité évolutive (dans notre étude l'unité correspond à la séquence). L'arbre traduit le degré de similarité sans nécessairement tenter de refléter l'évolution moléculaire sous-jacente (l'histoire) des phénotypes observés. Plus la ressemblance globale entre deux unités est importante, plus leurs liens de parenté sont étroits. Le calcul des distances et la construction d'arbres phylogénétiques sont les deux principales étapes d'analyse des séquences par ces méthodes. Le calcul des distances évolutives se base sur des modèles évolutifs par exemple le "Kimura-2-parameters" (Kimura, 1980), le "Tamura-3-parameters" (Tamura, 1992) et le "Tamura-Nei" (Tamura et Nei, 1993), qui considèrent de manière différente la substitution des nucléotides en corrigeant ainsi les distances observées. Une fois la matrice de distance obtenue, celle-ci est transformée en un arbre phylogénétique par la méthode des distances "Neighbor Joining" (NJ) (Saitou et Nei, 1987). L'originalité de cette méthode est qu'elle construit un seul arbre en choisissant d'associer les unités dont le regroupement va minimiser la longueur totale de l'arbre (somme de la longueur de ses branches). Pour réaliser ces analyses, nous avons utilisé le logiciel MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 2.1, (Kumar, 2001)).

2) les méthodes de caractère ou cladistiques (qualitatives) comprennent a) la méthode de la parcimonie (maximum parsimony, MP) et b) la méthode de la vraisemblance maximum (maximum likelihood, ML). Pour ces méthodes, la configuration de l'arbre tente de représenter le degré de parenté en intégrant l'évolution moléculaire sous-jacente aux phénotypes observés.

a) La parcimonie consiste à minimiser le nombre de "pas" (substitutions/insertion/délétions) nécessaires pour passer d'une séquence à une autre dans une topologie de l'arbre. Cette méthode recherche toutes les topologies possibles afin de trouver l'arbre optimal. Pour ceci, nous avons utilisé le logiciel PAUP 4.0*b10 (Swofford, 2002).

b) La méthode de la vraisemblance maximum évalue, en terme de probabilités, l'ordre des branchements et la longueur des branches d'un arbre sous un modèle évolutif donné. Lorsque le taux de changement s'avère très élevé sur l'ensemble des sites, les approches statistiques semblent nettement plus

appropriées. Cette méthode de reconstruction phylogénétique a été faite avec le logiciel Dambe (Xia et Xie, 2001).

La fiabilité des branches internes a été testée par la méthode de bootstrap (Felsenstein, 1988). Cette méthode génère un échantillonnage aléatoire et procède ensuite, sur chacun des échantillons, à la recherche du ou des meilleurs arbres. Elle recense alors les groupements les plus fréquemment rencontrés sur l'ensemble des arbres et restitue l'arbre consensus intégrant les groupements les plus fréquents, compatibles entre eux. De plus, MEGA a été utilisé pour calculer les distances génétiques, pour estimer le pourcentage de la composition des bases et le codon usage (Kumar, 2001).

4. RESULTATS

Publication I

Rhipicephalus Ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino).
Infection, Genetics and Evolution 2 (2002): 111-120.

Publication II

Population genetics of *Ixodes ricinus* sensu stricto (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial DNA sequences.
Submitted, 2005.

Publication III

Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by *recA* gene sequence.
FEMS Microbiology Letters 238 (2004) 115-123.

Publication IV

Presence of human pathogenic *Babesia* sp. in *Ixodes ricinus* in Switzerland.
Submitted, 2005.

Publication V

Diversity of the Tick-borne Encephalitis Virus population infecting *Ixodes ricinus* ticks in an endemic area of the central Switzerland (Canton Bern).
Submitted, 2005.

4.1. Publication I

Rhipicephalus Ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino).

Infection, Genetics and Evolution 2 (2002): 111-120.



Rhipicephalus ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino)[☆]

Marco V. Bernasconi^{a,*}, Simona Casati^a, Olivier Péter^b, Jean-Claude Piffaretti^a

^a Istituto Cantonale Batteriosierologico, Via Buffi 6, CH-6904 Lugano, Switzerland

^b Institut Central des Hôpitaux Valaisans, Av. Gd-Champsec, CH-1951 Sion, Switzerland

Received 22 April 2002; received in revised form 19 July 2002; accepted 29 July 2002

Abstract

Ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* species complex may be vector of various pathogens including *Rickettsia conorii* (the etiological agent of the Mediterranean spotted fever) and *Coxiella burnetii* (cause of the Query (Q) fever). *R. sanguineus* ticks have been imported in several parts of central and northern Europe, especially in environments such as kennels and houses providing the appropriate microclimatic conditions and the blood source necessary for their survival. Since 1940 these ticks have occasionally been recorded in Switzerland. In Ticino (the southern part of Switzerland), they have been reported since 1980 and their probable establishment in this area has been suggested in the 90s. By means of PCR and direct sequencing, we tested the identity of these ticks (using 12S rDNA gene) and the occurrence of *Rickettsia* spp. (using 16S rDNA, *gltA* and *OmpA* genes) as well as *Coxiella* sp. (using 16S rDNA). The results indicated that in Ticino, two different tick species coexist, i.e. *R. sanguineus* sensu stricto and *Rhipicephalus turanicus*. A few individuals of *R. sanguineus* sensu stricto are infected with *Rickettsia massiliae*/Bar29, which are strains of unknown pathogenicity. *Coxiella* sp., an endosymbiont of *Rhipicephalus* ticks, has also been identified in both tick species. Due to climatic changes towards global warming, imported tick species may therefore adapt to new area and might be considered as epidemiological markers for a number of infectious agents transmitted by them.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Tick; Zoonoses; Endosymbiont; Phylogeny; mtDNA; 12S rDNA; 16S rDNA; *gltA*; *OmpA*

1. Introduction

The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*, is a complex of species endemic in tropical and subtropical regions and may be vector of pathogenic micro-organisms. In the Mediterranean countries, these ticks are responsible for the transmission of the boutonniere or Mediterranean spotted fever (Aeschlimann and Büttiker, 1975; Péter et al., 1984; Aeschlimann et al., 1986; Parola and Raoult, 2001). The etiologic agent of this infection is the bacterium *Rickettsia conorii*. The disease is characterised by a black eschar (“tâche noire”) at the point of the tick bite, associated with high temperature and other flu-like symptoms. With the progression of the disease, a pink or violaceous maculopapular eruption will appear on several parts of the body. In some patients, more serious complications such as neurological,

renal or cardiac manifestations, can occur (see Raoult and Roux, 1997 for a review).

Query (Q) fever is an ubiquitous zoonotic disease caused by *Coxiella burnetii*. This micro-organism has been found in several tick species including *R. sanguineus*. Even if the role of ticks in human infections is probably minimal, ticks may be important in the dissemination of this pathogen in the environment because of the high concentration of *C. burnetii* in tick faeces (Parola and Raoult, 2001). The disease is usually acquired by the ingestion or inhalation of virulent organisms from infected mammals (normally goats, sheep, and cats) and their products (Parola and Raoult, 2001). The infection may present with acute or chronic clinical manifestations. Acute Q fever manifests primarily as a self-limited febrile illness, atypical pneumonia, or a granulomatous hepatitis, whereas endocarditis is the more common presentation of chronic Q fever (see Maurin and Raoult, 1999 for a review). Concomitant human infection caused by *R. conorii* and *C. burnetii* has been reported in the past (Janbon et al., 1989).

Although of African origin, *R. sanguineus* ticks have been collected in different parts of central and northern Europe including Switzerland, especially in environments such as kennels and houses providing the appropriate microclimatic

[☆] Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank, EMBL and DDBJ databases under the accession numbers AF483217–AF483264, AF484070–AF484078, AF487650–AF487651, AF487705–AF487708, and AY080898.

* Corresponding author. Tel.: +41-91-923-25-22; fax: +41-91-922-09-93.

E-mail address: marco.bernasconi@ti.ch (M.V. Bernasconi).

conditions and the blood source necessary for the survival of these ticks (Aeschlimann and Büttiker, 1975; Péter et al., 1984; Parola and Raoult, 2001). The presence of *R. sanguineus* ticks has been recorded in Switzerland since 1940, however it has been considered as occasional and not permanently established (Aeschlimann et al., 1965). This species has also been reported in Ticino since the beginning of the 80s (Aeschlimann et al., 1986; Misérez et al., 1990) and its probable establishment in this area has been suggested in the 90s (Bernasconi et al., 1997).

The Canton Ticino is a Swiss area of about 2800 km² located in the southern part of the Alps. This region often represents the northern limit in the distribution of several Mediterranean animal and plant species. Hence, it is not surprising that tick species of the *R. sanguineus* species complex may be occasionally found in this area. The differentiation of species within this complex is of clinical and veterinary importance because of the different host specificities of the transmitted pathogens (Zahler et al., 1997). Moreover, as emphasised by Parola and Raoult (2001), tickborne rickettsioses are a model of emerging diseases and numerous *Rickettsiae* of unknown pathogenicity have been isolated or detected in ticks in recent years (Raoult and Roux, 1997). For these reasons, it is important to determine the precise identity of these ticks collected in Southern Switzerland and test the occurrence of species of the *Rickettsia* and *Coxiella* genera.

2. Materials and methods

2.1. Sample sources

The collaboration with veterinarians and dog owners allowed us to collect *Rhipicephalus* ticks from the study area (Canton Ticino, the southern part of Switzerland). With few exceptions, most samples were correlated with information regarding date, location, and host from which ticks were collected. A first collection was performed on July 1994–October 1995 and a second on June–October 2001. Before DNA extraction, ticks were taxonomically determined. The specimens sampled for this study are listed in Table 1.

2.2. DNA extraction

DNA extraction was performed using either the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN AG, Basel, Switzerland) or the Dneasy Tissue Kit (QIAGEN AG, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Briefly, whole ticks were mechanically triturated in a microtube used as mortar and with the help of a corresponding micropestle, or were cut in several small pieces with a bistoury within a microtube. After digestion with Proteinase K (20 µg/ml) samples were applied to the columns for absorption and for washing DNA. Finally, the DNA was eluted in 200 µl of distilled water or buffer available from the kit.

2.3. PCR (*Rhipicephalus* ticks)

A standard PCR reaction was performed with 5 µl of the extracted DNA as template, 0.5 µM of each primer, 1 Unit Taq polymerase (QIAGEN AG, Basel, Switzerland) in a total reaction volume of 50 µl (buffer provided by the manufacturer). The reactions were overlaid with paraffin oil (Merck, Darmstadt, Germany) to prevent evaporation. Primers and PCR conditions were the same as reported by Beati and Keirans (2001). Briefly, primer T1B (5' AAAGTAGGATTAGATACCCT 3') and T2A (5' AATGAGAGCGACGGGCGATGT 3') amplifying a fragment of 338–339 bp of the mitochondrial 12S rDNA gene, were used. PCR conditions were as follow: 5 min of DNA denaturation at 94 °C, 5 cycles of denaturation at 94 °C for 15 s, annealing at 51 °C for 30 s, and elongation at 68 °C for 30 s, followed by 25 cycles of denaturation at 94 °C for 15 s, annealing at 53 °C for 30 s, and elongation at 70 °C for 30 s. The elongation was completed by a further 5-min step at 70 °C. PCRs were performed in a DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Rotkreuz, Switzerland).

2.4. PCR (*Rickettsia* and *Coxiella*)

A standard PCR reaction was performed with 5 µl of the extracted DNA from the whole tick as template, 0.5 µM of each primer, 1 Unit Taq polymerase (QIAGEN AG, Basel, Switzerland) in a total reaction volume of 50 µl (buffer provided by the manufacturer). The reactions were overlaid with paraffin oil (Merck, Darmstadt, Germany) to prevent evaporation. Primers fd1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') and rp2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3') designed by Weisburg et al. (1989) and amplifying a 1484 bp fragment of the 16S rDNA gene, were used to test the presence of *Rickettsia* and *Coxiella* in ticks by a standard PCR. According to Roux and Raoult (1995) an initial 5-min denaturation step at 95 °C was followed by 35 cycles of denaturation for 1 min at 95 °C, annealing for 1 min at 55 °C, and extension for 2 min at 72 °C. The amplification was finished by 10 min at 72 °C. For *Rickettsia*, two other standard PCRs were used, too. Primers Cs.Rp877p (5' GGGGGCCTGCTCACGGCGG 3') and Cs.Rp1258n (5' ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA 3') amplified a 380 bp fragment of the citrate synthase-encoding gene (*gltA*) with the following PCR profile: initial 2-min denaturation step at 95 °C, followed by 40 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 45 °C for 30 s, and extension at 65 °C for 55 s, followed by an incubation for 3 min at 72 °C to allow complete extension of PCR products (Roux et al., 1997). Finally, primers Rr 190.70p (5' ATGGCGAATATTTCTC-CAAAA 3') and Rr190-70l (5' GTTCCGTTAATGGCAGCATCT 3') amplified 632 bp of the *OmpA* gene. An initial 3 min of denaturation at 95 °C was followed by 35 cycles of denaturation for 20 s at 95 °C, annealing for 30 s at 46 °C, and extension for 1 min at 63 °C; the amplification

Table 1
List of samples used in this study

Sample number	Tick species	Accession number 12S rDNA	Source	Geographical origin	Date of collection	Detected micro-organism and accession number		
						<i>gltA</i> gene	<i>ompA</i> gene	16S rDNA gene
46	<i>R. turanicus</i>	AF483243	Dog	Toscana (Italy)	30.05.2001			
127	<i>R. turanicus</i>	AF483244	Dog	Chiasso	13.06.2001			<i>Coxiella</i> sp. AF484071
150	<i>R. sanguineus</i>	AF483219	Cat	Losone	23.05.2001			<i>Coxiella</i> sp. AF484072
163	<i>R. turanicus</i>	AF483245	House	Solduno	22.05.2001			<i>Coxiella</i> sp. AF484073
165	<i>R. turanicus</i>	AF483246	Dog	Costa Rica	17.05.2001			<i>Coxiella</i> sp. AF484074
198	<i>R. sanguineus</i>	AF483220	Dog	Novazzano	20.06.2001			<i>Coxiella</i> sp. AF484075
214	<i>R. sanguineus</i>	AF483221	Dog	Morbio Inferiore	19.07.2001			<i>Coxiella</i> sp. AF484076
238	<i>R. sanguineus</i>	AF483222	Dog or house	Rivera/Bironico	10.07.1994			
239	<i>R. sanguineus</i>	AF483223	Dog	Monte Ceneri	05.05.1995			
240	<i>R. sanguineus</i>	AF483224	Dog	Luganese	14.06.1995	<i>R. massiliae</i> Bar29 AY080898	ND ^a	ND
241	<i>R. sanguineus</i>	AF483225	Dog	Castel S. Pietro	14.06.1995			
242	<i>R. sanguineus</i>	AF483247	Dog	Piano di Magadino	01.06.1995			
243	<i>R. sanguineus</i>	AF483226	Dog	Vacallo	09.06.1995			
244	<i>R. sanguineus</i>	AF483227	Dog	Gentilino	27.06.1995			
245	<i>R. turanicus</i>	AF483248	Dog	Sonlerto/Val Bavona	30.07.1995			
246	<i>R. turanicus</i>	AF483249	Dog	Luganese	30.07.1995			
247	<i>R. sanguineus</i>	AF483228	Dog	Lamone	16.08.1995			
248	<i>R. turanicus</i>	AF483250	Dog	Montagnola	16.08.1995			<i>Coxiella</i> sp. AF484077
249	<i>R. sanguineus</i>	AF483229	Dog	Lugano	23.03.1995	<i>R. massiliae</i> Bar29 AF487650	Bar29 AF487705	Bar29 AF487707
250	<i>R. turanicus</i>	AF483251	Dog	Pambio–Noranco	24.04.1995			
251	<i>R. turanicus</i>	AF483252	Dog	Arzo	10.05.1995			
252	<i>R. turanicus</i>	AF483253	Dog	Novazzano	26.06.1996			
253	<i>R. turanicus</i>	AF483254	Dog	Monte Bisbino	02.05.1995			
254	<i>R. sanguineus</i>	AF483230	Dog	Lamone	27.06.1995			
255	<i>R. turanicus</i>	AF483255	Dog	Mendrisiotto	05.06.1995			
256	<i>R. sanguineus</i>	AF483231	Dog	Mendrisio	20.04.1995			
257	<i>R. sanguineus</i>	AF483232	Dog	Neggio	21.04.1995			
258	<i>R. sanguineus</i>	AF483233	Dog	Morbio Inferiore	11.05.1995			
259	<i>R. turanicus</i>	AF483256	Dog	Mendrisio	27.06.1995			<i>Coxiella</i> sp. AF484078
260	<i>R. turanicus</i>	AF483257	Dog	Molinazzo	30.06.1995			
261	<i>R. turanicus</i>	AF483258	Dog	Vernate	16.08.1995			
267	<i>R. sanguineus</i>	AF483234	Dog	Lostallo	1995			
560	<i>R. turanicus</i>	AF483259	Dog	Lugano	20.05.1995			
561	<i>R. sanguineus</i>	AF483235	Dog or house	Rivera/Bironico	10.07.1994			
562	<i>R. turanicus</i>	AF483260	Dog	Monte Bisbino	02.05.1995			
563	<i>R. sanguineus</i>	AF483236	Dog	unknown	01.06.1995			
565	<i>R. sanguineus</i>	AF483237	Dog	Lamone	16.08.1995			
566	<i>R. turanicus</i>	AF483261	Dog	Lugano/Caslano	27.06.1995			
567	<i>R. sanguineus</i>	AF483238	Cow	Freggio	06.06.1995			
568	<i>R. sanguineus</i>	AF483239	Human	Val d'Osogna	23.08.1995			
569	<i>R. sanguineus</i>	AF483240	Dog	Bedano	22.05.1995			
570	<i>R. sanguineus</i>	AF483241	Dog	Stabio	02.06.1995			
571	<i>R. turanicus</i>	AF483262	Dog or cat	Barbengo	15.05.1995			
573	<i>R. sanguineus</i>	AF483242	Dog	Milano (Italy)	20.05.1995	<i>R. massiliae</i> Bar29 AF487651	Bar29 AF487706	Bar29 AF487708
574	<i>R. turanicus</i>	AF483263	Dog	Luganese	20.05.1995			
575	<i>R. turanicus</i>	AF483264	Dog	Monte Bisbino	15.05.1995			
264	<i>D. marginatus</i>	AF483217	Dog	Bodio	24.08.2001	<i>R. slovacca</i> AF484070	ND	ND
564	<i>Haemaphysalis</i> sp.	AF483218	Cow	Freggio	14.06.1995			

^a ND means not determined.

Table 2
List of samples previously published and also used in this study

Species	Gene	Source	Geographical origin	Accession number	Reference
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	12S rDNA	<i>Canis familiaris</i>	France	AF150020	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus turanicus</i> 1	12S rDNA	Host unknown	Israel	AF150015	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus turanicus</i> 2	12S rDNA	Host unknown	Israel	AF150014	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus turanicus</i> 3	12S rDNA	Host unknown	Israel	AF150013	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus turanicus</i> 4	12S rDNA	<i>Capra hircus</i>	Zimbabwe	AF150017	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus turanicus</i> 5	12S rDNA	<i>Equus caballus</i>	France	AF150018	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus pusillus</i>	12S rDNA	Vegetation	France	AF150022	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus rossicus</i>	12S rDNA	Host unknown	Russia	AF150021	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus pumilio</i>	12S rDNA	<i>Canis familiaris</i>	Russia–Astrakhan	AF150023	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus bursa</i>	12S rDNA	Host unknown	Spain	AF150053	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus evertsi</i>	12S rDNA	<i>Bos taurus</i>	Zimbabwe	AF150052	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	12S rDNA	<i>Bos taurus</i>	Tanzania	AF150024	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus maculatus</i>	12S rDNA	Vet. Faculty Pretoria	South Africa	AF150026	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> 1	12S rDNA	<i>Bos taurus</i>	Uganda	AF150028	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> 2	12S rDNA	<i>Bos taurus</i>	Zimbabwe	AF150027	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus kochi</i>	12S rDNA	<i>Nesotragus moschatus</i>	Tanzania	AF150051	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus pravus</i>	12S rDNA	<i>Bos taurus</i>	Tanzania	AF150025	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus zumpti</i>	12S rDNA	Vegetation	South Africa	AF150016	Beati and Keirans, 2001
<i>Rhipicephalus simus</i>	12S rDNA	<i>Canis familiaris</i>	Zimbabwe	AF150019	Beati and Keirans, 2001
<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>gltA</i>	<i>Amblyomma maculatum</i>	USA	U59732	Roux et al., 1997
<i>Rickettsia sibirica</i>	<i>gltA</i>	<i>Dermacentor nuttali</i>	Former USSR	U59734	Roux et al., 1997
<i>Rickettsiasp.</i> 1 (<i>R. mongolotimonae</i>)	<i>gltA</i>	<i>Haemaphysalis asiaticum</i>	Inner Mongolia	U59731	Roux et al., 1997
<i>Rickettsia africana</i>	<i>gltA</i>	<i>Amblyomma variegatum</i>	Ethiopia	U59733	Roux et al., 1997
<i>Rickettsia conorii</i>	<i>gltA</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Morocco/South Africa/Georgia/India	U59730	Roux et al., 1997
<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>gltA</i>	<i>Dermacentor andersoni</i>	USA	U59729	Roux et al., 1997
Astrakhan fever rickettsia	<i>gltA</i>	<i>Rhipicephalus pumilio</i>	Russia–Astrakhan	U59728	Roux et al., 1997
Israeli tick typhus rickettsia	<i>gltA</i>	<i>Homo sapiens</i>	Israel	U59727	Roux et al., 1997
Thai tick typhus rickettsia	<i>gltA</i>	<i>Ixodes</i> sp. or <i>Rhipicephalus</i> sp.	Thailand	U59726	Roux et al., 1997
<i>Rickettsia slovacica</i>	<i>gltA</i>	<i>Dermacentor marginatus</i>	Slovakia	U59725	Roux et al., 1997
<i>Rickettsia japonica</i>	<i>gltA</i>	<i>Homo sapiens</i>	Japan	U59724	Roux et al., 1997
<i>Rickettsia montana</i>	<i>gltA</i>	<i>Microtus</i> sp.	USA	U74756	Roux et al., 1997
<i>Rickettsia massiliensis</i>	<i>gltA</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> / <i>R. turanicus</i>	Greece/France	U59719	Roux et al., 1997
Strain Bar29	<i>gltA</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Spain	U59720	Roux et al., 1997
<i>Rickettsia rhipicephali</i>	<i>gltA</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	USA	U59721	Roux et al., 1997
<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	<i>gltA</i>	<i>Hyalomma marginatum</i>	Morocco	U59722	Roux et al., 1997
<i>Rickettsia helvetica</i>	<i>gltA</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Switzerland	U59723	Roux et al., 1997
<i>Rickettsia australis</i>	<i>gltA</i>	<i>Homo sapiens</i>	Australia	U59718	Roux et al., 1997
<i>Rickettsia acari</i>	<i>gltA</i>	<i>Homo sapiens</i>	USA	U59717	Roux et al., 1997
<i>Rickettsiasp.</i> 2 (AB bacterium)	<i>gltA</i>	<i>Adalia bipunctata</i>	England	U59712	Roux et al., 1997
<i>Rickettsia canada</i>	<i>gltA</i>	<i>Haemaphysalis leporispalustris</i>	Canada	U59713	Roux et al., 1997
<i>Rickettsia bellii</i>	<i>gltA</i>	<i>Dermacentor variabilis</i>	USA	U59716	Roux et al., 1997
<i>Coxiella</i> “endosymbiont”	16S rDNA	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	USA	D84559	Noda et al., 1997
<i>Coxiella burnetii</i> 1	16S rDNA	–	Sweden	Y11501	Sjostedt et al., 1998
<i>Coxiella burnetii</i> 2	16S rDNA	–	–	M21291	Noda et al., 1997

was completed by holding for 7 min at 72 °C (Roux et al., 1996). PCRs were performed in a DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Rotkreuz, Switzerland).

2.5. DNA sequencing for *Rhipicephalus* ticks, *Rickettsia*, and *Coxiella*

Templates for direct sequencing were prepared by a simple purification step of PCR products using the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN AG, Basel, Switzerland)

following the manufacturer’s instructions. Cycle sequencing reactions were performed in total volumes of 15 µl using an ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Rotkreuz, Switzerland) on an ABI Prism 310 Genetic Analyser (Perkin-Elmer Applied Biosystems), all according to the manufacturers instructions. Tick samples (12S rDNA gene, 338 bp) were sequenced in both directions using our new designed internal primers RipSeqJ1 (5’ CAAAAAATTATGGCGG 3’), RipSeqN1 (5’ GTACATATTTTAGAGCT 3’), and RipSeqN2

(5' CTAAATTTTACTGCACC 3') (J means "major" and N means "minor" according to Simon et al., 1994). DNA sequencing for *Rickettsia* and *Coxiella* was performed with primers fd1 (16S rDNA gene, 441 bp for *Rickettsia* and 364 bp for *Coxiella*), Cs.Rp877p (*gltA* gene, 304 bp for *Rickettsia* only), and Rr190.70p (*OmpA* gene, 490 bp for *Rickettsia* only).

2.6. DNA sequence analysis

The sequences generated by this study were handled and stored with the help of the Lasergene 5.0 software EditSeq (DNASar Inc, Madison, WI USA) and aligned using Megalign (DNASar Inc.).

Ticks sequences (12S rDNA) were compared to those reported by Beati and Keirans (2001) and available in GenBank. The identity of the *Rickettsia* were determined by comparing the *gltA*, *OmpA*, and 16S rDNA sequences generated by this study with those reported by Roux et al. (1996, 1997), and Roux and Raoult (1995), respectively. *Coxiella* was determined by using the Blast function available in GenBank for the 16S rDNA gene sequences and by comparisons with sequences published in Noda et al. (1997). Genetic distances for all the genes analysed were computed with MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 2.1, Kumar et al., 2001) using Kimura 2 parameters (Kimura, 1980) for the 16S rDNA gene and Tamura 3 parameters (Tamura, 1992) for 12S rDNA, *gltA*, and *OmpA* genes.

For *Rhipicephalus* ticks (12S rDNA), *Rickettsia* (*gltA*), and *Coxiella* (16S rDNA), the sequences were analysed by neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987), with Tamura 3 parameters (12S rDNA and *gltA*) or Kimura 2 parameters distances (16S rDNA) also using MEGA. The reliability of internal branches was assessed by bootstrapping (Felsenstein, 1988), with 1000 pseudo-replicates.

2.7. DNA sequence accession numbers of the samples used in phylogenetic analyses

The GenBank accession numbers for the sequences generated by the present study are reported in Table 1, while those for the sequences previously published and also used in this study are listed in Table 2.

3. Results

3.1. Tick species

A total of 48 tick specimens sampled in Southern Switzerland were the object of the present study (Table 1). Sequence comparisons of the 12S rDNA gene (338 bp) allowed us to determine that 24 specimens belong to *R. sanguineus* and 22 to *R. turanicus* (Table 1 and Fig. 1). Samples 264 and 564 are *Dermacentor marginatus* and *Haemaphysalis* sp., respectively. Fig. 1 illustrates the phylogenetic placement

within the genus *Rhipicephalus* of the ticks collected in Ticino. The ticks classified as *R. sanguineus* form a clade, which is supported by 95% bootstrap value. These ticks were 98.5–100% similar to the specimen collected from a dog in France (GenBank accession number AF150020) reported by Beati and Keirans (2001). The genetic diversity within the *R. sanguineus* sensu stricto ticks from Ticino, calculated with Tamura 3 parameters, is 0–0.015. More in detail, there are two main groups of individuals showing identical 12S rDNA sequences (Fig. 1). Samples 257, 573, 214, 244, 563, and 249 are characterised by the presence of a few single point mutations.

With the exception of samples 46 and 165, all the *R. turanicus* ticks were 98.5–98.8% similar to the specimen collected from a horse in France (AF150018, Beati and Keirans, 2001) and clustered together with high bootstrap support (83%, Fig. 1). Sample 46 was collected on a dog coming back from Italy (Tuscany) and is 99.7% similar to a specimen from Israel (AF150014, Beati and Keirans, 2001). Sample 165 was imported from Costa Rica and is 97.6% similar to a specimen collected on a goat from Zimbabwe (Beati and Keirans, 2001). The genetic diversity within the *R. turanicus* specimens from Ticino (excluding therefore samples 46 and 165, which are of foreign origin), calculated with Tamura 3 parameters, is 0–0.003. In particular, samples 251 and 575 differ from all the other Swiss specimens from a single point mutation.

Our data provide evidence on the genetic homogeneity of the *R. sanguineus* sensu stricto and *R. turanicus* ticks from Ticino, suggesting therefore the existence of two distinct tick species of the *R. sanguineus* species complex in Southern Switzerland.

The overall base composition of the 12S rDNA gene for the genus *Rhipicephalus* is 35.9% T, 8.3% C, 42.7% A, and 13.1% G.

3.2. *Rickettsia*

Out of 48 ticks tested (Table 1 and Fig. 1), 3 *R. sanguineus* were infected with a *Rickettsia*, identified as *Rickettsia massiliae*/Bar29 by *gltA* sequences comparison (304 bp; 100% homology with *R. massiliae*, GenBank accession number U59719 as well as with Bar29, U59720, Roux et al., 1997). *Dermacentor marginatus* was infected with *Rickettsia slovacica* (304 bp of the *gltA* gene; 100% homology with the specimen reported by Roux et al., 1997; U59725). No *R. turanicus* and no *Haemaphysalis* sp. were found infected with *Rickettsia*. The base composition of the *gltA* gene was 29.9% T, 14.9% C, 36.0% A, and 19.2% G. Fig. 2 illustrates the phylogenetic placement within the genus *Rickettsia* of the samples found in Ticino.

Using *OmpA* (490 bp), samples 240, 249 and 573 were 100% similar with Bar29 (U43792, Roux et al., 1996) and 99.6% similar with *R. massiliae* (U43799, same reference). The base composition of the *OmpA* gene was 31.9% T, 18.3% C, 26.7% A, and 23.1% G.

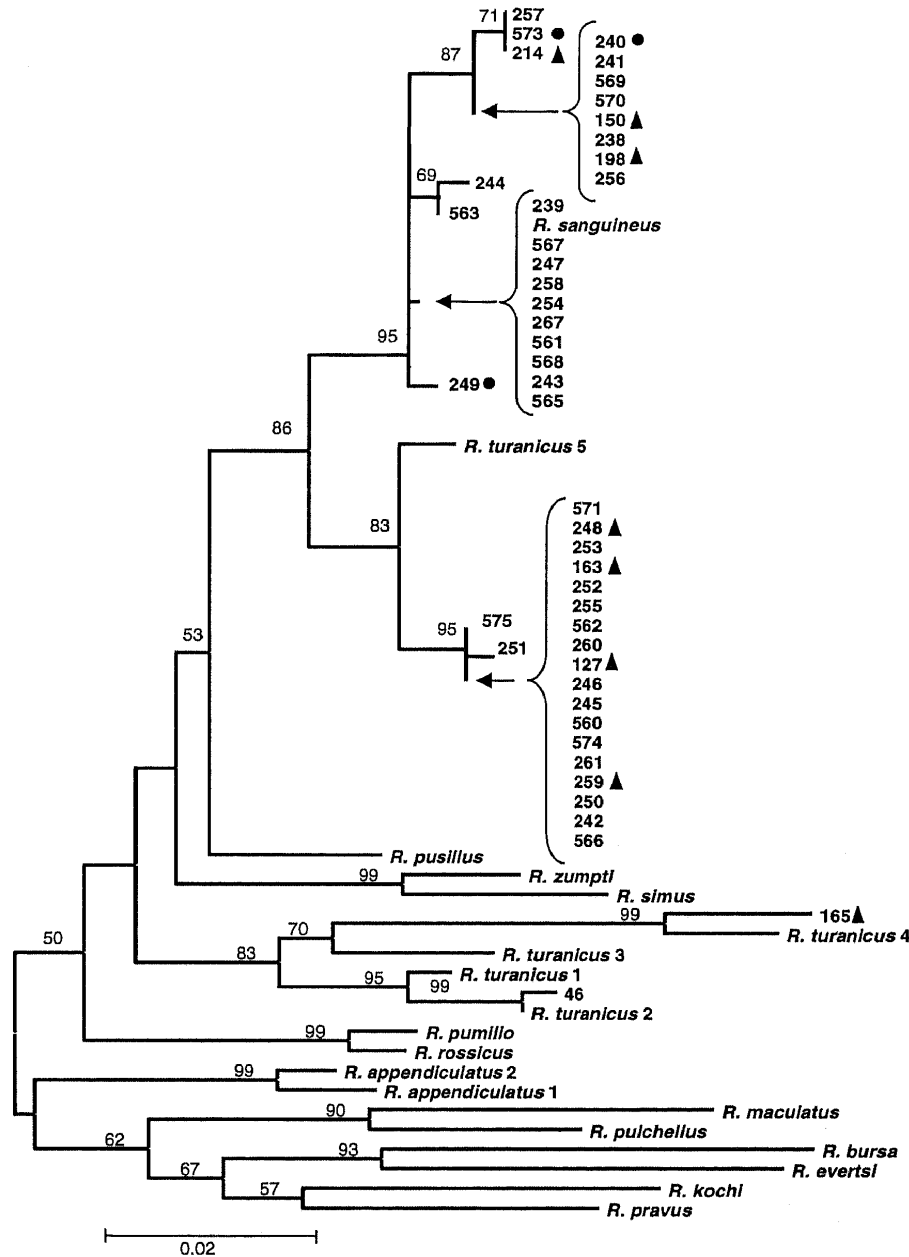


Fig. 1. Neighbour-joining tree of 1000 bootstrap pseudo-replicates with Tamura 3 parameters distances from 12S rDNA sequences for 65 tick samples of the genus *Rhipicephalus*. Bootstrap proportions are provided when greater than 50%. The tree illustrate the phylogenetic placement within the genus *Rhipicephalus* of the ticks collected in Ticino. Numbers refer to specimens collected in Ticino during the years 1994–1995 and 2001. Ticks infected with *R. massiliae*/Bar29 are marked by a dot (●), those infected with *Coxiella* sp. (an endosymbiont of *Rhipicephalus* ticks) by a triangle (▲). The *Rhipicephalus* ticks collected in Ticino are distributed into two major groups, corresponding to the taxa *R. sanguineus* and "*R. turanicus 5*", respectively. Samples 46 and 165 were collected on dogs coming back from Tuscany and Costa Rica, respectively. More details are provided in the text.

Also using 16S rDNA (441 bp) there was 100% similarity with Bar29 (L36102, Roux and Raoult, 1995) and 99.8% similarity with *R. massiliae* (L36214, same reference). The base composition of the 16S rDNA gene was 21.4% T, 20.3% C, 28.1% A, and 30.2% G.

Thus, all the *Rickettsia* detected in *R. sanguineus* ticks (samples 240, 249 and 573) were genetically identical one

each other by using *gltA*, *OmpA*, and 16S rDNA gene fragments.

3.3. *Coxiella*

Out of 48 ticks tested (Table 1 and Fig. 1), 3 *R. sanguineus* and 5 *R. turanicus* were infected with *Coxiella* sp.

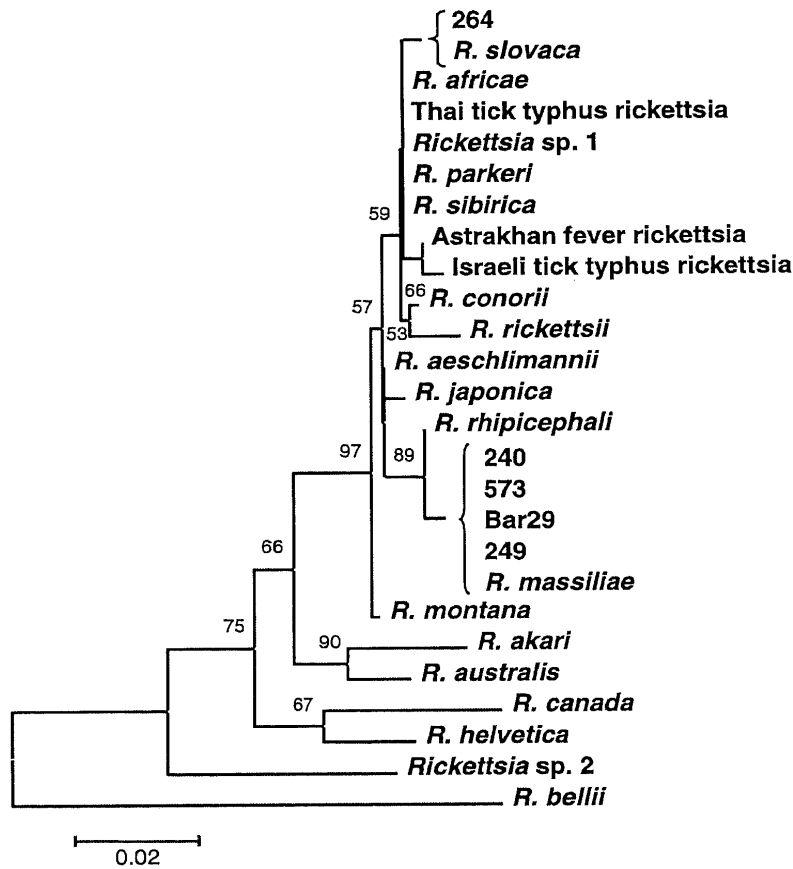


Fig. 2. Neighbour-joining tree of 1000 bootstrap pseudo-replicates with Tamura 3 parameters distances from *gltA* sequences for 26 *Rickettsia* samples. Bootstrap proportions are provided when greater than 50%. The tree illustrate the phylogenetic placement within the genus *Rickettsia* of the samples detected in Ticino. Numbers refer to *Rickettsia* identified in ticks collected in Ticino during the years 1994–1995 and 2001. Samples 240, 249 and 573 were detected in *R. sanguineus* ticks, while sample 264 was identified in *D. marginatus*.

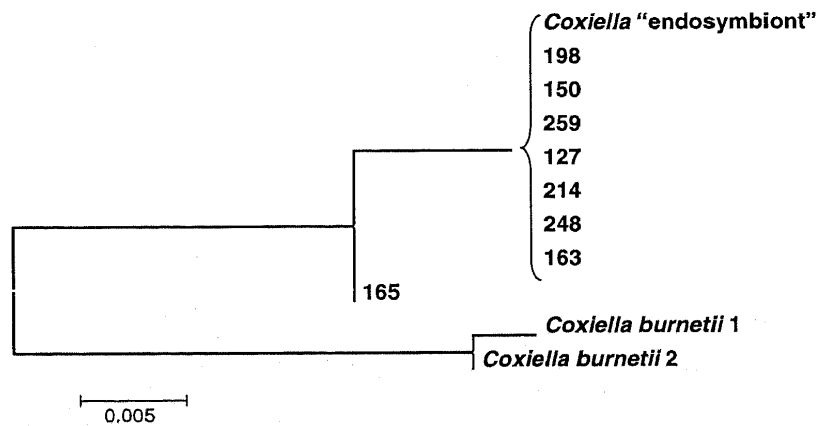


Fig. 3. Neighbour-joining tree of 1000 bootstrap pseudo-replicates with Kimura 2 parameters distances from 16S rDNA sequences for 10 *Coxiella* samples. The tree illustrate the phylogenetic placement within the genus *Coxiella* of the samples detected in Ticino. Numbers refer to *Coxiella* identified in ticks collected in Ticino during the years 1994–1995 and 2001. Samples 150, 198, and 214 were detected in *R. sanguineus* ticks, while samples 127, 163, 248, and 259 in *R. turanicus*. Sample 165 was detected in a *R. turanicus* tick collected on a dog coming back from Costa Rica.

Comparison of 16S rDNA sequences (364 bp) indicated that, with the exception of sample 165 (from Costa Rica), all the *Coxiella* were 100% identical with the endosymbiont of *Rhipicephalus* ticks (GenBank accession number D84559, Noda et al., 1997); sample 165 shows 99.2% of similarity to this endosymbiont (Fig. 3). These data indicate that the two *Rhipicephalus* species analysed may be infected with the same endosymbiont and that geographically distant *R. turanicus* may harbour different forms of *Coxiella* endosymbionts. The base composition of the eight *Coxiella* endosymbionts analysed was 21.1% T, 22.2% C, 25.4% A, and 31.3% G; the genetic distances, calculated with Kimura 2 parameters, are 0–0.008.

4. Discussion

In our previous study (Bernasconi et al., 1997) using the hemolymph test (Burgdorfer, 1970), we were able to analyse 70 *Rhipicephalus* ticks from Ticino and we found in one single individual the presence of *Rickettsia* sp. Further analyses (Beati, unpublished) revealed that this *Rickettsia* isolated in Ticino had a RFLP profile similar to that of *R. massiliae* or Bar29 strains. Moreover, DNA sequencing from the tick carrying this *Rickettsia* also indicated that this specimen belonged to the *R. sanguineus* species complex but it was in some ways different than the known sequences of *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *Rhipicephalus pumilio*, and *Rhipicephalus pusillus* (Beati, unpublished). Unfortunately, we were not able to include this tick specimen and the *Rickettsia* isolated from it in the present work. However, our study confirms these preliminary results, indicating the presence in Southern Switzerland of two different tick species, i.e. *R. sanguineus* sensu stricto and *R. turanicus*, and the occurrence of *Rickettsia* of the group *R. massiliae*/Bar29 in one of them (*R. sanguineus*).

4.1. Ticks

Whether or not the establishment of these tick species in Southern Switzerland is a recent event remains an open question. In our previous study (Bernasconi et al., 1997) we suggested the establishment of *R. sanguineus* ticks in Southern Switzerland. That this might be the case is supported by several lines of evidence. First, the ticks were mostly collected during the mild months of the year, from different hosts (mainly dogs, but also cats, and even from a child) living in several localities of the Canton Ticino. Second, adult and immature ticks were collected and, in most cases, it was possible to ascertain that the host had not left Ticino during several months before the ticks were collected. Third, the taxonomic examination of tens of historical ticks stored under ethanol in the Natural History Museum in Lugano gave no evidence for the presence of *R. sanguineus* ticks in Ticino in the past (data not shown). A possible reason of the distribution shifting northwards of these tick species could

be related to the general increase in temperature, occurring during the last years, which would create a more suitable environment for the survival of these organisms. Conversely, it is also possible that a certain amount of *R. sanguineus* ticks have been introduced and adapted in this area only in the last 20–30 years, as a consequence of the augmented mobility of both people and their pet animals, in particular dogs. The two hypotheses do not exclude each other. In fact, increased mobility of both humans and animals has allowed the introduction of tick species in houses (Péter et al., 1984) or in an area, which became suitable for tick survival, due to climatic changes. It has been observed that the level of intraspecific variability of sequences within *R. sanguineus* ticks from Spain, Portugal, France and Zimbabwe is extremely low (Beati and Keirans, 2001). Specifically, all the 12S rDNA *R. sanguineus* sequences analysed by Beati and Keirans (2001) were identical. Therefore, the genetic variability of 1.5% observed within the *R. sanguineus* ticks sampled in a relatively small area as Ticino, appears to be in some ways surprising. This observation may be interpreted as an indication that ticks from different geographic origin have been introduced several times into Southern Switzerland in recent years, and that these specimens were able to adapt at the changing environmental and climatic conditions occurring in Ticino. Concerning *R. turanicus*, this taxon is paraphyletic in the phylogeny generated by Beati and Keirans (2001) and it has been suggested that many cryptic species may possess a rather uniform *R. turanicus*-like morphology (Beati and Keirans, 2001). Further studies, involving morphological and molecular data collected on a wide number of samples from different geographic localities are needed to clarify the *R. turanicus* systematic.

Interestingly, Aeschlimann et al. (1968) and Aeschlimann and Büttiker (1975) reported in the past the case of *R. bursa* ticks imported in Ticino and collected on goats and cows. Nevertheless, after a period of about 2 years during which the tick has been found temporarily established in a natural biotope, this species disappeared completely. Concerning *R. sanguineus* and *R. turanicus*, both species were collected in various localities in 1994–1995 and 2001, suggesting therefore that they have not been only temporarily established in a restricted area. It seems therefore, that in Southern Switzerland there are actually the climatic and environmental conditions for the survival and development of ticks of the *R. sanguineus* complex. Moreover, *Rhipicephalus* ticks are able to use alternative blood sources other than dogs such as the brown hare (*Lepus europaeus*), the hedgehog (*Erinaceus europaeus*) (Aeschlimann and Büttiker, 1975), but in particular the domestic cat (*Felis catus*) (Bernasconi et al., 1997).

Regarding the possible association between climatic changes and tick distribution, recently, Lindgren and Gustafson (2001), found that the change towards a milder climate might have contributed to latitude shifts in the northern distribution limit of *Ixodes ricinus* ticks and a general increase in tick population density in Sweden between the early and mid-1990s. Their findings also suggest that the

incidence of tick-borne encephalitis and other tick-borne zoonoses might have been affected by the milder climate.

4.2. Micro-organisms

Concerning the micro-organisms, it was possible to identify for the first time in Switzerland the presence of Bar29 strains (which belong to the *R. massiliae* group) in a few individuals of *R. sanguineus*. To date, *R. massiliae* has been isolated from *Rhipicephalus* ticks in France, Greece, Spain, Portugal and Central Africa (Parola and Raoult, 2000) while Bar29 strains have been detected in Spain (Parola and Raoult, 2000). In addition, both tick species (*R. sanguineus* and *R. turanicus*) were infected with an unidentified species of the genus *Coxiella*. Moreover, *R. slovacica* was detected in a *D. marginatus* specimen.

Rickettsia massiliae and Bar29 are considered strains of unknown pathogenicity because they have been isolated only from arthropods (Roux and Raoult, 1995). However, a possible pathogenic role of Bar29 in humans has been proposed in the past (Beati et al., 1996). Furthermore, the non-pathogenic role of these and other *Rickettsia* species could be questioned in the future as it has been the case for *Rickettsia africae* (Roux and Raoult, 1995). As emphasised by Parola and Raoult (2000), all the rickettsial strains isolated to date from ticks only, have to be considered as potential pathogens. *Rickettsia massiliae* and Bar29 are very close related taxa, which differ slightly by antigenic and phenotypic criteria (Raoult and Roux, 1997). In the present study, the discrimination between them was only possible by sequencing *OmpA* and 16S rDNA while *gltA* failed to distinguish between them.

Rickettsia slovacica was first isolated in 1968 from *D. marginatus* ticks in Czechoslovakia. Subsequently, it has been detected or isolated from this tick species also in France, Switzerland (including Ticino, Beati et al., 1994), Armenia, and Portugal (Parola and Raoult, 2000). Concerning its pathogenic role, the first documented case of infection attributable to *R. slovacica* was reported in 1997 by Raoult et al. (1997). Currently, *R. slovacica* is listed as a pathogenic species (Parola and Raoult, 2000).

Noda et al. (1997) consider *Coxiella* sp. as a form of *C. burnetii*, which evolved as a tick endosymbiont. The same authors speculate that endosymbionts were originally animal pathogens acquired by ticks during their feeding on a bacteriemic host. Even if the potential for the endosymbionts in ticks to emerge (or reemerge) under natural conditions as human or animal pathogens remains to be determined (Noda et al., 1997), Weller et al. (1998) suggested the intriguing possibility that non-pathogenic mutualist (in particular rickettsial isolates) may have converted into pathogenic organisms (or vice versa).

4.3. Final remarks

In the past (before 1980), ticks of the *R. sanguineus* species complex have never been observed in Southern

Switzerland, but currently, it seems that there are the climatic and environmental conditions for their survival and development. Even if it has been hypothesised that *Rickettsia* of unknown pathogenicity may serve as a regulating factor in the infestation of ticks by pathogenic strains (Burgdorfer et al., 1981), we suggest that the presence of such *Rickettsia* and *Coxiella* might be interpreted as an alert of the possible establishment of pathogenic forms, e.g. *R. conorii* and *C. burnetii*. In particular, one cannot exclude that other specimens of the *R. sanguineus* species complex, infected with pathogens, may be accidentally introduced in this area, which seems, as demonstrated, suitable for the survival and development of these tick species. Moreover, *Rhipicephalus* ticks may also be vector of other pathogenic micro-organisms such as members of the genus *Babesia* (an analysis of the presence of these parasites in tick species from Ticino and other Swiss area is planned in a near future). In conclusion, the presence in Southern Switzerland of ticks of the *R. sanguineus* species complex and the agents they transmit could be viewed as a paradigmatic case. We are in the unusual and exciting position to follow the emergence and potential increase of tick species in a new area of their distribution. These ticks may play an important role as vector of micro-organisms, some of which could be pathogenic for both humans and domestic animals. Thus, ticks might be considered as epidemiological markers for a number of infectious agents transmitted by them.

Acknowledgements

We thank veterinarians and dog owners of Southern Switzerland for their collaboration in sampling the ticks. Many thanks also to D. Raoult (Marseille) for providing *R. conorii* DNA used as positive control. This project was supported by grant 3100-63937.00 from the Swiss National Science Foundation to JCP.

References

- Aeschlimann, A., Büttiker, W., 1975. Importations de tiques en Suisse (Acarina, Ixodoidea). *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* 48, 69–75.
- Aeschlimann, A., Büttiker, W., Elbl, A., Hoogstraal, H., 1965. A propos des tiques de Suisse (Arachnoidea, Acarina, Ixodoidea). *Rev. Suisse Zool.* 72, 577–583.
- Aeschlimann, A., Diehl, P.A., Eichenberger, G., Immler, R., Weiss, N., 1968. Les tiques (Ixodoidea) des animaux domestiques au Tessin. *Rev. Suisse Zool.* 75, 1039–1050.
- Aeschlimann, A., Schneeberger, S., Pfister, K., Burgdorfer, W., Cotty, A., 1986. Données nouvelles sur les tiques Ixodidae du canton du Tessin (Suisse) et sur la présence d'agents rickettsiens dans leur hémolymphe. *Annu. Soc. Helv. Sci. Nat.* 1, 58–68.
- Beati, L., Keirans, J.E., 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J. Parasitol.* 87, 32–48.

- Beati, L., Humair, P.-F., Aeschlimann, A., Raoult, D., 1994. Identification of spotted fever group Rickettsiae isolated from *Dermacentor marginatus* and *Ixodes ricinus* ticks collected in Switzerland. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 138–148.
- Beati, L., Roux, V., Ortuno, A., Castella, J., Porta, F.S., Raoult, D., 1996. Phenotypic and genotypic characterisation of spotted fever group Rickettsiae isolated from Catalan *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2688–2694.
- Bernasconi, M.V., Valsangiacomo, C., Balmelli, T., Péter, O., 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.
- Burgdorfer, W., 1970. Hemolymph test. A technique for detection of rickettsiae in ticks. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 19, 1010–1014.
- Burgdorfer, W., Hayes, S.F., Mavros, A.J., 1981. Non-pathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. In: Burgdorfer, W., Anacker, R.L. (Eds.), *Rickettsiae and Rickettsial Diseases*. Academic Press, New York, pp. 585–594.
- Felsenstein, J., 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.* 22, 521–565.
- Janbon, F., Raoult, D., Reynes, J., Bertrand, A., 1989. Concomitant human infection due to *Rickettsia conorii* and *Coxiella burnetii*. *J. Infect. Dis.* 160, 354–355.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. E* 16, 111–120.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M., 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Lindgren, E., Gustafson, R., 2001. Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. *Lancet* 358, 16–18.
- Maurin, M., Raoult, D., 1999. Q Fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 518–553.
- Misérez, V., Gern, L., Aeschlimann, A., 1990. *Borrelia burgdorferi* in ticks of the Canton Tessin (Switzerland). *Parassitologia* 32, 293–299.
- Noda, H., Munderloh, U.G., Kurtti, T.J., 1997. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3926–3932.
- Parola, P., Raoult, D., 2000. New tick-transmitted rickettsial diseases. In: Cunha, B.A. (Ed.), *Tickborne Infectious Disease, Diagnosis and Management*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 233–249.
- Parola, P., Raoult, D., 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.* 32, 897–928.
- Péter, O., Burgdorfer, W., Aeschlimann, A., Chatelanat, P., 1984. *Rickettsia conorii* isolated from *Rhipicephalus sanguineus* introduced into Switzerland on a pet dog. *Z. Parasitenkd.* 70, 265–270.
- Raoult, D., Berbis, P., Roux, V., Xu, W., Maurin, M., 1997. A new tick-transmitted disease due to *Rickettsia slovaca*. *Lancet* 350, 112–113.
- Raoult, D., Roux, V., 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 694–719.
- Roux, V., Fournier, P.E., Raoult, D., 1996. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2058–2065.
- Roux, V., Raoult, D., 1995. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. *Res. Microbiol.* 146, 385–396.
- Roux, V., Rydkina, E., Ereemeeva, M., Raoult, D., 1997. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 252–261.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. E* 4, 406–425.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651–701.
- Sjostedt, A., Goransson, I., Macellaro, A., Norlander, L., 1998. Genotypic and phenotypic characterization of two Swedish isolates and two prototypic strains of *Coxiella burnetii*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 20, 165–172.
- Tamura, K., 1992. The rate and pattern of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial DNA. *Mol. Biol. E* 9, 814–825.
- Weisburg, W.G., Dobson, M.E., Samuel, J.E., Dasch, G.A., Mallavia, L.P., Baca, O., Mandelco, L., Sechrest, J.E., Weiss, E., Woese, C.R., 1989. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J. Bacteriol.* 171, 4202–4206.
- Weller, S.J., Baldrige, G.D., Munderloh, U.G., Noda, H., Simser, J., Kurtti, T.J., 1998. Phylogenetic placement of rickettsiae from the ticks *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1305–1317.
- Zahler, M., Filippova, N.A., Morel, P.C., Gothe, R., Rinder, H., 1997. Relationships between species of the *Rhipicephalus sanguineus* group: a molecular approach. *J. Parasitol.* 83, 302–306.

4.2. Publication II

Population genetics of *Ixodes ricinus* sensu stricto (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial DNA sequences.

Submitted, 2005.

Population genetics of *Ixodes ricinus* sensu stricto (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial DNA sequences

S. Casati¹, M. V. Bernasconi², L. Gern³, and J.-C. Piffaretti^{1*}

¹Istituto Cantonale di Microbiologia, Via Mirasole 22A, 6500 Bellinzona, Switzerland

²Zoologisches Museum, Universität Zürich, Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich, Switzerland

³Institut de Zoologie, Laboratoire de Parasitologie, Université de Neuchâtel, 2000 Neuchâtel, Switzerland

Running title: Population genetics of *Ixodes ricinus* in Europe.

*Corresponding author:
Jean-Claude Piffaretti
Istituto Cantonale di Microbiologia
Via Mirasole 22A
6500 Bellinzona
Phone: +41 91 814 60 11
Fax: +41 91 814 60 29
Mail: jean-claude.piffaretti@ti.ch

SUMMARY

The *Ixodes ricinus* complex is composed of 14 species distributed worldwide. Some members of this complex are involved in the transmission of a number of diseases to animals and humans, in particular Lyme borreliosis, tick-borne encephalitis, ehrlichiosis and babesiosis. While the phylogenetic relationships between species of the *I. ricinus* complex have been investigated in the past, still little is known about the genetic structure within the species *I. ricinus* sensu stricto. We have investigated the phylogenetic relationships among 26 *I. ricinus* s.s. ticks collected in various European countries, including Switzerland, Italy, Austria, Denmark, Sweden, and Finland by using five mitochondrial gene fragments corresponding to the Control Region, 12S rDNA, cytb, COI, and COII. The combined sequences have been analysed for a total of 3414-3419 nucleotides. The five genes considered show a low variability (1.6-5%), precluding the identification of unique geographic populations. From a population genetics point of view, the European *I. ricinus* ticks seem to be extremely homogeneous.

Key words: mitochondrial DNA; Control Region; COI; COII; cytb; 12S rDNA; *Ixodes ricinus*

INTRODUCTION

Ticks are obligate hematophagous arthropods parasitizing all vertebrate classes. They are currently considered to be second only to mosquitoes as vectors of human infectious diseases (Parola & Raoult, 2001). The *Ixodes ricinus* complex forms a group composed of 14 species distributed in different geographic regions of the world. Despite this geographical delocalisation, it includes ticks which are closely related (Acari: Ixodidae) (Xu et al., 2003). A number of organisms of this complex is involved in the transmission of various diseases to animals and humans such as Lyme borreliosis, tick-borne encephalitis, ehrlichiosis, and babesiosis.

In Europe, the species *I. ricinus* sensu stricto plays a central role as a vector of the agents of the above-mentioned pathologies. *I. ricinus* ticks may feed on several host species, particularly birds and mammals, including humans.

Whereas phylogenetic relationships between the members of the *I. ricinus* complex have been analysed in the past (Caporale et al., 1995; Xu et al., 2003), in contrast little is known about the genetic structure of the species *I. ricinus* s.s.. This kind of information is potentially important to understand the epidemiology and evolutionary dynamics of the disease and the vector.

Mitochondrial DNA (mtDNA) is particularly well-suited as a genetic marker for phylogenetic studies because mitochondrial genes evolve more rapidly than nuclear genes (Li, 1997). In addition, being transmitted only by the mother (i.e. the ovule), they do not undergo meiotic recombination (Simon C., 1994). A few studies have demonstrated that their sequences are useful to distinguish closely related tick species and are thus appropriate for distinguishing populations within a species (Caporale et al., 1995; Xu et al., 2003). This is particularly the case with the Control Region, which appears to be subject to very weak selective constraints and evolves quite rapidly (Li, 1997). Its variability has made this DNA region successful for relationship studies below the species level both in vertebrates and insects (Simon C., 1994; Taylor et al., 1993). Other mitochondrial genes such as the cytochrome oxidase subunit I (COI), the cytochrome oxidase subunit II (COII), the cytochrome b (cytb) and the 12S ribosomal RNA (12S rDNA) show appropriate characteristics, which also make them suitable for evolutionary analyses (Bernasconi *et al.*, 2002; Caterino *et al.*, 2000; Lunt *et al.*, 1996; Simmons & Weller, 2001; Simon C., 1994).

In this study, we have investigated the genetic population structure of the species *I. ricinus* s.s. by using 5 mtDNA genes (Control Region, 12S, cytb, COI and COII) from ticks originating from different European regions. We have designed a number of new primers and used them to perform PCR and DNA sequencing assays.

MATERIALS AND METHODS

Sample source

The 26 *I. ricinus* ticks used in this study were collected from field sites and from different hosts in various regions of Europe (Switzerland, Italy, Austria, Finland, Denmark, and Sweden) (Table 1). Ticks were stored in 100% ethanol and conserved at 4°C until taxonomical identification (based on morphology characters) and DNA extraction.

DNA extraction

DNA was extracted from ticks by using a Dneasy Tissue kit (Qiagen AG, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Each sample was cut with a disposable sterile scalpel within a 1.5 ml micro tube. After digestion with proteinase K (20 µg/ml) samples were applied to the columns for DNA absorption and washing. Finally, the DNA was eluted in 200 µl of buffer available from the kit and stored at 4°C.

PCR

PCR reactions were performed with 5 µl of the extracted DNA as template, 0,5 µM of each primer (Microsynth, Balgach, Switzerland), 1 Unit Taq Polymerase (Qiagen AG, Basel, Switzerland) in a total volume of 50 µl (buffer provided by Qiagen AG). The reaction mixtures were subjected to 10 min DNA denaturation at 94°C, 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min, and elongation at 72°C for 2 min. The reaction was completed by a further 5 min step at 72°C. The PCR assays were performed in a DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Rotkreuz, Switzerland). We designed primers for the Control Region, cytb and COI. In addition, we modified a number of primers described in Simon et al. (1994) for the cytb, COI and COII regions (Simon C., 1994). Amplification and sequencing primers are reported in Table 2.

DNA sequencing

PCR products were purified using an Amicon Microcon Millipore Kit (Millipore, Milano, Italy), eluted in 20 µl of buffer and stored at 4°C. Cycle sequencing reactions were performed in total volumes of 15 µl using an ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Rotkreuz, Switzerland) on an ABI Prism 310 GENETIC Analyser (Perkin-Elmer Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Sequences were performed in both directions.

DNA sequence analysis

The mitochondrial sequences were handled and stored with the Lasergene program Editseq (DNASTar Inc., Madison, WI USA), and aligned with Megalign (DNASTar Inc.). Phylogenetic analyses were performed using 3 methods: i) the neighbor-joining (NJ) method with Tamura Nei distances (performed using MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 2.1, (Kumar, 2001)); ii) the maximum parsimony (MP) method using the heuristic search with stepwise addition option and 100 additional replicates (performed with PAUP*4.0b10, (Swofford, 2002)); and iii) the maximum likelihood (ML) method (implemented in Dambe, (Xia & Xie, 2001)). The distances were computed using Tamura-Nei parameters. MEGA was used for estimating percentage base composition and percentage codon usage. The reliability of internal branches was assessed by bootstrapping with 100 (MP), 100 (ML) and 1000 (NJ) replicates (Felsenstein, 1988).

Prior to combining the five datasets, congruence between them was examined with a partition-homogeneity test (Farris et al., 1994), implemented in PAUP*4.0b10 (Swofford, 2002).

DNA sequence accession numbers

The sequences of the five mitochondrial genes for the 26 *I. ricinus* s.s. originating from the different European countries have been deposited in GenBank (Table 1).

RESULTS

Sequence characteristics

For each of the five mitochondrial genes considered (Control Region, 12S rDNA, cytb, COI and COII), we obtained and aligned 26 sequences corresponding to the 26 individual ticks examined. Table 3 summarises the results (variable sites, parsimony informative sites, base composition and the Tamura Nei genetic distances).

Codon usage was biased by the high proportion of A+T. This was particularly true for the cytb and COII genes in the first position, where the A+T value is 89.5%, and for the COI gene in the second position with an A+T value of 92%.

Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses were first performed on each mitochondrial gene separately. The 5 separated trees obtained by the NJ analysis generated similar topologies (data not shown). Because concatenation can help in the recovery of a meaningful phylogeny, we created a large dataset including the genes encoding 12S rDNA, Control Region, cytb, COII, and COI. This way of doing was supported by their congruence, tested with the partition homogeneity test ($p=0.13$). The analysis on these combined sequences (3414-3419 bp) showed 90 variable (2.5%) and 44 (1.1%) parsimony informative sites. In order to determine the relationships between the 26 samples, three different procedures (NJ, MP and ML) were performed. The topologies of the trees generated by these different methods were similar: four clusters (A, B, C and D) were present (data shown for ML, Fig. 1). In general, samples that grouped together in one analysis tended to do so in the others as well. The four clusters were composed of individuals from different geographical regions; hence no geographic correlation among the samples could be identified. Clusters A, B and C were supported by relatively high bootstrap values in all the analyses (Fig. 1).

DISCUSSION

The five mitochondrial genes we have used (Control Region, cytb, 12S rDNA, COI and COII) are generally considered appropriate as molecular markers for phylogenetic and/or population genetic studies in arthropods (Bernasconi *et al.*, 2002; Bernasconi *et al.*, 2001; Bernasconi *et al.*, 2000; Caterino *et al.*, 2000; Lunt *et al.*, 1996; Simmons & Weller, 2001). In our study, the number of nucleotide substitutions within the *I. ricinus* s.s. strains examined is low in all the 5 mitochondrial markers analysed (5.0%, 2.7%, 2.6%, 2.4%, and 1.6%, for the Control Region, cytb, 12S rDNA, COI, and COII, respectively). This lack of variability at the mtDNA level in the *I. ricinus* s.s. ticks collected from various European countries is emphasised when considering the parsimony informative sites, which are exceptionally rare, ranging from 0.8% to 2.7%. Thus, from a population genetics point of view, the European *I. ricinus* s.s. ticks seem to be extremely homogeneous and their population does not show any phylogeography structure.

Other studies based on allozyme data (Delaye *et al.*, 1997) and microsatellite markers (De Meeus *et al.*, 2002) have provided similar results. Delaye *et al.* (Delaye *et al.*, 1997) found a low variability in allozymes, which did not allow reliable population genetic conclusions in *I. ricinus* s.s. collected in the northwest part of Switzerland. De Meeus *et al.* (De Meeus *et al.*, 2002) found no genetic differentiation within *I. ricinus* s.s. samples originating from different regions of Switzerland separated by the Alps.

Two factors might explain the *I. ricinus* s.s. homogeneity: the first one is the recent evolution of this species (Xu et al., 2003) and the second is the host vagility (the ability to move from place to place) throughout the country.

On the base of the low number of substitutions within its members, Xu et al. (2003) hypothesised that the *I. ricinus* complex is the most recently evolved group of ticks in the genus *Ixodes* (Xu et al., 2003). In addition, our results showed a high A+T content in the DNA fragments examined. In general, it is admitted that a high A+T content is characteristic of recent evolution (Simon C., 1994).

Recent analysis of tick-host associations does not support the generally accepted view that tick evolution arose through host adaptation, host specificity or co-speciation, but rather suggests an important role for biogeography and environment properties (Klompen et al., 1996). Indeed, despite the geographic and discontinuous distribution, the habitat conditions of ticks remain very strict and are dependent on environmental conditions such as relative humidity, temperature and vegetation. For these reasons, *I. ricinus* s.s. ticks live in a stringent environment, even though they can colonise more than 300 different avian and mammalian wild species (Gern, 2002). In addition, host movements or migrations especially of birds (highly mobile often on long-distance) may promote the uniformity between the European *I. ricinus* s.s. populations.

The low variability observed in Europe within *I. ricinus* s.s. ticks contrasts with the geographic genetic differentiation recorded in North America for other tick species of the *I. ricinus* complex (Kain et al., 1999; Norris et al., 1996; Qiu et al., 2002). Norris et al. (1996), using mitochondrial DNA markers (12S and 16S rDNA) and the single strand conformation polymorphism assay (SSCP), analysed the phylogeography of *I. scapularis* ticks originating from north-east America (Norris et al., 1996). They were able to identify two distinct lineages, a Southern clade (limited to the South) and an American clade (distributed in all the regions considered, but mainly in the North). These results were confirmed by Qui et al. (2002), who analysed the mitochondrial 16S rDNA with SSCP and reported that *I. scapularis* is geographically structured across the East Coast: the northern ("American clade") and southern ("Southern clade") populations are genetically separated and present different evolutionary and demographic histories with an effective increase of the Northern tick population size (Qiu et al., 2002). However, allozyme analysis of the mitochondrial COIII gene of another north American tick species, *I. pacificus*, suggested weak differentiation and the tree generated from these data revealed little geographic structure for the coastal ticks, but a separation of the Utah samples (an inland state) (Kain et al., 1999). To summarise, in North-America *I. scapularis* seems to have a geographic structure more marked than *I. pacificus*, while the variability of the genetic markers analysed is approximately the same, 12.6% (53/420, 12S rDNA, (Norris et al., 1996)) and 10.1% (36/355, COIII, (Kain et al., 1999)), respectively. Thus, the two American *Ixodes* species mentioned above show a more pronounced phylogeography structure and variability, (especially *I. scapularis*), than that observed for *I. ricinus* s.s. in Europe. Two factors may explain this difference. On the one hand, *I. ricinus* s.s. appears to be a more recent species than *I. pacificus* and *I. scapularis*. On the other hand, the Pleistocene glaciation in the North hemisphere generated vicariance (separation and subsequent isolation of portions of an original population) for the two continents. The consequence of the glaciation period is the extinction and the loss of genetic variation of the living populations in the affected regions (Hewitt, 1996). The deep structure of *I. scapularis* and the weak structure of *I. pacificus* may reflect the past presence of different refugia populations in north-east (Qiu et al., 2002) and in north-west America, precisely in Utah (Kain et al., 1999), and on the west coast, which were not affected by the ice, with the consequent independent evolution of the enclaves

(Hewitt, 1996). In contrast, the recent expansion of *I. ricinus* population northward from southern appears associated with a low degree of genetic diversity and the concomitant absence of deep genetic structure (McLain et al., 2001). This might indicate the presence of a single refugium in the south during the Pleistocene glaciation.

The homogeneity within the *I. ricinus* s.s. population contrasts with the extended heterogeneity of *B. burgdorferi* s.l., which is harboured by the former (Casati et al., 2004). It has been hypothesised that the genetic diversity within the *B. burgdorferi* genospecies is driven mainly by the host, in particular by the sensitivity or resistance to its complement system (Kurtenbach et al., 2002). Vertebrate hosts, rather than ticks species, are the key to Lyme borreliosis spirochetes diversity.

We are indebted to C. Benagli, M. Bordoni, J. Damgaard, E. Grasselli, V. Michelini, M. Nieminen, O. Péter, O. Rais, T. Roslin, A. Roulin, N. Wahlberg and the veterinarians from Ticino who provided us with the ticks from their region. We thank also A. Demarta and E. Grasselli for constructive advice. This work was supported by the Swiss National Science Foundation (31-64976) to J.-C. Piffaretti. This paper is part of the PhD thesis of one of the authors (S.C.).

REFERENCES

- BEATI, L. and KEIRANS, J. E. (2001). Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology* **87**, 32-48.
- BERNASCONI, M. V., CASATI, S., PETER, O. and PIFFARETTI, J. C. (2002). *Rhipicephalus* ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino). *Infection Genetics and Evolution* **2**, 111-120.
- BERNASCONI, M. V., PAWLOWSKI, J., VALSANGIACOMO, C., PIFFARETTI, J. C. and WARD, P. I. (2001). Phylogeny of the genus *Scathophaga* (Diptera: Scathophagidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Canadian Journal of Zoology* **79**, 517-524.
- BERNASCONI, M. V., VALSANGIACOMO, C., PIFFARETTI, J. C. and WARD, P. I. (2000). Phylogenetic relationships among muscoidea (Diptera: calypttratae) based on mitochondrial DNA sequences. *Insect Molecular Biology* **9**, 67-74.
- CAPORALE, D. A., RICH, S. M., SPIELMAN, A., TELFORD, S. R., 3RD and KOCHER, T. D. (1995). Discriminating between *Ixodes* ticks by means of mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **4**, 361-365.
- CASATI, S., BERNASCONI, M. V., GERN, L. and PIFFARETTI, J. C. (2004). Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by *recA* gene sequence. *FEMS Microbiology Letters* **238**, 115-123.
- CATERINO, M. S., CHO, S. and SPERLING, F. A. (2000). The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual Review of Entomology* **45**, 1-54.
- DE MEEUS, 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.
- DELAYE, C., BEATI, L., AESCHLIMANN, A., RENAUD, F. and DE MEEUS, T. (1997). Population genetic structure of *Ixodes ricinus* in Switzerland from allozymic data: no evidence of divergence between nearby sites. *International Journal of Parasitology* **27**, 769-773.
- FARRIS, J. S., KALLERSJO, M., KLUGE, A. G. and BULT, C. (1994). Testing significance of incongruence. *Cladistics* **10**, 315-319.
- FELSENSTEIN, J. (1988). Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annual Review of Genetics* **22**, 521-565.
- GERN, L., HUMAIR P.-F. (2002). Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control* (ed. Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S. & Stanek G.), pp. 149-174. CABI publishing Oxon UK.
- HEWITT, G. M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**, 247-276.
- KAIN, D. E., SPERLING, F. A., DALY, H. V. and LANE, R. S. (1999). Mitochondrial DNA sequence variation in *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Heredity* **83**, 378-386.
- KLOMPEN, J. S., BLACK, W. C. T., KEIRANS, J. E. and OLIVER, J. H., JR. (1996). Evolution of ticks. *Annual Review of Entomology* **41**, 141-161.

- KUMUR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I.B., NEI, M. (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- KURTENBACH, K., DE MICHELIS, S., ETTI, S., SCHAFFER, S. M., SEWELL, H. S., BRADE, V. and KRAICZY, P. (2002). Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-the key role of host complement. *Trends Microbiology* **10**, 74-79.
- LI, W.-H. (1997). Molecular evolution, Sunderland, Massachusetts.
- LUNT, D. H., ZHANG, D. X., SZYMURA, J. M. and HEWITT, G. M. (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* **5**, 153-165.
- MCLAIN, D. K., LI, J. and OLIVER, J. H., JR. (2001). Interspecific and geographical variation in the sequence of rDNA expansion segment D3 of *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae). *Heredity* **86**, 234-242.
- NORRIS, D. E., KLOMPEN, J. S., KEIRANS, J. E. and BLACK, W. C. T. (1996). Population genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S and 12S genes. *Journal of Medical Entomology* **33**, 78-89.
- PAROLA, P. and RAOULT, D. (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases* **32**, 897-928.
- QIU, W. G., DYKHUIZEN, D. E., ACOSTA, M. S. and LUFT, B. J. (2002). Geographic uniformity of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the North-eastern United States. *Genetics* **160**, 833-849.
- SIMMONS, R. B. and WELLER, S. J. (2001). Utility and evolution of cytochrome b in insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **20**, 196-210.
- SIMON C., F. F., BECKENBACH A., CRESPI B., LIU H., AND FLOOK P. (1994). Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America* **87**, 651-701.
- SWOFFORD, D. L. (2002). PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), version 4.0 b10., Sinauer Associates edn., Sunderland, MA.
- TAYLOR, M. F., MCKECHNIE, S. W., PIERCE, N. and KREITMAN, M. (1993). The lepidopteran mitochondrial control region: structure and evolution. *Molecular Biology and Evolution* **10**, 1259-1272.
- XIA, X. and XIE, Z. (2001). DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* **92**, 371-373.
- XU, G., FANG, Q. Q., KEIRANS, J. E. and DURDEN, L. A. (2003). Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. *Journal of Parasitology* **89**, 452-457.

FIGURE LEGENDS

Fig.1. Phylogenetic tree derived from the maximum likelihood (ML) analysis based on the combined mitochondrial DNA sequence dataset (3414-3419 nt). Data above branches indicate bootstrap values higher than 50% for NJ/MP/ML, respectively. The circles indicate the 4 identified clusters (see text for more details).

Fig. 2. PCR primers position: A) Control Region: the forward primer is situated in the tRNA-Leu region, while the reverse primer is in the 12S rDNA; B) The primers (forward and reverse) are distributed along the 4 regions: COI, COII, tRNA-Lys and tRNA-Asp.

Fig. 1.

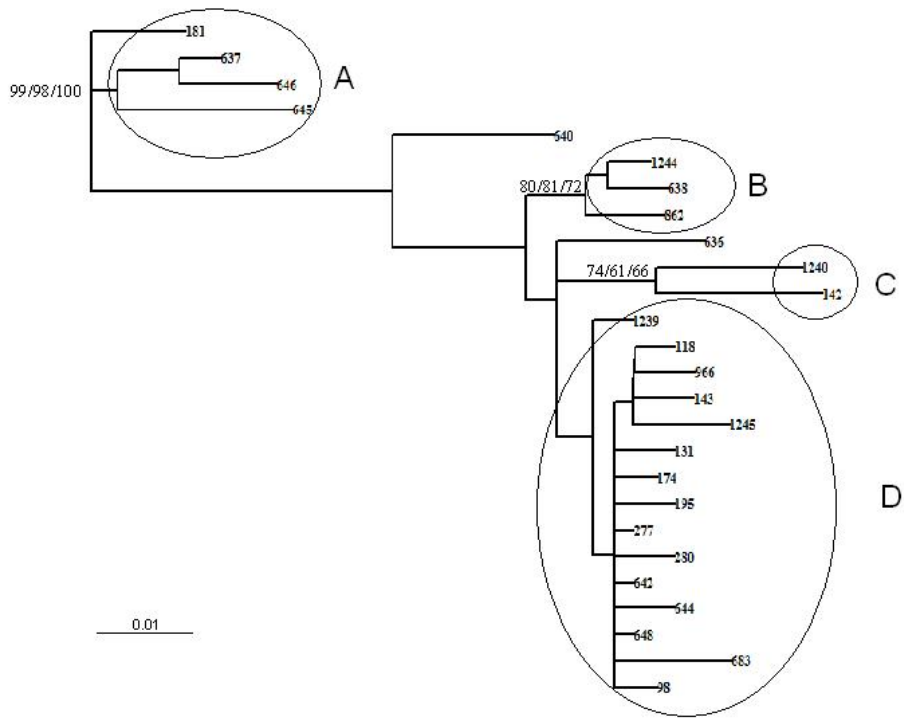


Fig. 2.

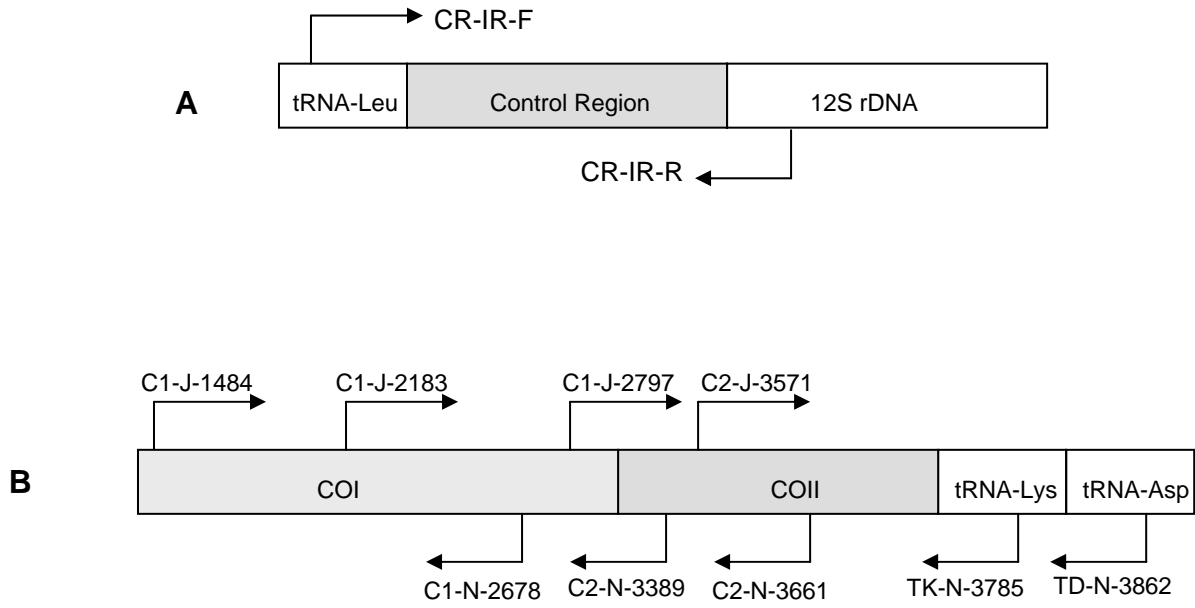


Table 1.

I. ricinus s.s. analysed.

Sample	Geographic origin	Tick provider	Host	Stage	GenBank Accession no.				
					Control Region	12S rDNA	Cytb	COI	COII
98	Switzerland (Tegna)	veterinarian	dog	F	AY945473	AY945499	AY945395	AY945447	AY945421
118	Switzerland (Castel S. Pietro)	veterinarian	dog	F	AY945448	AY945474	AY945370	AY945422	AY945396
131	Sweden (Stockholm)	N. Wahlberg	dog	F	AY945453	AY945479	AY945375	AY945427	AY945401
142	Switzerland (Unrerbeinil)	V. Michelini	goat	F	AY945454	AY945480	AY945376	AY945428	AY945402
143	Switzerland (Unterkulm)	V. Michelini	dog	F	AY945455	AY945481	AY945377	AY945429	AY945403
174	Switzerland (Zurigo)	C. Benagli	vegetation	F	AY945456	AY945482	AY945378	AY945430	AY945404
181	Switzerland (Villeneuve)	A. Roulin	bird (owl)	F	AY945457	AY945483	AY945379	AY945431	AY945405
195	Switzerland (Polleggio)	veterinarian	dog	F	AY945458	AY945484	AY945380	AY945432	AY945406
277	Switzerland (Neuchâtel)	O. Rais	vegetation	F	AY945459	AY945485	AY945381	AY945433	AY945407
280	Switzerland (Neuchâtel)	O. Rais	vegetation	F	AY945460	AY945486	AY945382	AY945434	AY945408
636	Finland (Turku)	M. Nieminen	dog	F	AY945461	AY945487	AY945383	AY945435	AY945409
637	Finland (Turku)	M. Nieminen	dog	F	AY945462	AY945488	AY945384	AY945436	AY945410
638	Finland (Helsinki)	T. Roslin	vegetation	F	AY945463	AY945489	AY945385	AY945437	AY945411
640	Denmark (Teglstrup Hegn)	J. Damgaard	vegetation	F	AY945464	AY945490	AY945386	AY945438	AY945412
642	Sweden (Smaland)	J. Damgaard	vegetation	F	AY945465	AY945491	AY945387	AY945439	AY945413
644	Denmark (Aebel)	J. Damgaard	vegetation	F	AY945466	AY945492	AY945388	AY945440	AY945414
645	Denmark (Sejer)	J. Damgaard	vegetation	F	AY945467	AY945493	AY945389	AY945441	AY945415
646	Finland (Helsinki)	T. Roslin	vegetation	F	AY945468	AY945494	AY945390	AY945442	AY945416
648	Finland (Helsinki)	T. Roslin	vegetation	F	AY945469	AY945495	AY945391	AY945443	AY945417
683	Switzerland (Sion)	O. Péter	vegetation	F	AY945470	AY945496	AY945392	AY945444	AY945418
862	Switzerland (Val du Trient)	O. Péter	vegetation	F	AY945471	AY945497	AY945393	AY945445	AY945419
966	Switzerland (Finger)	O. Péter	vegetation	F	AY945472	AY945498	AY945394	AY945446	AY945420
1239	Austria (Hammerfeld)	M. Bordoni	vegetation	N	AY945449	AY945475	AY945371	AY945423	AY945397
1240	Austria (Höll)	M. Bordoni	vegetation	N	AY945450	AY945476	AY945372	AY945424	AY945398
1244	Italy (Genova)	E. Grasselli	dog	M	AY945451	AY945477	AY945373	AY945425	AY945399
1245	Italy (Genova)	E. Grasselli	dog	F	AY945452	AY945478	AY945374	AY945426	AY945400

F: Adult female, M: Adult male and N: nymph

Table 2.

Primers used in this study for amplification (PCR) and sequencing (Seq).

mtDNA gene	Primer	Use	Strand	Sequence	Reference
Control Region	CR-IR-F	PCR/Seq	Major	5'-cgg ctg gca caa gtt tcg-3'	This paper
	CR-IR-R	PCR/Seq	Minor	5'-gat aat cct tta ctg agg cat-3'	This paper
cytb	CB-J-10933	PCR/Seq	Major	5'-tat gtt tta cca tga ggt caa ata tc-3'	(Simon C., 1994) (modified)
	CB-N-11270	PCR/Seq	Minor	5'-gct ata tta aag ttt tct gca tca-3'	This paper
COI*	C1-J-1484	PCR/Seq	Major	5'-tga gcc att tta ccg cga tg-3'	This paper
	C1-J-1903	Seq	Major	agc ttc cgt tga cat agc	This paper
	C1-J-2183	PCR/Seq	Major	5'-caa cat tta ttt tga ttt ttt gg-3'	(Simon C., 1994)
	C1-N-2309	Seq	Major	5'-tcc aat tgc taa tat agc-3'	This paper
	C1-J-2561	Seq	Major	5'-gcc aat tcg tca att gat att-3'	This paper
	C1-J-2678	Seq	Major	5'-cct tta ttt ttt gga ata aat-3'	This paper
	C1-N-2678	PCR/Seq	Minor	5'-att tat tcc aaa aaa taa agg-3'	This paper
	C1-J-2797	PCR/Seq	Major	5'-cca cga cga tac tca gat tat c-3'	(Simon C., 1994) (modified)
COII*	C2-N-3389	PCR/Seq	Minor	5'-tca taa gat cay tat cat tg-3'	(Simon C., 1994)
	C2-J-3571	PCR/Seq	Major	5'-aga tgt aat tca ctg atg a-3'	(Simon C., 1994) (modified)
	C2-N-3661	PCR/Seq	Minor	5'-cca caa att tct gaa cat tga cca-3'	(Simon C., 1994)
	TK-N-3785	PCR/Seq	Minor	5'-gtt taa gag acc att gct ta-3'	(Simon C., 1994) (modified)
	TD-N-3862	PCR/Seq	Minor	5'-aga atg aca ttc tct tgt tat-3'	(Simon C., 1994) (modified)
12S rDNA	T1B	PCR	Minor	5'-aaa cta gga tta gat acc ct-3'	(Beati & Keirans, 2001)
	T2A	PCR	Major	5'-aat gag agc gac ggg cga tgt-3'	(Beati & Keirans, 2001)
	RipSeqJ1	Seq	Major	5'-caa aaa att atg gcg g-3'	(Bernasconi et al., 2002)
	RipSeqN1	Seq	Minor	5'-gta cat att tta gag ct-3'	(Bernasconi et al., 2002)

*Note: the following primer combinations were used for the COI and COII PCRs: C1-J-1484/C1-N-2678, C1-J-2797/C2-N-3361, C1-J-2183/ C2-N-3389, C1-J-2561/C2-N-3389, C1-J-2561/C2-N-3661, C2-J-3571/TK-N-3785, and C2-J-3571/TD-N-3862.

Table 3.
Description of the 5 mtDNA genes sequenced.

mtDNA sequence	PCR primers	PCR primers position	Nucleotides	No. variables sites (%)	No. Pi* sites (%)	Base composition				Genetic distance (Tamura Nei)
						A(%)	T(%)	C(%)	G(%)	
tRNA-Leu (ps) Control Region (cs) 12S rDNA (ps)	CR-IR-F CR-IR-R	Fig. 2A	478-482	24 (5%)	13 (2.7%)	38.4	43.6	9.4	8.6	0.000-0.026
12S rDNA (ps)	T1B T2A	within the gene	309-311	8 (2.5%)	3 (1.0%)	39.4	40.3	6.8	13.5	0.000-0.012
Cytb (ps)	CB-J-10933 CB-N-11270	within the gene	336	9 (2.7%)	6 (1.8%)	32.5	43.8	14.0	9.8	0.000-0.021
COI (ps)	C1-J-1484 C1-J-2183 C1-N-2678 C1-J-2797	Fig. 2B	1520	37 (2.4%)	13 (0.8%)	30.6	41.9	14.5	13.0	0.000-0.011
COII (cs) tRNA-Lys (cs) tRNA-Asp (ps)	C2-N-3389 C2-J-3571 C2-N-3661 TK-N-3785 TD-N-3862	Fig. 2B	771	12 (1.6%)	9 (1.2%)	34.6	40.1	15.5	9.8	0.000-0.010

*Pi sites = parsimony informative sites; ps = partial sequence; cs = complete sequence

4.3. Publication III

Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by *recA* gene sequence.

FEMS Microbiology Letters 238 (2004) 115-123.



Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by *recA* gene sequence

Simona Casati ^a, Marco V. Bernasconi ^{a,b}, Lise Gern ^c, Jean-Claude Piffaretti ^{a,*}

^a Istituto Cantonale di Microbiologia, Via Mirasole 22A, 6500 Bellinzona, Switzerland

^b Zoologisches Museum, Universität Zürich, Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich, Switzerland

^c Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel, Emile-Argand 11, 2000 Neuchâtel, Switzerland

Received 12 May 2004; received in revised form 14 July 2004; accepted 14 July 2004

First published online 22 July 2004

Abstract

A total of 874 *Ixodes ricinus* ticks were collected in Switzerland to investigate the genetic diversity of the *Borrelia* population. We integrated to the RT-PCR method the DNA sequence analysis of a 162-bp fragment of the *recA* gene. Five genospecies were detected: *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* s.s., *Borrelia garinii*, *Borrelia valaisiana*, and *Borrelia lusitaniae*. A heterogeneous distribution was observed within the *B. burgdorferi* s.l. genospecies. The most prevalent and diverse genospecies found in Switzerland was *Borrelia afzelii*, which might suggest a rapid evolution of this genospecies.

© 2004 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *recA*; *Ixodes ricinus*; *Borrelia burgdorferi* sensu lato; Switzerland

1. Introduction

Borrelia burgdorferi sensu lato (s.l.) is a bacterial species complex consisting of at least 11 genospecies: *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *Borrelia afzelli*, *Borrelia garinii*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia bissettii*, *Borrelia japonica*, *Borrelia turdi*, *Borrelia tanukii*, *Borrelia andersoni*, and *Borrelia sinica* [1]. *Ixodes* ticks are the most important vectors of *B. burgdorferi* s.l. in the world. In Europe, six different *B. burgdorferi* genospecies have been recorded, four of which (*B. afzelli*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s., and *B. valaisiana*) are distributed throughout the continent [2]. *B. burgdorferi* s.s., *B. lusitaniae* and *B. bissettii* are relatively rare in Europe [3]. *B. lusitaniae* has also been found recently in Switzerland [4,5]. To better understand the ecology and the dis-

tribution of tick-borne spirochetes, knowledge of their genetic diversity is required. The genetic diversity of *B. burgdorferi* s.l. may be analysed at two different taxonomic levels: (i) between the recognised genospecies and (ii) within each of them. At the genospecies level, diversity is clinically important. Lyme disease is principally caused by 3 of the 11 described genospecies, i.e., *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, and *B. afzelii*. Occasionally, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, and *B. bissettii* have been detected in pathological situations, mostly erythema migrans lesions [6–8]. The association of some of the various clinical manifestations of the disease to the three recognised pathogenic genospecies has been suggested in the past [9]. Recently, Baranton et al. [10] described the association between genetic groups within single genospecies and different aspects of pathogenicity. Only two genetic groups of *B. afzelii* and four of *B. garinii* seem to cause invasive diseases.

Borrelia burgdorferi is maintained in nature by complex zoonotic transmission cycles, in which *Ixodes* ticks

* Corresponding author. Tel.: +41-91-814-60-11; fax: +41-91-814-60-29.

E-mail address: jean-claude.piffaretti@ti.ch (J.-C. Piffaretti).

are the vectors and vertebrates, involving more than 50 avian and mammalian wildlife species, are the reservoir hosts [11]. It has been hypothesised that the genetic diversification of the genospecies is driven mainly by the host [12], in particular by the sensitivity or resistance to the complement system of a particular host. Thus, complement might be a key factor of the *B. burgdorferi* s.l. evolution.

In order to enhance our vision on the genetic diversity of *B. burgdorferi* s.l., there is the need to develop a rapid and accurate method able to identify and differentiate the genospecies not only at the species level but also within them.

In this study, we integrated an RT-PCR method based on the *recA* gene and designed to identify *B. burgdorferi* s.l. organisms [13], to the DNA sequence analysis of the short 162 bp amplified fragment. We applied this approach to a large-scale survey of ticks collected on vegetation and from animals to investigate the genetic diversity of the *Borrelia* population in Switzerland.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains used as reference

A total of 33 *B. burgdorferi* s.l. strains were used as reference strains (Table 1).

2.2. DNA extraction and PCR of *Borrelia* reference strains

DNA was extracted from 200 µl of BSK-H liquid culture previously conserved at -80°C with Instagene DNA extraction matrix (Biorad, Reinach, Switzerland), according to the manufacturer's instructions. A standard PCR was performed with 5 µl of the extracted DNA, 0.5 µM of each primer, 1 U Taq Polymerase (Qiagen AG, Basel, Switzerland) in a total volume of 50 µl (buffer provided by the manufacturer). Primers were those reported by Morrison et al. [14], nTM17.F (5'-GTG GAT CTA TTG TAT TAG ATG AGG CTC TCG-3') and nTM17.R (5'-GCC AAA GTT CTG CAA CAT TAA CAC CTA AAG-3') amplifying a fragment of 162-bp of the *recA* gene. The reaction mixtures were subjected to an initial denaturation step of 10 min at 94°C , followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min and elongation at 72°C for 2 min. The elongation was completed by a further 5 min step at 72°C . The PCRs were performed in a DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Rotkreuz, Switzerland).

2.3. Tick sampling

In spring and in autumn 2002, *I. ricinus* ticks were collected in three Swiss Cantons (Neuchâtel, Valais

and Ticino). Sampling of questing *I. ricinus* was made by pulling a 1-m² white terry flag over the vegetation. In Canton Neuchâtel, an extended area of 1049 m² surface was flagged. In Canton Valais a set of three areas were chosen as sampling locations: Mt. d'Orge (Sion), Gueroz (Val Trient) and Finges. In Ticino (South Switzerland), ticks were collected from the animal hosts (dogs, cows, cats, goats, asses and humans). Collected ticks were immediately stored in 100% ethanol and conserved at 4°C until taxonomical identification (performed on the basis of their morphological characteristics) and DNA extraction.

2.4. DNA extraction and PCR of the collected ticks

DNA was extracted from minced ticks by using Dneasy Tissue kit (Qiagen AG, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. The PCR to detect *B. burgdorferi* s.l. in *Ixodes* ticks was performed using a fluorescence temperature cycler (Light-Cycler, Roche, Switzerland). We used the primers nTM17.F and nTM17.R described by Morrison et al. [14], and the PCR conditions of Pietila et al. [13]. The melting curve technique was used to determine the specific *Borrelia* PCR products. Five *B. burgdorferi* s.l. genospecies (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. valaisiana*, and *B. lusitaniae*) were used as positive controls and were included in each run. All unspecific products melted at temperature below 80°C .

2.5. DNA sequencing

After purification (Amicon Microcon, Millipore, Milan, Italy), the PCR positive samples were sequenced by using an ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Rotkreuz, Switzerland) on an ABI Prism 310 Genetic Analyser (Perkin-Elmer Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. DNA sequencing for *Borrelia* (*recA* gene, 162 bp) was performed in both directions.

2.6. DNA sequence analysis

The *recA* sequences were handled and stored with the Lasergene program Editseq (DNASTAR Inc., Madison, WI) and aligned with Megalign (DNASTAR Inc.). Phylogenetic analyses of the *recA* sequences were performed by using two different methods: (i) the neighbor-joining (NJ) method with Kimura 2 parameters distances (performed using MEGA Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 2.1 [15]) and (ii) the maximum parsimony (MP) method, using heuristic search with stepwise addition (using PAUP 4.0, [16]). The reliability of internal branches was assessed by bootstrapping with 1000 (NJ) and 100 (MP) pseudoreplicates.

Table 1
Borrelia strains used as reference in this study

Strain	Genospecies	Geographic origin	Accession No.
B31	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	United States	AY586362
NY1387	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	United States	AY586363
A44S	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Holland	AY586364
P1G	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Switzerland	AY586365
IP1	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	France	AY586366
IP2	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	France	AY586367
IP3	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	France	AY586368
VS219	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Switzerland	AY586369
SIKA2	<i>B. garinii</i>	Japan	AY586370
SIKA1	<i>B. garinii</i>	Japan	AY586371
VSPB	<i>B. garinii</i>	Switzerland	AY586372
P/Bi	<i>B. garinii</i>	Germany	AY586373
VS102	<i>B. garinii</i>	Switzerland	AY586374
NT29	<i>B. garinii</i>	Japan	AY586375
Ip89	<i>B. garinii</i>	Russia	AY586376
A19S	<i>B. garinii</i>	Holland	AY586377
Poti B1	<i>B. lusitaniae</i>	Portugal	AY586378
Poti B2	<i>B. lusitaniae</i>	Portugal	AY586379
Poti B3	<i>B. lusitaniae</i>	Portugal	AY586380
VS116	<i>B. valaisiana</i>	Switzerland	AY586381
UK	<i>B. valaisiana</i>	England	AY586382
CA2	<i>B. burgdorferi</i> sensu lato	United States	AY586383
VS461	<i>B. afzelii</i>	Switzerland	AY586384
DK8	<i>B. afzelii</i>	Denmark	AY586383
A26S	<i>B. afzelii</i>	Holland	AY586384
ECM1	<i>B. afzelii</i>	Sweden	AY586385
BO23	<i>B. afzelii</i>	Germany	AY586386
HO14	<i>B. japonica</i>	Japan	AY586387
COW611A	<i>B. japonica</i>	Japan	AY586388
DN127	<i>B. bissettii</i>	United States	AY586389
CA128	<i>B. bissettii</i>	United States	AY586390
CA55	<i>B. bissettii</i>	United States	AY586391
19952	<i>B. andersoni</i>	United States	AY586392

2.7. Nucleotide sequence accession numbers

The *recA* gene sequences (162 bp) of the *B. burgdorferi* s.l. used as reference strains determined in this study have been deposited in GenBank (Table 1).

3. Results

3.1. *Borrelia* reference strains

3.1.1. Sequence characteristics

Using the primers nTM17.F and nTM17.R [14], *recA* fragments of 162 bp were successfully amplified and sequenced from 33 reference strains of *Borrelia* (Table 1). No insertions or deletions were observed. Thirty-eight of 162 nucleotide sites (23.5%) were variable and 32 (19.7%) were parsimony informative. Within the *B. garinii* genospecies a variability of 5.0% was observed, and within the *B. burgdorferi* s.s. and *B. afzelii* genospecies the observed variability was 1.9% and 1.3%, respectively. The deduced amino acid sequences of the ampli-

fied *recA* DNA fragments comprised 54 amino acid residues. The amino acid sequences among the *Borrelia* species were highly conserved.

3.1.2. Phylogenetic analysis

Fig. 1 shows the NJ tree generated from the alignment of the 162-bp of the *recA* nucleotide sequences of the 33 *Borrelia* strains. Despite the limited size of the sequenced fragment, the strains belonging to the same genospecies clustered together, usually with high bootstrap support (82–100%). However, the *B. burgdorferi* s.s. clade was supported by a bootstrap value lower than 50%. In addition, *B. garinii* and *B. valaisiana* grouped together with a bootstrap support slightly higher than 50%. The topology of the tree obtained by MP analysis is generally congruent with those inferred by NJ method (data not shown). The most important difference is represented by the *B. burgdorferi* s.s. strains, which did not form a clade and the position of which remained unresolved within the MP tree.

3.2. *Borrelia* DNA in ticks



Fig. 1. Neighbour-joining tree of 1000 bootstrap pseudo-replicates with Kimura 2 parameters distances from *recA* sequences (162 bp) for 33 *Borrelia* strains. Numbers above branches indicate bootstrap support values higher than 50% for NJ/MP.

3.2.1. *Borrelia* detected by PCR in the collected ticks

Presence and identity of *Borrelia* in ticks were tested by LightCycler PCR and DNA sequence analysis of the *recA* gene (162 bp). A total of 874 ticks were tested for the presence of *B. burgdorferi* s.l. (Table 2): 580 ticks were collected on vegetation in Cantons Neuchâtel and Valais, the rest (294 specimens) from hosts (148 dogs, 70 cows, 45 cats, 15 cats or dogs, 6 goats, 2 unknown hosts, 1 ass, and 7 humans) in Canton Ticino. 196 ticks (22.4%) showed the presence of *B. burgdorferi* s.l. genome (Table 3): 96 ticks from Neuchâtel (32.6%, 45/155 nymphs and 51/139 adults), 44 from Ticino (15.0%, 44/284 adults) and 56 from Valais (19.6%, 17/82 nymphs and 39/204 adults) (Table 2).

3.2.2. Phylogenetic analysis

To allow the precise identification of the *B. burgdorferi* s.l. genospecies detected in ticks, the sequences of the *recA* amplified fragments were compared with the 33 *Borrelia* strains used as reference. A phylogenetic tree

was constructed by the NJ method with Kimura 2 parameters (Fig. 2).

Different *Borrelia* genospecies were recorded in each region studied (Table 2). In the Neuchâtel forest, five genospecies were present. *B. afzelii* (30.2%) and *B. garinii* (30.2%) were dominant, while *B. burgdorferi* s.s. (10.4%), *B. valaisiana* (17.7%), and *B. lusitaniae* strains Poti B2 (11.5%) were less abundant. In the other regions, Ticino and Valais, four *Borrelia* genospecies were found in *I. ricinus* ticks: *B. afzelii* was the dominant species (79.5% and 75%, respectively). In addition, in Canton Ticino, spirochetes identical to *B. lusitaniae* Poti B3 (15.9%) were detected, but *B. burgdorferi* s.s. was absent. Conversely, in Canton Valais, *B. burgdorferi* s.s. (16.1%) was present, but not *B. lusitaniae*. The other genospecies seem to be rare (2.3% for *B. garinii* and *B. valaisiana* in Ticino; and 7.1% for *B. garinii* and 1.8% for *B. valaisiana* in Valais).

Table 3
Description of the positive samples detected by PCR

Samples	<i>Borrelia</i> sp.	Region	Origin	Host
3	<i>B. garinii</i>	Ticino	Giornico	Dog
3 2f/3 3f/3 10M	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Giornico	Dog
3 16M	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Giornico	Dog
8	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Giornico	Cat
14	<i>B. lusitaniae</i>	Ticino	Lottigna	Dog
42	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Valle di Muggio	Dog
50	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Alpe Mürecc/Isone	Cow
54	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Valle di Blenio	Dog
59/60	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Osogna	Cat and dog
63 2f	<i>B. valaisiana</i>	Ticino	Lamone	Cat
84 2f	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Iragna	Goat
90 1f/90 9f/90 10f/90 11f/90 12f/90 13f	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Freggio	Cow
92 3f/92 4f/92 5f/92 6f/92 7f/92 8f/92 9f/92 10f/92 11f/92 12f	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Freggio	Cow
101	<i>B. lusitaniae</i>	Ticino	Breganzona	Dog
104 2f	<i>B. lusitaniae</i>	Ticino	Carena	Cat
121 2m	<i>B. lusitaniae</i>	Ticino	Lodrino	Dog
125	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Arogno	Cat
135 2f	<i>B. lusitaniae</i>	Ticino	Lugano	Cat
162	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Rivera	Dog
166 2m	<i>B. lusitaniae</i>	Ticino	Monti di Cavigliano	Dog
171	<i>B. afzelii</i>	Grigioni	Grono	Dog
234 2f	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Rodi-Fiesso	Dog
265	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Airolo	Dog
579	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Melano	Cat
602	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Vacallo	Human
603	<i>B. afzelii</i>	Ticino	Porza	Dog
607	<i>B. lusitaniae</i>	Ticino	Giornico	Dog
273/276/287/288/308/312/317/322/324/329/349/365/382/393/397/ 398/403/404/412/421/430/438/485/490/516/534/537/546/612	<i>B. afzelii</i>	Neuchâtel	Forest	Vegetation
278/283/290/316/352/390/399/425/435/453/460/465/493/510/512/ 523/624	<i>B. valaisiana</i>	Neuchâtel	Forest	Vegetation
282/285/291/297/298/321/326/330/331/341/343/353/367/368/420/ 431/440/ 450/459/473/474/481/494/526/528/535/538/625/626	<i>B. garinii</i>	Neuchâtel	Forest	Vegetation
332/414/419/422/439/470/487/495/513/545/618	<i>B. lusitaniae</i>	Neuchâtel	Forest	Vegetation
336/345/378/402/413/443/445/501/519/621	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Neuchâtel	Forest	Vegetation
684/685/698/705/708/710/713/714/717/721/729/732/740/743/746/ 747/ 753/754/755/758/760/765/795/825/837/838/848/ 691	<i>B. afzelii</i>	Valais	Mt d'Orge (Sion)	Vegetation
694/706/709	<i>B. valaisiana</i>	Valais	Mt d'Orge (Sion)	Vegetation
704	<i>B. garinii</i>	Valais	Mt d'Orge (Sion)	Vegetation
716/738/745/759/809/842/860	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Valais	Mt d'Orge (Sion)	Vegetation
886/893/895/897/900/904/905/906/915/922/924/935/937/941/951	<i>B. afzelii</i>	Valais	Val Trient	Vegetation
891/956	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Valais	Val Trient	Vegetation

ticks from the three Swiss regions

In the present study, five different genospecies of the *B. burgdorferi* s.l. complex, e.g., *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. valaisiana*, and *B. lusitaniae* were detected in Switzerland. The tick infection rates were 32.6% for Neuchâtel, 19.6% for Valais and 15.0% for Ticino. Considering the three regions together, the most prevalent genospecies in Switzerland was *B. afzelii*.

This finding is in agreement with several studies, which described the high prevalence of *B. afzelli* in *I. ricinus* ticks in North and Central Europe countries [21–23]. However, it is in contrast with other reports showing that *B. garinii* is the most common genospecies in a number of countries of Central Europe and South

Western Europe [2,24]. In addition, according to Kirsten et al. [25], *B. valaisiana* is the most abundant species in Ireland, and *B. lusitaniae* in Tunisia [26], in Morocco [27] as well as in Portugal [28]. Summarising these different studies, *B. afzelii* and *B. garinii* appear to be the most abundant genospecies in Europe, while the presence of the other genospecies differs according to the study area and are in any case less abundant.

Considering the situation in the three Swiss regions analysed, in Neuchâtel the five genospecies were recorded, which confirms previous results [5]. In the Canton Ticino, it has been possible for the first time to show the presence of *B. afzelii* strains. In a previous report [29], *B. valaisiana* (VS116) was detected and identified by PCR in ticks collected from animals, while Jo-

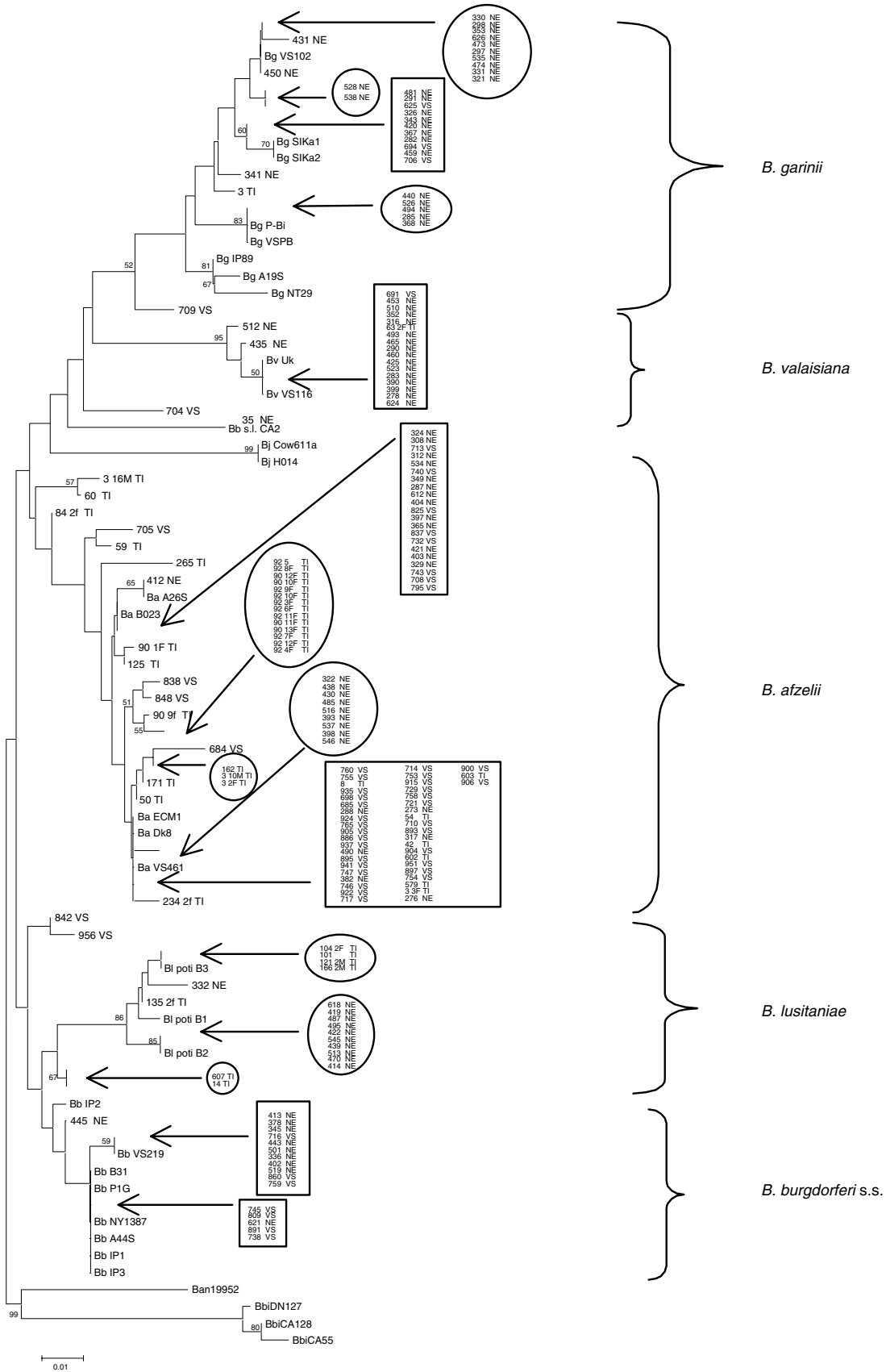


Fig. 2. Neighbour-joining tree of 1000 bootstrap pseudo-replicates with Kimura 2 parameters distances from *recA* sequences for 229 *Borrelia* sp. samples. Bootstrap proportions are provided when greater than 50%. Numbers refer to *Borrelia* identified in ticks collected in three regions of Switzerland: Neuchâtel (NE), Ticino (TI) and Valais (VS). The circle ("O") shows the groups formed in according to the geographical origin and the square ("□") shows the mixed groups.

uda et al. [4] reported *B. garinii*, *B. lusitaniae*, and *B. valaisiana* in ticks collected from vegetation. *B. burgdorferi* s.s. seems to be very rare or even absent in Ticino. Concerning the Valais region, *B. lusitaniae* was not detected. A previous study [30] already showed the presence of

B. burgdorferi s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* and *B. valaisiana*, but with different infection rates.

Interestingly, *B. lusitaniae* Poti B2 strains were reported in Neuchâtel and *B. lusitaniae* Poti B3 in Ticino. In the past, the *B. lusitaniae* Poti B2 has been found in various European countries [2], but in contrast the *B. lusitaniae* Poti B3 was noted only in Spain [28]. The dynamics of the two *B. lusitaniae* strains distribution seems to be different.

4.4. Phylogenetic relationships

In the phylogenetic tree of Fig. 2, we identified groups formed according to the geographical origin of the vector ticks as local *Borrelia* populations; alternatively, we found mixed groups formed by *Borrelia* ssp. originating from samples coming from two or all the three regions considered. For instance, strains corresponding to *B. lusitaniae* Poti B2 are characteristic of the Neuchâtel forest while *B. lusitaniae* Poti B3 strains were recorded in various localities for the Canton Ticino (Table 3). On the other hand, *B. valaisiana* strains are indistinguishable in all three regions considered.

From the data presented, we observe that each area studied has its particular *Borrelia* population. Each population probably has its own internal dynamics that results in a heterogeneous distribution of the *B. burgdorferi* s.l. population in Switzerland. This distribution reflects the situation in Europe, where the prevalence of *B. burgdorferi* s.l. in the vector *I. ricinus* ticks differs considerably.

The heterogeneous structure and distribution of *B. burgdorferi* s.l. has been associated with the diversity of the reservoir hosts [4]. *B. burgdorferi* s.l. may be maintained in nature through distinct transmission cycles, involving small mammals and/or birds [31]. According to Kurtenbach [12], the vertebrate hosts rather than tick species are the key to the Lyme borreliosis spirochete diversity. Local host communities probably contribute significantly to the population structure of the *B. burgdorferi* s.l. populations.

At the local level, genetic factors such as mutations generate new forms of *Borrelia*, many of which remain on the same place (host population closed). At the European level, the circulation of the different forms of *Borrelia* is probably due to host movements or migrations (rodents moving only short distances, highly mobile and birds migrating long distance).

The heterogeneity of the *B. burgdorferi* s.l. genospecies in Switzerland, and also in Europe, seems to infer continuous evolution. Our data showed that *B. afzelii* is the most frequent and heterogeneous genospecies in Switzerland. This is surprising since *B. afzelii* is known to include only one ospA serotype, whereas *B. garinii* shows different serotypes, a number of which might be related to neuroborreliosis [32]. The diversity of *B. burgdorferi* s.l. in Eurasia is much greater than in North America, where we observe an apparent homogeneity with *B. burgdorferi* s.s. as the predominant genospecies. In addition, it is interesting to note the presence in Europe of other genospecies such as the *Borrelia* isolate I-77 [33]. The whole Lyme borreliosis spirochete complex might originate from Eurasia and is close to *B. garinii*, which has shown the greatest genetic heterogeneity [34]. However, in the present study based on *recA* diversity, *B. afzelii* has been found to be more heterogeneous than *B. garinii*, which might suggest a rapid evolution of this genospecies.

Acknowledgements

We thank all the people who helped us in collecting ticks, particularly the veterinarians (Ticino), O. Rais (Neuchâtel) and O. Péter (Valais). This work was supported by the Swiss national Science Foundation (31-64976) to J.-C. Piffaretti. This paper is part of the Ph.D. thesis of one of the author (S.C.).

References

- [1] Bergström, S., Noppa, L., Gylfe, A. and Ostberg, Y. (2002) Molecular and cellular biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In: Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control, pp. 47–90. CABI International.
- [2] Hubalek, Z. and Halouzka, J. (1997) Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. Eur. J. Epidemiol. 13, 951–957.
- [3] Hanincova, K., Taragelova, V., Koci, J., Schafer, S.M., Hails, R., Ullmann, A.J., Piesman, J., Labuda, M. and Kurtenbach, K. (2003) Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2825–2830.
- [4] Jouda, F., Crippa, M., Perret, J.L. and Gern, L. (2003) Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of canton Ticino (Switzerland). Eur. J. Epidemiol. 18, 907–912.
- [5] Jouda, F., Perret, J.L. and Gern, L. (2004) *Ixodes ricinus* density, and distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient. J. Med. Entomol. 41, 162–169.
- [6] Rijpkema, S.G., Tazelaar, D.J., Molkenboer, M.J., Noordhoek, G.T., Plantinga, G., Schouls, L.M. and Schellekens, J.F. (1997) Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of

- patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin. Microbiol. Infect.* 3, 109–116.
- [7] Picken, R.N., Cheng, Y., Strle, F. and Picken, M.M. (1996) Patient isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities of strain 25015. *J. Infect. Dis.* 174, 1112–1115.
- [8] Collares-Pereira, M., Couceiro, S., Franca, I., Kurtenbach, K., Schafer, S.M., Vitorino, L., Goncalves, L., Baptista, S., Vieira, M.L. and Cunha, C. (2004) First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1316–1318.
- [9] Balmelli, T. and Piffaretti, J.C. (1995) Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Res. Microbiol.* 146, 329–340.
- [10] Baranton, G., Seinost, G., Theodore, G., Postic, D. and Dykhuizen, D. (2001) Distinct levels of genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* are associated with different aspects of pathogenicity. *Res. Microbiol.* 152, 149–156.
- [11] Gern, L. and Humair, P.-F. (2002) Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In: *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control* (Gray, J., Kahl, O., Lane, R.S. and Stanek, G., Eds.), pp. 149–174. CABI International.
- [12] Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schafer, S.M., Sewell, H.S., Brade, V. and Kraiczky, P. (2002) Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato – the key role of host complement. *Trends Microbiol.* 10, 74–79.
- [13] Pietila, J., He, Q., Oksi, J. and Viljanen, M.K. (2000) Rapid differentiation of *Borrelia garinii* from *Borrelia afzelii* and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by LightCycler fluorescence melting curve analysis of a PCR product of the *recA* gene. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2756–2759.
- [14] Morrison, T.B., Ma, Y., Weis, J.H. and Weis, J.J. (1999) Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi*-infected mouse tissues by continuous fluorescent monitoring of PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37, 987–992.
- [15] Kumur, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. and Nei, M. (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Arizona State University, Tempe, AZ.
- [16] Swofford, D.L. (1998). PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods), version 4., Sunderland, MA.
- [17] Le Fleche, A., Postic, D., Girardet, K., Peter, O. and Baranton, G. (1997) Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 921–925.
- [18] Lee, S.H., Kim, B.J., Kim, J.H., Park, K.H., Kim, S.J. and Kook, Y.H. (2000) Differentiation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato on the basis of RNA polymerase gene (*rpoB*) sequences. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2557–2562.
- [19] Valsangiacomo, C., Balmelli, T. and Piffaretti, J.C. (1997) A phylogenetic analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato based on sequence information from the *hbb* gene, coding for a histone-like protein. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1–10.
- [20] Fukunaga, M., Okada, K., Nakao, M., Konishi, T. and Sato, Y. (1996) Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease *borreliae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 898–905.
- [21] Schaarschmidt, D., Oehme, R., Kimmig, P., Hesch, R.D. and Englisch, S. (2001) Detection and molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and in different patient samples from southwest Germany. *Eur. J. Epidemiol.* 17, 1067–1074.
- [22] 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.
- [23] Quessada, T., Martial-Convert, F., Arnaud, S., Leudel 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.
- [24] 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. Microbiol.* 38, 4026–4033.
- [25] Kirstein, F., Rijpkema, S., Molkenboer, M. and Gray, J.S. (1997) The distribution and prevalence of *B. burgdorferi* genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Ireland. *Eur. J. Epidemiol.* 13, 67–72.
- [26] 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.
- [27] Sarih, M., Jouda, F., Gern, L. and Postic, D. (2003) First isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks in Morocco. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 3, 133–139.
- [28] De Michelis, S., Sewell, H.S., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Schouls, L.M., 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, 2128–2133.
- [29] Bernasconi, M.V., Valsangiacomo, C., Balmelli, T., Peter, 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.
- [30] Peter, 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.
- [31] Gern, L. and Humair, P.F. (1998) Natural history of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Wien. Klin. Wochenschr.* 110, 856–858.
- [32] Wilske, B., Preac-Mursic, V., Gobel, U.B., Graf, B., Jauris, S., Soutschek, E., Schwab, E. and Zumstein, G. (1993) An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31, 340–350.
- [33] Derdakova, M., Beati, L., Pet'ko, B., Stanko, M. and Fish, D. (2003) Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the *rrfA-rrlB* intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 509–516.
- [34] Marti Ras, N., Postic, D., Foretz, M. and Baranton, G. (1997) Marti *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, a bacterial species made in the U.S.A.?. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1112–1117.

4.4. Publication IV

Presence of human pathogenic *Babesia* sp. in *Ixodes ricinus* in Switzerland.

Submitted, 2005.

Presence of human pathogenic *Babesia* sp. in *Ixodes ricinus* in Switzerland.

Running title: *Babesia* sp. in Switzerland.

Simona Casati¹, Heinz Sager², Lise Gern³, and Jean-Claude Piffaretti¹

¹ Istituto Cantonale di Microbiologia, Via Mirasole 22A, 6500 Bellinzona, Switzerland

² Institute of Parasitology, University of Bern, 3001 Bern, Switzerland

³ Institut de Parasitologie, Université de Neuchâtel, Rue Emile-Argand 11, 2000 Neuchâtel, Switzerland

Corresponding author:
Jean-Claude Piffaretti
Istituto Cantonale di Microbiologia
Via Mirasole 22A
6500 Bellinzona
Phone: +41 91 814 60 11
Fax: +41 91 814 60 29
Mail: jean-claude.piffaretti@ti.ch

Key words: *Babesia microti* - *Babesia divergens* - *Babesia* sp. EU1 - *Ixodes ricinus* - Switzerland

Abstract

We have designed and performed a new PCR method based on the 18S rRNA in order to individuate the presence and the identity of *Babesia* parasites. Out of 1159 *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks collected in four areas of Switzerland, nine were found to contain *Babesia* DNA. Sequencing of the short amplicon obtained (411-452 bp) allowed to identify three human pathogenic species: *Babesia microti*, *B. divergens*, and for the first time in Switzerland, *B. sp. EU1*. We also report coinfections with *B. sp. EU1-Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *B. sp. EU1-B. afzelii*.

INTRODUCTION

The tick *Ixodes ricinus* may carry various pathogens with the potential of generating serious human and animal diseases such as borreliosis, babesiosis and tick-borne encephalitis. Babesiosis is caused by the infection of erythrocytes by a protozoan belonging to the genus *Babesia*. The symptoms are broad, ranging from an apparently silent infection to a fulminant malaria-like disease that can result occasionally in human death [14]. The *Babesia* species represent one of the major tick-borne pathogens that infect human and animal red blood cells all over the world [15].

In North America, the predominant etiological agent of human babesiosis is *Babesia microti*, a parasite of small mammals. In addition, a *Babesia* species, designated WA1, was also shown to cause disease in humans [16]. *B. microti* is present in Europe too [6,8,21], where few human cases, not well documented, have been reported [11]. Recently, Meer-Scherrer et al. (2004) described the first *B. microti* infection in a Swiss patient.

Since the late 1957s, European human infection have been attributed to *B. divergens*, usually a cattle parasite [11,23]. However, in absence of a molecular-based confirmation, the identification of the species causing human cases is uncertain. A new candidate species pathogenic in humans, designated EU1 (*Babesia* sp. EU1), has been recently documented [13]. Phylogenetic analysis has shown that EU1 and *B. odocoilei* form a sister group to *B. divergens*. The serological assays presently available are not able to discriminate between EU1 and *B. divergens* infections [13], hence all the cases reported till now have been ascribed to *B. divergens*. European human babesiosis is infrequent and concerns mostly splenectomised patients. Infections with *B. divergens* are likely to be more severe than those caused by *B. microti* [11].

Since 1997, DNA sequences from two cases of human babesiosis due to *B. divergens* are available on GenBank. Both concerned splenectomised patients: one was related to a fatal case in a 66-year-old patient in Portugal [5], the other to a 34-year-old patient in the Canary Islands [20]. Molecular analysis have confirmed that the protozoans involved are *B. divergens*.

Other cases of human babesiosis have been described by molecular techniques in Italy and in Austria [13]. Herwaldt et al. (2003) documented how two asplenic patients were not infected by *B. divergens*, but by the new candidate organism EU1. In addition, in Slovenia the presence of a *Babesia* sp. in *I. ricinus* ticks has been reported [6]. The partial sequence of the gene 18S rRNA has been shown to be identical to the corresponding gene of EU1. In conclusion, these fragmentary pieces of information do not allow to have a representative picture of the distribution in Europe of the different *Babesia* sp.

The aim of this study is to determine the prevalence of *Babesia* sp. in *I. ricinus* in Switzerland. For this purpose, we designed and performed a new PCR method, which we applied to more than 1'000 *I. ricinus* ticks collected from 4 different regions of the country.

MATERIALS AND METHODS

Tick sampling. In spring and autumn of the years 2002 and 2003, *I. ricinus* ticks were collected in four regions of Switzerland (Neuchâtel, Ticino, Zürich and Valais). In Canton Neuchâtel and in Canton Zürich, an area of 1049m² and a more extended surface were flagged, respectively. In Canton Valais, 3 areas were chosen as sampling locations: Mt. d'Orge (Sion), Gueuroz (Val Trient) and Finges. In Ticino (South Switzerland), ticks were collected from the animal hosts (dogs, cows, cats, goats and asses) and humans. Ticks were immediately introduced in 100% ethanol and conserved at 4°C until taxonomic identification (based on morphological characteristics).

DNA extraction of the collected ticks. Total DNA was extracted from each tick by using a Dneasy Tissue kit (Qiagen AG, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Each sample was minced with a disposable sterile scalpel within a microtube. After digestion with proteinase K (20 µg/ml) samples were applied to the columns for absorption and washing of DNA. Finally, DNA was eluted in 200 µl of buffer available from the kit and stored at 4°C. In order to show that negative results were not due to inhibition of the PCR reaction, the efficiency of the DNA extraction was validated on 100 negatively samples amplifying a 338-339 bp DNA fragment corresponding to the 12S rDNA gene of the ticks [2].

DNA extraction of blood samples. The DNAs of the *Babesia* strains used to validate the method were extracted from blood samples of infected animals (Table 1), provided from the Institute of Parasitology in Bern, with the QIAmp DNA Blood Mini kit (Qiagen AG, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions.

Detection of Babesia DNA by PCR. The PCR reactions for the detection of *Babesia* from blood samples and *Ixodes* ticks were performed with 5 µl of the extracted DNAs as template, 0,5 µM of each primer (see below), 1 Unit Taq Polymerase (Qiagen AG, Basel, Switzerland) in a total volume of 50 µl (buffer provided by the manufacturer). The reaction mixtures were subjected to an initial denaturation step of 10 min at 94°C, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, and elongation at 72°C

for 2 min. Amplification was completed by a further 5 min step at 72°C. The reactions were performed in a DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Rotkreuz, Switzerland). We designed the primers used both for PCR amplification and sequencing on the basis of the common sequence of the 18S rRNA gene of the genus *Babesia* (primer BJ1: 5'-GTC TTG TAA TTG GAA TGA TGG-3'; primer BN2: 5'-TAG TTT ATG GTT AGG ACT ACG-3'). According to the sequence of the 18S rRNA gene of *B. divergens* AY439713 (Table 3), the position of the amplified fragment is 488-912.

Sequencing of PCR products. PCR products (411-452 bp) were purified by using an Amicon Microcon Millipore Kit (Millipore, Milano, Italy), eluted in 20 µl of buffer and stored at 4°C. Cycle sequencing reactions were performed in total volumes of 15 µl using an ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Rotkreuz, Switzerland) on an ABI Prism 310 GENETIC Analyser (Perkin-Elmer Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. DNA sequencing was performed in both directions.

Limit of detection. To assess the analytical sensitivity of the PCR assays for the multicopy target 18S rRNA gene, the DNA concentration of an extract originating from a *B. divergens* strain from Austria (Table 1) was determined by fluorimetry (Fluorimeter TD-700, Witec AG, Switzerland). The extract was then serially diluted 10-fold in sterile water. Five µl of each dilution were used as template for the PCR reaction.

DNA sequence analysis. To verify the taxonomic status of *Babesia* sp. detected in our collection of ticks, we performed a phylogenetic analysis with the amplicons obtained from the positive samples and the sequences downloaded from GenBank (Table 2). The 18S rRNA sequences were handled and stored with the Lasergene program Editseq (DNASTar Inc., Madison, WI USA) and aligned with Megalign (DNASTar Inc.). Phylogenetic analyses of the 18S rRNA sequences were performed by the neighbor-joining (NJ) method, with Kimura-2-parameters distances (performed using MEGA Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 2.1, [18]). The reliability of internal branches was assessed by bootstrapping with 1000 (NJ) pseudoreplicates [7].

Nucleotide sequence accession number. The 18S rRNA sequences of *Babesia* used to validate the method and the *Babesia* detected in the *I. ricinus* ticks have been deposited in GenBank: the accession numbers are in Table 1 and Fig. 2, respectively.

RESULTS

PCR of the collected ticks. A total of 1159 ticks (294 from Ticino, 294 from Neuchâtel, 285 from Zürich and 286 from Valais) were tested for the presence of *Babesia* by amplification of the 18S rRNA gene (Table 2). A total of 9 samples (0.8%) (5 from Ticino, 2 from Neuchâtel and 2 from Zürich) showed single bands of 411-452 bp, which were confirmed to be *Babesia* DNA by sequencing (Fig. 2). The five animals (2 dogs, 1 cat and 2 cows) carrying the infected ticks in Ticino did not show any clinical signs of *Babesia* infection, such as fever, anorexia, anaemia, or jaundice. The peripheral blood of these animals could not be analysed in this study.

Validation of the PCR method. All the 7 infected blood samples (Table 1) used to validate the method were successfully amplified, which supports its reliability. The PCR experiments on serial dilutions of purified genomic DNA from *B. divergens* showed that the limit of detection under ideal sample condition was 27.5 fg/reaction (Fig.1). The PCR tests did not produce amplicons when DNA extracted from *T. gondii* and *L. infantum* were used as template (data not shown).

All the 100 *Babesia*-negative ticks, tested to validate the DNA extraction by amplifying a fragment of the 12S rDNA gene, generated positive results (data not shown). This confirms that our *Babesia*-negative results are not due to inhibition of the PCR reaction.

Sequence analysis. In order to verify whether the size of the amplified short fragment is sufficient to discriminate the different species, we downloaded from Genbank the sequences of the 18S rRNA gene of 10 strains (Table 3) and compared the nucleotide variability of the short fragments (411-452 bp) to that of the whole sequences (1'700 bp). The values obtained were 25.3% and 20.3%, respectively, which can be considered similar.

We then determined the species of the *Babesia* detected in our ticks by comparing the sequences of the 18S rRNA short amplicons with the corresponding fragments of the 12 *Babesia* sequences used as references (Table 3) and of the 7 *Babesia* sequences used to validate our method (Table 1). A phylogenetic tree was constructed by the NJ method with Kimura-2-parameters (Fig. 2).

Three positive samples (samples 1 and 2, two nymphs from Neuchâtel, and sample 3, a female from Ticino) were identified as EU1 organisms (Table 3, GenBank accession no. AY046575). Two other samples from Ticino (samples 4 and 5, two females) were found to be closely related to EU1 with an identity of 99.8% (the sequences differed by only 1 base). The last two positive amplicons from Ticino (sample 6 and 7, a

female and a nymph, respectively) perfectly overlapped with *B. divergens* sequences obtained from a blood cattle sample (Table 1, GenBank accession no. AY648871) and from a cattle blood smear (Table 1, AY648873). Finally, samples 8 and 9 (two nymphs) from Zürich were identical to the GenBank sequence of *B. microti* found in a tick from Switzerland (Table 3, GenBank accession no. AY144692) and differed by 1 bp from the North American reference strain *B. microti* (Table 3, GenBank accession no. AF231348).

DISCUSSION

We have described a new PCR method based on the 18S rRNA gene that allows the detection of *Babesia* in *I. ricinus* ticks and in blood samples. The amplified fragments show an important number of mutations. In addition, the variability of the target fragments (25.3%) is similar to the variability of the complete gene sequences (20.3%). Because of this variability, the short amplicon of 411-452 bp of the 18S rRNA gene may be used for accurate species resolution. Indeed, we could differentiate all the *Babesia* species we considered (Fig. 2). Moreover, in the *B. canis* cluster, we clearly could separate the two subspecies *B. canis vogeli* and *B. canis canis* (Fig. 2).

The analytical sensitivity of the PCR assays has been shown to be 27.5 fg/reaction of *B. divergens* DNA. However, the majority of the previous reports describing PCR for the detection of *Babesia* in ticks did not report the sensitivity with the exception of a study which showed a limit of detection of 50 organisms/ml of canine whole blood [3].

We have detected *B. microti*, *B. divergens* and *B. sp.* EU1 in *I. ricinus* ticks collected in four areas of Switzerland. The comparison of the tick infection rate between the studied areas is difficult to make because of the different origin of the samples: indeed, ticks were collected from animal hosts in Ticino and from vegetation in the other three areas. However, the infection rate values were low, whatever the collection method (0.7%-1.7%). A similar infection rate (1%) was reported from a study on ticks collected in 4 different areas of Southern Germany [12]. In contrast, ticks tested in Slovenia and in Poland had a positivity rate for *Babesia* spp. of 9.6% and 16.3%, respectively [6,21]. The reasons for such infection rate differences remain to be clarified.

This is the first study reporting the presence of *B. sp.* EU1 in Switzerland. This organism was detected in ticks collected in two areas located at North (Neuchâtel) and South of the Alps (Ticino). The presence in Switzerland of *B. microti* and *B. divergens* was also confirmed. Although *B. divergens* has been described in various Swiss cantons (Valais, Ticino and Jura) [1,10], until now there has been no reports of clinical human case due to indigenous strains of this species. Concerning *B. microti*, a study reported the

presence in rodents of *Babesia* and specific antibodies in two sites of the Canton Bern [9]. In addition, the presence of antibodies directed against *B. microti* was evidenced in inhabitants of an eastern Swiss area [8]. Recently, Meer-Scherrer et al. (2004) described the first human case due to *B. microti* in a Swiss patient. However, the behaviour and the virulence of the European *B. microti* strains might be different from those of North America. Interestingly, in another study, it has been suggested that *B. microti* in the United States may be more virulent for humans than the *B. microti*-like isolated in Japan [24].

Recently, two cases of human babesiosis, in Italy and Austria, have been attributed to EU1 [13]. Moreover, in Slovenia ticks have been found infected by this species [6]. The EU1 sequences obtained in these different countries, including Switzerland, are identical or very close (99.8% of similarity) and thus no specific geographic association may be identified. An important issue concerning *B. sp.* EU1 is to determine whether it is an emergent species. Only the 4 bordering European countries mentioned above have been found to host this pathogen. However, the serological tests used in the past are not able to distinguish this species and hence, it is not possible to know its real prevalence. Further surveys similar to ours should be implemented in the European countries to track this new *Babesia* species.

Another issue which has to be clarified is related to the *Babesia* reservoirs. Zintl et al. suggested that *B. divergens* is maintained in cattle, which have recovered from previous infections or present mild subclinical infections [25]. Thus, cattle movement across Europe may influence the distribution of this pathogen. Moreover, the reservoir host for EU1 is presently unknown and for this reason its distribution throughout European countries is not predictable.

A serological study in western France indicated that asymptomatic infection with *B. divergens* may co-exist with *Borrelia burgdorferi sensu lato* [11]. The ticks we have analysed in this work have been also examined for infection by *B. burgdorferi s. l.* [4]. We report two coinfections, detected molecularly, the first in a tick from the Neuchâtel forest (sample 2) which was found to host both EU1 and *B. burgdorferi s.s.*, and the second in a tick from a cow in Ticino (sample 5) which contained *B. sp.* EU1 and *B. afzelii*. Coinfections with *B. microti* and *B. burgdorferi s.l.* are well documented in North-America as well as in Europe [17,19,22].

To conclude, we would like to stress that the association of *I. ricinus* with *B. sp.* EU1, *B. divergens* and *B. microti* is important because of their zoonotic relevance. Indeed, ticks may be considered as epidemiological markers for the distribution of different infectious agents such as *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Ehrlichia*, *Rickettsia* and TBEV.

Acknowledgements

We thank all our colleagues and friends who helped us in collecting ticks, particularly veterinarians in Ticino, Olivier Péter for Valais, Olivier Rais for Neuchâtel and Cinzia Benagli for Zürich. We are indebted to André Gorenflot for providing DNA extracted from two isolates of *B. divergens* and *B. canis*. We also thank Maruska Convert, Marco Bernasconi, Valeria Gaia and Elena Grasselli for their help. This work was supported by the Swiss National Science Foundation (31-64976) to J.-C. Piffaretti. This paper is part of the PhD thesis of one of the authors (S.C.).

REFERENCES

1. Aeschlimann A, Brossard M, Quenet G: Contribution to the knowledge of Swiss piroplasmas. *Acta Trop* 1975, **32**, 281-289.
2. Beati L, Keirans JE: Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J Parasitol* 2001, **87**, 32-48.
3. Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB: Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J Clin Microbiol* 2003, **41**, 4172-4177.
4. Casati S, Bernasconi MV, Gern L, Piffaretti JC: Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by *recA* gene sequence. *FEMS Microbiol Lett* 2004, **238**, 115-123.
5. Centeno-Lima S, do Rosario V, Parreira R, Maia AJ, Freudenthal AM, Nijhof AM, Jongejan F: A fatal case of human babesiosis in Portugal: molecular and phylogenetic analysis. *Trop Med Int Health* 2003, **8**, 760-764.
6. Duh D, Petrovec M, Avsic-Zupanc T: Diversity of *Babesia* infecting European sheep ticks (*Ixodes ricinus*). *J Clin Microbiol* 2001, **39**, 3395-3397.
7. Felsenstein J: Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu Rev Genet* 1988, **22**, 521-565.
8. Foppa IM, Krause PJ, Spielman A, Goethert H, Gern L, Brand B, Telford SR, 3rd: Entomologic and serologic evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti*, in eastern Switzerland. *Emerg Infect Dis* 2002, **8**, 722-726.
9. Gern L, Aeschlimann A: Seroepidemiologic study of 2 foci of babesiosis of small mammals in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1986, **128**, 587-600.
10. Gern L, Brossard M, Aeschlimann A, Broquet CA, Quenet G, Stucki JP, Ackermann J: Bovine piroplasmiasis in the Clos-du-Doubs (Jura, Switzerland): preliminary observations. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1982, **124**, 549-556.
11. Gorenflot A, Moubri K, Precigout E, Carcy B, Schetters TP: Human babesiosis. *Ann Trop Med Parasitol* 1998, **92**, 489-501.
12. Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, Hassler D, Kimmig P: Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int J Med Microbiol* 2004, **293 Suppl 37**, 86-92.
13. Herwaldt BL, Caccio S, Gherlinzoni F, Aspöck H, Slemenda SB, Piccaluga P, Martinelli G, Edelhofer R, Hollenstein U, Poletti G, Pampiglione S, Loschenberger K, Tura S, Pieniazek NJ: Molecular characterization of a non-*Babesia* divergens organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis* 2003, **9**, 942-948.
14. Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford SR, 3rd, Krause PJ, Persing DH: Babesiosis. *Clin Microbiol Rev* 2000, **13**, 451-469.
15. Inokuma H, Yoshizaki Y, Shimada Y, Sakata Y, Okuda M, Onishi T: Epidemiological survey of *Babesia* species in Japan performed with specimens from ticks collected from dogs and detection of new *Babesia* DNA closely related to *Babesia odocoilei* and *Babesia divergens* DNA. *J Clin Microbiol* 2003, **41**, 3494-3498.

16. Kjemtrup AM, Conrad PA: Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *Int J Parasitol* 2000, **30**, 1323-1337.
17. Krause PJ, McKay K, Thompson CA, Sikand VK, Lentz R, Lepore T, Closter L, Christianson D, Telford SR, Persing D, Radolf JD, Spielman A: Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2002, **34**, 1184-1191.
18. Kumur S, Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M.: *MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software*. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA, 2001
19. Meer-Scherrer L, Adelson M, Mordechai E, Lottaz B, Tilton R: *Babesia microti* infection in Europe. *Curr Microbiol* 2004, **48**, 435-437.
20. Olmeda AS, Armstrong PM, Rosenthal BM, Valladares B, del Castillo A, de Armas F, Miguelez M, Gonzalez A, Rodriguez Rodriguez JA, Spielman A, Telford SR, 3rd: A subtropical case of human babesiosis. *Acta Trop* 1997, **67**, 229-234.
21. Skotarczak B, Cichocka A: Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of *Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland. *Ann Agric Environ Med* 2001, **8**, 187-189.
22. Skotarczak B, Wodecka B, Cichocka A: Coexistence DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland. *Ann Agric Environ Med* 2002, **9**, 25-28.
23. Skrabalo Z, Deanovic Z: Piroplasmosis in man; report of a case. *Doc Med Geogr Trop* 1957, **9**, 11-16.
24. Tsuji M, Wei Q, Zamoto A, Morita C, Arai S, Shiota T, Fujimagari M, Itagaki A, Fujita H, Ishihara C: Human babesiosis in Japan: epizootologic survey of rodent reservoir and isolation of new type of *Babesia microti*-like parasite. *J Clin Microbiol* 2001, **39**, 4316-4322.
25. Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, Taylor SM, Gray JS: *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clin Microbiol Rev* 2003, **16**, 622-636.

Table 1. Blood samples^a containing different *Babesia* strains.

Strains	Source	Strains origin	GenBank accession no.
<i>B. equi</i>	Horse blood	Clinical case in Switzerland (Bern)	AY648885
<i>B. canis</i>	Dog blood	Clinical case in Switzerland	AY648872
<i>B. divergens</i>	Cattle blood	Reference strain (Institute for Parasitology, Hannover Veterinary School)	AY648871
<i>B. major</i>	Cattle blood	Reference strain (Central Veterinary Laboratory, Weybridge)	AY648886
<i>B. bigemina</i>	Cattle blood	Reference strain (Central Veterinary Laboratory, Weybridge)	AY648884
<i>B. canis canis</i>	Dog blood	Clinical case in Switzerland (Aargau)	AY648874
<i>B. divergens</i>	Cattle blood smear	Clinical case in Switzerland (Fribourg)	AY648873

^aThe samples were provided by the Parasitology Institute of the University of Bern, Switzerland.

Table 2. *Babesia* found in *I. ricinus* ticks collected in four regions of Switzerland.

Areas	Total number of ticks examined	Collected from	Infection rate ^a (%)			<i>Babesia</i> sp. detected by PCR (stage of the infected tick / Accession no.)		
			Total	Nymph stage	Adult stage	<i>B. EU1</i>	<i>B. divergens</i>	<i>B. microti</i>
Ticino	294 (1L ^b , 9N, 284A)	Animals	5/294 (1.7)	1/9 (11.1)	4/284 (1.4)	Sample3 (F/AY648881) Sample4 (F/AY648879) Sample5 (F/AY648880)	Sample6 (F/AY648875) Sample7 (N/AY648876)	-
Neuchâtel	294 (155N, 139A)	Vegetation	2/294 (0.7)	2/155 (1.3)	0/139 (0)	Sample1 (N/AY648877) Sample2 (N/AY648878)	-	-
Valais	286 (82N, 204A)	Vegetation	0/286 (0)	0/82 (0)	0/204 (0)	-	-	-
Zürich	285 (246N, 39A)	Vegetation	2/285 (0.7)	2/246 (0.8)	0/39 (0)	-	-	Sample 8 (N/AY648882) Sample 9 (N/AY648883)

A, Adults; N, Nymphs; L, Larvae and F, Adult Female.

^a Number of ticks infected/number of ticks examined (%).

^b tested negative for *Babesia*.

Table 3. *Babesia* sequences downloaded from GenBank and used as references in the phylogenetic tree of Fig. 2.

Reference strains	Source	GenBank accession number
<i>B. sp.</i> EU1	GenBank	AY046575 ^a
<i>B. divergens</i>	GenBank	AJ439713 ^a
<i>B. odocolei</i>	GenBank	U16369 ^a
<i>B. canis</i>	GenBank	AY072926
<i>B. caballi</i>	GenBank	AY309955 ^a
<i>B. bigemina</i>	GenBank	X59604 ^a
<i>B. rodhaini</i>	GenBank	M87565 ^a
<i>B. microti</i> (North-America)	GenBank	AF231348 ^a
<i>B. microti</i> (Switzerland)	GenBank	AY144692
<i>B. equi</i>	GenBank	AY150064 ^a
<i>B. canis canis</i>	GenBank	AY527063/AY072926 ^a
<i>B. canis vogeli</i>	GenBank	AY150061/AY072925 ^a

^a complete sequence of the 18S rRNA gene (1'700 bp) available in Genbank

LEGENDS TO ILLUSTRATIONS

Figure 1. PCR assay on a serial dilution of purified genomic DNA from *Babesia divergens* (10-fold dilutions starting from 55 ng/ml in lane 1). The 425 bp amplicon has a detection limit of 550 fg/ml which corresponds to 27.5 fg/reaction (lane 5). The bands at the bottom are due to residual primers from the reaction. DNA size markers, 100 bp ladder, have been loaded on each side.

Figure 2. Neighbour-joining tree of 1000 bootstrap pseudo-replicates with Kimura-2-parameters distances from 18S rRNA (411-452 bp) sequences. Bootstrap proportions are indicated when greater than 50%. The tree illustrates the phylogenetic relationship of the *Babesia* species detected in Switzerland. The codes refer to the geographic origin of the collected ticks (NE = Neuchâtel, TI = Ticino and ZH = Zürich). Sample 3 originates from an *I. ricinus* tick collected from a cow, whereas the ticks of samples 4 and 5 originated from a dog and a cow, those of 6 and 7 from a dog and a cat, respectively. *Plasmodium falciparum* has been used as outgroup. The GenBank accession numbers of the *Babesia* sequences detected in *I. ricinus* are in bold. The scale bar represents 5% of divergence.

Figure 1.

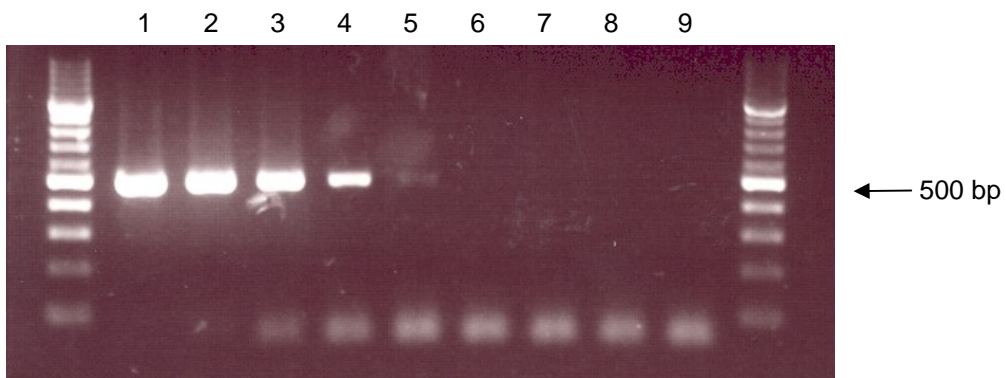
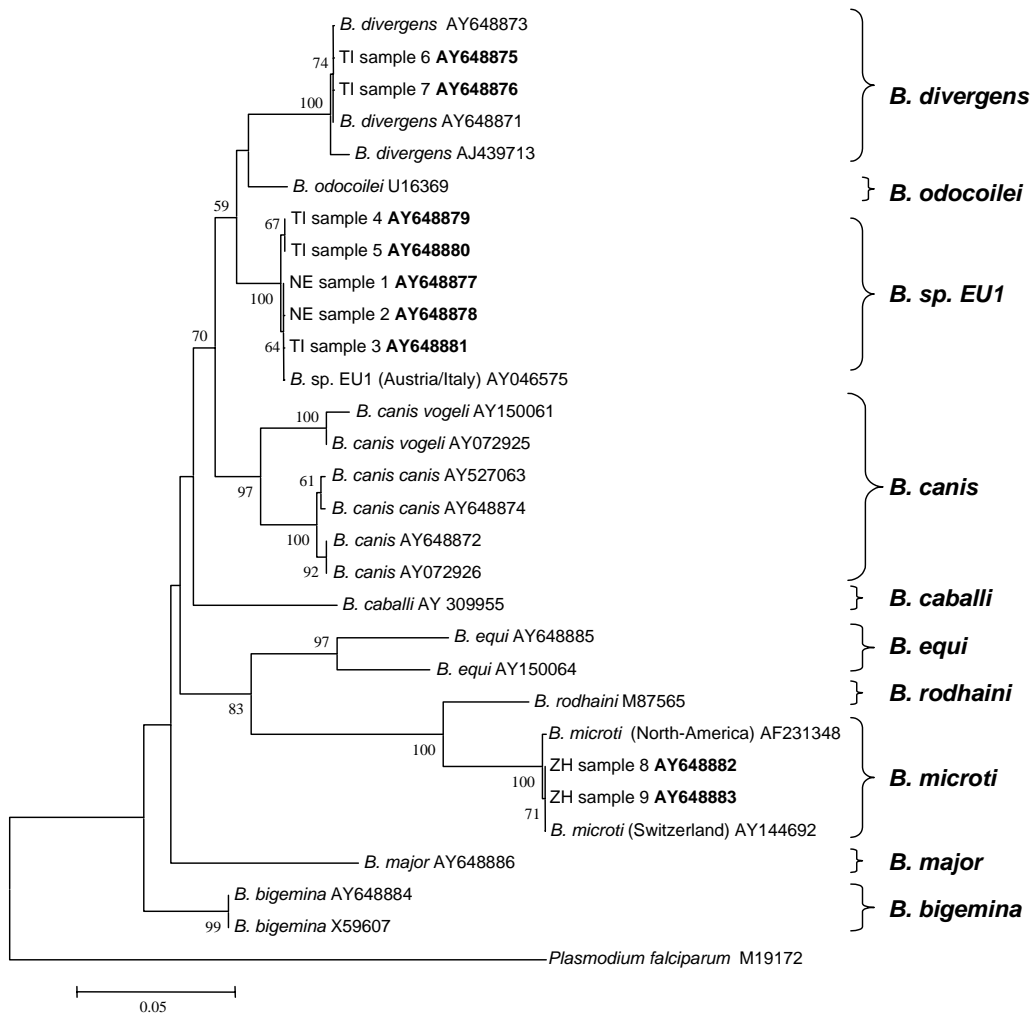


Figure 2.



4.5. Publication V

Diversity of the Tick-borne Encephalitis Virus population infecting *Ixodes ricinus* ticks in an endemic area of the central Switzerland (Canton Bern).

Submitted, 2005.

Diversity of the Tick-borne Encephalitis Virus population infecting *Ixodes ricinus* ticks in an endemic area of central Switzerland (Canton Bern)

Simona Casati¹, Lise Gern² and Jean-Claude Piffaretti¹

¹Istituto Cantonale di Microbiologia, Via Mirasole 22A, 6500 Bellinzona, Switzerland

²Institut de Parasitologie, Université de Neuchâtel, Rue Emile-Argand, 2000 Neuchâtel, Switzerland

Summary word count: 188 words

Text word count: 2'655 words

Number of figures: 2

Number of tables: 1

Running title: TBEV population in *Ixodes ricinus* in Switzerland.

Jean-Claude Piffaretti
Istituto Cantonale di Microbiologia
Via Mirasole 22A
6500 Bellinzona
Phone: +41 91 814 60 11
Fax: +41 91 814 60 29
e-mail: jean-claude.piffaretti@ti.ch

Summary

The TBEV (tick-borne encephalitis virus), member of the genus *Flavivirus*, has a positive-strand RNA genome containing a single ORF flanked by noncoding regions (NCR). We collected 307 *Ixodes ricinus* ticks from vegetation in a natural TBEV focus in Belp (Switzerland). The presence and the identity of the virus was determined by nRT-PCR followed by sequencing of the 5' terminal region that comprises the 5' NCR and the capsid coding region (C). The presence of W-TBEV genome was detected in 14.3% of the ticks. Nucleotide sequence analysis revealed a high variability of 55.5%. In particular, 4 DNA fragments (CS "A", CS "B", the folding stem structure and the start codon) showed a substantial heterogeneity, which has the potential of compromising replication, translation and packaging of the viral genome. This variability may reflect a viral strategy to adapt to different tick stages and/or to different vertebrate hosts. It may also indicate a possible ancient introduction of the TBEV in the Belp site. In addition, it may contribute to explain the annual low incidence of tick-borne encephalitis in the natural focus of Belp despite the high prevalence of TBEV infected ticks.

INTRODUCTION

The tick *Ixodes ricinus* may carry various pathogens with the potential of generating serious human and animal diseases such as Lyme borreliosis, babesiosis and tick-borne encephalitis (TBE). TBE virus (TBEV) is a member of the genus *Flavivirus* within the family *Flaviviridae*, that comprises about 70 distinct viruses, including yellow fever virus, dengue virus, Japanese encephalitis virus, and hepatitis C virus (HCV). TBEV is endemic in Central and Eastern Europe, Russia and the Far East (Dumpis et al., 1999). Three genetic lineages can be clearly distinguished, corresponding to a Western (also referred as European; W-TBEV), a Far Eastern (FE-TBEV) and a Siberian subtype (S-TBEV) (Ecker et al., 1999). The W-TBEV subtype usually produces a biphasic febrile illness, while the disease caused by the Far-Eastern and Siberian subtype viruses is characterised by a monophasic course (Dumpis et al., 1999). The symptoms are diverse, ranging from an apparently silent infection for most of the cases to a disease involving the central nervous system, that can result in human death. A fatality rate of 0.5-2% for the Western subtype, 6-8% for the Siberian subtype and 20-40% for the Far Eastern subtype has been observed (Gritsun et al., 2003, Gustafson, 1994).

In Central European and Baltic States TBE endemic areas are limited to strict regions (foci), where the TBEV circulates through the tick and vertebrate populations (Charrel et al., 2004, Dumpis et al., 1999). Usually natural foci are defined by registering the numbers of autochthonous human cases and/or detection of the virus in ticks. In Switzerland, several natural foci of TBEV are recognized, as reported on the website of the Swiss Federal Office of Public Health (<http://www.admin.ch/bag/infreporting/>).

Small rodents play an important role in the enzootic transmission cycle of TBEV (Randolph et al., 1999). These hosts develop a short viraemic phase (2-3 days) resulting in a low transmission potential (viraemic transmission) to ticks. However, it has been observed that an essential element for virus maintenance is the transmission of TBEV between infected nymphs and non infected larvae co-feeding on the same host in the absence of a systemic viraemia (non-viraemic transmission) (Randolph, 2001).

The flavivirus genome is a positive-strand RNA molecule approximately 11,000 nucleotides long containing a single open reading frame flanked by noncoding regions (NCR). The NCRs mediate crucial processes of the viral life cycle, such as replication, translation and packaging of the genome (Kuno et al., 1998, Mandl et al., 1998). The 5' terminal region that comprises the 5' NCR and the capsid region (C) is conserved, hence it has been used for amplification in PCR assays both for hepatitis virus C detection and genotyping, and TBE virus studies (Lole et al., 2003, Schrader & Suss, 1999).

The Belp region (near Bern, central Switzerland) is considered to be a TBEV focus on the basis of the presence of the virus in ticks reported in 1994 (De Marval, 1994) and the disease frequency occurring in this area. In order to estimate the present degree of risk and the viral population genetic diversity of this natural focus, we have investigated the presence and the identity of TBEV in *I. ricinus* ticks collected in the Belp region.

METHODS

Tick sampling. In spring 2004, *I. ricinus* ticks (adults and nymphs) were collected by flagging low vegetation in a natural TBEV focus in Belp (Canton Bern). The ticks were stored at -80°C until taxonomic identification (based on morphological characteristics) and nucleic acids extraction.

RNA and DNA extraction of the collected ticks. Ticks were first frozen in liquid nitrogen and grounded in 1.5 ml microtubes using plastic pistils (Fisher scientific, Wohlen, Switzerland). The resulting tick powder was mixed with 600 µl lysis buffer and homogenised by using QIAshredder columns (Qiagen AG, Basel, Switzerland). Total nucleic acids were extracted from each tick by using a MagNA Pure LC Total Acid Isolation Kit (Roche, Rothkreuz, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Finally, both RNA and DNA were eluted in 100 µl of buffer available from the kit and stored at 4°C.

Detection of the TBE virus RNA. For the detection of the TBE virus RNA, a sensitive nested reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay (nRT-PCR) was performed as described by Schrader et al. (1999) (Schrader & Suss, 1999). The target for the nRT-PCR was designed from the 5'-terminal NCR and included a fragment of the C coding region (Fig. 1).

Sequencing of PCR products. The nested PCR products obtained (178 nt) were purified using the Amicon Microcon Millipore Kit (Millipore, Milano, Italy) and stored at 4°C. Cycle sequencing reactions were performed in total volumes of 15 µl with an ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Rothkreuz, Switzerland) on an ABI Prism 310 GENETIC Analyser (Perkin-Elmer Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. DNA sequencing was performed in both directions with the same primers used for the nested PCR (Pp2 and Pm2; Fig. 1).

DNA sequence analysis. The sequences obtained were handled and stored with the Lasergene program Editseq (DNASTar Inc., Madison, WI USA), and aligned with Megalign (DNASTar Inc.). Phylogenetic analyses were performed by the neighbor-joining (NJ) method, with Kimura-2-parameters distances (by using MEGA Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 2.1, (Kumar, 2001)). The reliability of internal branches was assessed by bootstrapping with 1000 (NJ) pseudoreplicates (Felsenstein, 1988).

Nucleotide sequence accession numbers. The target region sequences (124 nt) of TBE virus detected in the *I. ricinus* ticks have been deposited in GenBank. The accession numbers are listed in Fig. 2.

RESULTS

Detection and identification of the TBE virus. A total of 307 *I. ricinus* ticks (75 nymphs, 105 female and 127 male adults) were tested for the presence of TBEV by amplification of the 5' NCR-C coding region. On gel electrophoresis of the amplicons, a total of 44 samples (14.3%) showed the specific band of 178 nt. TBE viruses were found more frequently in nymphs (18.7%, 14/75) than in adult males (14.2%, 18/127) or females (11.5%, 12/105).

In order to allow the identification of the TBEV subtypes detected in the ticks, the sequences of the 124-nt fragments (corresponding to the 178 nt bands without primer sequences) were aligned to 7 TBE viral reference sequences available in GenBank. A phylogenetic tree was constructed by the NJ method with Kimura-2-parameters (Fig. 2). All the TBE viruses sequences belonged to the W-TBEV subtype.

Sequence analysis. The variability of the target fragments was found to be considerably high (55.5%) and none of the 44 sequences were found to be identical to another one. This result confirms that there has not been any contamination between viral samples. We focused our attention on 4 DNA stretches of the target region: i) the two 5' terminal cyclization regions (CS "A" position location 115-126 (Mandl et al., 1993) and CS "B" position location 164-175 (Khromykh et al., 2001)), ii) the folding stem structure supporting the CS "A" (110-114/127-131) (Gritsun et al., 1997) and iii) the translation start codon AUG at the beginning of the open reading frame coding for the capsid (position 133-135) (Korenberg et al., 1999) (Fig. 1). We observed a substantial heterogeneity in these regions (Table 1). In the 44 TBEV sequenced, the CS "A" showed mutations in 16 of them (36.6%), and the CS "B" in 12 (27.3%). Mutations in both CS "A" and CS "B" were found in 6 samples (13.7%). Twenty-five sequences (56.8%) showed mutations in the folding stem structure that supports the CS "A". Moreover, the translation start codon in position 133-135 was lacking in 5

sequences, but an additional start codon was present 6 codons downwards in position 151-153 in these 5 sequences, as well as almost all the other sequences (Table 1). In this same position, a stop codon was present in sample BE193, which showed a start codon downwards in position 179-181.

DISCUSSION

A TBEV infection prevalence of 14.3% was observed in *I. ricinus* ticks collected in the natural focus of Belp (Switzerland). The phylogenetic tree represented in Fig. 2 shows that all the TBEV were different and belonged to the Western TBE virus subtype.

The infection prevalence observed in the present study is significantly higher than that reported by de Marval in 1994 in the same region using the indirect immunofluorescence test (0.56%) (De Marval, 1994). However, it is difficult to compare these two values, since the detection methods are very different.

Our results confirm that this region is a risk area, but contrast with the low annual incidence of TBE disease in Canton Bern which was of 1 case/100'000 habitants for the period 1996-2002 (source <http://www.admin.ch/bag/infrereporting/>, Swiss Federal Office of Public Health), representing about 10% of all the TBE cases reported in Switzerland in the recent years. It is important to consider that approximately 70-90% of all the human TBE infections result in asymptomatic infections, which escape reporting (Krech, 2002). However, in the last 10 years, a significant increase in the number of notifications has been observed in Switzerland including Bern, namely from 30-70 to 60-120 TBE cases per year (Krech, 2002).

The correlation between the disease incidence and tick infection rate in natural foci is not easy to establish because of a number of factors: the human behaviour (vaccination, frequency of the exposure in the endemic area, preventing measures such as wearing long trousers, using repellents and self-examination), the unreliability of the reporting systems, and the vector abundance.

In Europe, the infection prevalence of TBEV in ticks ranges from 0.1% to 5% (Oehme et al., 2002, Randolph, 2001), however these values undergo annual fluctuations. Bormane et al. described a prevalence of 26.6% in field-collected adult ticks in Latvia in 1995, and of 5.2% in 2002 in the same region (Bormane et al., 2004). Similarly to the Latvia situation, the high infection rate found in the present study in Belp could be a single isolated event, which might be followed by a decrease in the next years. The occurrence of fluctuations might indicate that the rate of TBEV infected ticks in nature can be influenced by various factors such as tick and host densities, the co-feeding of larvae and nymphs, and the environmental and ecological conditions, which may influence the duration and the development of the tick life cycle.

In addition, tick sampling might be important and could influence the detected tick infection rate. In fact, field investigations have revealed an aggregated distribution of TBEV infected ticks (microfocus) within an endemic area (focus) (Pretzmann et al., 1967), where the infection rate could appear significantly higher than in the adjacent area (Blaskovic & Nosek, 1972). Thus, a proportion of our infected ticks might come from microfoci.

It is important to consider that the rate of TBEV infectious particles in ticks may be influenced by endogenous factors such as a high mutation frequency of the viral genome leading to defective particles. It is known that the RNA-dependent RNA polymerase is not provided with a proof-reading system. Consequently, the resulting lack of the repair mechanism during replication generates a rapid accumulation of random mutations in the viral genome. Random mutations can hinder or even block replication, translation or packaging of the virus. Interestingly, within the virus population studied, we have found a high variability rate of 55.5%. In addition, in the 44 sequences analysed, none were found to be identical to another one.

The 4 DNA stretches we focused in the target regions showed a consistent variation. Overall, compared to the three sequences already published in GenBank, only 11 TBEV sequences (25%) did not show any mutation in the 4 DNA stretches considered (Fig. 2). Of the total 44 TBEV sequences, 12 had mutations in the CS "B" (27.3%) and 16 in the CS "A" region (36.6%). It has been demonstrated that RNA replication requires both 5'- and 3'- terminal regions containing the conserved cyclization motifs (5' CS"A", 5' CS"B" and 3' CS"A", 3' CS"B", respectively), which interact by complementary pairing (Khromykh et al., 2001). Thus, CS "A" and possibly CS "B", which are at the 5' terminus, are essential for RNA replication of the TBEV. Mutations in either 5' or 3' conserved CS regions may block the elongation process. However, the elongation ability may be restored when both regions (5' and 3') undergo compensatory mutations (Khromykh et al., 2001). Alternatively, mutations in the CS regions might just decrease the replication efficiency, resulting in viruses with lower fitness. In addition, the CS "A" region is involved in the formation of a secondary structure consisting of a hairpin loop, which is supported by a stem structure of 10 nucleotides. The hairpin loop plays a role in the regulating translation, transcription and encapsidation of the viral genome (Gritsun et al., 1997). Out of the 44 sequences analysed, 25 showed non compensated mutations in the stem structure, which might also affect viral fitness.

Considering the capsid coding fragment, 5 sequences out of 44 did not show a start codon in position 133-135. However, a start codon is present downwards in position 151-153, which suggests the translation of a protein lacking the initial 6 amino acids. In this same position 151-153, the BE193 virus

sequence shows a stop codon, which is expected to end the translation, but in position 179-181, a further start codon is present: this generates a shorter capsid protein.

To summarise, most of the TBEV sequences we have analysed showed mutations, a number of which have the potential to compromise the replication of the virus. We hypothesise that the rate of transmission of infectious TBE particles is influenced by the generation within the tick of genetic errors in sites important for replication or gene expression. Considering the mutations which might occur on the whole viral RNA genome and not only on the 4 DNA fragments considered, the proportion of infectious viruses might even be lower. However, since each single TBEV sequence identified corresponds probably to a master form of the viral population present within a tick, other minor forms may partly complement the defective dominant genome. Additional studies, using for example cell cultures and/or animal models (rodents), should be performed to test the fitness of the different TBEV viral genomes.

The high DNA sequence variability found in the Belp TBEV population (55.5%) might be related to the virus persistence in ticks and/or vertebrate hosts: two environments showing different selective pressures. In the tick, the virus is exposed to the diverse stages of the relatively long arthropod life cycle including moult (nymph, larve and adult), blood ingestion and digestion processes, the diapause period, the transmission processes (viraemic and non-viraemic). Differently, in the infected host, the pressures on the virus originate from the immune system. Moreover, the TBEV adaptation to different host species such as *Apodemus flavicollis*, *A. sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* may further enhance its variability. Hence, the TBEV population genetic diversity might be interpreted as a viral strategy to adapt to different situations in ticks and/or in vertebrate hosts. In addition, the heterogeneity could also be related to an ancient introduction in the geographical site observed and thus to the long time presence of the TBEV in a restricted region. The TBEV population supported by some rodent species may be limited geographically (rodents which move only on short distances) and thus the diversity of viral population that has emerged over time is being preserved in this natural focus.

In conclusion, the annual low incidence of TBE observed in a region with a high tick infection rate, may be explained not only by environment or human related factors, but also by the genetics of TBEV.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Cinzia Benagli, Bruno Gottstein and Heinz Sager for their help in collecting ticks. We are indebted to Franz X. Heinz for providing TBE virus RNA used as positive control in the nRT-PCR. We also thank Marco Bernasconi, Antonella Demarta, Elena Grasselli, Michaela Gutacker and Ernst Peterhans for

reading the manuscript and constructive advices. This work was supported by the Swiss National Science Foundation (31-64976) to J.-C. Piffaretti. This paper is part of the PhD thesis of one of the authors (S.C.).

REFERENCES

- Blaskovic, D. & Nosek, J. (1972).** The ecological approach to the study of tick-borne encephalitis. *Prog Med Virol* **14**, 275-320.
- Bormane, A., Lucenko, I., Duks, A., Mavtchoutko, V., Ranka, R., Salmina, K. & Baumanis, V. (2004).** Vectors of tick-borne diseases and epidemiological situation in Latvia in 1993-2002. *Int J Med Microbiol* **293 Suppl 37**, 36-47.
- Charrel, R. N., Attoui, H., Butenko, A. M., Clegg, J. C., Deubel, V., Frolova, T. V., Gould, E. A., Gritsun, T. S., Heinz, F. X., Labuda, M., Lashkevich, V. A., Loktev, V., Lundkvist, A., Lvov, D. V., Mandl, C. W., Niedrig, M., Papa, A., Petrov, V. S., Plyusnin, A., Randolph, S., Suss, J., Zlobin, V. I. & de Lamballerie, X. (2004).** Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect* **10**, 1040-55.
- De Marval, F. (1994).** Etude séroépidémiologique de l'encéphalite à tiques et de la borréliose de Lyme en Suisse. Faculté des Sciences. Neuchâtel: Université de Neuchâtel.
- Dumpis, U., Crook, D. & Oksi, J. (1999).** Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis* **28**, 882-90.
- Ecker, M., Allison, S. L., Meixner, T. & Heinz, F. X. (1999).** Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol* **80 (Pt 1)**, 179-85.
- Felsenstein, J. (1988).** Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu Rev Genet* **22**, 521-65.
- Gritsun, T. S., Nuttall, P. A. & Gould, E. A. (2003).** Tick-borne flaviviruses. *Adv Virus Res* **61**, 317-71.
- Gritsun, T. S., Venugopal, K., Zanutto, P. M., Mikhailov, M. V., Sall, A. A., Holmes, E. C., Polkinghorne, I., Frolova, T. V., Pogodina, V. V., Lashkevich, V. A. & Gould, E. A. (1997).** Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: analysis and significance of the 5' and 3'-UTRs. *Virus Res* **49**, 27-39.
- Gustafson, R. (1994).** Epidemiological studies of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. *Scand J Infect Dis Suppl* **92**, 1-63.
- Khromykh, A. A., Meka, H., Guyatt, K. J. & Westaway, E. G. (2001).** Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J Virol* **75**, 6719-28.
- Korenberg, E. I., Kovalevskii, Y. V., Karavanov, A. S. & Moskvitina, G. G. (1999).** Mixed infection by tick-borne encephalitis virus and *Borrelia* in ticks. *Med Vet Entomol* **13**, 204-8.
- Krech, T. (2002).** TBE foci in Switzerland. *Int J Med Microbiol* **291 Suppl 33**, 30-3.

- Kumur, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M. (2001).** MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Kuno, G., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N. & Cropp, C. B. (1998).** Phylogeny of the genus Flavivirus. *J Virol* **72**, 73-83.
- Lole, K. S., Jha, J. A., Shrotri, S. P., Tandon, B. N., Prasad, V. G. & Arankalle, V. A. (2003).** Comparison of hepatitis C virus genotyping by 5' noncoding region- and core-based reverse transcriptase PCR assay with sequencing and use of the assay for determining subtype distribution in India. *J Clin Microbiol* **41**, 5240-4.
- Mandl, C. W., Holzmann, H., Kunz, C. & Heinz, F. X. (1993).** Complete genomic sequence of Powassan virus: evaluation of genetic elements in tick-borne versus mosquito-borne flaviviruses. *Virology* **194**, 173-84.
- Mandl, C. W., Holzmann, H., Meixner, T., Rauscher, S., Stadler, P. F., Allison, S. L. & Heinz, F. X. (1998).** Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus. *J Virol* **72**, 2132-40.
- Oehme, R., Hartelt, K., Backe, H., Brockmann, S. & Kimmig, P. (2002).** Foci of tick-borne diseases in southwest Germany. *Int J Med Microbiol* **291 Suppl 33**, 22-9.
- Pretzmann, G., Radda, A. & Loew, J. (1967).** Die Verteilung virustragender Zecken in Naturherden der Fröhsummer-Meningoencephalitis. *ZBL. Bakt. I. Orig.* **203**, 30-46.
- Randolph, S. E. (2001).** The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**, 1045-56.
- Randolph, S. E., Miklisova, D., Lysy, J., Rogers, D. J. & Labuda, M. (1999).** Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus. *Parasitology* **118 (Pt 2)**, 177-86.
- Schrader, C. & Suss, J. (1999).** A nested RT-PCR for the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in natural foci. *Zentralbl Bakteriol* **289**, 319-28.

TABLE

Table 1.
Mutations (in bold and underlined) in the 4 DNA fragments of the 124-nt sequences analysed.

Samples	CS "A"	Folding stem structure ^d	Principal start codon ^a	Additional start codon ^a	CS "B"
			(position: 133-135)	(position: 151-153)	
BE19	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE22	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE27	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGCGG <u>C</u> CCC
BE42	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE44	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE50	GGAGAACA <u>AA</u> A	CAGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGG <u>A</u> CGGCCCC
BE56	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE60	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE62	GGAGAACAAGA	C <u>G</u> GCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGC <u>G</u> AUCCC
BE69	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGCGG <u>C</u> CCC
BE76	GG <u>G</u> AACAAGA	CAGCU/AGC <u>C</u> G	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE83	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE85	GG <u>U</u> G <u>A</u> C <u>A</u> A <u>G</u> <u>G</u>	CA <u>U</u> C <u>U</u> / <u>G</u> GCUG	AUG	CUG	GGGGC <u>G</u> UCCC
BE87	GG <u>A</u> <u>U</u> AACAAGA	CAGCU/AGC <u>A</u> G	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE88	GGAGAACA <u>U</u> GA	CAGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE94	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE100	GGAGAACA <u>U</u> GA	CAGCU/AGC <u>C</u> G	AUG	CAG ^c	GGGGC <u>G</u> UCCC
BE105	GGAGAACAAGA	CAGCU/AG <u>U</u> UG	AUG	CUA ^c	GGGGCGGUCCC
BE109	GGAGAACAAG <u>G</u>	CAGCU/ <u>G</u> GCUG	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE110	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGC <u>C</u> G	ACG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE112	GGAGAACAAG <u>G</u>	CA <u>C</u> C <u>U</u> / <u>G</u> GC <u>A</u> G	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE113	GG <u>G</u> AACAAGA	CAGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE117	GGAGA <u>G</u> CAAGA	C <u>G</u> GCU/AGCUG	A <u>U</u> <u>C</u>	CUG	GGGGC <u>A</u> UCCC
BE125	GG <u>C</u> AACAAGA	CAGCU/AGCUG	AUG	AUG	GGGGCGGUCCC
BE127	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGC <u>C</u> G	A <u>U</u> <u>A</u>	CUG	GGGGCGGUCCC
BE129	GGAG <u>U</u> ACAAGA	<u>U</u> AGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE143	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGC <u>C</u> G	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE144	GGAGA <u>U</u> CAAGA	CAGCU/AGCUG	AUG	CUG	<u>G</u> GGGCGGUCCC
BE152	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGC <u>C</u> G	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE169	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGC <u>C</u> G	AUG	UUG ^c	GGGG <u>U</u> GGUCCC
BE172	GGAGAACAAGA	C <u>U</u> GCU/AGC <u>C</u> G	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE183	GGAG <u>U</u> ACAAGA	<u>U</u> AGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE189	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGC <u>C</u> G	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE193	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGCUG	AUG	<u>U</u> GA ^b	GGGGCGGUCCC
BE222	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE230	GGAGAACAAG <u>G</u>	CAGCU/ <u>G</u> C <u>C</u> G	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE232	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGCUG	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE235	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGC <u>C</u> G	AUG	CUG	GGGGCGG <u>C</u> CCC
BE241	GG <u>U</u> G <u>A</u> C <u>A</u> A <u>G</u> <u>G</u>	CA <u>U</u> C <u>U</u> / <u>G</u> GCUG	AUG	CUG	GGGGC <u>G</u> UCCC
BE242	GGAGAACAAGA	C <u>U</u> GCU/AGC <u>C</u> G	A <u>U</u> <u>A</u>	CUG	GGGGCGGUCCC
BE244	GGAGAACAAGA	CGGCU/AGCCG	GUG	CUG	GGGGCGG <u>C</u> CCA
BE292	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGC <u>C</u> G	AUG	CUG	GGGGCGGUCCC
BE299	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGC <u>C</u> G	<u>A</u> <u>C</u> <u>A</u>	CUG	GGGGCGGUCCC
BE304	GGAGAACAAGA	CAGCU/AGC <u>C</u> G	<u>A</u> <u>C</u> <u>A</u>	CUG	GGGGCGGUCCC
Total of samples with mutations	16	25	5	1	12

^astart codon: AUG, ACG, GUG, and CUG.

^bstop codon: UGA, UAG, and UAA

^cnot a start codon

^dthe folding stem structure (FSS; see Fig. 1)

FIGURE LEGENDS

Fig. 1.

Map of the 124-nt region sequenced. The nested primers pp2 and pm2 flank the target region. NCR: noncoding region, CS"A": cyclization region "A", CS"B": cyclization region "B", FSS: folding stem structure supporting the CS"A" and AUG: start codon.

Fig. 2.

Phylogenetic tree (Neighbour-joining, Kimura-2-parameters distances) based on 5' NCR and capsid (C) fragment (124 nt) of 44 TBE virus and 7 reference sequences (in bold). Bootstrap proportions are provided when greater than 50%. The code BE refer to the geographic origin of the collected ticks (BE=Belg). Alhkuma virus has been used as outgroup.

Fig. 1.

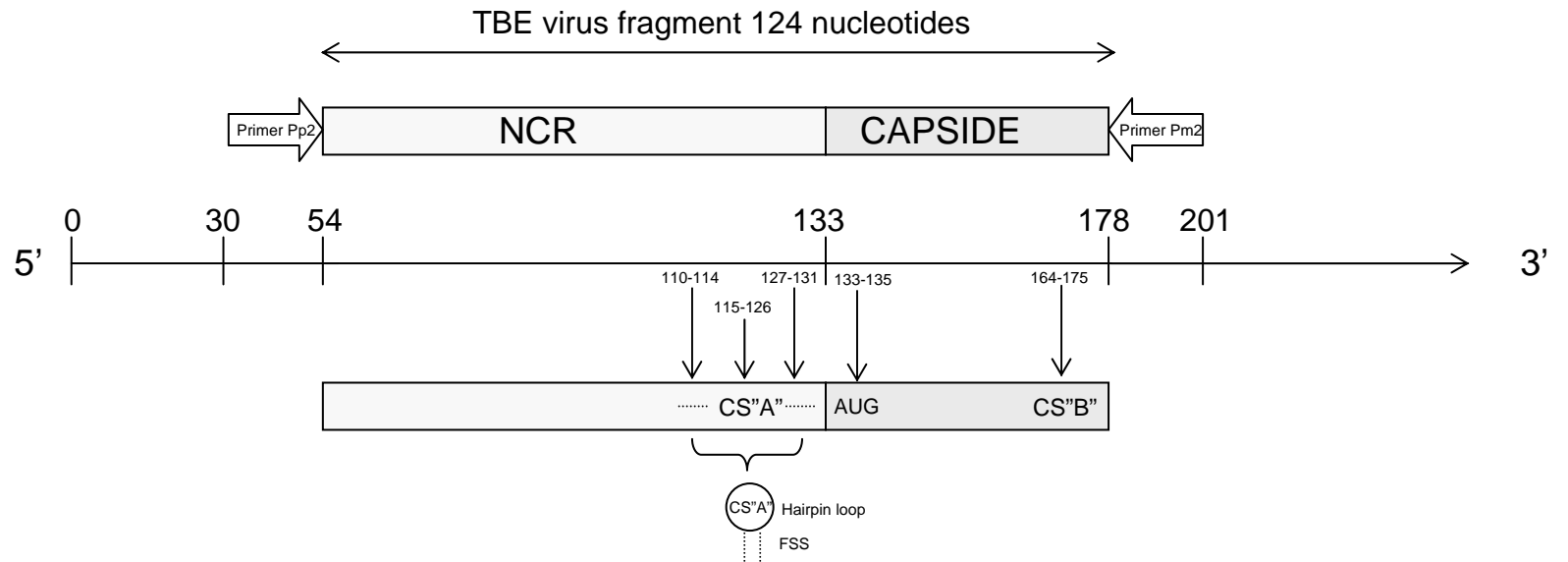
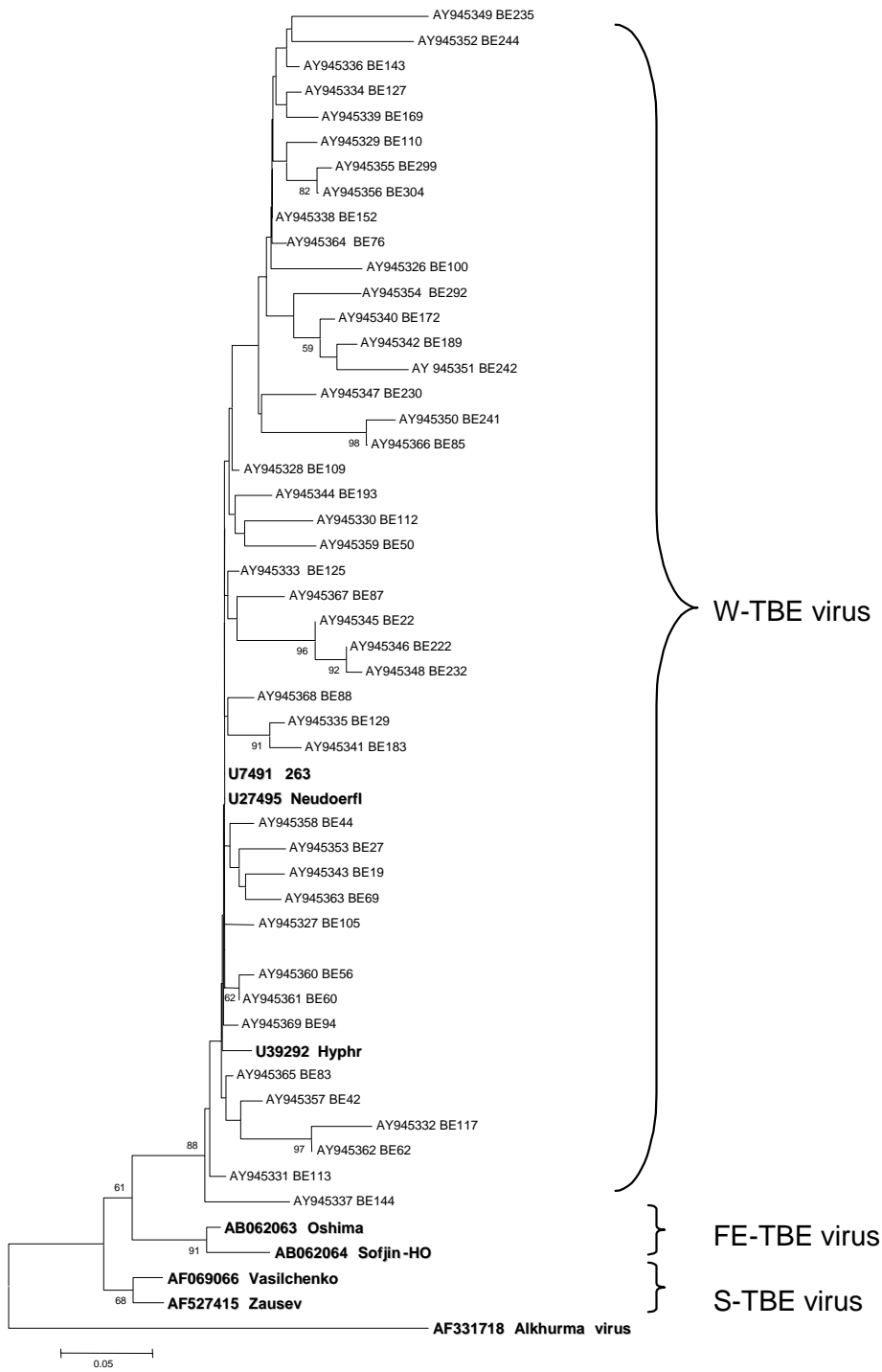


Fig. 2.



5. DISCUSSION

Ce travail de recherche a permis de répondre aux cinq buts fixés préalablement. Il a donné la possibilité d'aborder des aspects différents et intéressants du microcosme de la tique et des agents pathogènes transmis par ce vecteur. Tout au long de ce projet, le fil conducteur a été essentiellement la présence, la prévalence et la diversité génétique des différentes populations étudiées, que ce soit du vecteur ou des micro-organismes. Ci-dessous nous allons discuter les aspects importants de chaque partie du travail réalisé.

5.1. La tique *R. sanguineus* sensu lato au Tessin vecteur de *R. Bar29* et de *Coxiella endosymbionte*.

La tique *R. sanguineus* sensu lato est un complexe d'espèces endémiques dans les régions subtropicales et tropicales. Ensuite, elle a été importée de ces régions dans différentes régions du centre et nord de l'Europe, surtout dans des environnements fermés (maisons, structures liées aux chiens, etc.) qui fournissent le microclimat et l'apport de sang nécessaires à leur survie.

Dès les années '80 et plus tard, les tiques du genre *Rhipicephalus* ont été signalées au Tessin, avec une prédominance dans le sud de cette région (Aeschlimann et al., 1986; Bernasconi et al., 1997; Miserez et al., 1990). L'étude de Bernasconi et al. (1997) suggérait la colonisation du Tessin par ces tiques en se basant sur les observations suivantes: la présence des *Rhipicephalus* dans différentes localités au nord et au sud et sur différents hôtes (chien, chat, bovin et homme), la présence dans les habitations et la récolte d'adultes et de formes immatures surtout pendant les mois doux de l'année (Bernasconi et al., 1997). Ces éléments pouvaient être considérés comme un signal d'une bonne adaptation de cette tique au Tessin. Notre étude a confirmé cette colonisation (Bernasconi et al., 2002).

Deux facteurs peuvent expliquer l'expansion de la distribution de ce vecteur vers le nord par rapport à son origine: la mobilité des personnes et de leurs animaux de compagnie et les changements climatiques. Il est possible qu'un certain nombre de *Rhipicephalus* sp. ait été introduit au Tessin durant les dernières décennies et que *R. sanguineus* se soit ensuite adapté au climat et à l'environnement de cette région, éventuellement modifiés par les changements climatiques des dernières années qui ont ouvert les portes du Tessin vers les régions du sud. Un phénomène similaire a été décrit avec la tique *Ixodes ricinus* en Suède. En effet, Lindgren et Gustafson ont observé le déplacement vers le nord et l'augmentation de la densité de la population d'*I. ricinus* dans ce pays (Lindgren et Gustafson, 2001).

Péter et al. avaient déjà observé l'introduction dans l'environnement de la maison des tiques *Rhipicephalus* par les chiens de retour des zones endémiques (Péter et al., 1984). En effet, ces auteurs ont reporté l'apparition dans une maison près de Genève, probablement en 1976, d'un foyer de *Rhipicephalus* importées de France ou d'Italie par le chien de la famille. Ce type d'introduction a été aussi documenté en Allemagne (à l'ouest de Berlin) où les tiques, dispersées en plusieurs foyers, ont été importées des régions méditerranéennes (Hoffman, 1981). Ces observations soulignent l'importance de la mobilité croissante des personnes et de leurs animaux de compagnie, en particulier les chiens. De plus, il est certain qu'au Tessin, les espèces appartenant au complexe *R. sanguineus* semblent trouver les conditions climatiques et environnementales favorables à leur survie et à leur développement.

Les données climatiques enregistrées par le Centro meteorologico Locarno-Monti (Fosco Spinedi, communication personnelle) montrent effectivement que dans ces 2 dernières décennies (depuis 1988) la température moyenne annuelle a oscillé entre 12 et 13 °C, tandis qu'avant elle était plutôt entre 11 et 12 °C (Fig. 5 et annexe 20). Donc, depuis 1988, la tendance semble aller vers une augmentation d'environ 1°C de la température annuelle moyenne et ainsi elle confirme qu'il y a des changements climatiques au Tessin.

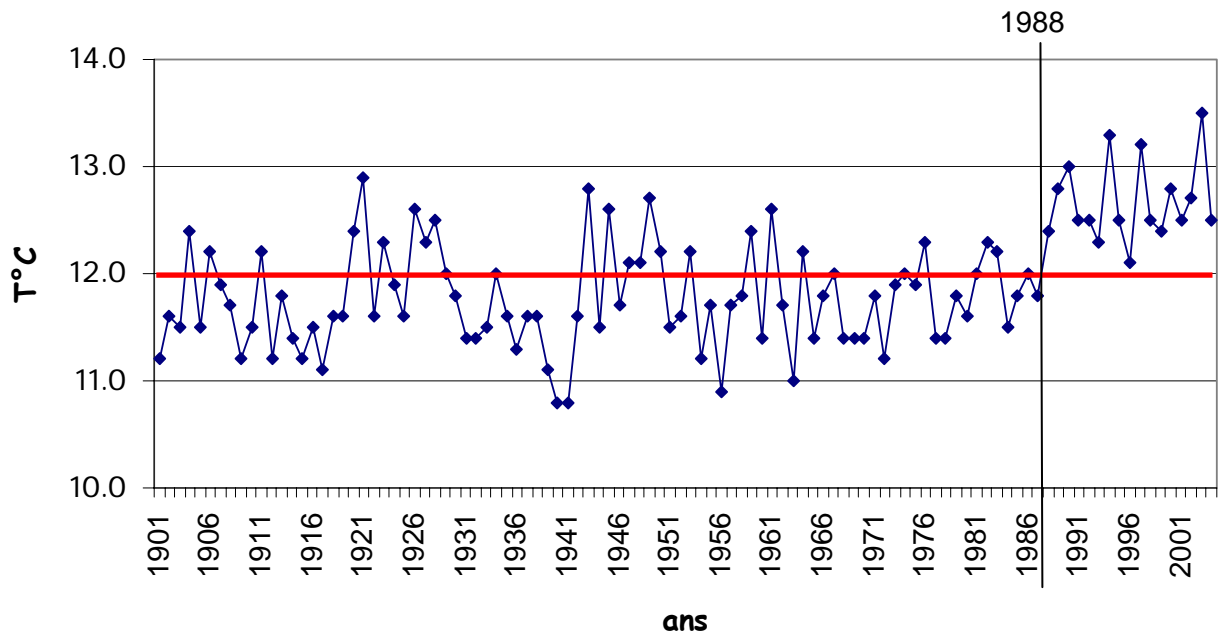


Figure 5. Données climatiques des températures moyennes annuelles ($\langle T \rangle$) enregistrées par la station météorologique du Tessin (Centro meteorologico Locarno-Monti, Fosco Spinedi) de 1901 à 2004. La ligne rouge située à 12°C montre la tendance de la $\langle T \rangle$: une oscillation entre 11 et 12°C avant 1988 et une oscillation entre 12 et 13°C depuis 1988.

Notre étude basée sur l'amplification et le séquençage du gène codant pour le rDNA mitochondrial 12S confirme donc la présence de cette tique au Tessin et montre deux populations de *Rhipicephalus* qui coexistent: *R. sanguineus* s.s. et *R. turanicus* (Bernasconi et al., 2002). Une étude précédente a montré qu'il n'y avait pas de variabilité intra-spécifique entre les séquences du gène rDNA 12S de *R. sanguineus* s.s. provenant de France, d'Espagne, du Portugal et du Zimbabwe (Beati et Keirans, 2001). Dans notre travail, nous observons cependant une surprenante variabilité de 1.5% pour les échantillons collectés dans une petite région comme le Tessin. Cette variabilité pourrait être interprétée comme l'indication que *R. sanguineus* s.s. a été introduite en différentes occasions dans cette région et/ou qu'elle a subi un processus d'adaptation (conversion génétique) aux nouvelles conditions climatiques et environnementales. Au contraire, *R. turanicus*, qui n'a pas la même préférence que *R. sanguineus* s.s. pour les chiens, a un plus large spectre d'hôtes, montre une variabilité plus grande (1.5-7.7%) entre les échantillons provenant de Grèce, du Zimbabwe, d'Israël et de France (Beati et Keirans, 2001). Les tiques *R. turanicus* collectées au Tessin sont très proches de *R. turanicus* provenant de France.

Ces 2 espèces de tiques sont connues pour transporter différents agents pathogènes, principalement *R. sanguineus* s.s. qui peut être vecteur de *Rickettsia conorii*, *R. conorii* Israel et *Coxiella burnetii*. Dans notre étude, nous avons mis en évidence la présence de *R. Bar29* chez cette tique. Cette bactérie appartient au groupe boutonneux (SFG, spotted fever group) et est considérée comme potentiellement pathogène (Parola et Raoult, 2000). En 1996, le possible rôle pathogène chez l'homme a été proposé (Beati et al., 1996).

Nous avons de plus mis en évidence chez *R. sanguineus* s.s. et *R. turanicus* la présence d'une espèce de *Coxiella* non identifiée (*Coxiella* endosymbionte). Noda et al. considèrent cette *Coxiella* sp. comme une forme de *C. burnetii*, laquelle aurait évolué en un endosymbionte de la tique (Noda et al., 1997). Cependant, la possibilité d'une reconversion à la forme pathogène ne serait pas à exclure.

En conclusion, les résultats que nous avons obtenus confirment l'établissement de la tique *R. sanguineus* s.s. et de la tique *R. turanicus* au Tessin, en particulier au sud de cette région (voir Fig. 6). Par conséquent, il est important de surveiller cette implantation afin de détecter l'éventuelle arrivée d'organismes pathogènes connus pour être transportés par ces tiques, comme *R. conorii*, *R. conorii* Israel et *C. burnetii*, et de garder une attention particulière sur un éventuel rôle pathogène des souches *R. massiliae*, Bar29 et *Coxiella* endosymbionte dans le futur.

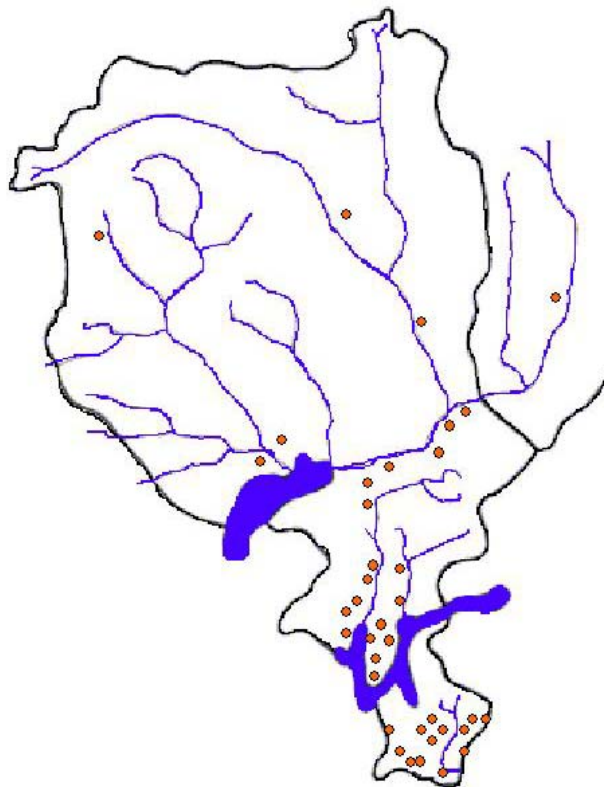


Figure 6. Distribution des tiques *R. sanguineus* s. l. (n=40) au Tessin récoltées en deux périodes: 1994-1995 et 2001 (Bernasconi et al., 2002).

5.2. Etude de la population d'*I. ricinus* sensu stricto en Europe sur la base de l'ADN mitochondrial.

Dans ce travail, nous avons étudié la population d'*I. ricinus* en Europe. Pour ce faire, nous avons testé 5 marqueurs moléculaires localisés sur l'ADN mitochondrial et considérés appropriés pour les études phylogénétiques et de génétique des populations chez les arthropodes (Bernasconi et al., 2000; Caterino et al., 2000; Lunt et al., 1996; Simmons et Weller, 2001; Simon et al., 1994). Les tiques *I. ricinus* s.s. examinées (provenant de Suisse, d'Italie, d'Autriche et du nord de l'Europe) ont montré une faible variabilité des séquences nucléotidiques considérées: 1.6% (COII), 2.4% (COI), 2.6% (12S rDNA), 2.7% (cytb) et 5% ("Control Region") (Casati et al., submitted-a). La "Control Region" est considérée comme étant la région la plus variable de l'ADN mitochondrial et nos résultats ont confirmé cette tendance (Simon et al., 1994; Taylor et al., 1993). Nous avons conclu que la population d'*I. ricinus* s.s. en Europe semble être extrêmement homogène et qu'elle ne montre pas de structure phylogéographique.

Ces données confirment les résultats obtenus par d'autres études basées sur les allozymes (Delaye et al., 1997) et les microsatellites (De Meeus et al., 2002). L'homogénéité trouvée peut être expliquée par la récente évolution de l'espèce *I. ricinus* s.s. et du complexe auquel elle appartient (Xu et al., 2003). Le contenu élevé en A+T de l'ADN mitochondrial montré par nos résultats, confirme cette hypothèse (Simon et al., 1994). Un deuxième élément à considérer est le déplacement des hôtes à travers le pays qui peut promouvoir l'uniformité des populations européennes d'*I. ricinus* s.s.. La faible variabilité et l'absence d'une structure géographique chez *I. ricinus* s.s. contraste avec la discrimination géographique trouvée chez d'autres espèces du même complexe. Par exemple, la tique nord-américaine *I. scapularis* (Nord-Est) semble avoir une structure géographique bien définie: un groupe formé par les échantillons du Sud ("Southern clade") et un groupe formé surtout par les échantillons du Nord ("American clade") (Norris et al., 1996; Qiu et al., 2002). L'arbre phylogénétique d'une autre espèce nord-américaine, *I. pacificus* (examinée dans le Nord-Ouest), révèle une faible structure géographique pour les échantillons de la côte ouest à l'exception des échantillons provenant de l'arrière-pays (Utah) (Kain et al., 1999). Ces deux espèces américaines montrent donc une variabilité plus marquée que celle observée chez la tique européenne *I. ricinus* s.s.. Plusieurs facteurs pourraient expliquer cette différence entre les tiques de l'Europe et celles de l'Amérique. D'une part le fait que *I. ricinus* s.s. pourrait être plus récente que les espèces *I. scapularis* et *I. pacificus*, et d'autre part, l'avènement d'un événement climatique important sur les deux continents comme la glaciation de l'hémisphère nord pendant le Pléistocène. L'extinction de certaines espèces vivantes ou la perte de variabilité génétique est la conséquence de cette modification brutale de l'environnement, sauf pour les populations qui trouvent des abris ("refugia") (Hewitt, 1996). La structure génétique plus marquée chez *I. scapularis* et celle plus faible chez *I. pacificus* pourraient refléter la présence de plusieurs "refugia" dans la partie nord-est de l'Amérique (Qiu et al., 2002) et dans la partie nord-ouest (qui correspondraient à la région de l'Utah et à la côte ouest non couverte par la glace) (Kain et al., 1999). Chaque enclave suivrait ensuite sa propre évolution (Hewitt, 1996). Par contre, l'expansion de *I. ricinus*, après la fonte des glaciers, du sud vers le nord semble être associée à un faible degré de diversité génétique et à l'absence d'une structure génétique. Ceci pourrait indiquer la présence dans le passé d'un seul refugium situé au sud de l'Europe. Donc, *I. ricinus* a colonisé dans le temps de nouvelles régions jusqu'à déterminer les données de la

distribution qu'on connaît aujourd'hui. De plus, sous la poussée des récents changements climatiques, *I. ricinus* a continué son expansion jusqu'à la Suède où elle a été récemment détectée (Lindgren et al., 2000).

Si on regarde du côté sud de l'hémisphère nord, *I. ricinus* est présente aussi en Afrique du Nord et plus précisément en Tunisie (Younsi et al., 2001; Zhioua et al., 1999) et au Maroc (Bailly-Choumara et al., 1976; Sarih et al., 2003). A cette latitude, la tique *I. ricinus* semble avoir inversé son rythme saisonnier par rapport à l'Europe: elle est active dans la période hivernale (Yousfi-Monod et Aeschlimann, 1986). De plus, elle s'est adaptée aux conditions climatiques, lesquelles semblent avoir entraîné une variation physiologique de la tique (par ex. augmentation du nombre de pores et de poils) (Jouda, 2003). Cette différence physiologique entre *I. ricinus* d'Afrique du Nord et de Suisse, a trouvé une confrontation avec l'analyse génétique: De Meeûs et al. (2002) ont montré une différence significative entre les tiques de ces différentes régions (De Meeus et al., 2002).

En conclusion, une étude complémentaire qui prendra en considération les tiques *I. ricinus* d'Afrique du Nord en plus de celles européennes devrait être entreprise pour étudier la diversité génétique sur la base de l'ADN mitochondrial entre les deux continents.

5.3. Les populations de *B. burgdorferi* s.l. en Suisse

Dans cette étude, nous avons analysé les populations de *B. burgdorferi* provenant de différentes régions de Suisse. Ainsi, nous avons analysé 874 tiques *I. ricinus* provenant de trois régions de la Suisse: Neuchâtel (n=294), Valais (n=286) et Tessin (n=294). Nous avons montré la présence de 5 génoespèces appartenant au complexe *B. burgdorferi* s.l. en utilisant l'amplification génomique en temps réel ("real-time PCR") d'un fragment du gène *recA* (Casati et al., 2004). Les taux d'infection obtenus sont 32.6% pour Neuchâtel, 19.6% pour le Valais et 15.0% pour le Tessin. A Neuchâtel et au Valais nous avons confirmé la présence de *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. burgdorferi* s.s. et *B. lusitaniae* (sauf au Valais où cette dernière n'a jamais été isolée). Dans le canton du Tessin, nous avons montré la présence pour la première fois de *B. afzelii* et confirmé la présence de *B. garinii*, *B. valaisiana* et *B. lusitaniae* (voir Fig. 7) (Casati et al., 2004; Jouda et al., 2003). Il est intéressant de noter la distribution de *B. lusitaniae*: la souche PotiB2 a été isolée à Neuchâtel, alors qu'au Tessin nous avons trouvé la souche PotiB3. En plus du Portugal (De Michelis et al., 2000), *B. lusitaniae* PotiB2 a été répertoriée dans différents pays d'Europe (Hubalek et Halouzka, 1997) et au Maroc (Younsi et al., 2005). Par contre PotiB3 n'a été répertoriée qu'en Espagne (De Michelis et al., 2000) et en Tunisie (Younsi et al., 2005). La dynamique de distribution de ces deux souches (Poti B2 et PotiB3) semble donc être différente et les raisons de cette restriction géographique ne sont pas connues. Cependant, cette génoespèce est sporadique dans les régions du centre et de l'est de l'Europe, mais elle est la plus fréquente et même prédominante dans la partie sud de l'hémisphère nord (Portugal et Afrique du Nord) et sa diversité semble diminuer vers le sud. Pour cette raison, Younsi et al. ont supposé que la diversité plus marquée trouvée chez *B. lusitaniae* au Portugal, par rapport à celle plus faible rencontrée en Afrique du Nord, indique une évolution de cette génoespèce pour un temps considérable au Portugal et une introduction récente en Afrique du Nord (Younsi et al., 2005). Cela pourrait être valable pour la Suisse aussi.

Toutefois, si on considère les trois régions ensemble, la génoespèce la plus fréquente en Suisse semble être *B. afzelii*.

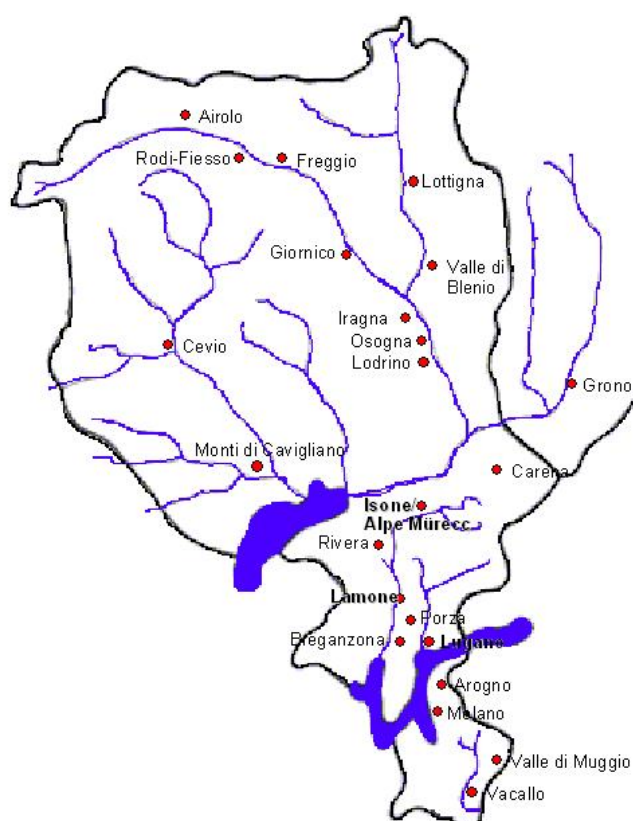


Figure 7. Localisation géographique des tiques *I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi* s. l. au Tessin (Casati et al., 2004).

L'analyse phylogénétique basée sur un fragment du gène *recA* (162 bp), nous a montré la présence de différents groupes: des groupes formés par des échantillons isolés chez des vecteurs provenant uniquement de la même région géographique et des groupes formés par des échantillons mixtes, c'est-à-dire isolés chez des vecteurs provenant de 2 ou 3 régions. Par exemple, la souche *B. lusitaniae* PotiB2 est caractéristique de Neuchâtel, alors que la souche PotiB3 a été isolée uniquement au Tessin. Par contre, la même souche *B. valaisiana* a été détectée à la fois à Neuchâtel, au Valais et au Tessin.

A partir des données obtenues, nous avons observé que chaque région de Suisse a sa population particulière de borrélioses. Chaque population possède probablement sa propre dynamique interne qui résulte en une distribution hétérogène de *B. burgdorferi* s.l. Cette distribution hétérogène reflète la situation en Europe où la prévalence de *B. burgdorferi* s.l. chez le vecteur *I. ricinus* est considérablement différente selon la région considérée.

La structure et la distribution hétérogène de ce complexe ont été associées à la diversité des hôtes. En effet, certaines génoespèces sont adaptées à des hôtes déterminés en étant résistantes à leur système du complément, tandis que d'autres y sont sensibles (non adaptées) et donc tuées (Kurtenbach et al., 2002). Par exemple, *B. afzelii* est adaptée aux rongeurs (hôtes compétents), mais elle ne l'est pas aux oiseaux

(hôtes non compétents) et ne pourra donc pas survivre et être transmise par ces derniers. Ainsi, la communauté locale des hôtes vertébrés contribue probablement de manière significative à la structure de la population de *B. burgdorferi* s.l..

Au niveau local, les facteurs génétiques comme les mutations génèrent des nouvelles formes de *Borrelia*, dont beaucoup d'entre elles restent sur place (population d'hôtes fermée). Au niveau européen, la circulation des différentes formes de *Borrelia* est probablement due aux mouvements ou à la migration des hôtes. Donc, l'association des géoespèces avec des vertébrés déterminés a une implication importante pour la dissémination de *B. burgdorferi* s.l.: les rongeurs pour les courtes distances (200-300 m par génération) et les oiseaux pour les longues distances.

L'origine du complexe *B. burgdorferi* s.l. est à rechercher probablement en Eurasie à partir de *B. garinii*, la géoespèce considérée jusqu'à aujourd'hui comme la plus hétérogène (Marti Ras et al., 1997). Dans notre étude basée sur la diversité du gène *recA*, *B. afzelii* est apparue être plus variable que *B. garinii*. Cela pourrait suggérer une évolution rapide de cette géoespèce.

5.4. Présence de trois espèces de *Babesia* pathogènes pour l'homme en Suisse.

Pour mettre en évidence le protozoaire *Babesia* chez 1159 tiques *I. ricinus* collectées dans 4 régions de la Suisse (294 au Tessin, 294 à Neuchâtel, 286 au Valais et 285 à Zürich), nous avons mis au point une PCR basée sur le gène rRNA 18S. Le fragment choisi (411-452 bp) est très variable et a permis de bien distinguer les différentes espèces et sous-espèces de *Babesia*, comme par exemple *B. canis*, *B. canis vogeli* et *B. canis canis* (Casati et al., submitted-c).

En Suisse, nous avons confirmé la présence de *B. divergens* (Tessin, voir Fig. 8) et de *B. microti* (Zürich) et nous avons montré la présence pour la première fois de *B. sp.* EU1 (Tessin, voir Fig. 8, et Neuchâtel). La prévalence assez faible de ces 3 espèces, 0.8%, est comparable à celle décrite en Allemagne chez *I. ricinus* (1% avec *B. divergens* et *B. microti*) (Hartelt et al., 2004). Par contre, les tiques *I. ricinus* analysées en Slovénie et en Pologne ont montré un taux d'infection par *B. divergens* et *B. microti* plus grand, respectivement de 9.6% et 16.3% (Duh et al., 2001; Skotarczak et Cichocka, 2001). Les raisons de cette différence restent à clarifier.

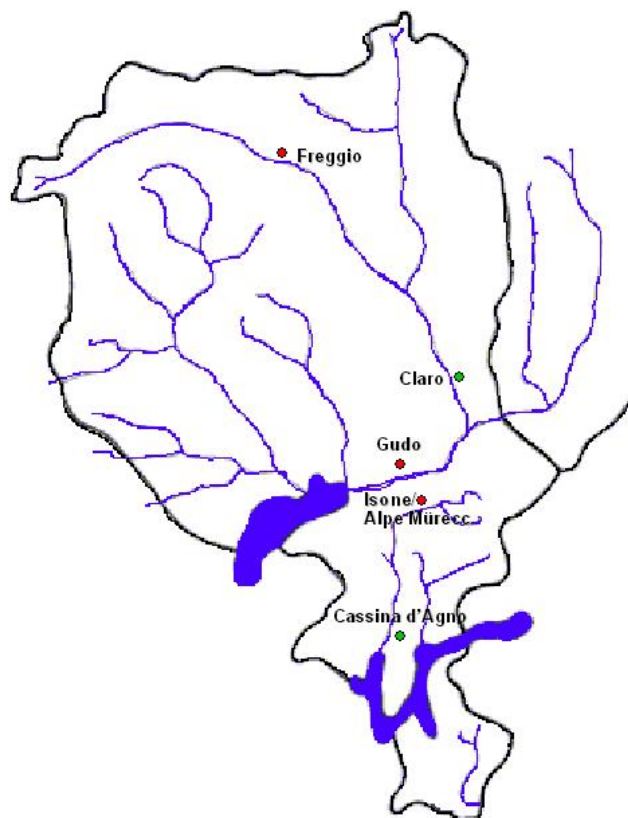


Figure 8. Localisation géographique des tiques *I. ricinus* infectées par *B. divergens* (●) et *B. EU1 sp.* (●) au Tessin (Casati et al., submitted-c).

Il est intéressant d'observer en Suisse la présence de *B. sp. EU1*, considérée comme une espèce émergente. A l'heure actuelle, elle a été isolée seulement dans 4 pays, qui tous ont des frontières communes: la Suisse, l'Italie, l'Autriche et la Slovénie (Duh et al., 2001; Herwaldt et al., 2003). Les séquences des *B. sp. EU1* provenant de ces 4 pays montrent une similarité de 99.8%, et ne permettent donc pas de déduire une association géographique. Dans le passé, la présence de cette espèce n'a pas pu être relevée, car les tests sérologiques utilisés en Europe pour mettre en évidence l'espèce pathogène humaine alors connue (*B. divergens*) n'arrivaient pas à distinguer les 2 espèces. Donc, toutes les infections humaines déclarées depuis 1957 ont été attribuées à *B. divergens* et en absence d'une confirmation moléculaire l'identité de l'espèce reste incertaine. Depuis 1997, deux séquences d'ADN de *B. divergens* ont été publiées dans GenBank et elles proviennent de 2 cas distincts: un homme splénectomisé de 66 ans au Portugal (décédé) (Centeno-Lima et al., 2003) et un homme splénectomisé de 34 ans aux Iles Canaries (Olmeda et al., 1997). Ensuite, les analyses moléculaires ont confirmé qu'il s'agissait de *B. divergens*. Récemment, deux nouveaux cas en Italie et en Autriche ont été documentés: ils n'étaient pas provoqués par *B. divergens*, mais par *B. sp. EU1* (Herwaldt et al., 2003). Malheureusement, il n'est donc pas possible de connaître sa réelle

prévalence. De plus, d'autres études devraient être entreprises pour suivre cette espèce et pour déterminer son réservoir.

Nous avons mis en évidence des coinfections de *B. sp.* EU1 et *B. burgdorferi* s.s., et de *B. sp.* EU1 et *B. afzelii*. Ces associations n'ont jamais été décrites; par contre les coinfections de *B. microti* et *B. divergens* avec *B. burgdorferi* s.l. sont connues.

La babésiose est considérée aujourd'hui comme une possible zoonose émergente. Nos données montrent que 3 espèces pathogènes, *B. divergens*, *B. microti* et *B. sp.* EU1, coexistent en Suisse. Il est donc nécessaire de renforcer la surveillance de ce protozoaire.

5.5. La population du virus TBE chez *I. ricinus* dans le foyer naturel de Belp (Berne).

Nous avons analysé 307 tiques *I. ricinus* collectées dans le foyer naturel de Belp (Canton de Berne) à la recherche du virus TBE. Parmi les tiques testées 14.3% (44/307) étaient infectées par ce virus, identifié ensuite à l'aide de l'analyse phylogénétique comme appartenant au sous-type européen (W-TBEV) (Casati et al., submitted-b).

Cette valeur est significativement plus élevée par rapport à celle reportée par de Marval (0.56%) en 1994, qui a décrit ce foyer pour la première fois, mais en utilisant le test de l'immunofluorescence indirecte (de Marval, 1994).

Nos résultats confirment la situation de risque de cette zone, mais ils contrastent avec la faible incidence de la maladie dans le canton Berne: 1 cas/100'000 habitants pour la période 1996-2002 (source <http://www.admin.ch/bag/infrereporting/>, Office Fédéral de la Santé Publique).

Il est important de considérer que la corrélation entre l'incidence de la maladie et le taux d'infection des tiques n'est pas facile à établir à cause de plusieurs facteurs: le comportement humain (vaccination, fréquence des séjours dans les zones endémiques, mesures préventives prises), les infections asymptomatiques, l'immunité acquise et la densité des tiques.

D'autres études ont montré une prévalence de 0.1% à 5% pour les foyers en Europe. Ces valeurs peuvent varier, comme l'a décrit l'étude de Bormane et al. en Lettonie (Bormane et al., 2004). En 1995, le taux d'infection chez les tiques adultes était de 26.6% et il a diminué jusqu'au 5.2% en 2002. Le taux élevé d'infection observé dans le foyer de Belp pourrait représenter un épisode isolé similaire à celui reporté en Lettonie. Ces fluctuations pourraient indiquer que le taux de tiques infectées par le TBEV pourrait être influencé par plusieurs facteurs, comme par exemple la concentration du virus dans les tiques, la densité de tiques et des hôtes, le "co-feeding" (transmission non-virémique) et les conditions environnementales et écologiques.

De plus, l'échantillonnage des tiques pourrait influencer le taux d'infection. En effet, plusieurs études ont montré la présence d'agrégats de tiques infectées (microfoyers) à l'intérieur d'une zone endémique (foyer) (Pretzmann et al., 1967), où le taux d'infection relevé pourrait être plus haut (10%) par rapport aux zones contiguës (Blaskovic et Nosek, 1972). Donc, une proportion de tiques collectées à Belp pourrait provenir de microfoyers.

Toutefois, la population de TBEV pourrait être aussi influencée par des facteurs de nature endogène, comme par exemple le taux élevé de mutations. En effet, la polymérase virale ("RNA-dependent RNA polymerase") n'est pas munie d'un système de "proof-reading". L'absence de ce mécanisme de réparation pendant la réplication provoque des mutations aléatoires tout au long de l'ARN viral. Par conséquent, il n'est pas surprenant de trouver un taux de variabilité très élevé dans notre population de virus W-TBE (55.5%).

Les mutations pourraient avoir une influence sur l'infectiosité des TBEV. Dans notre étude, les 4 zones d'ADN considérées ("CSA", "CSB", "start codon" et "folding stem structure") montrent un taux de mutations substantiel. Sur les 44 séquences analysées, 11 seulement ne montrent pas de mutations en ces 4 zones. La plupart des séquences analysées (33/44) montrent des mutations qui pourraient compromettre des processus viraux importants comme l'expression, la réplication et l'encapsidation du génome. De plus, si on considère les mutations qui pourraient se vérifier sur le génome viral entier, la proportion de virus infectieux pourrait être encore plus faible. Il faut considérer que chaque séquence de TBEV détectée par PCR correspond probablement à la proportion dominante de la population de virus portée par la tique analysée. Celle-ci peut donc abriter une population hétérogène du virus TBE composée, en proportions différentes, non seulement par des génomes viraux infectieux, mais aussi par des particules non fonctionnelles.

La grande variabilité (55.5%) trouvée dans la population de TBEV à Belp pourrait être expliquée par la persistance du virus chez la tique et chez l'hôte vertébré : deux environnements ayant des pressions sélectives différentes. Donc, la diversité génétique pourrait être une stratégie du virus pour s'adapter à chaque situation. Le virus est exposé au cycle de vie triphasique de la tique (larve, nymphe et adulte), aux processus d'ingestion et de digestion du sang, à la diapause et aux modes de transmission (virémique et non virémique). Par contre chez l'hôte infecté, les pressions sont liées au système immunitaire et aux différentes espèces d'hôtes réservoir vertébrés. De plus, l'hétérogénéité pourrait être due à la présence depuis longtemps du virus dans le foyer de Belp. La population de TBEV, supportée par certaines espèces de rongeurs, a été limitée géographiquement (rongeurs se déplaçant sur de courtes distances) et la diversité génétique qui a émergé dans le temps, a été préservée dans ce foyer naturel.

En conclusion, nos résultats suggèrent la présence de pressions sélectives, non seulement exogènes (conditions environnementales, cycle de vie de la tique, le passage dans l'hôte animal ou humain, le comportement de l'homme), mais aussi endogènes comme l'évolution du génome viral, qui agissent sur les populations de TBEV. Ceci pourrait contribuer à expliquer la faible incidence de la maladie TBE dans le canton de Berne.

5.6. La variabilité des populations étudiées

Il est intéressant d'observer que les populations étudiées ont des variabilités génétiques très différentes. Nous avons montré que la population d'*I. ricinus* s.s. (eucaryote pluricellulaire) en Europe est homogène. Cette homogénéité est en contraste avec le fait que cette tique abrite des populations génétiquement hétérogènes comme la bactérie *B. burgdorferi* s.s. (procaryote) et le virus TBE. Par ailleurs, on est aussi surpris par la grande homogénéité de *Babesia* (eucaryote unicellulaire). Un premier élément à considérer pour expliquer ces observations est la division évolutive à laquelle nos populations appartiennent:

procaryote, eucaryote (unicellulaire et pluricellulaire) et virus; les eucaryotes sont connus pour être moins variable par rapport aux autres groupes. A cette division évolutive correspond une organisation génomique différente. De plus, la multiplication des micro-organismes implique des processus différents comme la reproduction sexuée (tique et *Babesia*), la division cellulaire (*Borrelia*) et la réplication virale. Cette dernière a besoin de certains éléments de la cellule de l'hôte pour avoir lieu. En outre, les cycles de vie des "parasites" chez les hôtes et chez les tiques sont des passages essentiels soumis à des pressions sélectives différentes. En effet, les 3 pathogènes montrent des comportements distincts:

-*Borrelia burgdorferi* s.l. : après le repas sanguin de la tique, les spirochètes se retrouvent au niveau de l'intestin de celle-ci. Lors du prochain repas sanguin, ils vont se multiplier et migrer à travers les cellules épithéliales de l'intestin, via l'hémolymphe, aux glandes salivaires. La tique transmet à l'hôte la population de borrelies qu'elle abrite. Ensuite, les bactéries seront disséminées par la voie hématogène et pourront provoquer une maladie systémique touchant différents organes. La bactériémie peut durer plusieurs semaines.

-TBEV: après le repas sanguin de la tique, les virus se répliquent au niveau de son intestin, ensuite envahissent les cellules épithéliales pour coloniser enfin les glandes salivaires sans jamais arrêter la réplication. Pendant le repas sanguin, la tique transmet à l'hôte la population de virus qui est disséminée par le système lymphatique pour arriver enfin au système nerveux central. Même chez l'hôte la réplication est faite en continuation. La virémie dure quelques jours uniquement.

-*Babesia* sp.: après le repas sanguin de la tique, la gamogonie (reproduction sexuée) a lieu dans l'intestin du vecteur. Le zygote se transforme en ookinète (mobile), lequel pénètre la paroi intestinale pour rejoindre d'autres tissus (fibres musculaires, ovaires, etc.) où il devient un sporokinète. Lors du repas sanguin, le sporokinète migre dans les glandes salivaires où il y a la formation du sporonte qui libère des milliers de sporozoïtes. Ceux-ci envahissent directement les érythrocytes de l'hôte sous forme de mérozoïtes pour donner lieu au cycle endoérythrocytaire et à la formation des gamontes.

Nous considérons que les pressions sélectives sont dues surtout à l'impact des "parasites" avec le système immunitaire de l'hôte, mais d'autres éléments aussi sont importants comme le passage entre milieux différents (tique et hôte) et l'adaptation qui suit, l'ingestion du repas sanguin, la digestion du sang, la migration des "parasites" aux glandes salivaires, leur transmission et leur migration aux organes cibles de l'hôte. Les micro-organismes extracellulaires comme les borrelies et le TBEV sont confrontés directement avec le système immunitaire de l'hôte par le passage dans le système sanguin et le système lymphatique. Par contre, les babésies étant intracellulaires (intra-érythrocytaires) restent plus protégées et ce fait pourrait contribuer à expliquer leur homogénéité par rapport aux autres micro-organismes extracellulaires. A l'extérieur du pathogène aussi, il y a des éléments qui pourraient influencer la diversité génétique comme les facteurs environnementaux, climatiques et écologiques. En conclusion, chaque organisme se caractérise par sa propre combinaison d'éléments, qui influence son degré de variabilité génétique.

Conclusions

Cette étude a permis d'actualiser et de compléter les connaissances sur les deux tiques *R. sanguineus* au Tessin et *I. ricinus* en Europe, les 5 agents pathogènes *Rickettsia* sp. et *Coxiella* sp. au Tessin, *Borrelia burgdorferi* s.l. et *Babesia* sp. en Suisse avec un regard particulier sur le Tessin et le virus TBE dans le foyer naturel de Belp (canton de Berne). Parmi les résultats les plus marquants que nous avons obtenu, nous pouvons mentionner:

- *Rhipicephalus sanguineus* s.l. est présente et s'est implantée au sud des Alpes sous forme de 2 populations distinctes : *R. sanguineus* s.s. et *R. turanicus*.
- *Rickettsia* Bar29, considérée comme potentiellement pathogène, et *Coxiella* endosymbionte, considérée comme une forme de *Coxiella burnetii*, sont présentes au Tessin chez *R. sanguineus* s.l..
- La population d'*I. ricinus* s.s. en Europe semble être homogène et ne montre pas de structure phylogéographique. Nous avons apporté des nouvelles données sur l'ADN mitochondrial.
- La population de *B. burgdorferi* s.l. en Suisse est très hétérogène et dans chaque région elle montre une distribution et une prévalence différentes. *B. afzelii* et *B. lusitaniae* ont été signalées respectivement au Tessin et à Neuchâtel.
- *B. divergens*, *B. microti* et *B. sp.* EU1 sont présentes en Suisse chez la tique *I. ricinus*. Nous avons apporté de nouvelles données pour *B. sp.* EU1.
- Le virus TBE isolé chez les tiques *I. ricinus*, provenant du foyer naturel de Belp, appartient au sous-type européen W-TBEV. Le taux d'infection des tiques est très élevé (14.3%). La population de virus contient aussi une proportion significative d'organismes défectifs.

Le Tessin avec sa position géographique particulière (au sud des Alpes) et son climat pourrait être considéré comme une porte d'entrée, plus particulièrement ces dernières décennies probablement sous l'influence des changements climatiques. En effet, on observe des organismes qui se déplacent vers le nord par rapport à leur origine, et par conséquent ils amènent, si c'est le cas, les agents pathogènes qu'ils abritent. D'autres exemples, à part la tique *R. sanguineus*, sont les moustiques : *Aedes albopictus* (le moustique tigre) et *Culicoides imicola* moucheron responsable de la "fièvre catarrhale du mouton", pour lesquels des surveillances au Tessin ont été mises en place.

Enfin, la problématique des maladies émergentes est tout à fait actuelle. Elle est liée soit aux nouveaux micro-organismes pathogènes importés d'autres régions (*Rickettsia* sp., *Ehrlichia* sp., *Coxiella burnetii*, *Babesia microti*, *Borrelia bissettii*), soit aux nouveaux micro-organismes pathogènes détectés (*B. spielmani*, *B. sp.* EU1), soit aux rôles pathogènes non encore définis des micro-organismes résidents (*B. lusitaniae*, *B. valaisiana*) ou importés (*Rickettsia massiliae*, *R.* Bar29, *Coxiella* endosymbionte).

Donc, il est important de surveiller l'implantation de nouveaux vecteurs (par ex. *R. sanguineus* s.l.) porteurs de micro-organismes exotiques, des vecteurs connus (par ex. *I. ricinus*) pour garder sous contrôle la situation ou pour éventuellement recenser des nouveaux micro-organismes et les futurs rôles pathogènes des micro-organismes considérés comme potentiellement pathogènes.

Mots clés/Key words: *Rhipicephalus sanguineus*, *R. turanicus*, *Ixodes ricinus*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Babesia* sp. EU1, *B. microti*, *B. divergens*, TBEV, *Rickettsia* Bar29, *Coxiella* sp., Suisse/Switzerland, Ticino, *recA*, *gltA*, *ompA*, ADN mitochondrial/mitochondrial DNA, Control Region, 18S rRNA.

RESUME

Dans la première partie de l'étude, nous nous sommes concentrés sur la tique *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato signalée au Tessin dès les années '80 et sur les agents pathogènes transmis par ce vecteur: *Rickettsia* sp. et *Coxiella burnetii*. Nous avons confirmé par l'étude du gène rDNA 12S l'implantation de ce complexe sous la forme de deux populations distinctes: *R. sanguineus* s.s. et *R. turanicus*. Chez le premier vecteur nous avons détecté *R. Bar 29* (*ompA*, *gltA*, rDNA 16S), considérée comme potentiellement pathogène, tandis que chez les deux vecteurs nous avons isolé *Coxiella* endosymbionte (rDNA 16S), probablement une forme de *C. burnetii*.

Ensuite, nous avons étendu l'étude à l'Europe et à la tique la plus fréquemment répandue, *Ixodes ricinus*. Sur la base de cinq gènes mitochondriaux considérés appropriés pour les études phylogénétiques et de génétique des populations chez les arthropodes ("Control Region", rDNA 12S, *COI*, *COII* et *cytb*), la population d'*I. ricinus* s.s. semble être extrêmement homogène et elle ne montre pas de structure phylogéographique.

Nous nous sommes aussi intéressés aux agents pathogènes transmis par la tique européenne *I. ricinus* en Suisse: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Babesia* sp. et le virus de l'encéphalite à tique. La méthode de la RT-PCR sur un fragment du gène *recA*, nous a permis de relever la présence de populations hétérogènes de *B. burgdorferi* dans les trois régions choisies: Neuchâtel (32.6%), Valais (19.6%) et Tessin (15.0%). La population est composée le plus souvent par 5 génoespèces sur les 12 qui forment le complexe *B. burgdorferi* s.l.: *B. afzelii* (décrite pour la première fois au Tessin), *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. burgdorferi* s.s. (sauf au Tessin) et *B. lusitaniae* (sauf au Valais et décrite pour la première fois à Neuchâtel). Toutefois, si on considère les trois régions dans leur ensemble, la génoespèce la plus fréquente en Suisse semble être *B. afzelii*.

Pour mettre en évidence le protozoaire *Babesia* chez les tiques *I. ricinus* récoltées dans 4 régions de Suisse (Neuchâtel, Tessin, Valais et Zürich), nous avons mis au point une PCR basée sur le gène rRNA 18S. Le fragment choisi est très variable et permet de bien distinguer les différentes espèces et sous-espèces de *Babesia*. Trois espèces pathogènes pour l'homme ont été détectées avec une prévalence assez faible 0.8%: *B. divergens*, *B. microti* et pour la première fois *B. sp* EU1. De plus, nous avons mis en évidence des coinfections de *B. sp.* EU1 et de *B. burgdorferi* s.s. et de *B. sp.* EU1 et *B. afzelii* qui n'ont jamais été décrites.

Pour terminer, nous avons analysé des tiques *I. ricinus* récoltées dans le foyer naturel de Belp (canton de Berne) à la recherche du virus TBE à l'aide d'une nested RT-PCR basée sur la région 5' terminal du cadre de lecture du virus comprenant une partie de la région non codifiante (NCR) et de la région de la capsid (C). Le 14.3% des tiques était infecté par ce virus appartenant au sous-type européen W-TBEV. En étudiant de plus près 4 zones d'ADN, en particulier CS"A", CS"B", "start codon" et "folding stem structure", nous avons constaté un taux de mutations substantiel: toutes les séquences étaient différentes. Les tiques infectées peuvent abriter une population hétérogène du virus TBE composée, en proportions différentes, non seulement par des génomes viraux infectieux, mais aussi par des particules défectives.

REMERCIEMENTS

😊 Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mes remerciements sincères au Dr Jean-Claude Piffaretti pour m'avoir mis à disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce projet, pour le soutien scientifique et pour les précieux conseils.

😊 Je tiens à remercier de tout cœur le Dr Lise Gern pour avoir accepté d'être co-directeur de thèse, pour sa disponibilité, pour sa gentillesse et pour ses précieux conseils.

😊 Un grand merci au Dr Marco Bernasconi qui m'a fait découvrir le domaine de la phylogénie. Ses encouragements et ses conseils tout au long du chemin se sont avérés très précieux.

😊 Je tiens à remercier le Prof. Bruno Betschart et le Prof. Peter Deplazes pour avoir accepté d'être membres du jury de cette thèse.

😊 J'adresse mes sincères remerciements au Dr Heinz Sager pour sa disponibilité, pour sa collaboration, pour m'avoir fourni plusieurs souches de *Babesia* et pour avoir récolté les tiques *I. ricinus* à Belp. Pour cela je remercie aussi le Prof. Bruno Gottstein.

😊 J'aimerais aussi remercier le Dr Valeria Gaia pour l'aide technique dans tous les domaines, ses conseils, sa disponibilité et l'amitié.

😊 Je n'oublierai certainement pas le Dr Antonella Demarta pour sa disponibilité et les discussions sur certaines parties de la thèse.

😊 Un grand merci à Cinzia Benagli pour son aide sur le terrain, pour le soutien moral, pour la bonne humeur et pour l'amitié.

😊 Je tiens à remercier le Dr Elena Grasselli pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses précieux conseils.

😊 Un grand merci à Maruska Convert pour l'aide pendant l'extraction d'ADN des tiques.

😊 Merci de tout cœur au Dr Michaela Gutacker pour les conseils et les discussions en phase de rédaction de la publication sur le virus TBE.

😊 Je remercie le Dr Gladys Martinetti pour son aide technique et ses conseils en biologie moléculaire.

😊 Merci à Olivier Rais et au Dr Olivier Péter pour la récolte des tiques respectivement à Neuchâtel et au Valais.

😊 Un immense merci à Anna Schenini pour son aide pratique pendant la dernière partie de ce travail.

😊 Mes remerciements vont également à Aline Gioria-Martinoni et Barbara Lemaître pour le bon français du texte.

😊 Un grand merci à toutes les personnes et aux vétérinaires du Tessin qui m'ont fourni des tiques de Suisse et de l'étranger, au Prof. Didier Raoult et au Prof. Franz X. Heinz qui m'ont donné respectivement l'ADN de *Rickettsia conorii* et l'ARN du virus TBE pour mes expériences.

😊 J'aimerais remercier de tout cœur tous les collègues de l'Istituto Cantonale di Microbiologia et les personnes que j'ai rencontrées pendant cette thèse pour leur soutien, leur aide, leur bonne humeur, leur sympathie, leur disponibilité, et leurs conseils. Merci!

😊 Je tiens à remercier infiniment ma mère Annamaria, ma sœur Lorena et mon ami Stefano pour leur soutien quotidien et permanent.

BIBLIOGRAPHIE

- Aeschlimann, A., 1972. *Ixodes ricinus*, Linné, 1758 (Ixodoidea: Ixodidae). Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse. Acta Trop., 29: 321-340.
- Aeschlimann, A., Büttiker, W., 1975. Importations de tiques en Suisse (Acarina, Ixodoidea). Mitteilungen des Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft, 48: 69-75.
- Aeschlimann, A., Büttiker, W., Elbl, A., Hoogstraal, H., 1965. A propos des tiques de Suisse (Arachnoidea, Acarina, Ixodoidea). Rev. Suisse Zool., 72: 1039-1050.
- Aeschlimann, A., Schneeberger, S., Pfister, K., Burgdorfer, W., Cotty, A., 1986. Données nouvelles sur les tiques Ixodides du canton du Tessin (Suisse) et sur la présence d'agents rickettsiens dans leur hémolymphe. Annu. Soc. Helv. Sci. Nat., 1: 58-68.
- Afzelius, A., 1910. Verhandlung der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. Arch. Dermatol. Syphilis., 101: 405-6.
- Alekseev, A.N., Dubinina, H.V., Van De Pol, I., Schouls, L.M., 2001. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. J. Clin. Microbiol., 39(6): 2237-42.
- Babalis, T., Tselentis, Y., Roux, V., Psaroulaki, A., Raoult, D., 1994. Isolation and identification of a rickettsial strain related to *Rickettsia massiliae* in Greek ticks. Am. J. Trop. Med. Hyg., 50(3): 365-72.
- Bacellar, F., Beati, L., Franca, A., Pocas, J., Regnery, R., Filipe, A., 1999. Israeli spotted fever rickettsia (*Rickettsia conorii* complex) associated with human disease in Portugal. Emerg. Infect. Dis., 5(6): 835-6.
- Bacellar, F., Regnery, R.L., Nuncio, M.S., Filipe, A.R., 1995. Genotypic evaluation of rickettsial isolates recovered from various species of ticks in Portugal. Epidemiol. Infect., 114(1): 169-78.
- Bailly-Choumara, H., Morel, J.C., Rageau, J., 1976. Sommaire des données actuelles sur les tiques au Maroc (Acari: Ixodidae). Bull. Inst. Sci., 1: 101-115.
- Balmelli, T., Piffaretti, J.C., 1995. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Res. Microbiol., 146(4): 329-40.
- Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J.C., Assous, M., Grimont, P.A., 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. Int. J. Syst. Bacteriol., 42(3): 378-83.
- Baranton, G., Seinost, G., Theodore, G., Postic, D., Dykhuizen, D., 2001. Distinct levels of genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* are associated with different aspects of pathogenicity. Res. Microbiol., 152(2): 149-56.
- Barker, I.K., Lindsay, L.R., 2000. Lyme borreliosis in Ontario: determining the risks. Cmaj, 162(11): 1573-4.
- Beati, L., Finidori, J.P., Gilot, B., Raoult, D., 1992. Comparison of serologic typing, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis protein analysis, and genetic restriction fragment length polymorphism analysis for identification of *Rickettsiae*: characterization of two new rickettsial strains. J. Clin. Microbiol., 30(8): 1922-30.
- Beati, L., Finidori, J.P., Raoult, D., 1993. First isolation of *Rickettsia slovaca* from *Dermacentor marginatus* in France. Am. J. Trop. Med. Hyg., 48(2): 257-68.

- Beati, L., Humair, P.F., Aeschlimann, A., Raoult, D., 1994. Identification of spotted fever group rickettsiae isolated from *Dermacentor marginatus* and *Ixodes ricinus* ticks collected in Switzerland. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 51(2): 138-48.
- Beati, L., Keirans, J.E., 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J. Parasitol.*, 87(1): 32-48.
- Beati, L., Roux, V., Ortuno, A., Castella, J., Porta, F.S., Raoult, D., 1996. Phenotypic and genotypic characterization of spotted fever group *Rickettsiae* isolated from Catalan *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *J. Clin. Microbiol.*, 34(11): 2688-94.
- Beattie, J.F., Michelson, M.L., Holman, P.J., 2002. Acute babesiosis caused by *Babesia divergens* in a resident of Kentucky. *N. Engl. J. Med.*, 347(9): 697-8.
- Bellet-Edimo, O.R., 1997. Importance de la transmission transstadiale et de la transmission transovarienne du spirochète *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) chez la tique *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) dans l'épidémiologie de la borréliose de Lyme. PhD thesis, University of Neuchâtel, Neuchâtel, Switzerland, 123 pp.
- Beninati, T., Lo, N., Noda, H., Esposito, F., Rizzoli, A., Favia, G., Genchi, C., 2002. First detection of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* from Italy. *Emerg. Infect. Dis.*, 8(9): 983-6.
- Bergström, S., Noppa, L., Gylfe, A., Ostberg, Y., 2002. Molecular and Cellular Biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In: *Lyme Borreliosis: Biology*, E.a.C. (Ed.), Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., Stanek, G. CABI International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 47-90.
- Bernasconi, M.V., Casati, S., Peter, O., Piffaretti, J.C., 2002. *Rhipicephalus* ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino). *Infect. Genet. Evol.*, 2(2): 111-20.
- Bernasconi, M.V., Valsangiacomo, C., Balmelli, T., Peter, O., 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(2): 209-15.
- Bernasconi, M.V., Valsangiacomo, C., Piffaretti, J.C., Ward, P.I., 2000. Phylogenetic relationships among muscoidea (Diptera: calyptratae) based on mitochondrial DNA sequences. *Insect. Mol. Biol.*, 9(1): 67-74.
- Blaskovic, D., Nosek, J., 1972. The ecological approach to the study of tick-borne encephalitis. *Prog. Med. Virol.*, 14: 275-320.
- Bormane, A., Lucenko, I., Duks, A., Mavtchoutko, V., Ranka, R., Salmina, K., Baumanis, V., 2004. Vectors of tick-borne diseases and epidemiological situation in Latvia in 1993-2002. *Int. J. Med. Microbiol.*, 293 Suppl 37: 36-47.
- Bouattour, A., Darghouth, M.A., 1996. First report of *Babesia divergens* in Tunisia. *Vet. Parasitol.*, 63(1-2): 161-5.
- Boustani, M.R., Gelfand, J.A., 1996. Babesiosis. *Clin. Infect. Dis.*, 22(4): 611-5.
- Brezina, R., Rehacek, J., Majerska, M., 1968. Two strains of rickettsiae of Rocky Mountain spotted fever group recovered from *Dermacentor marginatus* ticks in Czechoslovakia. Results of preliminary serological identification. *Acta Virol.*, 13: 142-145.
- Burgdorfer, W., Aeschlimann, A., Peter, O., Hayes, S.F., Philip, R.N., 1979. *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Trop.*, 36(4): 357-67.

- Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Benach, J.L., Grunwaldt, E., Davis, J.P., 1982. Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science*, 216(4552): 1317-9.
- Calisher, C.H., Gould, E.A., 2003. Taxonomy of the virus family *Flaviviridae*. *Adv. Virus. Res.*, 59: 1-19.
- Caporale, D.A., Rich, S.M., Spielman, A., Telford, S.R., 3rd, Kocher, T.D., 1995. Discriminating between *Ixodes* ticks by means of mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 4(4): 361-5.
- Cardenosa, N., Roux, V., Font, B., Sanfeliu, I., Raoult, D., Segura, F., 2000. Short report: isolation and identification of two spotted fever group rickettsial strains from patients in Catalonia, Spain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62(1): 142-4.
- Casati, S., Bernasconi, M.V., Gern, L., Piffaretti, J.C., 2004. Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by *recA* gene sequence. *FEMS Microbiol. Lett.*, 238(1): 115-23.
- Casati, S., Bernasconi, M.V., Gern, L., Piffaretti, J.C., submitted-a. Population genetics of *Ixodes ricinus* sensu stricto (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial DNA sequences.
- Casati, S., Gern, L., Piffaretti, J.C., submitted-b. Diversity of the Tick-borne Encephalitis Virus population infecting *Ixodes ricinus* ticks in an endemic area of central Switzerland (Canton Bern).
- Casati, S., Sager, H., Gern, L., Piffaretti, J.C., submitted-c. Presence of human pathogenic *Babesia* sp. in *Ixodes ricinus* in Switzerland.
- Casjens, S., Palmer, N., van Vugt, R., Huang, W.M., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J., Dodson, R.J., Haft, D., Hickey, E., Gwinn, M., White, O., Fraser, C.M., 2000. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.*, 35(3): 490-516.
- Caterino, M.S., Cho, S., Sperling, F.A., 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annu. Rev. Entomol.*, 45: 1-54.
- Centeno-Lima, S., do Rosario, V., Parreira, R., Maia, A.J., Freudenthal, A.M., Nijhof, A.M., Jongejan, F., 2003. A fatal case of human babesiosis in Portugal: molecular and phylogenetic analysis. *Trop. Med. Int. Health*, 8(8): 760-4.
- Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R., Rice, C.M., 1990. *Flavivirus* genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44: 649-88.
- Charrel, R.N., Attoui, H., Butenko, A.M., Clegg, J.C., Deubel, V., Frolova, T.V., Gould, E.A., Gritsun, T.S., Heinz, F.X., Labuda, M., Lashkevich, V.A., Loktev, V., Lundkvist, A., Lvov, D.V., Mandl, C.W., Niedrig, M., Papa, A., Petrov, V.S., Plyusnin, A., Randolph, S., Süß, J., Zlobin, V.I., de Lamballerie, X., 2004. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, 10(12): 1040-55.
- Christova, I., Van De Pol, J., Yazar, S., Velo, E., Schouls, L., 2003. Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group *Rickettsiae* in ticks from Southeastern Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 22(9): 535-42.
- Cinco, M., Padovan, D., Murgia, R., Poldini, L., Frusteri, L., van de Pol, I., Verbeek-De Kruif, N., Rijpkema, S., 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(2): 90-4.

- Collares-Pereira, M., Couceiro, S., Franca, I., Kurtenbach, K., Schafer, S.M., Vitorino, L., Goncalves, L., Baptista, S., Vieira, M.L., Cunha, C., 2004. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. J. Clin. Microbiol., 42(3): 1316-8.
- Craine, N.G., Nuttall, P.A., Marriott, A.C., Randolph, S.E., 1997. Role of grey squirrels and pheasants in the transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the Lyme disease spirochaete, in the U.K. Folia Parasitol. (Praha), 44(2): 155-60.
- de Marval, F., 1994. Etude séroépidémiologique de l'encéphalite à tiques et de la borréliose de Lyme en Suisse, PhD thesis, Université de Neuchâtel, Neuchâtel.
- De Meeûs, T., Beati, L., Delaye, C., Aeschlimann, A., Renaud, F., 2002. Sex-biased genetic structure in the vector of Lyme disease, *Ixodes ricinus*. Evolution Int. J. Org. Evolution, 56(9): 1802-7.
- De Michelis, S., Sewell, H.S., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Schouls, L.M., Benes, V., Holmes, E.C., Kurtenbach, K., 2000. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. J. Clin. Microbiol., 38(6): 2128-33.
- Delaye, C., Beati, L., Aeschlimann, A., Renaud, F., de Meeus, T., 1997. Population genetic structure of *Ixodes ricinus* in Switzerland from allozymic data: no evidence of divergence between nearby sites. Int. J. Parasitol., 27(7): 769-73.
- Derdakova, M., Beati, L., Pet'ko, B., Stanko, M.Fish, D., 2003. Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the rrfA-rrlB intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech Republic. Appl. Environ. Microbiol., 69(1): 509-16.
- Donahue, J.G., Piesman, J., Spielman, A., 1987. Reservoir competence of white-footed mice for Lyme disease spirochetes. Am. J. Trop. Med. Hyg., 36(1): 92-6.
- Duh, D., Petrovec, M., Avsic-Zupanc, T., 2001. Diversity of *Babesia* Infecting European sheep ticks (*Ixodes ricinus*). J.Clin. Microbiol., 39(9): 3395-7.
- Dumpis, U., Crook, D., Oksi, J., 1999. Tick-borne encephalitis. Clin. Infect. Dis., 28(4): 882-90.
- Dupont, H.T., Cornet, J.P., Raoult, D., 1994. Identification of *Rickettsiae* from ticks collected in the Central African Republic using the polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg., 50(3): 373-80.
- Dupuis, G., Petite, J., Peter, O., Vouilloz, M., 1987. An important outbreak of human Q fever in a Swiss Alpine valley. Int. J. Epidemiol., 16(2): 282-7.
- Ecker, M., Allison, S.L., Meixner, T., Heinz, F.X., 1999. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. J. Gen. Virol., 80 (Pt 1): 179-85.
- Eisen, L., Lane, R.S., 2002. Vectors of *B. burgdorferi* sensu lato. In: Lyme Borreliosis: Biology E.a.C. (Ed.), Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., Stanek, G. CABI International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 91-115.
- Escudero, R., Barral, M., Perez, A., Vitutia, M.M., Garcia-Perez, A.L., Jimenez, S., Sellek, R.E., Anda, P., 2000. Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. J. Clin. Microbiol., 38(11): 4026-33.
- Etti, S., Hails, R., Schafer, S.M., De Michelis, S., Sewell, H.S., Bormane, A., Donaghy, M., Kurtenbach, K., 2003. Habitat-specific diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe, exemplified by data from Latvia. Appl. Environ. Microbiol., 69(5): 3008-10.

- Fameree, L., Cotteleer, C., Antoine, H., 1977. La babésiose bovine en Belgique, une arthropozoonose envahissante et méconnue. Incidence des babésioses animales sur la santé humaine. *Revue Med. Liege*, 12: 383-390.
- Felsenstein, J., 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.*, 22: 521-65.
- Fernandez-Soto, P., Encinas-Grandes, A., Perez-Sanchez, R., 2003. *Rickettsia aeschlimannii* in Spain: molecular evidence in *Hyalomma marginatum* and five other tick species that feed on humans. *Emerg. Infect. Dis.*, 9(7): 889-90.
- Foppa, I.M., Krause, P.J., Spielman, A., Goethert, H., Gern, L., Brand, B., Telford, S.R., 3rd, 2002. Entomologic and serologic evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti*, in eastern Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.*, 8(7): 722-6.
- Fournier, P.E., Tissot-Dupont, H., Gallais, H., Raoult, D.R., 2000. *Rickettsia mongolotimonae*: a rare pathogen in France. *Emerg. Infect. Dis.*, 6(3): 290-2.
- Fraenkel, C.J., Garpmo, U., Berglund, J., 2002. Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. *J. Clin. Microbiol.*, 40(9): 3308-12.
- 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., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J., Venter, J.C. et al., 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390(6660): 580-6.
- Garin, C., Bujadoux, R., 1922. Paralysie par les tiques. *J. Méd. Lyon*, 71: 765-767.
- Gern, L., Aeschlimann, A., 1986. Seroepidemiologic study of 2 foci of babesiosis of small mammals in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 128(11): 587-600.
- Gern, L., Brossard, M., Aeschlimann, A., Broquet, C.A., Quenet, G., Stucki, J.P., Ackermann, J., 1982. Bovine piroplasmiasis in the Clos-du-Doubs (Jura, Switzerland): preliminary observations. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 124(11): 549-56.
- Gern, L., Hu, C.M., Kocianova, E., Vyrostekova, V., Rehacek, J., 1999. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *Eur. J. Epidemiol.*, 15(7): 665-9.
- Gern, L., Humair, P.F., 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In: *Lyme Borreliosis: Biology*, E.a.C. (Ed.), Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., Stanek, G. CABI International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 149-174.
- Gern, L., Rais, O., 1996. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between co-feeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, 33(1): 189-92.
- Gern, L., Rouvinez, E., Toutoungi, L.N., Godfroid, E., 1997. Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland. *Folia Parasitol. (Praha)*, 44(4): 309-14.
- Gilot, B., Laforge, M.L., Pichot, J., Raoult, D., 1990. Relationships between the *Rhipicephalus sanguineus* complex ecology and Mediterranean spotted fever epidemiology in France. *Eur. J. Epidemiol.*, 6(4): 357-62.
- Goethert, H.K., Telford, S.R., 3rd, 2003. What is *Babesia microti*? *Parasitology*, 127(Pt 4): 301-9.

- Goldwasser, R.A., Steiman, Y., Klingberg, W., Swartz, T.A., Klingberg, M.A., 1974. The isolation of strains of rickettsiae of the spotted fever group in Israel and their differentiation from other members of the group by immunofluorescence methods. *Scand. J. Infect. Dis.*, 6(1): 53-62.
- Gorenflot, A., Moubri, K., Precigout, E., Carcy, B., Schetters, T.P., 1998. Human babesiosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 92(4): 489-501.
- Gould, E.A., de Lamballerie, X., Zanotto, P.M., Holmes, E.C., 2003. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*. *Adv. Virus Res.*, 59: 277-314.
- Gray, J., von Stedingk, L.V., Gurtelschmid, M., Granström, M., 2002. Transmission studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks and gerbils. *J. Clin. Microbiol.*, 40(4): 1259-63.
- Gray, J.S., 2002. Biology of *Ixodes* species ticks in relation to tick-borne zoonoses. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 114(13-14): 473-8.
- Gray, J.S., Kahl, O., Janetzki-Mittman, C., Stein, J., Guy, E., 1994. Acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus* ticks fed on the European hedgehog, *Erinaceus europaeus* L. *Exp. Appl. Acarol.*, 18(8): 485-91.
- Greenfield, R.A., Drevets, D.A., Machado, L.J., Voskuhl, G.W., Cornea, P., Bronze, M.S., 2002. Bacterial pathogens as biological weapons and agents of bioterrorism. *Am. J. Med. Sci.*, 323(6): 299-315.
- Grimm, D., Eggers, C.H., Caimano, M.J., Tilly, K., Stewart, P.E., Elias, A.F., Radolf, J.D., Rosa, P.A., 2004a. Experimental assessment of the roles of linear plasmids lp25 and lp28-1 of *Borrelia burgdorferi* throughout the infectious cycle. *Infect. Immun.*, 72(10): 5938-46.
- Grimm, D., Tilly, K., Byram, R., Stewart, P.E., Krum, J.G., Bueschel, D.M., Schwan, T.G., Policastro, P.F., Elias, A.F., Rosa, P.A., 2004b. Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 101(9): 3142-7.
- Gritsun, T.S., Nuttall, P.A., Gould, E.A., 2003. Tick-borne flaviviruses. *Adv. Virus Res.*, 61: 317-71.
- Guner, E.S., Hashimoto, N., Takada, N., Kaneda, K., Imai, Y., Masuzawa, T., 2003. First isolation and characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains from *Ixodes ricinus* ticks in Turkey. *J. Med. Microbiol.*, 52(Pt 9): 807-13.
- Gustafson, R., 1994. Epidemiological studies of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.*, 92: 1-63.
- Hall, B.G., 2001. *Phylogenetic Trees Made Easy: a How-To Manual for Molecular Biologists*. Sunderland, Massachusetts, 1-179 pp.
- Hanincova, K., Schafer, S.M., Etti, S., Sewell, H.S., Taragelova, V., Ziak, D., Labuda, M., Kurtenbach, K., 2003a. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology*, 126(Pt 1): 11-20.
- Hanincova, K., Taragelova, V., Koci, J., Schafer, S.M., Hails, R., Ullmann, A.J., Piesman, J., Labuda, M., Kurtenbach, K., 2003b. Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(5): 2825-30.
- Hartelt, K., Oehme, R., Frank, H., Brockmann, S.O., Hassler, D., Kimmig, P., 2004. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int. J. Med. Microbiol.*, 293 Suppl. 37: 86-92.
- Hayes, E.B., Schriefer, M.E., 2002. Vaccination Against Lyme Borreliosis. In: *Lyme Borreliosis: Biology*, E.a.C (Ed.), Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., Stanek, G. CABI International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 281-300.

- Hayes, S.F., Burgdorfer, W., Aeschlimann, A., 1980. Sexual transmission of spotted fever group rickettsiae by infected male ticks: detection of rickettsiae in immature spermatozoa of *Ixodes ricinus*. *Infect. Immun.*, 27(2): 638-42.
- Herwaldt, B.L., Caccio, S., Gherlinzoni, F., Aspöck, H., Slemenda, S.B., Piccaluga, P., Martinelli, G., Edelhofer, R., Hollenstein, U., Poletti, G., Pampiglione, S., Loschenberger, K., Tura, S., Pieniasek, N.J., 2003. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 9(8): 942-8.
- Hewitt, G.M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.*, 58: 247-276.
- Hilbink, F., Penrose, M., Kovacova, E., Kazar, J., 1993. Q fever is absent from New Zealand. *Int. J. Epidemiol.*, 22(5): 945-9.
- Hildebrandt, A., Schmidt, K.H., Wilske, B., Dorn, W., Straube, E., Fingerle, V., 2003. Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes ricinus* ticks in central Germany. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 22(6): 364-7.
- Hoffman, G., 1981. Die braune Hundezecke (*Rhipicephalus sanguineus* L.) in Berlin (West). *Bundesgesundheitsbl.*, 24: 41-50, 153-163.
- Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., 3rd, Krause, P.J., Persing, D.H., 2000. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13(3): 451-69.
- Hubalek, Z., Halouzka, J., 1997. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur. J. Epidemiol.*, 13(8): 951-7.
- Huegli, D., Hu, C.M., Humair, P.F., Wilske, B., Gern, L., 2002. *Apodemus* species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.*, 40(12): 4735-7.
- Humair, P.F., Gern, L., 1998. Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Trop.*, 69(3): 213-27.
- Humair, P.F., Peter, O., Wallich, R., 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(4): 433-8.
- Humair, P.F., Postic, D., Wallich, R., Gern, L., 1998. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. *Zentralbl. Bakteriol.*, 287(4): 521-38.
- Humair, P.F., Rais, O., Gern, L., 1999. Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitology*, 118 (Pt 1): 33-42.
- Hunfeld, K.P., Brade, V., 2004. Zoonotic *Babesia*: possibly emerging pathogens to be considered for tick-infested humans in Central Europe. *Int. J. Med. Microbiol.*, 293 Suppl. 37: 93-103.
- Hunfeld, K.P., Lambert, A., Kampen, H., Albert, S., Epe, C., Brade, V., Tenter, A.M., 2002. Seroprevalence of *Babesia* infections in humans exposed to ticks in midwestern Germany. *J. Clin. Microbiol.*, 40(7): 2431-6.
- Inokuma, H., Yoshizaki, Y., Shimada, Y., Sakata, Y., Okuda, M., Onishi, T., 2003. Epidemiological survey of *Babesia* species in Japan performed with specimens from ticks collected from dogs and detection of new *Babesia* DNA closely related to *Babesia odocoilei* and *Babesia divergens* DNA. *J. Clin. Microbiol.*, 41(8): 3494-8.

- Jaenson, T.G., Tälleklint, L., Lundqvist, L., Olsen, B., Chirico, J., Mejlou, H., 1994. Geographical distribution, host associations, and vector roles of ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) in Sweden. *J. Med. Entomol.*, 31(2): 240-56.
- Janbon, F., Raoult, D., Reynes, J., Bertrand, A., 1989. Concomitant human infection due to *Rickettsia conorii* and *Coxiella burnetii*. *J. Infect. Dis.*, 160(2): 354-5.
- Jenkins, A., Kristiansen, B.E., Allum, A.G., Aakre, R.K., Strand, L., Kleveland, E.J., van de Pol, I., Schouls, L., 2001. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. in *Ixodes ticks* from southern Norway. *J. Clin. Microbiol.*, 39(10): 3666-71.
- Jouda, F., 2003. 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*, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, 142 pp.
- Jouda, F., Crippa, M., Perret, J.L., Gern, L., 2003. Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of canton Ticino (Switzerland). *Eur.J. Epidemiol.*, 18(9): 907-12.
- Junttila, J., Peltomaa, M., Soini, H., Marjamaki, M., Viljanen, M.K., 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. *J. Clin. Microbiol.*, 37(5): 1361-5.
- Kain, D.E., Sperling, F.A., Daly, H.V., Lane, R.S., 1999. Mitochondrial DNA sequence variation in *Ixodes pacificus* (Acari: ixodidae). *Heredity*, 83 (Pt 4): 378-86.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16(2): 111-20.
- Kirstein, F., Rijpkema, S., Molkenboer, M., Gray, J.S., 1997. The distribution and prevalence of *B. burgdorferi* genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Ireland. *Eur. J. Epidemiol.*, 13(1): 67-72.
- Kjemtrup, A.M., Conrad, P.A., 2000. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *Int. J. Parasitol.*, 30(12-13): 1323-37.
- Korenberg, E.I., Gorelova, N.B., Kovalevski, Y.V., 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia. In: *Lyme Borreliosis: Biology*, E.a.C. (Ed.), Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., Stanek, G. CABI International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 175-200.
- Krech, T., 2002. TBE foci in Switzerland. *Int. J. Med. Microbiol.*, 291 Suppl. 33: 30-3.
- Kuloglu, F., Rolain, J.M., Fournier, P.E., Akata, F., Tugrul, M., Raoult, D., 2004. First isolation of *Rickettsia conorii* from humans in the Trakya (European) region of Turkey. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 23(8): 609-14.
- Kumur, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M., 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schafer, S.M., Sewell, H.S., Brade, V., Kraiczy, P., 2002a. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato--the key role of host complement. *Trends Microbiol.*, 10(2): 74-9.
- Kurtenbach, K., De Michelis, S., Sewell, H.S., Etti, S., Schafer, S.M., Hails, R., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Hanincova, K., Labuda, M., Bormane, A., Donaghy, M., 2001. Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(10): 4926-9.

- Kurtenbach, K., Peacey, M., Rijpkema, S.G., Hoodless, A.N., Nuttall, P.A., Randolph, S.E., 1998a. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(4): 1169-74.
- Kurtenbach, K., Schafer, S.M., De Michelis, S., Etti, S., Sewell, H.S., 2002b. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the Vertebrate Host. In: *Lyme Borreliosis: Biology*, E.a.C. (Ed.), Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., Stanek, G. CABI International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 117-148.
- Kurtenbach, K., Sewell, H.S., Ogden, N.H., Randolph, S.E., Nuttall, P.A., 1998b. Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infect. Immun.*, 66(3): 1248-51.
- L'Hostis, M., Seegers, H., 2002. Tick-borne parasitic diseases in cattle: current knowledge and prospective risk analysis related to the ongoing evolution in French cattle farming systems. *Vet. Res.*, 33(5): 599-611.
- Labuda, M., Austyn, J.M., Zuffova, E., Kozuch, O., Fuchsberger, N., Lysy, J., Nuttall, P.A., 1996. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology*, 219(2): 357-66.
- Labuda, M., Danielova, V., Jones, L.D., Nuttall, P.A., 1993a. Amplification of tick-borne encephalitis virus infection during co-feeding of ticks. *Med. Vet. Entomol.*, 7(4): 339-42.
- Labuda, M., Jones, L.D., Williams, T., Nuttall, P.A., 1993b. Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Med. Vet. Entomol.*, 7(2): 193-6.
- Le Fleche, A., Postic, D., Girardet, K., Péter, O., Baranton, G., 1997. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47(4): 921-5.
- Lee, J.H., Park, H.S., Jang, W.J., Koh, S.E., Park, T.K., Kang, S.S., Kim, B.J., Kook, Y.H., Park, K.H., Lee, S.H., 2004. Identification of the *Coxiella* sp. detected from *Haemaphysalis longicornis* ticks in Korea. *Microbiol. Immunol.*, 48(2): 125-30.
- Liebisch, G., Finkbeiner-Weber, B., Liebisch, A., 1996. The infection with *Borrelia burgdorferi* s.l. in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and its ticks. *Parasitologia*, 38: 385.
- Lindgren, E., Gustafson, R., 2001. Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. *Lancet*, 358(9275): 16-8.
- Lindgren, E., Tälleklint, L., Polfeldt, T., 2000. Impact of climatic change on the northern latitude and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ. Health Perspect.*, 108(2): 119-23.
- Lunt, D.H., Zhang, D.X., Szymura, J.M., Hewitt, G.M., 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect. Mol. Biol.*, 5(3): 153-65.
- Marconi, R.T., Hohenberger, S., Jauris-Heipke, S., Schulte-Spechtel, U., LaVoie, C.P., Rossler, D., Wilske, B., 1999. Genetic analysis of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 strains associated with neuroborreliosis: evidence for extensive genetic homogeneity. *J. Clin. Microbiol.*, 37(12): 3965-70.
- Marrie, T.J., Schlech, W.F., 3rd, Williams, J.C., Yates, L., 1986. Q fever pneumonia associated with exposure to wild rabbits. *Lancet*, 1(8478): 427-9.
- Marti Ras, N., Postic, D., Foretz, M., Baranton, G., 1997. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, a bacterial species "made in the U.S.A."? *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47(4): 1112-7.
- Matsumoto, K., Parola, P., Brouqui, P., Raoult, D., 2004. *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma* ticks from Corsica. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 23(9): 732-4.

- Matuschka, F.R., Allgower, R., Spielman, A., Richter, D., 1999. Characteristics of garden dormice that contribute to their capacity as reservoirs for Lyme disease spirochetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(2): 707-11.
- Matuschka, F.R., Eiffert, H., Ohlenbusch, A., Spielman, A., 1994. Amplifying role of edible dormice in Lyme disease transmission in central Europe. *J. Infect. Dis.*, 170(1): 122-7.
- Matuschka, F.R., Endepols, S., Richter, D., Ohlenbusch, A., Eiffert, H., Spielman, A., 1996. Risk of urban Lyme disease enhanced by the presence of rats. *J. Infect. Dis.*, 174(5): 1108-11.
- Matuschka, F.R., Endepols, S., Richter, D., Spielman, A., 1997. Competence of urban rats as reservoir hosts for Lyme disease spirochetes. *J. Med. Entomol.*, 34(4): 489-93.
- Maurin, M., Raoult, D., 1999. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12(4): 518-53.
- Meer-Scherrer, L., Adelson, M., Mordechai, E., Lottaz, B., Tilton, R., 2004. *Babesia microti* infection in Europe. *Curr. Microbiol.*, 48(6): 435-7.
- Miserez, V., Gern, L., Aeschlimann, A., 1990. *Borrelia burgdorferi* in ticks of the Canton Tessin (Switzerland). *Parassitologia*, 32(2): 293-9.
- Misonne, M.C., Van Impe, G., Hoet, P.P., 1998. Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in Belgium. *J. Clin. Microbiol.*, 36(11): 3352-4.
- Miyamoto, K., Masuzawa, T., 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Japan and East Asia. In: Lyme Borreliosis: Biology, (Ed.), Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., Stanek, G. CABI International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 201-222.
- Morrison, T.B., Ma, Y., Weis, J.H., Weis, J.J., 1999. Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi*-infected mouse tissues by continuous fluorescent monitoring of PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 37(4): 987-92.
- Nadelman, R.B., Wormser, G.P., 1998. Lyme borreliosis. *Lancet*, 352(9127): 557-65.
- Nakao, M., Miyamoto, K., Fukunaga, M., 1994. Lyme disease spirochetes in Japan: enzootic transmission cycles in birds, rodents, and *Ixodes persulcatus* ticks. *J. Infect. Dis.*, 170(4): 878-82.
- Nilsson, K., Jaenson, T.G., Uhnoo, I., Lindquist, O., Pettersson, B., Uhlen, M., Friman, G., Pahlson, C., 1997. Characterization of a spotted fever group *Rickettsia* from *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. *J. Clin. Microbiol.*, 35(1): 243-7.
- Noda, H., Munderloh, U.G., Kurtti, T.J., 1997. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Appl Environ. Microbiol.*, 63(10): 3926-32.
- Norris, D.E., Klompen, J.S., Keirans, J.E., Black, W.C.t., 1996. Population genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S and 12S genes. *J. Med. Entomol.*, 33(1): 78-89.
- Nuttall, P.A., Jones, L.D., Labuda, M., Kaufman, W.R., 1994. Adaptations of arboviruses to ticks. *J. Med. Entomol.*, 31(1): 1-9.
- Nuttall, P.A., Labuda, M., 1994. Tick-borne encephalitis subgroup. In: Ecological Dynamics of Tick-Borne Zoonoses, (Ed.) Sonenshine D. E. Oxford Univ. Press, Oxford, UK.
- Nuttall, P.A., Labuda, M., 2003. Dynamics of infection in tick vectors and at the tick-host interface. *Adv. Virus Res.*, 60: 233-72.
- OFSP, 2000. Guide méthodologique des maladies transmissibles.
- Ohnishi, J., Piesman, J., de Silva, A.M., 2001. Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 98(2): 670-5.

- Olmeda, A.S., Armstrong, P.M., Rosenthal, B.M., Valladares, B., del Castillo, A., de Armas, F., Miguelez, M., Gonzalez, A., Rodriguez Rodriguez, J.A., Spielman, A., Telford, S.R., 3rd, 1997. A subtropical case of human babesiosis. *Acta Trop.*, 67(3): 229-34.
- Olsen, B., Jaenson, T.G., Noppa, L., Bunikis, J., Bergstrom, S., 1993. A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. *Nature*, 362(6418): 340-2.
- Pagodina, V.V., Bochkova, N.G., Koreshkova, G.V., 1981. Strain properties of the Aina/1448 serotype of the tick-borne encephalitis virus. *Vopr. Virusol.*, 6: 741-746.
- Pal, U., Yang, X., Chen, M., Bockenstedt, L.K., Anderson, J.F., Flavell, R.A., Norgard, M.V., Fikrig, E., 2004. OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *J. Clin. Invest.*, 113(2): 220-30.
- Parola, P., Beati, L., Cambon, M., Raoult, D., 1998. First isolation of *Rickettsia helvetica* from *Ixodes ricinus* ticks in France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 17(2): 95-100.
- Parola, P., Raoult, D., 2000. New Tick-Transmitted Rickettsial Diseases. In: Tickborne Infectious Diseases. Diagnosis and Management. (Ed.) B.A. Cunha. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Parola, P., Raoult, D., 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.*, 32(6): 897-928.
- Péter, O., 1981. Contribution à la connaissance de l'écologie de la "rickettsie suisse" transmise par la tique *Ixodes ricinus* L. 1758. PhD thesis Thesis, Faculty of Sciences, University of Neuchâtel, Neuchâtel, Switzerland.
- Péter, O., 2003. *Coxiella burnetii* - fièvre Q. *Caduceus Express*, 5(11).
- Péter, O., Bretz, A.G., Bee, D., 1995. Occurrence of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ixodid ticks of Valais, Switzerland. *Eur. J. Epidemiol.*, 11(4): 463-7.
- Péter, O., Burgdorfer, W., Aeschlimann, A., Chatelangat, P., 1984. *Rickettsia conorii* isolated from *Rhipicephalus sanguineus* introduced into Switzerland on a pet dog. *Z. Parasitenkd.*, 70: 265-270.
- Philip, C.B., 1959. Some epidemiological considerations in Rocky Mountain spotted fever. *Public Health Rep.*, 74(7): 595-600.
- Philip, C.B., Parker, R.R., 1933. Rocky Mountain spotted fever. Investigation of sexual transmission in the wood tick *Dermacentor andersoni*. *Public Health Rep.*, 48: 266-272.
- Picken, R.N., Cheng, Y., Strle, F., Picken, M.M., 1996. Patient isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities of strain 25015. *J. Infect. Dis.*, 174(5): 1112-5.
- Pietila, J., He, Q., Oksi, J., Viljanen, M.K., 2000. Rapid differentiation of *Borrelia garinii* from *Borrelia afzelii* and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by LightCycler fluorescence melting curve analysis of a PCR product of the *recA* gene. *J. Clin. Microbiol.*, 38(7): 2756-9.
- Postic, D., Korenberg, E., Gorelova, N., Kovalevski, Y.V., Bellenger, E., Baranton, G., 1997. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates. *Res. Microbiol.*, 148(8): 691-702.
- Postic, D., Ras, N.M., Lane, R.S., Henderson, M., Baranton, G., 1998. Expanded diversity among Californian borrelia isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J. Clin. Microbiol.*, 36(12): 3497-504.
- Pretzmann, G., Radda, A., Loew, J., 1967. Die Verteilung virustragender Zecken in Naturherden der Frühsommer-Meningoencephalitis. *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 203: 30-46.

- Punda-Polic, V., Petrovec, M., Trilar, T., Duh, D., Bradaric, N., Klismanic, Z., Avsic-Zupanc, T., 2002. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in ticks collected in southern Croatia. *Exp. Appl. Acarol.*, 28(1-4): 169-76.
- Qiu, W.G., Dykhuizen, D.E., Acosta, M.S., Luft, B.J., 2002. Geographic uniformity of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the Northeastern United States. *Genetics*, 160(3): 833-49.
- Quessada, T., Martial-Convert, F., Arnaud, S., Leudet De La Vallee, H., Gilot, B., 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(3): 165-73.
- Rampas, J., Gallia, F., 1949. Isolation of encephalitis virus from *Ixodes ricinus* ticks. *Cas. Lék. Cesk.*, 88: 1179-1180.
- Randolph, S.E., 2001. Tick-borne encephalitis in Europe. *Lancet*, 358(9294): 1731-2.
- Randolph, S.E., Miklisova, D., Lysy, J., Rogers, D.J., Labuda, M., 1999. Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus. *Parasitology*, 118 (Pt 2): 177-86.
- Raoult, D., Berbis, P., Roux, V., Xu, W., Maurin, M., 1997. A new tick-transmitted disease due to *Rickettsia slovaca*. *Lancet*, 350(9071): 112-3.
- Rauter, C., Oehme, R., Diterich, I., Engele, M., Hartung, T., 2002. Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 40(1): 36-43.
- Rehacek, J., 1987. Epidemiology and significance of Q fever in Czechoslovakia. *Zbl. Bakt. Mikrobiol Hyg [A]*, 267(1): 16-9.
- Rehacek, J., Kaaserer, B., Urvolgyi, J., Lukacova, M., Kovacova, E., Kocianova, E., 1994. Isolation of *Coxiella burnetii* and of an unknown rickettsial organism from *Ixodes ricinus* ticks collected in Austria. *Eur. J. Epidemiol.*, 10(6): 719-23.
- Rehacek, J., Urvolgyi, J., Kocianova, E., Sekeyova, Z., Vavrekova, M., Kovacova, E., 1991. Extensive examination of different tick species for infestation with *Coxiella burnetii* in Slovakia. *Eur. J. Epidemiol.*, 7(3): 299-303.
- Richter, D., Schlee, D.B., Allgower, R., Matuschka, F.R., 2004. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(11): 6414-9.
- Rosa, P.A., 1997. Microbiology of *Borrelia burgdorferi*. *Semin. Neurol.*, 17(1): 5-10.
- Roux, V., Drancourt, M., Raoult, D., 1992. Determination of genome sizes of *Rickettsia* spp. within the spotted fever group, using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Bacteriol.*, 174(22): 7455-7.
- Roux, V., Fournier, P.E., Raoult, D., 1996. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. *J. Clin. Microbiol.*, 34(9): 2058-65.
- Roux, V., Raoult, D., 1995. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. *Res. Microbiol.*, 146(5): 385-96.
- Roux, V., Rydkina, E., Eremeeva, M., Raoult, D., 1997. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47(2): 252-61.

- Rydkina, E., Roux, V., Rudakov, N., Gafarova, M., Tarasevich, I., Raoult, D., 1999. New Rickettsiae in ticks collected in territories of the former soviet union. *Emerg. Infect. Dis.*, 5(6): 811-4.
- Saint Girons, I., Gern, L., Gray, J.S., Guy, E.C., Korenberg, E., Nuttall, P.A., Rijpkema, S.G., Schonberg, A., Stanek, G., Postic, D., 1998. Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe. *Zentralbl. Bakteriol.*, 287(3): 190-5.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4): 406-25.
- Sarih, M., Jouda, F., Gern, L., Postic, D., 2003. First isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks in Morocco. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 3(3): 133-9.
- Schaarschmidt, D., Oehme, R., Kimmig, P., Hesch, R.D., Englisch, S., 2001. Detection and molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and in different patient samples from southwest Germany. *Eur. J. Epidemiol.*, 17(12): 1067-74.
- Schneider, B.S., Zeidner, N.S., Burkot, T.R., Maupin, G.O., Piesman, J., 2000. *Borrelia* isolates in Northern Colorado identified as *Borrelia bissettii*. *J. Clin. Microbiol.*, 38(8): 3103-5.
- Schouls, L.M., Van De Pol, I., Rijpkema, S.G., 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(7): 2215-22.
- Schrader, C., Suss, J., 1999. A nested RT-PCR for the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in natural foci. *Zentralbl. Bakteriol.*, 289(3): 319-28.
- Sekeyova, Z., Roux, V., Raoult, D., 2001. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51(Pt 4): 1353-60.
- Sharan, K.P., Krause, P.J., 2000. Babesiosis. In: *Tickborne Infectious Diseases. Diagnosis and Management.* (Ed.) B.A. Cunha. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Simmons, R.B., Weller, S.J., 2001. Utility and evolution of cytochrome b in insects. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 20(2): 196-210.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87(6): 651-701.
- Skotarczak, B., Cichocka, A., 2001. Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of *Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 8(2): 187-9.
- Skrabalo, Z., Deanovic, Z., 1957. Piroplasmiasis in man; report of a case. *Doc. Med. Geogr. Trop.*, 9(1): 11-6.
- Sonenshine, D.E., 1991a. *Biology of Ticks. Vol. 1.* Oxford University Press, Inc.
- Sonenshine, D.E., 1991b. *Biology of Ticks. Vol. 2.* Oxford University Press, Inc.
- Spitalska, E., Kocianova, E., 2003. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected in Slovakia and Hungary. *Eur. J. Epidemiol.*, 18(3): 263-6.
- Spyridaki, I., Psaroulaki, A., Loukaides, F., Antoniou, M., Hadjichristodolou, C., Tselentis, Y., 2002. Isolation of *Coxiella burnetii* by a centrifugation shell-vial assay from ticks collected in Cyprus: detection by nested polymerase chain reaction (PCR) and by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 66(1): 86-90.

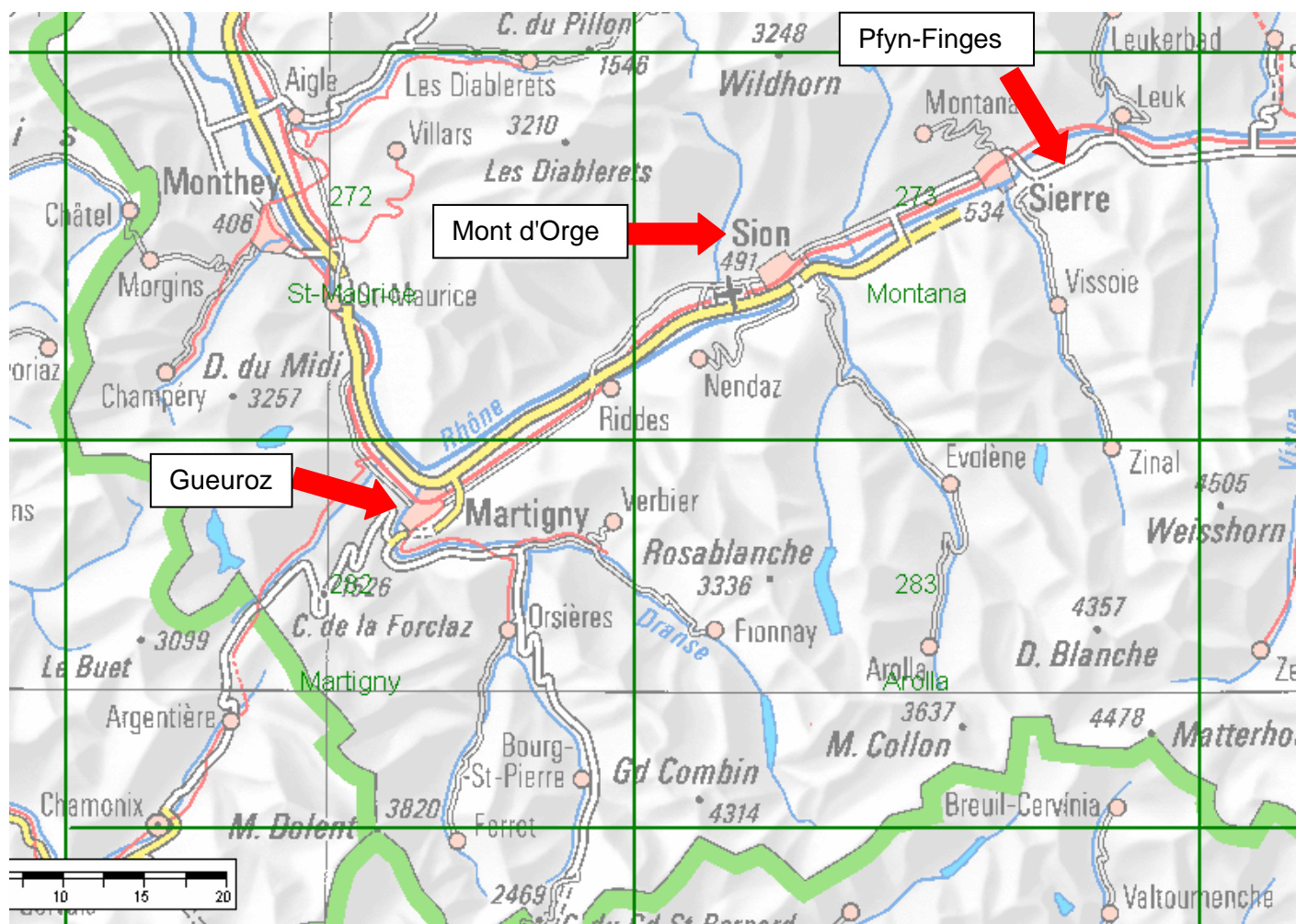
- Stanek, G., Strle, F., Gray, J., Wormser, G.P., 2002. History and Characteristics of Lyme Borreliosis. In: Lyme Borreliosis: Biology, E.a.C. (Ed.), Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., Stanek, G. CABI International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 1-28.
- Steere, A.C., 2001. Lyme disease. N. Engl. J. Med., 345(2): 115-25.
- Steere, A.C., Malawista, S.E., Hardin, J.A., Ruddy, S., Askenase, W., Andiman, W.A., 1977. *Erythema chronicum migrans* and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. Ann. Intern. Med., 86(6): 685-98.
- Stein, A., Saunders, N.A., Taylor, A.G., Raoult, D., 1993. Phylogenic homogeneity of *Coxiella burnetii* strains as determined by 16S ribosomal RNA sequencing. FEMS Microbiol. Lett., 113(3): 339-44.
- Stepanova-Tresova, G., Pet'ko, B., Stefancikova, A., Nadzamova, D., 2000. Occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* in the *Ixodes ricinus* ticks from Eastern Slovakia. Eur. J. Epidemiol., 16(2): 105-9.
- Stewart, P.E., Byram, R., Grimm, D., Tilly, K., Rosa, P.A., 2005. The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. Plasmid, 53(1): 1-13.
- Sting, R., Breitling, N., Oehme, R., Kimmig, P., 2004. The occurrence of *Coxiella burnetii* in sheep and ticks of the genus *Dermacentor* in Baden-Wuerttemberg. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr., 111(10): 390-4.
- Sutakova, G., Rehacek, J., 1990. Mixed infection of *Rickettsiella phytoseiuli* and *Coxiella burnetii* in *Dermacentor reticulatus* female ticks: electron microscope study. J. Invertebr. Pathol., 55(3): 407-16.
- Swofford, D.L., 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), version 4.0 b10., Sunderland, MA.
- Tälleklint, L., Jaenson, T.G., 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(6): 880-6.
- Tamura, A., Ohashi, N., Urakami, H., Miyamura, S., 1995. Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 45(3): 589-91.
- Tamura, K., 1992. The rate and pattern of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial DNA. Mol. Biol. Evol., 9(5): 814-25.
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol. Biol. Evol., 10(3): 512-26.
- Tarasevich, I.V., Makarova, V.A., Fetisova, N.F., Stepanov, A.V., Miskarova, E.D., Balayeva, N., Raoult, D., 1991. Astrakhan fever, a spotted-fever rickettsiosis. Lancet, 337(8734): 172-3.
- Taylor, M.F., McKechnie, S.W., Pierce, N., Kreitman, M., 1993. The lepidopteran mitochondrial control region: structure and evolution. Mol. Biol. Evol., 10(6): 1259-72.
- Tsai, T.F., Chandler, L.J., 2003. Arboviruses. In: Manual of Clinical Microbiology: 8th Edition. (Ed.) P.R. Murray, Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, M.C., Tenover, F.C. ASM Press, Washington, D.C, pp. 1553-1569.
- Tylewska-Wierzbanska, S., Kruszezka, D., Chmielewski, T., Zukowski, K., Zabicka, J., 1996. Ticks as a reservoir of *Borrelia burgdorferi* and *Coxiella burnetii* on Polish terrain. Przegl. Epidemiol., 50(3): 245-51.

- Walker, J.B., Keirans, J.E., Horak, I.G., 2000. The Genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae). A Guide to the Brown Ticks of the World. Cambridge University Press.
- Wang, G., van Dam, A.P., Dankert, J., 1999a. Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with Lyme borreliosis. J. Clin. Microbiol., 37(9): 3025-8.
- Wang, G., van Dam, A.P., Schwartz, I., Dankert, J., 1999b. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. Clin. Microbiol. Rev., 12(4): 633-53.
- Wang, I.N., Dykhuizen, D.E., Qiu, W., Dunn, J.J., Bosler, E.M., Luft, B.J., 1999c. Genetic diversity of *ospC* in a local population of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Genetics, 151(1): 15-30.
- Weisburg, W.G., Dobson, M.E., Samuel, J.E., Dasch, G.A., Mallavia, L.P., Baca, O., Mandelco, L., Sechrest, J.E., Weiss, E., Woese, C.R., 1989. Phylogenetic diversity of the *Rickettsiae*. J. Bacteriol., 171(8): 4202-6.
- Weiss, E., Moulder, J.W., 1984. Genus III. *Coxiella*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md, pp. 701-704.
- Weller, S.J., Baldridge, G.D., Munderloh, U.G., Noda, H., Simser, J., Kurtti, T.J., 1998. Phylogenetic placement of rickettsiae from the ticks *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis*. J. Clin. Microbiol., 36(5): 1305-17.
- Wilske, B., Jauris-Heipke, S., Lobentanzer, R., Pradel, I., Preac-Mursic, V., Rossler, D., Soutschek, E., Johnson, R.C., 1995. Phenotypic analysis of outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by monoclonal antibodies: relationship to genospecies and OspA serotype. J. Clin. Microbiol., 33(1): 103-9.
- Wilske, B., Preac-Mursic, V., Gobel, U.B., Graf, B., Jauris, S., Soutschek, E., Schwab, E., Zumstein, G., 1993. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. J. Clin. Microbiol., 31(2): 340-50.
- Wilske, B., Schriefer, M.E., 2003. *Borrelia*. In: Manual of Clinical Microbiology: 8th Edition. (Ed.) Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, M.C., Tenover, P.C. ASM Press, Washington, D.C., pp. 937-954.
- Wodecka, B., Skotarczak, B., 2005. First isolation of *Borrelia lusitaniae* DNA from *Ixodes ricinus* ticks in Poland. Scand. J. Infect. Dis., 37(1): 27-34.
- Xia, X., Xie, Z., 2001. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. J. Hered., 92(4): 371-3.
- Xu, G., Fang, Q.Q., Keirans, J.E., Durden, L.A., 2003. Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. J. Parasitol., 89(3): 452-7.
- Yang, X.F., Pal, U., Alani, S.M., Fikrig, E., Norgard, M.V., 2004. Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. J. Exp. Med., 199(5): 641-8.
- Yano, Y., Fujita, H., Takada, N., 2004. Ultrastructure of a Japanese Rickettsial strain genetically identified as *Rickettsia helvetica* which was originally found in Europe. Microbiol. Immunol., 48(7): 535-9.
- Younsi, H., Postic, D., Baranton, G., Bouattour, A., 2001. High prevalence of *Borrelia lusitaniae* in *Ixodes ricinus* ticks in Tunisia. Eur. J. Epidemiol., 17(1): 53-6.
- Younsi, H., Sarih, M., Jouda, F., Godfroid, E., Gern, L., Bouattour, A., Baranton, G., Postic, D., 2005. Characterization of *Borrelia lusitaniae* isolates collected in Tunisia and Morocco. J. Clin. Microbiol., 43(4): 1587-93.

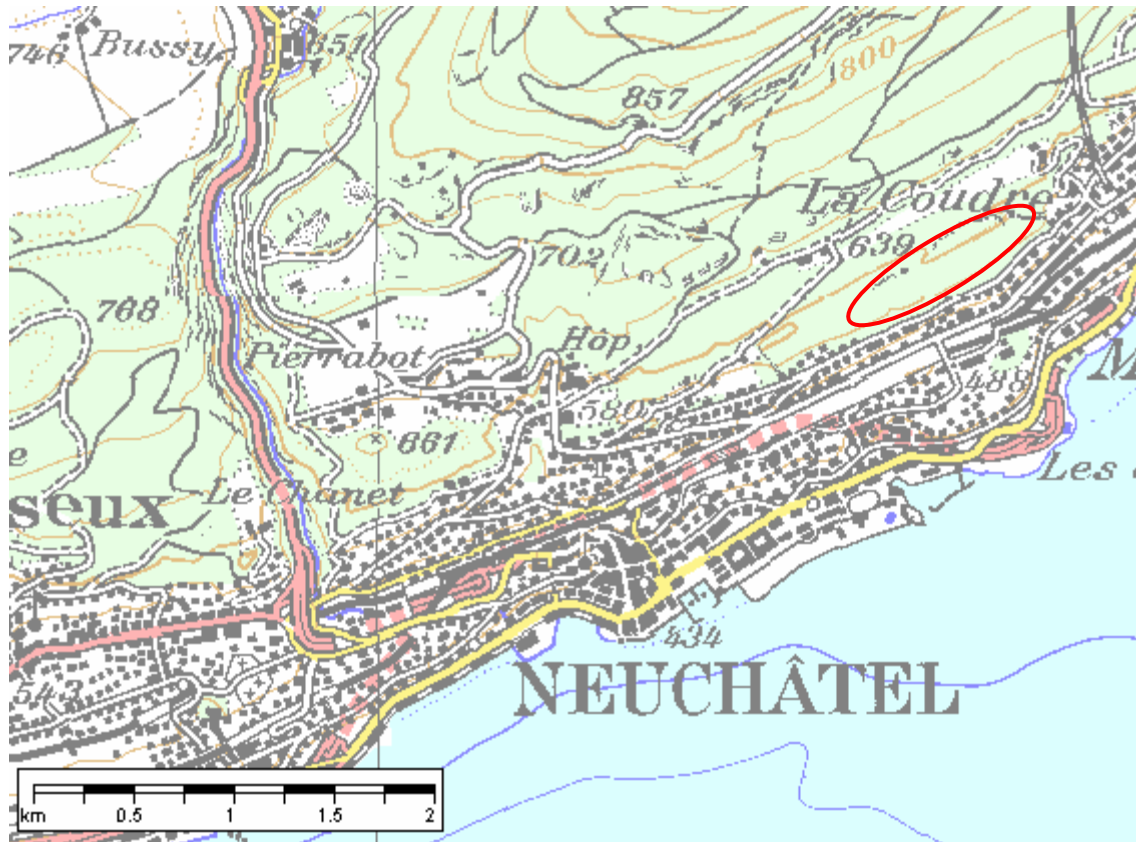
- Yousfi-Monod, R., Aeschlimann, A., 1986. Studies on ticks (Acarina, Ixodidae), parasites of cattle in West Algeria. I. Systematic survey and seasonal activity. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 61(3): 341-58.
- Zhioua, E., Bouattour, A., Hu, C.M., Gharbi, M., Aeschliman, A., Ginsberg, H.S., Gern, L., 1999. Infection of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in North Africa. *J. Med. Entomol.*, 36(2): 216-8.
- Zilber, L.A., Xoloviev, V.D., 1946. Far Eastern tick-borne spring-summer (spring) encephalities. *AM. Rev. Soviet. Med.*, (Special Suppl.): 80 pp.
- Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H.E., Taylor, S.M., Gray, J.S., 2003. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16(4): 622-36.

ANNEXES

ANNEXE 1: carte géographique du canton Valais. Les trois sites de récolte des tiques *I. ricinus* sont montrés par les flèches en rouge (Swiss Map 100).



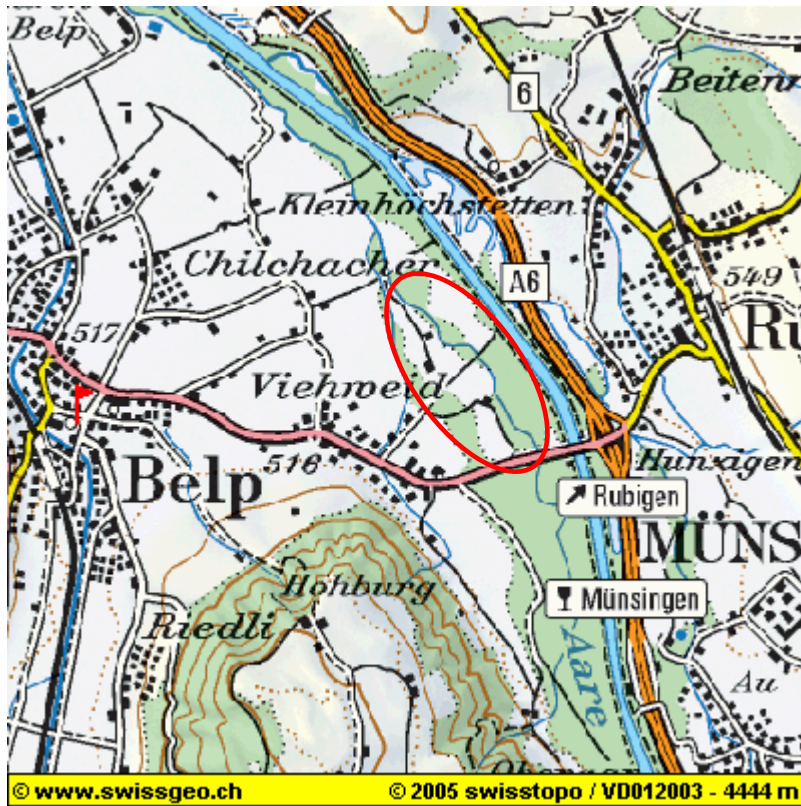
ANNEXE 2: carte géographique du canton de Neuchâtel. Le site de récolte des tiques *I. ricinus* est montré par le cercle en rouge (Swiss Map 100).



ANNEXE 3: carte géographique du canton de Zürich. Le site de récolte des tiques *I. ricinus* est montré par le cercle en rouge.



ANNEXE 4: carte géographique du canton de Bern. Le site de récolte des tiques *I. ricinus* est montré par le cercle en rouge.



ANNEXE 5: carte géographique de la Suède (www.europa-planet.com). Les sites de récolte des tiques *I. ricinus* sont montrés par les flèches en rouge: Stockholm et Småland.



ANNEXE 6: carte géographique de la Finlande (www.europa-planet.com). Les sites de récolte des tiques

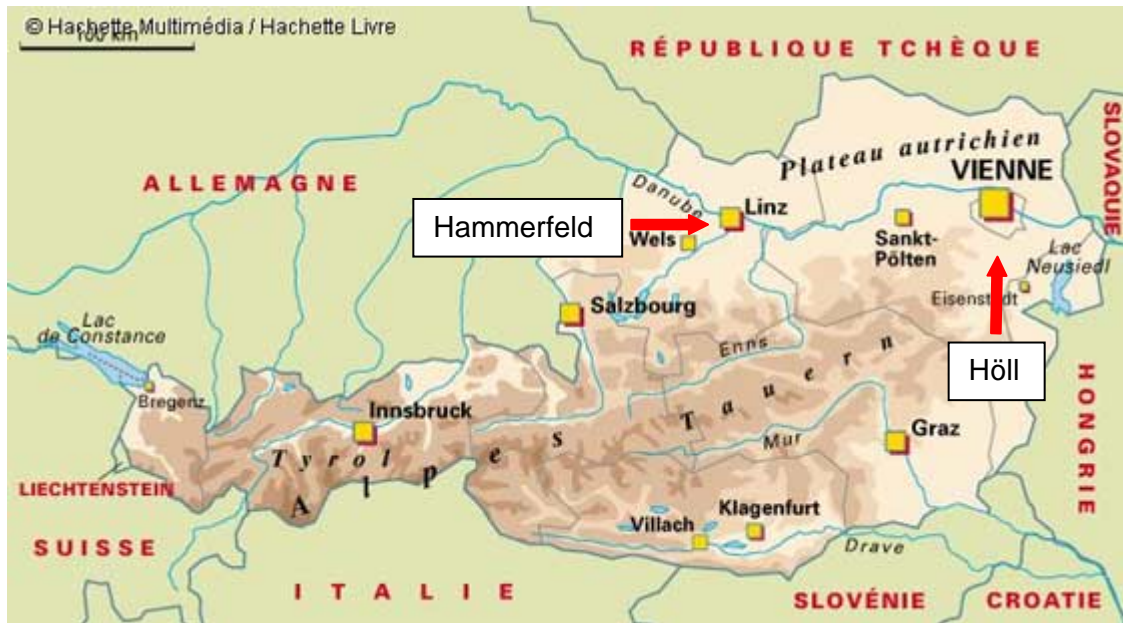
I. ricinus sont montrés par les flèches en rouge: Turku et Helsinki.



ANNEXE 7: carte géographique de la Danemark (www.europa-planet.com). Les sites de récolte des tiques *I. ricinus* sont montrés par les flèches en rouge: Aabelø, Sejerø et Teglstrup Hegn.



ANNEXE 8: carte géographique de l'Autriche (www.europa-planet.com). Les sites de récolte des tiques *I. ricinus* sont montrés par les flèches en rouge: Hammerfeld et Höll.



ANNEXE 9: carte géographique de l'Italie (www.europa-planet.com). Le site de récolte des tiques *I. ricinus* est montré par la flèche en rouge: Genova (Gênes).



ANNEXE 10: Description des primers utilisés dans cette étude.

Organisme	Gène	Fonction	Primers	Direction	Utilisé pour	Longueur du fragment (bp)	Référence																																																																																																																																																																																										
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>glTA</i>	Gène codant pour la citrate synthase: enzyme impliquée dans le cycle de Krebs (cycle du citrate)	Cs.Rp877p (5'-ggg ggc ctg ctc acg gcg g-3')	J	PCR/SEQ	380	(Roux et al., 1997)																																																																																																																																																																																										
			Cs.Rp1258n (5'-att gca aaa agt aca gtg aac a-3')	N	PCR/SEQ			<i>Rickettsia</i> sp.	<i>ompA</i>	Gène codant pour la protéine membranaire de surface OmpA	Rr 190.70p (5'-atg gcg aat att tct cca aaa-3')	J	PCR/SEQ	632	(Roux et al., 1996)	Rr190-701 (5'-gtt ccg tta atg gca gca tct-3')	N	PCR/SEQ	<i>Rickettsia</i> sp.	rDNA 16S	Gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal	fD1 (5'-aga gtt tga tcc tgg ctc ag-3')	J	PCR/SEQ	1484	(Weisburg et al., 1989)	rp2 (5'-acg gct acc ttg tta cga ctt-3')	N	PCR/SEQ	<i>Coxiella</i> sp.	rDNA 16S	Gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal	fD1 (5'-aga gtt tga tcc tgg ctc ag-3')	J	PCR/SEQ	1484	(Weisburg et al., 1989)	rp2 (5'-acg gct acc ttg tta cga ctt-3')	N	PCR/SEQ	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	<i>recA</i>	Gène codant pour une protéine recA impliquée dans le contrôle de la recombinaison	nTM17.F (5'-gtg gat cta ttg tat tag atg agc ctc tcg-3')	J	PCR/SEQ	162	(Morrison et al., 1999)	nTM17.R (5'-gcc aaa gtt ctg caa cat taa cac cta aag-3')	N	PCR/SEQ	<i>Babesia</i> sp.	rRNA 18S	Gène codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal	B1J (5'-gtc ttg taa ttg gaa tga tgg-3')	J	PCR/SEQ	411-452	(Casati et al., submitted-c)	B2N (5'-tag ttg atg gtt agg act acg-3')	N	PCR/SEQ	virus TBE	5' NCR et CR	NCR: région non codifiante CR: région codifiante pour la capsid (protéine structurale)	Pp1 (5'-gcg ttg gct tcg gac agc att agc-3')	J	RT-PCR	191	(Schrader et Suss, 1999)	Pm1 (5'-gc gtc ttc gtt gcg gtc tct ttc g-3')	N	RT-PCR	Pp2 (5'-tcg gac agc att agc agc ggt tgg-3')	J	Nested/SEQ	178	Pp2 (5'-tcg gac agc att agc agc ggt tgg-3')	N	Nested/SEQ	<i>Rhipicephalus</i> sp.	rDNA 12S	Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 12S de l'ARN ribosomal	T1B (5'-aaa cta gga tta gat ata ccc t-3')	N	PCR	338-339	(Beati et Keirans, 2001)	T2A (5'-aat gag agc gac ggg cga tgt-3')	J	PCR	RipSeqJ1 (5'-caa aaa att atg gcg g-3')	J	SEQ	309-311	(Bernasconi et al., 2002)	RipSeqN1 (5'-gta cat att tta gag ct-3')	N	SEQ	<i>I. ricinus</i>	rDNA 12S	Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 12S de l'ARN ribosomal	T1B (5'-aaa cta gga tta gat ata ccc t-3')	N	PCR	338-339	(Beati et Keirans, 2001)	T2A (5'-aat gag agc gac ggg cga tgt-3')	J	PCR	RipSeqJ1 (5'-caa aaa att atg gcg g-3')	J	SEQ	309-311	(Bernasconi et al., 2002)	RipSeqN1 (5'-gta cat att tta gag ct-3')	N	SEQ	<i>I. ricinus</i>	Control Region	Région non codifiante Origine de réplication de la mitochondrie	CR-IR-F 5'-cgg ctg gca caa gtt tcg-3'	J	PCR/SEQ	478-482	(Casati et al., submitted-a)	CR-IR-R 5'-gat aat cct tta ctc agg cat-3'	N	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>cytb</i>	Gène codant pour la sous-unité b de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	CB-J-10933 (5'-tat gtt tta cca tga ggt caa ata tc-3')	J	PCR/SEQ	336	(Simon et al., 1994) (modifié) (Casati et al., submitted-a)	CB-N-11270 (5'-gct ata tta aag tt tct gca tca-3')	N	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>COI</i>	Gène codant pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	C1-J-1484 (5'-tga gcc att tta ccg cga tg-3')	J	PCR/SEQ	1520	(Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Simon et al., 1994) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Simon et al., 1994) (modifié)	C1-J-1903 (5'-agc ttc cgt tga cat agc-3')	J	SEQ	C1-J-2183 (5'-caa cat tta ttt tga ttt ttt gg-3')	J	PCR/SEQ	C1-N-2309 (5'-tcc aat tgc taa tat agc-3')	N	PCR/SEQ	C1-J-2561 (5'-gcc aat tcg tca att gat att-3')	J	SEQ	C1-J-2678 (5'-cct tta ttt tta ata aat-3')	J	SEQ	C1-N-2678 (5'-att tat tcc aaa aaa taa agg-3')	N	PCR/SEQ	C1-J-2797 (5'-cca cga cga tac tca gat tat c-3')	J	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>COII</i>	Gène codant pour la sous-unité II de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	C2-N-3389 (5'-tca taa gat cay tat cat tg-3')	N	PCR/SEQ	771	(Simon et al., 1994) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (modifié)	C2-J-3571 (5'-aga tgt aat tca ctc atg a-3')	J	PCR/SEQ	C2-N-3661 (5'-cca caa att tct gaa cat tga cca-3')	N	PCR/SEQ	TK-N-3785 (5'-gtt taa gag acc att gct ta-3')	N	PCR/SEQ	TD-N-3862 (5'-aga atg aca ttc tct tgt tat-3')	N	PCR/SEQ				
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>ompA</i>	Gène codant pour la protéine membranaire de surface OmpA	Rr 190.70p (5'-atg gcg aat att tct cca aaa-3')	J	PCR/SEQ	632	(Roux et al., 1996)																																																																																																																																																																																										
			Rr190-701 (5'-gtt ccg tta atg gca gca tct-3')	N	PCR/SEQ			<i>Rickettsia</i> sp.	rDNA 16S	Gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal	fD1 (5'-aga gtt tga tcc tgg ctc ag-3')	J	PCR/SEQ	1484	(Weisburg et al., 1989)	rp2 (5'-acg gct acc ttg tta cga ctt-3')	N	PCR/SEQ	<i>Coxiella</i> sp.	rDNA 16S	Gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal	fD1 (5'-aga gtt tga tcc tgg ctc ag-3')	J	PCR/SEQ	1484	(Weisburg et al., 1989)	rp2 (5'-acg gct acc ttg tta cga ctt-3')	N	PCR/SEQ	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	<i>recA</i>	Gène codant pour une protéine recA impliquée dans le contrôle de la recombinaison	nTM17.F (5'-gtg gat cta ttg tat tag atg agc ctc tcg-3')	J	PCR/SEQ	162	(Morrison et al., 1999)	nTM17.R (5'-gcc aaa gtt ctg caa cat taa cac cta aag-3')	N	PCR/SEQ	<i>Babesia</i> sp.	rRNA 18S	Gène codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal	B1J (5'-gtc ttg taa ttg gaa tga tgg-3')	J	PCR/SEQ	411-452	(Casati et al., submitted-c)	B2N (5'-tag ttg atg gtt agg act acg-3')	N	PCR/SEQ	virus TBE	5' NCR et CR	NCR: région non codifiante CR: région codifiante pour la capsid (protéine structurale)	Pp1 (5'-gcg ttg gct tcg gac agc att agc-3')	J	RT-PCR	191	(Schrader et Suss, 1999)	Pm1 (5'-gc gtc ttc gtt gcg gtc tct ttc g-3')	N	RT-PCR				Pp2 (5'-tcg gac agc att agc agc ggt tgg-3')	J	Nested/SEQ	178		Pp2 (5'-tcg gac agc att agc agc ggt tgg-3')	N	Nested/SEQ	<i>Rhipicephalus</i> sp.	rDNA 12S	Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 12S de l'ARN ribosomal	T1B (5'-aaa cta gga tta gat ata ccc t-3')	N	PCR	338-339				(Beati et Keirans, 2001)	T2A (5'-aat gag agc gac ggg cga tgt-3')	J	PCR	RipSeqJ1 (5'-caa aaa att atg gcg g-3')	J	SEQ	309-311	(Bernasconi et al., 2002)	RipSeqN1 (5'-gta cat att tta gag ct-3')	N	SEQ	<i>I. ricinus</i>	rDNA 12S	Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 12S de l'ARN ribosomal	T1B (5'-aaa cta gga tta gat ata ccc t-3')				N	PCR	338-339	(Beati et Keirans, 2001)	T2A (5'-aat gag agc gac ggg cga tgt-3')	J	PCR	RipSeqJ1 (5'-caa aaa att atg gcg g-3')	J	SEQ	309-311	(Bernasconi et al., 2002)	RipSeqN1 (5'-gta cat att tta gag ct-3')	N	SEQ	<i>I. ricinus</i>	Control Region	Région non codifiante Origine de réplication de la mitochondrie	CR-IR-F 5'-cgg ctg gca caa gtt tcg-3'	J	PCR/SEQ	478-482	(Casati et al., submitted-a)	CR-IR-R 5'-gat aat cct tta ctc agg cat-3'	N	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>cytb</i>	Gène codant pour la sous-unité b de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	CB-J-10933 (5'-tat gtt tta cca tga ggt caa ata tc-3')	J	PCR/SEQ	336	(Simon et al., 1994) (modifié) (Casati et al., submitted-a)	CB-N-11270 (5'-gct ata tta aag tt tct gca tca-3')	N	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>				<i>COI</i>	Gène codant pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	C1-J-1484 (5'-tga gcc att tta ccg cga tg-3')			J	PCR/SEQ	1520	(Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Simon et al., 1994) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Simon et al., 1994) (modifié)	C1-J-1903 (5'-agc ttc cgt tga cat agc-3')	J	SEQ	C1-J-2183 (5'-caa cat tta ttt tga ttt ttt gg-3')	J	PCR/SEQ	C1-N-2309 (5'-tcc aat tgc taa tat agc-3')	N	PCR/SEQ	C1-J-2561 (5'-gcc aat tcg tca att gat att-3')	J	SEQ	C1-J-2678 (5'-cct tta ttt tta ata aat-3')	J	SEQ	C1-N-2678 (5'-att tat tcc aaa aaa taa agg-3')	N				PCR/SEQ	C1-J-2797 (5'-cca cga cga tac tca gat tat c-3')	J			PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>COII</i>	Gène codant pour la sous-unité II de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	C2-N-3389 (5'-tca taa gat cay tat cat tg-3')	N	PCR/SEQ	771	(Simon et al., 1994) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (modifié)	C2-J-3571 (5'-aga tgt aat tca ctc atg a-3')	J	PCR/SEQ	C2-N-3661 (5'-cca caa att tct gaa cat tga cca-3')	N	PCR/SEQ	TK-N-3785 (5'-gtt taa gag acc att gct ta-3')
<i>Rickettsia</i> sp.	rDNA 16S	Gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal	fD1 (5'-aga gtt tga tcc tgg ctc ag-3')	J	PCR/SEQ	1484	(Weisburg et al., 1989)																																																																																																																																																																																										
			rp2 (5'-acg gct acc ttg tta cga ctt-3')	N	PCR/SEQ			<i>Coxiella</i> sp.	rDNA 16S	Gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal	fD1 (5'-aga gtt tga tcc tgg ctc ag-3')	J	PCR/SEQ	1484	(Weisburg et al., 1989)	rp2 (5'-acg gct acc ttg tta cga ctt-3')	N	PCR/SEQ	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	<i>recA</i>	Gène codant pour une protéine recA impliquée dans le contrôle de la recombinaison	nTM17.F (5'-gtg gat cta ttg tat tag atg agc ctc tcg-3')	J	PCR/SEQ	162	(Morrison et al., 1999)	nTM17.R (5'-gcc aaa gtt ctg caa cat taa cac cta aag-3')	N	PCR/SEQ	<i>Babesia</i> sp.	rRNA 18S	Gène codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal	B1J (5'-gtc ttg taa ttg gaa tga tgg-3')	J	PCR/SEQ	411-452	(Casati et al., submitted-c)	B2N (5'-tag ttg atg gtt agg act acg-3')	N	PCR/SEQ	virus TBE	5' NCR et CR	NCR: région non codifiante CR: région codifiante pour la capsid (protéine structurale)	Pp1 (5'-gcg ttg gct tcg gac agc att agc-3')	J	RT-PCR	191	(Schrader et Suss, 1999)	Pm1 (5'-gc gtc ttc gtt gcg gtc tct ttc g-3')	N	RT-PCR				Pp2 (5'-tcg gac agc att agc agc ggt tgg-3')	J	Nested/SEQ	178		Pp2 (5'-tcg gac agc att agc agc ggt tgg-3')	N	Nested/SEQ	<i>Rhipicephalus</i> sp.	rDNA 12S	Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 12S de l'ARN ribosomal	T1B (5'-aaa cta gga tta gat ata ccc t-3')	N	PCR	338-339	(Beati et Keirans, 2001)	T2A (5'-aat gag agc gac ggg cga tgt-3')	J	PCR				RipSeqJ1 (5'-caa aaa att atg gcg g-3')	J	SEQ	309-311	(Bernasconi et al., 2002)	RipSeqN1 (5'-gta cat att tta gag ct-3')	N	SEQ	<i>I. ricinus</i>	rDNA 12S	Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 12S de l'ARN ribosomal	T1B (5'-aaa cta gga tta gat ata ccc t-3')	N	PCR	338-339	(Beati et Keirans, 2001)	T2A (5'-aat gag agc gac ggg cga tgt-3')	J	PCR				RipSeqJ1 (5'-caa aaa att atg gcg g-3')	J	SEQ	309-311	(Bernasconi et al., 2002)	RipSeqN1 (5'-gta cat att tta gag ct-3')	N	SEQ	<i>I. ricinus</i>	Control Region	Région non codifiante Origine de réplication de la mitochondrie	CR-IR-F 5'-cgg ctg gca caa gtt tcg-3'	J	PCR/SEQ	478-482	(Casati et al., submitted-a)	CR-IR-R 5'-gat aat cct tta ctc agg cat-3'	N	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>cytb</i>	Gène codant pour la sous-unité b de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	CB-J-10933 (5'-tat gtt tta cca tga ggt caa ata tc-3')	J	PCR/SEQ	336	(Simon et al., 1994) (modifié) (Casati et al., submitted-a)	CB-N-11270 (5'-gct ata tta aag tt tct gca tca-3')	N	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>COI</i>	Gène codant pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	C1-J-1484 (5'-tga gcc att tta ccg cga tg-3')	J	PCR/SEQ	1520	(Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Simon et al., 1994) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Simon et al., 1994) (modifié)	C1-J-1903 (5'-agc ttc cgt tga cat agc-3')	J	SEQ							C1-J-2183 (5'-caa cat tta ttt tga ttt ttt gg-3')			J	PCR/SEQ			C1-N-2309 (5'-tcc aat tgc taa tat agc-3')	N	PCR/SEQ	C1-J-2561 (5'-gcc aat tcg tca att gat att-3')	J	SEQ	C1-J-2678 (5'-cct tta ttt tta ata aat-3')	J	SEQ	C1-N-2678 (5'-att tat tcc aaa aaa taa agg-3')	N	PCR/SEQ	C1-J-2797 (5'-cca cga cga tac tca gat tat c-3')	J	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>COII</i>				Gène codant pour la sous-unité II de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	C2-N-3389 (5'-tca taa gat cay tat cat tg-3')	N			PCR/SEQ				771	(Simon et al., 1994) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (modifié)	C2-J-3571 (5'-aga tgt aat tca ctc atg a-3')			J	PCR/SEQ	C2-N-3661 (5'-cca caa att tct gaa cat tga cca-3')	N	PCR/SEQ	TK-N-3785 (5'-gtt taa gag acc att gct ta-3')	N
<i>Coxiella</i> sp.	rDNA 16S	Gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal	fD1 (5'-aga gtt tga tcc tgg ctc ag-3')	J	PCR/SEQ	1484	(Weisburg et al., 1989)																																																																																																																																																																																										
			rp2 (5'-acg gct acc ttg tta cga ctt-3')	N	PCR/SEQ			<i>B. burgdorferi</i> s.l.	<i>recA</i>	Gène codant pour une protéine recA impliquée dans le contrôle de la recombinaison	nTM17.F (5'-gtg gat cta ttg tat tag atg agc ctc tcg-3')	J	PCR/SEQ	162	(Morrison et al., 1999)	nTM17.R (5'-gcc aaa gtt ctg caa cat taa cac cta aag-3')	N	PCR/SEQ	<i>Babesia</i> sp.	rRNA 18S	Gène codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal	B1J (5'-gtc ttg taa ttg gaa tga tgg-3')	J	PCR/SEQ	411-452	(Casati et al., submitted-c)	B2N (5'-tag ttg atg gtt agg act acg-3')	N	PCR/SEQ	virus TBE	5' NCR et CR	NCR: région non codifiante CR: région codifiante pour la capsid (protéine structurale)	Pp1 (5'-gcg ttg gct tcg gac agc att agc-3')	J	RT-PCR	191	(Schrader et Suss, 1999)	Pm1 (5'-gc gtc ttc gtt gcg gtc tct ttc g-3')	N	RT-PCR				Pp2 (5'-tcg gac agc att agc agc ggt tgg-3')	J	Nested/SEQ	178		Pp2 (5'-tcg gac agc att agc agc ggt tgg-3')	N	Nested/SEQ	<i>Rhipicephalus</i> sp.	rDNA 12S	Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 12S de l'ARN ribosomal	T1B (5'-aaa cta gga tta gat ata ccc t-3')	N	PCR	338-339	(Beati et Keirans, 2001)	T2A (5'-aat gag agc gac ggg cga tgt-3')	J	PCR				RipSeqJ1 (5'-caa aaa att atg gcg g-3')	J	SEQ	309-311	(Bernasconi et al., 2002)	RipSeqN1 (5'-gta cat att tta gag ct-3')	N	SEQ	<i>I. ricinus</i>	rDNA 12S	Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 12S de l'ARN ribosomal	T1B (5'-aaa cta gga tta gat ata ccc t-3')	N	PCR	338-339	(Beati et Keirans, 2001)	T2A (5'-aat gag agc gac ggg cga tgt-3')	J	PCR				RipSeqJ1 (5'-caa aaa att atg gcg g-3')	J	SEQ	309-311	(Bernasconi et al., 2002)	RipSeqN1 (5'-gta cat att tta gag ct-3')	N	SEQ	<i>I. ricinus</i>	Control Region	Région non codifiante Origine de réplication de la mitochondrie	CR-IR-F 5'-cgg ctg gca caa gtt tcg-3'	J	PCR/SEQ	478-482	(Casati et al., submitted-a)	CR-IR-R 5'-gat aat cct tta ctc agg cat-3'	N	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>cytb</i>	Gène codant pour la sous-unité b de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	CB-J-10933 (5'-tat gtt tta cca tga ggt caa ata tc-3')	J	PCR/SEQ	336	(Simon et al., 1994) (modifié) (Casati et al., submitted-a)	CB-N-11270 (5'-gct ata tta aag tt tct gca tca-3')	N	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>COI</i>	Gène codant pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	C1-J-1484 (5'-tga gcc att tta ccg cga tg-3')	J	PCR/SEQ	1520	(Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Simon et al., 1994) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Simon et al., 1994) (modifié)	C1-J-1903 (5'-agc ttc cgt tga cat agc-3')	J	SEQ				C1-J-2183 (5'-caa cat tta ttt tga ttt ttt gg-3')	J	PCR/SEQ			C1-N-2309 (5'-tcc aat tgc taa tat agc-3')	N	PCR/SEQ							C1-J-2561 (5'-gcc aat tcg tca att gat att-3')			J	SEQ			C1-J-2678 (5'-cct tta ttt tta ata aat-3')	J	SEQ	C1-N-2678 (5'-att tat tcc aaa aaa taa agg-3')	N	PCR/SEQ	C1-J-2797 (5'-cca cga cga tac tca gat tat c-3')	J	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>COII</i>	Gène codant pour la sous-unité II de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	C2-N-3389 (5'-tca taa gat cay tat cat tg-3')	N	PCR/SEQ			771	(Simon et al., 1994) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (modifié)	C2-J-3571 (5'-aga tgt aat tca ctc atg a-3')		J	PCR/SEQ	C2-N-3661 (5'-cca caa att tct gaa cat tga cca-3')	N	PCR/SEQ						TK-N-3785 (5'-gtt taa gag acc att gct ta-3')			N	PCR/SEQ	TD-N-3862 (5'-aga atg aca ttc tct tgt tat-3')	N	PCR/SEQ		
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	<i>recA</i>	Gène codant pour une protéine recA impliquée dans le contrôle de la recombinaison	nTM17.F (5'-gtg gat cta ttg tat tag atg agc ctc tcg-3')	J	PCR/SEQ	162	(Morrison et al., 1999)																																																																																																																																																																																										
			nTM17.R (5'-gcc aaa gtt ctg caa cat taa cac cta aag-3')	N	PCR/SEQ			<i>Babesia</i> sp.	rRNA 18S	Gène codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal	B1J (5'-gtc ttg taa ttg gaa tga tgg-3')	J	PCR/SEQ	411-452	(Casati et al., submitted-c)	B2N (5'-tag ttg atg gtt agg act acg-3')	N	PCR/SEQ	virus TBE	5' NCR et CR	NCR: région non codifiante CR: région codifiante pour la capsid (protéine structurale)	Pp1 (5'-gcg ttg gct tcg gac agc att agc-3')	J	RT-PCR	191	(Schrader et Suss, 1999)	Pm1 (5'-gc gtc ttc gtt gcg gtc tct ttc g-3')	N	RT-PCR				Pp2 (5'-tcg gac agc att agc agc ggt tgg-3')	J	Nested/SEQ	178		Pp2 (5'-tcg gac agc att agc agc ggt tgg-3')	N	Nested/SEQ	<i>Rhipicephalus</i> sp.	rDNA 12S	Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 12S de l'ARN ribosomal	T1B (5'-aaa cta gga tta gat ata ccc t-3')	N	PCR	338-339	(Beati et Keirans, 2001)	T2A (5'-aat gag agc gac ggg cga tgt-3')	J	PCR				RipSeqJ1 (5'-caa aaa att atg gcg g-3')	J	SEQ	309-311	(Bernasconi et al., 2002)	RipSeqN1 (5'-gta cat att tta gag ct-3')	N	SEQ	<i>I. ricinus</i>	rDNA 12S	Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 12S de l'ARN ribosomal	T1B (5'-aaa cta gga tta gat ata ccc t-3')	N	PCR	338-339	(Beati et Keirans, 2001)	T2A (5'-aat gag agc gac ggg cga tgt-3')	J	PCR				RipSeqJ1 (5'-caa aaa att atg gcg g-3')	J	SEQ	309-311	(Bernasconi et al., 2002)	RipSeqN1 (5'-gta cat att tta gag ct-3')	N	SEQ	<i>I. ricinus</i>	Control Region	Région non codifiante Origine de réplication de la mitochondrie	CR-IR-F 5'-cgg ctg gca caa gtt tcg-3'	J	PCR/SEQ	478-482	(Casati et al., submitted-a)	CR-IR-R 5'-gat aat cct tta ctc agg cat-3'	N	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>cytb</i>	Gène codant pour la sous-unité b de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	CB-J-10933 (5'-tat gtt tta cca tga ggt caa ata tc-3')	J	PCR/SEQ	336	(Simon et al., 1994) (modifié) (Casati et al., submitted-a)	CB-N-11270 (5'-gct ata tta aag tt tct gca tca-3')	N	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>COI</i>	Gène codant pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	C1-J-1484 (5'-tga gcc att tta ccg cga tg-3')	J	PCR/SEQ	1520	(Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Simon et al., 1994) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Simon et al., 1994) (modifié)	C1-J-1903 (5'-agc ttc cgt tga cat agc-3')	J	SEQ				C1-J-2183 (5'-caa cat tta ttt tga ttt ttt gg-3')	J	PCR/SEQ			C1-N-2309 (5'-tcc aat tgc taa tat agc-3')	N	PCR/SEQ				C1-J-2561 (5'-gcc aat tcg tca att gat att-3')	J	SEQ			C1-J-2678 (5'-cct tta ttt tta ata aat-3')	J	SEQ		C1-N-2678 (5'-att tat tcc aaa aaa taa agg-3')	N	PCR/SEQ			C1-J-2797 (5'-cca cga cga tac tca gat tat c-3')	J	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>COII</i>			Gène codant pour la sous-unité II de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	C2-N-3389 (5'-tca taa gat cay tat cat tg-3')	N	PCR/SEQ	771	(Simon et al., 1994) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (modifié)	C2-J-3571 (5'-aga tgt aat tca ctc atg a-3')	J	PCR/SEQ				C2-N-3661 (5'-cca caa att tct gaa cat tga cca-3')	N	PCR/SEQ					TK-N-3785 (5'-gtt taa gag acc att gct ta-3')		N	PCR/SEQ	TD-N-3862 (5'-aga atg aca ttc tct tgt tat-3')	N	PCR/SEQ															
<i>Babesia</i> sp.	rRNA 18S	Gène codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal	B1J (5'-gtc ttg taa ttg gaa tga tgg-3')	J	PCR/SEQ	411-452	(Casati et al., submitted-c)																																																																																																																																																																																										
			B2N (5'-tag ttg atg gtt agg act acg-3')	N	PCR/SEQ			virus TBE	5' NCR et CR	NCR: région non codifiante CR: région codifiante pour la capsid (protéine structurale)	Pp1 (5'-gcg ttg gct tcg gac agc att agc-3')	J	RT-PCR	191	(Schrader et Suss, 1999)	Pm1 (5'-gc gtc ttc gtt gcg gtc tct ttc g-3')	N	RT-PCR				Pp2 (5'-tcg gac agc att agc agc ggt tgg-3')	J	Nested/SEQ	178		Pp2 (5'-tcg gac agc att agc agc ggt tgg-3')	N	Nested/SEQ	<i>Rhipicephalus</i> sp.	rDNA 12S	Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 12S de l'ARN ribosomal	T1B (5'-aaa cta gga tta gat ata ccc t-3')	N	PCR	338-339	(Beati et Keirans, 2001)	T2A (5'-aat gag agc gac ggg cga tgt-3')	J	PCR				RipSeqJ1 (5'-caa aaa att atg gcg g-3')	J	SEQ	309-311	(Bernasconi et al., 2002)	RipSeqN1 (5'-gta cat att tta gag ct-3')	N	SEQ	<i>I. ricinus</i>	rDNA 12S	Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 12S de l'ARN ribosomal	T1B (5'-aaa cta gga tta gat ata ccc t-3')	N	PCR	338-339	(Beati et Keirans, 2001)	T2A (5'-aat gag agc gac ggg cga tgt-3')	J	PCR				RipSeqJ1 (5'-caa aaa att atg gcg g-3')	J	SEQ	309-311	(Bernasconi et al., 2002)	RipSeqN1 (5'-gta cat att tta gag ct-3')	N	SEQ	<i>I. ricinus</i>	Control Region	Région non codifiante Origine de réplication de la mitochondrie	CR-IR-F 5'-cgg ctg gca caa gtt tcg-3'	J	PCR/SEQ	478-482	(Casati et al., submitted-a)	CR-IR-R 5'-gat aat cct tta ctc agg cat-3'	N	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>cytb</i>	Gène codant pour la sous-unité b de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	CB-J-10933 (5'-tat gtt tta cca tga ggt caa ata tc-3')	J	PCR/SEQ	336	(Simon et al., 1994) (modifié) (Casati et al., submitted-a)	CB-N-11270 (5'-gct ata tta aag tt tct gca tca-3')	N	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>COI</i>	Gène codant pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	C1-J-1484 (5'-tga gcc att tta ccg cga tg-3')	J	PCR/SEQ	1520	(Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Simon et al., 1994) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Simon et al., 1994) (modifié)	C1-J-1903 (5'-agc ttc cgt tga cat agc-3')	J	SEQ				C1-J-2183 (5'-caa cat tta ttt tga ttt ttt gg-3')	J	PCR/SEQ			C1-N-2309 (5'-tcc aat tgc taa tat agc-3')	N	PCR/SEQ				C1-J-2561 (5'-gcc aat tcg tca att gat att-3')	J	SEQ			C1-J-2678 (5'-cct tta ttt tta ata aat-3')	J	SEQ				C1-N-2678 (5'-att tat tcc aaa aaa taa agg-3')	N	PCR/SEQ			C1-J-2797 (5'-cca cga cga tac tca gat tat c-3')	J	PCR/SEQ	<i>I. ricinus</i>	<i>COII</i>	Gène codant pour la sous-unité II de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	C2-N-3389 (5'-tca taa gat cay tat cat tg-3')	N	PCR/SEQ	771	(Simon et al., 1994) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (modifié)	C2-J-3571 (5'-aga tgt aat tca ctc atg a-3')			J	PCR/SEQ		C2-N-3661 (5'-cca caa att tct gaa cat tga cca-3')	N	PCR/SEQ			TK-N-3785 (5'-gtt taa gag acc att gct ta-3')	N	PCR/SEQ				TD-N-3862 (5'-aga atg aca ttc tct tgt tat-3')	N	PCR/SEQ																										
virus TBE	5' NCR et CR	NCR: région non codifiante CR: région codifiante pour la capsid (protéine structurale)	Pp1 (5'-gcg ttg gct tcg gac agc att agc-3')	J	RT-PCR	191	(Schrader et Suss, 1999)																																																																																																																																																																																										
			Pm1 (5'-gc gtc ttc gtt gcg gtc tct ttc g-3')	N	RT-PCR																																																																																																																																																																																												
			Pp2 (5'-tcg gac agc att agc agc ggt tgg-3')	J	Nested/SEQ	178																																																																																																																																																																																											
			Pp2 (5'-tcg gac agc att agc agc ggt tgg-3')	N	Nested/SEQ																																																																																																																																																																																												
<i>Rhipicephalus</i> sp.	rDNA 12S	Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 12S de l'ARN ribosomal	T1B (5'-aaa cta gga tta gat ata ccc t-3')	N	PCR	338-339	(Beati et Keirans, 2001)																																																																																																																																																																																										
			T2A (5'-aat gag agc gac ggg cga tgt-3')	J	PCR																																																																																																																																																																																												
			RipSeqJ1 (5'-caa aaa att atg gcg g-3')	J	SEQ	309-311	(Bernasconi et al., 2002)																																																																																																																																																																																										
			RipSeqN1 (5'-gta cat att tta gag ct-3')	N	SEQ																																																																																																																																																																																												
<i>I. ricinus</i>	rDNA 12S	Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 12S de l'ARN ribosomal	T1B (5'-aaa cta gga tta gat ata ccc t-3')	N	PCR	338-339	(Beati et Keirans, 2001)																																																																																																																																																																																										
			T2A (5'-aat gag agc gac ggg cga tgt-3')	J	PCR																																																																																																																																																																																												
			RipSeqJ1 (5'-caa aaa att atg gcg g-3')	J	SEQ	309-311	(Bernasconi et al., 2002)																																																																																																																																																																																										
			RipSeqN1 (5'-gta cat att tta gag ct-3')	N	SEQ																																																																																																																																																																																												
<i>I. ricinus</i>	Control Region	Région non codifiante Origine de réplication de la mitochondrie	CR-IR-F 5'-cgg ctg gca caa gtt tcg-3'	J	PCR/SEQ	478-482	(Casati et al., submitted-a)																																																																																																																																																																																										
			CR-IR-R 5'-gat aat cct tta ctc agg cat-3'	N	PCR/SEQ																																																																																																																																																																																												
<i>I. ricinus</i>	<i>cytb</i>	Gène codant pour la sous-unité b de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	CB-J-10933 (5'-tat gtt tta cca tga ggt caa ata tc-3')	J	PCR/SEQ	336	(Simon et al., 1994) (modifié) (Casati et al., submitted-a)																																																																																																																																																																																										
			CB-N-11270 (5'-gct ata tta aag tt tct gca tca-3')	N	PCR/SEQ																																																																																																																																																																																												
<i>I. ricinus</i>	<i>COI</i>	Gène codant pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	C1-J-1484 (5'-tga gcc att tta ccg cga tg-3')	J	PCR/SEQ	1520	(Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Simon et al., 1994) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Casati et al., submitted-a) (Simon et al., 1994) (modifié)																																																																																																																																																																																										
			C1-J-1903 (5'-agc ttc cgt tga cat agc-3')	J	SEQ																																																																																																																																																																																												
			C1-J-2183 (5'-caa cat tta ttt tga ttt ttt gg-3')	J	PCR/SEQ																																																																																																																																																																																												
			C1-N-2309 (5'-tcc aat tgc taa tat agc-3')	N	PCR/SEQ																																																																																																																																																																																												
			C1-J-2561 (5'-gcc aat tcg tca att gat att-3')	J	SEQ																																																																																																																																																																																												
			C1-J-2678 (5'-cct tta ttt tta ata aat-3')	J	SEQ																																																																																																																																																																																												
			C1-N-2678 (5'-att tat tcc aaa aaa taa agg-3')	N	PCR/SEQ																																																																																																																																																																																												
			C1-J-2797 (5'-cca cga cga tac tca gat tat c-3')	J	PCR/SEQ																																																																																																																																																																																												
<i>I. ricinus</i>	<i>COII</i>	Gène codant pour la sous-unité II de la cytochrome oxydase: enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale	C2-N-3389 (5'-tca taa gat cay tat cat tg-3')	N	PCR/SEQ	771	(Simon et al., 1994) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (modifié) (Simon et al., 1994) (modifié)																																																																																																																																																																																										
			C2-J-3571 (5'-aga tgt aat tca ctc atg a-3')	J	PCR/SEQ																																																																																																																																																																																												
			C2-N-3661 (5'-cca caa att tct gaa cat tga cca-3')	N	PCR/SEQ																																																																																																																																																																																												
			TK-N-3785 (5'-gtt taa gag acc att gct ta-3')	N	PCR/SEQ																																																																																																																																																																																												
			TD-N-3862 (5'-aga atg aca ttc tct tgt tat-3')	N	PCR/SEQ																																																																																																																																																																																												

J= Major, N= Minor, SEQ= séquençage

ANNEXE 11: PCR pour l'étude de la structure génétique de la population de
R. sanguineus s.l. (Beati et Keirans, 2001).

Gène: rDNA 12S

Primers: T1B/T2A

Réactifs:

- Taq PCR Master mix Kit (Qiagen AG):
 - Taq DNA Polymerase 250U
 - Qiagen PCR Buffer 2X
 - MgCl₂ 3 mM
 - 400 µM de chaque dNTP
- H₂O : filtrée (0.22 µm) stérile

Mode opératoire:

Dans chaque tube de réaction pour un volume total de 50 µl:		Cycles d'amplification
Taq PCR Master mix	25 µl	• dénaturation initiale 5 min 94°C
Primer J (10 µM)	2 µl	• amplification (5 cycles):
Primer N (10 µM)	2 µl	dénaturation 15 sec 94°C
H ₂ O	16 µl	hybridation 30 sec 51°C
		extension 30 sec 68°C
échantillon à tester	5 µl ADN	• amplification (25 cycles):
contrôles négatifs	5 µl H ₂ O	dénaturation 15 sec 94°C
		hybridation 30 sec 53°C
		extension 30 sec 70°C
Les tubes ont été introduits dans l'appareil pour PCR (DNA Thermal Cycler, Applied Biosystems).		• extension 5 min 70°C
		• conservation 4°C

ANNEXE 12: PCR pour l'étude de la structure génétique de la population de *I. ricinus* s.s. (Casati et al., submitted-a; Simon et al., 1994).

Gènes: Control Region, *cytb*, rDNA12S, *COI* et *COII*.

Primers:

Gènes	Primers
rDNA 12S (voir annexe 11)	T1B/T2A
Control Region	CR-IR-F/CR-IR-R
<i>Cytb</i>	CB-J-10933/CB-N-11270
<i>COI</i>	C1-J-1484/C1-N-2678
	C1-J-2797/C2-N-3661
	C1-J-2183/C2-N-3389
	C1-J-2651/C2-N-3389
	C1-J-2561/C2-N-3661
<i>COII</i>	C2-J-3571/TK-N-3785
	C2-J-3571/TD-N-3862

Réactifs:

- Taq PCR Master mix Kit (Qiagen AG):
 - Taq DNA Polymerase 250U
 - Qiagen PCR Buffer 2X
 - MgCl₂ 3 mM
 - 400 µM de chaque dNTP
- H₂O : filtrée (0.22 µm) stérile

Mode opératoire:

Dans chaque tube de réaction pour un volume total de 50 µl:		Cycles d'amplification
Taq PCR Master mix)	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • dénaturation initiale 10 min 94°C • amplification (35 cycles): <ul style="list-style-type: none"> dénaturation 1 min 94°C hybridation 1 min 50°C extension 2 min 72°C • extension 5 min 72°C • conservation 4°C
Primer J (10 µM)	2 µl	
Primer N (10 µM)	2 µl	
H ₂ O	16 µl	
échantillon à tester	5 µl ADN	
contrôles négatifs	5 µl H ₂ O	
Les tubes ont été introduits dans l'appareil pour PCR (DNA Thermal Cycler, Applied Biosystems).		

ANNEXE 13: Réaction PCR pour la détection de *Rickettsia* sp. dans *R. sanguineus* s.l. (Roux et al., 1996; Roux et al., 1997; Weisburg et al., 1989).

Gènes: 1) *gltA*, 2) *ompA* et 3) rDNA 16S

Primers: 1) Cs.Rp877p/Cs.Rp1258n

2) Rr 190.70p /Rr190-701

3) fD1/rp2

Réactifs:

- Taq PCR Master mix Kit (Qiagen AG):
 - Taq DNA Polymerase 250U
 - Qiagen PCR Buffer 2X
 - MgCl₂ 3 mM
 - 400 µM de chaque dNTP
- H₂O : filtrée (0.22 µm) stérile

Mode opératoire:

1)

Dans chaque tube de réaction pour un volume total de 50 µl:		Cycles d'amplification
Taq PCR Master mix (Qiagen)	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • dénaturation initiale 2 min 95°C • amplification (40 cycles): <ul style="list-style-type: none"> dénaturation 30 sec 95°C hybridation 30 sec 55°C extension 55 sec 65°C • extension 3 min 72°C • conservation 4°C
Primer J (10 µM)	2 µl	
Primer N (10 µM)	2 µl	
H ₂ O	16 µl	
échantillons à tester	5 µl ADN	
contrôles négatifs	5 µl H ₂ O	
contrôles positifs	5 µl ADN <i>R. conorii</i>	
Les tubes ont été introduits dans l'appareil pour PCR (DNA Thermal Cyclers, Applied Biosystems).		

2)

Dans chaque tube de réaction pour un volume total de 50 µl:		Cycles d'amplification
Taq PCR Master mix (Qiagen)	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • dénaturation initiale 3 min 95°C • amplification (35 cycles): <ul style="list-style-type: none"> dénaturation 20 sec 95°C hybridation 30 sec 46°C extension 1 min 63°C • extension 7 min 72°C • conservation 4°C
Primer J (10 µM)	2 µl	
Primer N (10 µM)	2 µl	
H ₂ O	16 µl	
échantillons à tester	5 µl ADN	
contrôles négatifs	5 µl H ₂ O	
contrôles positifs	5 µl ADN <i>R. conorii</i>	
Les tubes ont été introduits dans l'appareil pour PCR (DNA Thermal Cycler, Applied Biosystems).		

3)

Dans chaque tube de réaction pour un volume total de 50 µl:		Cycles d'amplification
Taq PCR Master mix (Qiagen)	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • dénaturation initiale 5 min 95°C • amplification (35 cycles): <ul style="list-style-type: none"> dénaturation 1 min 95°C hybridation 1 min 55°C extension 2 min 72°C • extension 10 min 72°C • conservation 4°C
Primer J (10 µM)	2 µl	
Primer N (10 µM)	2 µl	
H ₂ O	16 µl	
échantillons à tester	5 µl ADN	
contrôles négatifs	5 µl H ₂ O	
contrôles positifs	5 µl ADN <i>R. conorii</i>	
Les tubes ont été introduits dans l'appareil pour PCR (DNA Thermal Cycler, Applied Biosystems).		

ANNEXE 14: Réaction PCR pour la détection de *Coxiella* sp. dans *R. sanguineus* s.l. (Weisburg et al., 1989).

Gène: rDNA 16S

Primers: fD1/rp2

Réactifs: voir annexe 13, 3)

Mode opératoire: voir annexe 13, 3)

ANNEXE 15: Réaction PCR pour la détection de *Borrelia burgdorferi* s.l. (Casati et al., 2004; Morrison et al., 1999; Pietila et al., 2000): 1) les souches de référence (SR)
2) chez *I. ricinus*

Gène: *recA*

Primers: nTM17.F/nTM17.R

1)

Réactifs:

- Taq PCR Master mix Kit (Qiagen AG):
 - Taq DNA Polymerase 250U
 - Qiagen PCR Buffer 2X
 - MgCl₂ 3 mM
 - 400 µM de chaque dNTP
- H₂O : filtrée (0.22 µm) stérile

Mode opératoire:

Dans chaque tube de réaction pour un volume total de 50 µl:		Cycles d'amplification
Taq PCR Master mix (Qiagen)	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • dénaturation initiale 10 min 94°C • amplification (35 cycles): <ul style="list-style-type: none"> dénaturation 1 min 94°C hybridation 1 min 50°C extension 2 min 72°C • extension 5 min 72°C • conservation 4°C
Primer J (10 µM)	2 µl	
Primer N (10 µM)	2 µl	
H ₂ O	16 µl	
échantillons à tester	5 µl ADN des SR	
contrôles négatifs	5 µl H ₂ O	
Les tubes ont été introduits dans l'appareil pour PCR (DNA Thermal Cycler, Applied Biosystems).		

2)

Réactifs:

- LightCycler (LC) FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche):
 - Light Cycler FastStart Enzyme
 - LightCycler FastStart Reaction mix SYBR Green I 10X (FastStart Taq DNA Polymerase, dNTP mix, SYBR Green I dye et 10 mM MgCl₂)
- H₂O : filtrée (0.22 µm) stérile

Dans chaque capillaire pour un volume total de 20 µl:	Cycles d'amplification
<p>LC FastStart mix (Roche) 2 µl</p> <p>Primer J (10 µM) 1.6 µl</p> <p>Primer N (10 µM) 1.6 µl</p> <p>MgCl₂ (Roche) 1.6 µl</p> <p>H₂O 11.2 µl</p> <p>échantillons à tester 2 µl ADN</p> <p>contrôles négatifs 2 µl H₂O</p> <p>contrôles positifs 2 µl <i>Ba/Bb/Bg/Bl/Bv</i></p> <p>Les capillaires ont été introduits dans l'appareil pour RT-PCR (LightCycler, Roche).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • dénaturation initiale 10 min 95°C • amplification (50 cycles): <ul style="list-style-type: none"> dénaturation 1 sec 95°C (20°C/sec) hybridation 5 sec 59°C (20°C/sec) extension 11 sec 72°C (20°C/sec) • melting curve (1 cycle) <ul style="list-style-type: none"> segment 1 0 sec 95°C (20°C/sec) segment 2 20 sec 55°C (20°C/sec) segment 3 0 sec 94°C (0.1°C/sec) • refroidissement 120 sec 40°C (20°C/sec)

ANNEXE 16: Détection du virus TBE par "nested RT-PCR" dans *I. ricinus* (Schrader et Suss, 1999):

- 1) RT-PCR
- 2) nested PCR

1) RT-PCR

Gènes: 5' NCR-CR

Primers: Pp1/Pm1

Réactifs:

- Tth DNA Polymerase (Roche):
 - Tth Polymerase 250U
 - PCR buffer 10X, inclus MgCl₂
 - Mn(OAc)₂ 25mM
- Protector Rnase Inhibitor 2000U (Roche)
- H₂O : RNase free (Fluka)
- Deoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade (Roche):
 - dATP 10 mM
 - dCTP 10 mM
 - dGTP 10 mM
 - dTTP 10 mM

Mode opératoire:

Dans chaque tube de réaction pour un volume total de 25 µl:		Cycles d'amplification
H ₂ O RNase-free	9.6 µl	<ul style="list-style-type: none"> • Transcription 45 min 60°C • dénaturation initiale 2 min 94°C • amplification (40 cycles): <ul style="list-style-type: none"> dénaturation 30 sec 94°C hybridation 30 sec 66°C extension 5 min 66°C conservation 4°C
5X RT-PCR Buffer	5 µl	
dNTP mix (2mM)	3.8 µl	
Mn(OAc) ₂ (25mM)	2.5 µl	
Rnase Inhibitor (40U/ul)	0.6 µl	
Primer J (50uM)	0.5 µl (25 pmol)	
Primer N (50uM)	0.5 µl (25 pmol)	
RTthDNA polymerase (5U/ul)	0.5 µl	
échantillons à tester	2 µl ARN	
contrôles négatifs	2 µl H ₂ O RNase free	
contrôles positifs	2 µl TBEV ARN	
Les tubes ont été introduits dans l'appareil pour PCR (DNA Thermal Cyclor, Applied Biosystems).		

- Après la réaction de RT-PCR, conserver les échantillons à 4 °C ou poursuivre avec la nested PCR.

2) nested PCR

Gènes: 5' NCR-CR

Primers: Pp2/Pm2

Réactifs:

- HotStart Taq DNA Polymerase and Q-Solution (Qiagen AG):
 - HotStarTaq DNA Polymerase 250U
 - PCR Buffer 10X
 - Q-Solution 5X
 - MgCl₂ 25 mM
- Deoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade (Roche):
 - dATP 10 mM
 - dCTP 10 mM
 - dGTP 10 mM
 - dTTP 10 mM
- H₂O : filtrée (0.22 µm) stérile

Mode opératoire:

Dans chaque tube de réaction pour un volume total de 50 µl:		Cycles d'amplification
H ₂ O	30.5 µl	<ul style="list-style-type: none"> • dénaturation initiale 15 min 95°C • amplification (40 cycles): <ul style="list-style-type: none"> dénaturation 30 sec 94°C hybridation 30 sec 66°C extension • extension 5 min 66°C • conservation 4°C
Buffer 10x	5 µl	
Q-Solution 5x	10 µl	
dNTP mix (10mM)	1 µl	
Primer J	1 µl	
Primer N	1 µl	
HotStart Taq	0.5 µl	
échantillons à tester	1 µl RT-PCR produit	
contrôles négatifs	1 µl H ₂ O	
contrôles positifs	1 µl RT-PCR contrôle positif	
Les tubes ont été introduits dans l'appareil pour PCR (DNA Thermal Cycler, Applied Biosystems).		

ANNEXE 17: Réaction PCR pour la détection de *Babesia* sp. dans *I. ricinus* (Casati et al., submitted-c).

Gène: rDNA 18S

Primers: B1J/B2N

Réactifs:

- Taq PCR Master mix Kit (Qiagen AG):
 - Taq DNA Polymerase 250U
 - Qiagen PCR Buffer 2X
 - MgCl₂ 3 mM
 - 400 µM de chaque dNTP
- H₂O : filtrée (0.22 µm) stérile

Mode opératoire:

Dans chaque tube de réaction pour un volume total de 50 µl:		Cycles d'amplification
Taq PCR Master mix (Qiagen)	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • dénaturation initiale 10 min 94°C • amplification (35 cycles): <ul style="list-style-type: none"> dénaturation 1 min 95°C hybridation 1 min 55°C extension 2 min 72°C • extension 5 min 72°C • conservation 4°C
Primer J (10 µM)	2 µl	
Primer N (10 µM)	2 µl	
H ₂ O	16 µl	
échantillons à tester	5 µl ADN	
contrôles négatifs	5 µl H ₂ O	
contrôles positifs	5 µl ADN <i>B. divergens</i>	
Les tubes ont été introduits dans l'appareil pour PCR (DNA Thermal Cycler, Applied Biosystems).		

ANNEXE 18: Electrophorèse: solutions et tampons

• **EDTA (0.5 mM, pH 8.0)**

Na₂EDTA.2H₂O (Fluka) 18.61 g

H₂O dém. 40 ml

Ajuster le pH à 8.0

H₂O dém., volume ajusté à 100 ml

Stériliser 15' à 120°C

Conserver à température ambiante

• **TBE10X**

Tris base (Fluka) 108 g

Acide borique (Fluka) 55 g

EDTA (0.5M, pH 8.0) 40 ml

H₂O dém., volume ajusté à 1000 ml

Stériliser 15' à 120°C

Conserver à température ambiante

• **Loading Buffer (10X)**

SDS (Sigma) 1%

Bleu de bromothymol (Merck) 0.25%

Xylène Cyanole (Sigma) 0.25%

Ficoll type 400 en H₂O (Pharmacia Biotech) 25.00%

Conserver à 4°C

• **Bromure d'éthidium (EtBr, 10mg/ml)**

EtBr (Sigma) 0.20 g

H₂O mst. 200 ml

Dissoudre longuement sur agitateur magnétique

Conserver à 4°C à l'abri de la lumière

ANNEXE 19: Réaction de séquençage

Primers: voir annexe 10

Réactifs:

- ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
 - BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing
 - BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Buffer (5X)
- H₂O : filtrée (0.22 µm) stérile

Mode opératoire:

Dans chaque tube de réaction pour un volume total de 15 µl:		Cycles d'amplification
Big Dye Terminator RR Mix	2 µl	<ul style="list-style-type: none"> • Polymérisation (25 cycles): <ul style="list-style-type: none"> 10 sec 96°C 5 sec 50°C 4 min 60°C • Conservation 4°C
Buffer 5X	3 µl	
Primer J ou N (1µM)	3 µl	
H ₂ O	5 µl	
Produit PCR purifié	2 µl	
Les tubes ont été introduits dans l'appareil pour PCR (DNA Thermal Cyclers, Applied Biosystems).		

ANNEXE 20: Températures (en dixièmes de degré) enregistrées par la station météorologique du Tessin (Centro Meteorologico Locarno Monti, Fosco Spinedi, communication personnelle) chaque mois (I à XII) depuis 1901 au 2004. La dernière colonne montre la température moyenne annuelle (<T>).

ANS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	<T>
1901	23	-3	53	112	156	207	206	206	173	116	62	33	112
1902	41	38	80	129	131	179	219	200	166	109	56	41	116
1903	11	55	90	95	143	174	203	204	171	122	76	32	115
1904	32	42	69	129	172	202	228	219	159	130	67	35	124
1905	19	44	80	118	135	186	229	198	173	90	65	44	115
1906	29	39	75	108	155	207	214	222	173	135	77	32	122
1907	27	32	75	107	156	195	200	213	178	129	76	42	119
1908	28	59	60	97	170	198	204	197	161	128	65	34	117
1909	18	22	47	132	155	170	200	201	159	125	63	47	112
1910	42	45	79	104	141	192	189	196	161	123	55	54	115
1911	30	41	72	113	153	178	228	228	184	111	76	46	122
1912	42	56	92	106	167	184	202	173	138	104	51	31	112
1913	32	42	79	106	152	198	194	199	158	120	92	48	118
1914	15	55	81	132	141	178	194	197	169	109	64	39	114
1915	21	21	71	106	164	195	203	200	152	106	53	55	112
1916	49	39	59	120	158	168	203	203	152	116	73	38	115
1917	25	18	58	93	160	200	205	193	186	100	69	23	111
1918	32	54	73	97	161	178	213	203	176	106	64	41	116
1919	35	35	75	107	162	213	187	223	182	96	47	36	116
1920	55	62	97	114	183	192	207	192	168	120	58	41	124
1921	62	47	93	108	162	204	231	205	181	145	60	48	129
1922	28	44	86	102	178	198	201	206	149	108	65	32	116
1923	32	54	91	110	158	175	227	219	162	132	80	41	123
1924	20	43	74	125	169	196	214	181	168	119	74	45	119
1925	46	49	55	111	148	209	201	200	152	125	73	20	116
1926	22	59	91	123	140	177	212	211	198	126	96	57	126
1927	43	37	79	131	167	191	209	198	168	125	85	44	123
1928	40	66	75	117	134	194	247	222	172	117	81	34	125
1929	6	-1	84	102	160	207	223	206	199	126	77	56	120
1930	31	35	84	113	140	199	198	199	174	114	85	41	118
1931	29	34	63	107	159	212	200	188	143	121	79	30	114
1932	44	11	57	93	141	179	195	222	189	110	78	51	114
1933	21	38	77	127	152	167	219	217	174	122	54	18	115
1934	25	56	71	117	169	189	221	189	182	113	58	52	120
1935	22	54	76	107	128	207	222	196	170	121	76	19	116
1936	36	39	82	104	152	188	192	202	165	93	62	44	113
1937	25	60	51	116	161	195	211	205	161	114	67	24	116
1938	25	40	115	104	129	202	203	199	159	119	79	22	116
1939	28	62	55	119	124	182	194	191	160	107	81	26	111
1940	5	31	70	111	153	175	194	201	172	111	77	2	108
1941	13	32	71	94	122	191	209	188	164	113	55	38	108
1942	-1	21	84	108	155	189	213	200	181	142	64	39	116
1943	19	62	89	138	162	196	211	229	180	134	65	47	128
1944	46	32	68	128	157	185	207	220	162	104	54	22	115
1945	-9	47	105	139	166	212	243	203	177	126	60	39	126
1946	13	64	78	134	140	176	223	199	182	116	61	22	117
1947	-2	18	67	137	167	206	222	218	187	123	81	32	121

ANS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	<T>
1948	37	46	116	117	153	186	194	197	169	128	82	30	121
1949	43	59	64	144	140	200	222	213	188	144	70	38	127
1950	25	50	98	100	161	208	235	206	164	129	62	25	122
1951	37	37	58	107	138	184	208	195	182	108	78	47	115
1952	18	40	77	129	159	204	232	205	142	107	53	27	116
1953	20	37	93	124	178	170	207	207	174	129	69	58	122
1954	16	20	76	108	147	185	196	182	171	118	73	56	112
1955	39	35	61	131	150	182	208	195	171	118	63	50	117
1956	32	-12	64	95	166	176	201	194	171	109	67	43	109
1957	27	52	95	118	132	177	209	191	168	126	81	31	117
1958	28	61	54	91	173	182	209	204	179	121	83	35	118
1959	32	64	97	118	158	196	226	204	173	118	64	44	124
1960	30	31	76	124	166	191	191	191	150	103	72	38	114
1961	13	69	111	137	149	193	201	210	200	126	66	43	126
1962	43	45	49	113	146	190	210	224	172	129	58	20	117
1963	-3	14	68	113	152	175	215	189	168	122	83	28	110
1964	19	55	64	119	171	199	221	202	177	114	83	38	122
1965	38	30	72	122	154	193	200	195	139	119	64	40	114
1966	15	63	83	124	163	194	192	188	182	132	48	37	118
1967	29	39	95	111	150	185	222	200	162	130	74	37	120
1968	28	39	86	122	141	181	205	181	159	131	72	27	114
1969	26	17	67	107	159	176	216	200	170	135	70	22	114
1970	24	36	60	99	144	194	209	204	182	116	76	28	114
1971	18	54	49	125	148	172	219	214	166	126	68	55	118
1972	26	50	84	113	143	174	209	197	133	113	72	34	112
1973	32	50	81	96	155	194	203	217	185	117	73	29	119
1974	52	48	81	110	153	180	215	216	165	84	66	72	120
1975	48	51	61	119	146	180	216	208	177	115	61	46	119
1976	54	57	72	116	172	215	225	192	149	116	70	32	123
1977	21	48	91	112	137	175	199	181	159	132	76	41	114
1978	29	23	81	97	132	179	201	198	179	128	74	34	114
1979	14	47	71	100	160	195	212	195	174	122	69	52	118
1980	21	61	71	108	131	175	193	219	187	120	64	37	116
1981	29	39	92	128	145	201	201	216	173	117	74	28	120
1982	34	36	70	122	162	205	226	199	187	109	78	50	123
1983	60	20	87	101	132	197	237	214	179	133	71	39	122
1984	32	32	68	112	111	187	225	201	153	122	81	54	115
1985	-6	45	59	122	147	181	227	209	191	138	50	59	118
1986	30	9	72	84	173	197	214	208	175	142	87	47	120
1987	21	35	53	127	145	174	214	204	196	117	79	50	118
1988	41	50	81	126	153	182	219	214	176	136	54	60	124
1989	47	65	111	94	166	187	220	218	178	137	70	43	128
1990	36	78	120	112	173	187	223	224	180	133	70	22	130
1991	32	30	98	111	145	186	238	242	197	113	65	42	125
1992	32	63	90	116	172	172	217	234	171	105	89	39	125
1993	47	52	88	121	162	198	206	220	158	109	63	48	123
1994	47	39	124	116	154	202	241	232	168	120	99	57	133
1995	30	68	77	128	161	181	235	210	149	146	78	40	125
1996	41	35	68	131	156	211	207	203	153	128	81	42	121
1997	42	69	123	129	164	181	208	223	195	136	72	49	132
1998	36	79	94	100	166	197	224	222	164	120	58	37	125
1999	42	39	89	122	173	186	221	208	181	127	70	32	124
2000	36	66	101	115	171	207	200	216	182	128	67	52	128

ANS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	<T>
2001	31	66	92	114	174	191	212	221	152	148	76	27	125
2002	28	64	107	125	149	212	204	200	164	130	92	50	127
2003	38	24	104	121	181	248	238	253	178	110	74	45	135
2004	44	79	134	185	207	219	211	148	117	78	50	32	125