

**ETUDE SEROEPIDEMIOLOGIQUE
DE L'ENCEPHALITE A TIQUES
ET DE LA
BORRELIOSSE DE LYME
EN SUISSE**

THESE

Présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel
pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences

par

FLORIANE DE MARVAL
Licenciée en Biologie

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Etude séroépidémiologique de l'encéphalite
à tiques et de la borréliose de Lyme en
Suisse

de Mlle Floriane de Marval

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

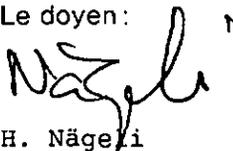
La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel
sur le rapport des membres du jury,

Mmes et MM. A. Aeschlimann, L. Gern, P. Nuttall
(Oxford), P.-A. Raeber (Berne) et M. Kremer
(Strasbourg)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 25 mai 1994

Le doyen:



H.-H. Nägeli

TABLE DES MATIERES

	Page
I. <u>INTRODUCTION</u>	<u>1</u>
I.1. Généralités.....	1
I.2. L'encéphalite à tiques.....	1
I.2.1. Définition et systématique.....	2
I.2.2. Manifestations cliniques.....	4
I.2.3. Traitement, prévention.....	4
I.2.4. Historique.....	5
I.2.5. Distribution géographique.....	5
I.2.6. Cycle épidémiologique.....	6
I.2.6.1. Vecteurs.....	6
I.2.6.2. Hôtes et réservoirs.....	7
I.2.6.3. Modes de transmission particuliers.....	9
I.2.7. L'encéphalite à tiques en Suisse.....	10
I.3. La borréliose de Lyme.....	11
I.3.1. Définition et systématique.....	11
I.3.2. Manifestations cliniques.....	12
I.3.3. Traitement, prévention.....	13
I.3.4. Historique.....	13
I.3.5. Distribution géographique.....	15
I.3.6. Cycle épidémiologique.....	15
I.3.6.1. Vecteurs.....	15
I.3.6.2. Hôtes et réservoirs en Europe.....	16
I.2.6.3. Modes de transmission particuliers.....	17
I.3.7. La borréliose de Lyme en Suisse.....	18
I.4. <i>Ixodes ricinus</i>	18
I.4.1. Systématique.....	18
I.4.2. Répartition géographique.....	19
I.4.3. Cycle épidémiologique.....	19
I.4.4. Importance médicale et vétérinaire.....	20

II.	<u>CONTEXTE ET BUTS DU TRAVAIL</u>	21
II.1.	Recherche d'une méthode permettant de visualiser le virus CEE directement dans la tique, sans devoir recourir à l'infection de petits rongeurs.....	21
II.2.	Mise à jour de la distribution géographique des foyers d'encéphalite à tiques.	21
II.3.	Evaluation du risque comparé d'entrer en contact avec le virus CEE et/ou <i>B. burgdorferi</i>	22
II.4.	Etablissement d'un centre de diagnostic-conseil pour l'encéphalite à tiques à l'Institut de Zoologie de Neuchâtel.....	22
III.	<u>MISE EN OEUVRE DE L'ETUDE</u>	23
IV.	<u>MATERIEL ET METHODES</u>	25
IV.1.	Analyse des cas déclarés d'encéphalite à tiques et choix de la zone d'investigations.....	26
IV.2.	Choix des populations humaines et obtention des échantillons de sang.....	26
IV.2.1.	Collectes de sang auprès du personnel forestier et des cantonniers.....	27
IV.2.2.	Collectes auprès des donateurs de sang.....	27
IV.2.3.	Echantillons de sang en provenance des patients d'hôpitaux.....	28
IV.2.4.	Collectes de sang auprès des militaires dans le cadre des Ecoles de recrues (ER).....	28
IV.3.	Choix et capture des populations de tiques.....	29
IV.3.1.	Capture et conservation des tiques en phase de quête.....	29
IV.3.2.	Capture et conservation des tiques en cours de gorgement.....	30
IV.4.	Analyse des échantillons de sang.....	30
IV.4.1.	ELISA.....	30
IV.4.1.1.	ELISA pour la détection des anticorps de classe IgG dirigés contre le virus CEE.....	31

IV.4.1.2.	ELISA pour la détection des anticorps de classe IgM dirigés contre le virus CEE.....	32
IV.4.1.3.	ELISA pour la détection des anticorps de classe IgG dirigés contre <i>B. burgdorferi</i>	32
IV.4.2.	Test de capture (ELISA-Capture) pour la détection des anticorps de classe IgM dirigés contre <i>B. burgdorferi</i>	33
IV.4.3.	Test de Western blot pour la détection des anticorps de classe IgG dirigés contre <i>B. burgdorferi</i>	34
IV.4.4.	Immunofluorescence indirecte (IFAT: Immunofluorescence antibody test) pour la détection des anticorps de classe IgG dirigés contre <i>B. burgdorferi</i>	35
IV.5.	Analyse des tiques	35
IV.5.1.	Préparation des homogénats de tiques.....	35
IV.5.2.	Préparation des tiques sur lames de microscopie ("squashes").....	36
IV.5.3.	Immunofluorescence (IF).....	36
IV.5.3.1.	Immunofluorescence indirecte sur "squash" (IF/S) pour la détection du virus CEE.....	36
IV.5.3.2.	Immunofluorescence directe sur "squash" (IF/S) pour la détection de <i>B. burgdorferi</i>	37
IV.5.3.3.	Immunofluorescence indirecte sur cultures de cellules (IF/C) pour la détection du virus CEE ..	38
IV.5.4.	Titration du virus CEE sur cultures cellulaires ("Plaque assay").....	39
IV.5.5.	PCR	39
IV.5.5.1.	PCR pour la détection du virus CEE.....	40
IV.5.5.2.	PCR pour la détection de <i>B. burgdorferi</i>	41
IV.5.6.	ELISA pour la détection du virus CEE.....	43
IV.5.7.	Infection de souriceaux pour la détection du virus CEE....	44
V.	RECHERCHE D'UNE METHODE DE DETECTION DU VIRUS CEE DANS LA TIQUE	45
V.1.	Comparaison de la fiabilité des méthodes testées.....	45
V.2.	Comparaison du pouvoir de détection des méthodes testées	49
V.3.	Discussion	52

VI. CAS CLINIQUES D'ENCEPHALITE A TIQUES DECLARES A L'OFSP DE 1984 A 1992	55
VI.1. Apparition saisonnière des cas (diagnostic sûr).....	55
VI.2. Age, sexe et activités "à risque" (diagnostic sûr).....	57
VI.3. Origine géographique des piqûres infectieuses (tous cas confondus).....	60
VI.4. Dynamique des foyers (tous cas confondus).....	62
VI.5. Discussion	65
VII. FORESTIERS, DONNEURS DE SANG ET PATIENTS D'HOPITAUX	71
VII.1. Personnes ayant des contacts réguliers d'au moins 1/2-heure par semaine avec la forêt, dans le cadre de leur travail	71
VII.1.1. Résultats sérologiques.....	72
VII.1.2. Anamnèse et symptômes de borréliose ou d'encéphalite à tiques.....	73
VII.1.3. Sérologies anti- <i>B burgdorferi</i>	74
VII.1.3.1. Séroprévalence et âge	74
VII.1.3.2. Séroprévalence et piqûres de tiques.....	76
VII.1.3.3. Séroprévalence et durée de travail en forêt.....	77
VII.1.4. Sérologies anti-virus CEE.....	79
VII.1.5. Piqûres de tiques et durée de travail en forêt.....	80
VII.2. Personnes ayant des contacts réguliers d'au moins 1/2-heure par semaine avec la forêt, pour les loisirs	81
VII.3. Personnes n'ayant pas de contacts réguliers avec la forêt	82
VII.3.1. Sérologies anti- <i>B. burgdorferi</i>	82
VII.3.2. Sérologies anti-virus CEE.....	82
VII.4. Donneurs de sang (centres de transfusion de la Croix-Rouge) et patients d'hôpitaux.....	83
VII.4.1. Donneurs de sang auprès des Centres de transfusion.....	83
VII.4.1.1. Sérologies anti- <i>B. burgdorferi</i>	83
VII.4.1.2. Sérologies anti-virus CEE.....	86
VII.4.1.3. Caractéristiques des donateurs de sang des Grisons.....	87

VII.4.2. Patients de l'hôpital de La Béroche/NE (envois du Dr Laperrouza).....	88
VII.4.2.1. Sérologies anti- <i>B. burgdorferi</i>	88
VII.4.2.2. Sérologies anti-virus CEE.....	89
VII.4.3. Patients de l'Ospedale civico de Lugano.....	89
VII.4.3.1. Sérologies anti- <i>B. burgdorferi</i>	90
VII.4.3.2. Sérologies anti-virus CEE.....	90
VII.4.4. Patients des cliniques de neurologie de Bâle, Zürich, Berne et Lausanne.....	90
VII.4.4.1. Sérologies anti- <i>B. burgdorferi</i>	91
VII.4.4.2. Sérologies anti-virus CEE.....	92
VII.5. Discussion.....	93
VII.5.1. Séroprévalences vis-à-vis de <i>B. burgdorferi</i>	93
VII.5.2. Séroprévalences vis-à-vis du virus CEE.....	97
VIII. MILITAIRES DANS LE CADRE DES ECOLES DE RECRUES.....	99
VIII.1. Nombre et origine des piqures de tiques.....	99
VIII.2. Analyse virologique et bactériologique des tiques.....	102
VIII.3. Analyses sérologiques.....	105
VIII.3.1. Militaires n'ayant participé qu'à la première prise de sang.....	106
VIII.3.1.1. <i>B. burgdorferi</i>	106
VIII.3.1.2. Virus CEE.....	106
VIII.3.2. Militaires ayant participé à deux prises de sang.....	106
VIII.3.2.1. <i>B. burgdorferi</i>	109
VIII.3.2.2. Virus CEE.....	111
VIII.3.3. Evolution sérologique des recrues piquées par des tiques infectées par <i>B. burgdorferi</i> ou le virus CEE.....	112
VIII.3.4. Troisième prise de sang: évolution sérologique sur un an des militaires piqués par une tique infectée.....	113
VIII.4. Méthodes d'extraction de la tique.....	117
VIII.5. Discussion.....	119

IX.	RECHERCHE DU VIRUS CEE DANS DES TIQUES CAPTUREES EN PHASE DE QUETE	125
IX.1.	Origine des tiques et résultats d'analyses.....	126
IX.2.	Description et analyse des foyers.....	130
IX.2.1.	Simmental/BE.....	130
IX.2.2.	Belpberg/BE.....	134
IX.2.3.	Santenberg/LU.....	136
IX.3.	Discussion.....	139
X.	DISCUSSION GENERALE	141
X.1.	Recherche d'une méthode de détection du virus CEE dans la tique et établissement d'un centre de diagnostic-conseil pour l'encéphalite à tiques à l'Institut de Zoologie de Neuchâtel.....	141
X.2.	Mise en évidence de nouveaux foyers naturels d'encéphalite à tiques.....	142
X.3.	Estimation du risque comparé d'entrer en contact avec <i>B. burgdorferi</i> ou le virus CEE: considérations sur le fonctionnement des foyers.....	144
XI.	CONCLUSIONS	148
XI.1.	Mise au point d'une méthode de détection du virus CEE directement dans la tique.....	148
XI.2.	Répartition géographique des foyers naturels d'encéphalite à tiques.....	149
XI.3.	Risque comparé d'entrer en contact avec <i>B. burgdorferi</i> et/ou le virus CEE.....	149
XI.4.	Etablissement d'un centre de diagnostic-conseil à l'Institut de Zoologie de Neuchâtel.....	150

RESUME..... 152

REMERCIEMENTS..... 155

BIBLIOGRAPHIE..... 157

ANNEXE 1

ANNEXES 2-1 et 2-2

ANNEXE 3

ANNEXE 4

ANNEXE 5

I. INTRODUCTION

1.1. GENERALITES

L'encéphalite à tiques verno-estivale d'Europe centrale (couramment abrégée FSME en Suisse, d'après sa dénomination en allemand: Frühsommer Meningoenzephalitis), est une atteinte cérébrale due au variant européen du virus TBE. Bien que grave, c'est en Suisse une affection rare ayant exceptionnellement une issue fatale.

La borréliose de Lyme est une maladie systémique due à une bactérie, *Borrelia burgdorferi* Johnson *et al.* Beaucoup plus fréquente que l'encéphalite à tiques, elle se manifeste cliniquement par des atteintes cutanées, rhumatologiques, neurologiques, voire cardiaques.

Les deux agents pathogènes sont transmis à l'homme principalement par le même vecteur: *Ixodes ricinus* (L.). Cette tique, la plus commune de Suisse, abonde dans toutes les forêts de feuillus situées en-dessous de 1'000 m. d'altitude. Peu exigeante quant au choix de ses hôtes, elle pique facilement l'homme, qui peut ainsi être infecté par les microorganismes qu'elle transporte. Toute personne fréquentant les milieux forestiers, régulièrement ou non, s'expose au risque potentiel de contracter l'une ou l'autre de ces maladies.

Le présent travail vise à apporter une contribution à l'actualisation et à la compréhension de l'épidémiologie de l'encéphalite à tiques et de la borréliose de Lyme en Suisse.

1.2. L'ENCEPHALITE A TIQUES

L'encéphalite à tiques est considérée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme l'une des plus importantes arboviroses d'Europe [315]. Sur le plan des affections du système nerveux central d'origine virale, elle arrive en Suisse en quatrième position après les infections à Picornavirus, virus ouïlien et Varicella-zoster [163].

I.2.1. DÉFINITION ET SYSTÉMATIQUE

"Encéphalite à tiques" est un terme désignant une entité clinique, un ensemble de symptômes neurologiques ayant pour cause une infection par un *Flavivirus* transmis lors d'une piqûre de tique.

Les virus faisant intervenir dans leur cycle des arthropodes vecteurs sont regroupés sous le terme général d'*Arbovirus*. Les arbovirus sont définis par l'OMS comme des "virus qui subsistent dans la nature essentiellement ou en grande partie grâce à la transmission biologique entre hôtes vertébrés sensibles par des arthropodes hématophages; ils se multiplient et provoquent une virémie chez le vertébré, prolifèrent dans les tissus de l'arthropode et sont transmis à un nouveau vertébré par l'arthropode piqueur après une période d'incubation extrinsèque" [314].

Sur plus de 500 *Arbovirus* catalogués, 68 appartiennent au genre *Flavivirus* (famille des *Flaviviridae*). 18 d'entre eux sont considérés comme étant transmis par des tiques [141].

Les *Flavivirus* sont des particules sphériques de 40-50 nm de diamètre. Leur génome consiste en une molécule monocaténaire d'acide ribonucléique (ARN) de polarité positive et de poids moléculaire (PM) de 4×10^6 ($\approx 10,5$ kb). Il est protégé par une capsid de nature protéique de 25-30 nm de diamètre. La nucléocapsid est entourée d'une enveloppe lipoprotéique de 35-45 nm ornée de péplomères ("spikes") de 5-10 nm, formant un halo continu visible sur certaines préparations [78, 323].

3 polypeptides de structure ont été mis en évidence: la glycoprotéine E (enveloppe) de PM 51'000-59'000, la protéine C (core) de PM 13-16'000 (ces deux protéines E et C, associées à des lipides, constituant l'enveloppe), et une protéine M (membrane-like) de PM 7'000-9'000 [78, 323]. Dans les particules virales intracellulaires, la protéine M est remplacée par un précurseur, la protéine preM, de PM 20-24'000 [78]. Heinz et Kunz [120] ont déterminé, pour divers isolats européens du virus TBE, des poids moléculaires respectifs de 55'000 (E), 15'000 (C) et 6'500-7'500 (M). La glycoprotéine E est le plus important déterminant antigénique viral induisant la réponse immunitaire [120, 323].

La réplication de l'ARN viral a lieu dans la région périnucléaire de la cellule-hôte; la maturation s'effectue dans des vésicules intracytoplasmiques. La production virale dure 3-4 jours et n'interrompt pas la synthèse d'ARN et de protéines de la cellule infectée [78, 219, 323].

Les virus responsables d'encéphalites à tiques sont classés dans un sous-groupe antigénique du genre *Flavivirus*, le "complexe TBE" (de tick-borne encephalitis). La plupart des 12 virus et sous-types viraux de ce complexe

[78] sont connus pour occasionner des encéphalites chez l'homme, certaines de ces affections évoluant par ailleurs en formes hémorragiques.

En Europe, on rencontre trois formes d'encéphalite liées à des piqûres de tiques:

- l'encéphalite d'Europe centrale (CEE), objet du présent travail, est due au variant européen du virus TBE. C'est une maladie typiquement biphasique, de pronostic généralement favorable; son taux de mortalité dépasse rarement 1% [126, 134, 282, 315], bien que le chiffre de 4,6 % ait été atteint lors d'une épidémie survenue en Autriche [106]. Son aire de répartition recouvre toute l'Europe à l'exception du Portugal, de l'Espagne, du Bénélux et des Iles britanniques; son principal vecteur est *I. ricinus*.
- l'encéphalite verno-estivale russe (RSSE) s'étend de l'ouest de la Russie au Kamtchatka et au nord de la Chine [117]. De type monophasique, c'est une affection sévère, dont le taux de mortalité peut atteindre 30-38% lors de certaines épidémies [230, cité par 37]. Les séquelles sont courantes [115] et la maladie peut évoluer en des formes chroniques [247]. Son agent étiologique, le variant extrême-oriental du virus TBE, est véhiculé par plusieurs espèces de tiques, la plus importante étant *I. persulcatus*.

L'aire de répartition des deux variants du virus TBE recouvre celle de leurs principaux vecteurs. Ainsi, on peut observer, dans les zones marquant la limite de répartition d'*I. ricinus* et *I. persulcatus*, des foyers de CEE et de RSSE à faible distance les uns des autres [115].

- le Louping Ill, dû au virus du même nom (LI) se trouve essentiellement en Grande-Bretagne, en Irlande et en Ecosse, où il est connu depuis des siècles [63]. De récentes études ont en outre démontré l'existence d'une forme semblable de maladie en Espagne, en Bulgarie, en Turquie et en Norvège [136, 264]. Transmis par *I. ricinus*, qui semble être son unique vecteur, il affecte essentiellement le mouton. Il peut cependant provoquer de graves épidémies chez le lagopède d'Ecosse (*Lagopus lagopus scoticus*), avec une mortalité proche de 80 % [263]. Chez l'homme, ce virus ne provoque généralement qu'une encéphalite légère, de type biphasique. Les cas d'infection sont rares et concernent surtout les bergers et le personnel de laboratoire manipulant le virus [63].

Par commodité, et bien qu'il n'ait pas de statut spécifique, nous désignerons dans ce travail le virus responsable de l'encéphalite à tiques d'Europe centrale par le terme "virus CEE".

I.2.2. MANIFESTATIONS CLINIQUES

La description des symptômes de l'encéphalite à tiques varie légèrement d'un auteur à l'autre. Nous présentons ci-dessous une synthèse de diverses publications [13, 106, 162, 163, 282, 293, 329].

L'encéphalite à tiques se déroule en deux phases distinctes:

La **phase primaire** débute 1-30 jours (généralement 1-2 semaines) après la piqûre. Elle se manifeste par un mal-être général évoquant une affection grippale, et une fièvre ne dépassant pas 39 °C. Elle correspond à la phase virémique de la maladie [152]. Les symptômes disparaissent spontanément après 1-7 jours. La maladie évolue alors le plus souvent vers une guérison définitive.

La **phase secondaire** se développe dans 5-30% des cas d'infection (en Suisse: moins de 10% [197, 329]). Elle survient après une phase intermédiaire asymptomatique d'une durée de 1-12 jours (généralement 1 semaine) et correspond à l'invasion du système nerveux central par le virus. Elle prend la forme d'une méningite, méningoencéphalite, méningoencéphalomyélite, méningoradiculonévrite ou radiculomyélite, et occasionne, selon la forme de l'atteinte, une fièvre élevée (jusqu'à 42 °C), des vomissements, des paralysies (localisées le plus souvent dans les membres supérieurs et les épaules), une photophobie, des troubles du sommeil, des symptômes psychiatriques (délires, psychoses), des difficultés respiratoires ou des atteintes neurologiques diverses pouvant entraîner un coma, voire la mort. Des formes épileptiques ont également été décrites [107, 163, 315]. D'une manière générale, la maladie est d'autant plus sévère que le patient est âgé, surtout à partir de 60 ans [27, 126, 163, 266]. Selon le type d'atteinte (méningite, méningoencéphalite, etc), les symptômes peuvent durer quelques jours à plusieurs semaines, et la convalescence plusieurs mois [134, 162, 163]. Des troubles résiduels tels que maux de tête ou de dos, paralysies, vertiges, faiblesses, problèmes sensoriels, peuvent persister quelques mois, voire des années [134, 163].

I.2.3. TRAITEMENT, PRÉVENTION

Le traitement de l'encéphalite à tiques est purement symptomatique. Une protection individuelle peut être assurée par le recours à la vaccination. Le produit disponible en Suisse confère une immunité proche de 100% après 3 injections intramusculaires échelonnées sur 10 mois [18]; un rappel est ensuite nécessaire tous les 3 ans. Une protection postexpositionnelle ou pour un séjour de courte durée dans une région à risque peut être apportée par

l'administration d'immunoglobulines (60-70% de protection) [18]. Selon le producteur, cette sérothérapie peut être administrée jusqu'à 96 heures après la piqûre de tique; néanmoins, l'Office fédéral de la santé publique (OFSP) recommande de ne pas dépasser le délai de 48 heures, l'efficacité d'une administration tardive n'étant pas démontrée de manière convaincante [224].

On considère que le fait d'avoir été en contact avec le virus, avec ou sans développement de la seconde phase de la maladie, confère une immunité définitive [40].

I.2.4. HISTORIQUE

L'encéphalite à tiques a été reconnue comme maladie bien définie à la suite d'épidémies survenues en Sibérie au début des années 1930, dans des chantiers de défrichage [115]. Des recherches entreprises dès 1937 permirent d'isoler le virus responsable à partir du sang de patients et de tiques de l'espèce *I. persulcatus* [337].

La forme occidentale de la maladie est connue depuis 1927 au moins en Autriche [284]. C'est Schneider qui, en décrivant en 1931 une maladie survenant régulièrement, au début de l'été, dans le district de Neunkirchen (sud de Vienne), donna à ce syndrome une entité propre. Il ne put cependant en élucider l'étiologie et il fallut attendre 1957 pour que Moritsch et Krausler, en isolant le virus à partir d'un patient, soient en mesure de prouver que l'affection décrite en Autriche était une encéphalite à tiques [208].

Mais c'est aux chercheurs tchécoslovaques que l'on doit la reconnaissance de l'agent étiologique et de l'épidémiologie de l'encéphalite à tiques d'Europe centrale: en 1948, des cas cliniques de cette maladie furent décrits chez des habitants du centre de la Bohême [123]; le virus CEE fut isolé la même année à partir du sang d'un patient et d'*I. ricinus* [81, 255].

I.2.5. DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE

Actuellement, la présence du virus CEE, attestée par des cas cliniques de maladie, des sérologies positives ou des isollements viraux, est reconnue dans la presque totalité des pays d'Europe: ouest de la Russie [115], Biélorussie [144], Lettonie, Lituanie, Ukraine [115], Pologne [250], République tchèque [255], Slovaquie [104, 154], Hongrie [206], Roumanie [315], Bulgarie [234], Grèce [19, 54], Turquie [315], Albanie [71], Slovénie [186], Croatie [42], ancienne Yougoslavie [43], Italie [313], Suisse [330], France [116, 189],

Liechtenstein [164], Autriche [208], Allemagne [262], Danemark [315], Norvège [308], Suède [332] et Finlande [48].

I.2.6. CYCLE ÉPIDÉMIOLOGIQUE

De nombreux isolements de virus CEE ont été effectués, tant à partir d'arthropodes que de vertébrés capturés dans la nature ou infectés expérimentalement. Ces résultats doivent être interprétés avec prudence dans la mesure où la présence du virus dans l'organisme d'un animal ne signifie pas nécessairement que celui-ci joue un rôle prépondérant dans l'épidémiologie de la maladie. Ainsi, la transmission du virus CEE a été vérifiée expérimentalement chez *Rhipicephalus appendiculatus* [170], *Haemaphysalis spinigera* [223], *Hm. turturis* [223] et *Hyalomma dromedarii* [144], quatre espèces de tiques ixodides absentes de l'aire de répartition de l'encéphalite à tiques. Dans le même ordre d'idées, Ernek *et al* ont démontré la présence du virus CEE dans le sang de canards colverts (*Anas platyrhynchos*) infectés par des *I. ricinus* virulents; cependant, les opportunités de rencontre naturelle de ces Anatidés avec *I. ricinus* sont trop faibles pour qu'ils puissent être considérés comme partie prenante du cycle épidémiologique du virus [74].

Plutôt que de dresser la liste exhaustive des hôtes et vecteurs potentiels ou avérés du virus CEE, nous n'en citerons donc que les plus importants, ou ceux qui présentent des particularités épidémiologiques.

I.2.6.1. Vecteurs

I. ricinus est le vecteur principal du virus CEE. L'incidence d'infection chez cette tique varie entre moins de 0,1 % et près de 6 % selon le foyer [99, 133, 197, 315]. La transmission transovarienne est un phénomène rare [62, 259] et les larves à jeun ne sont qu'exceptionnellement trouvées porteuses de virus CEE dans la nature.

Le rôle de vecteur et l'isolement du virus à partir de tiques sauvages ont également été démontrés avec *I. (Pholeoixodes) hexagonus* [167, 300], *Hm. concinna* [158, 267], *Hm. punctata* [98, 234] et *Hm. inermis* [102, 160, 222]. Selon Gresikova *et al* [102], cette dernière espèce pourrait fonctionner comme vecteur principal du virus CEE dans les zones xéothermiques du sud de l'Europe. *I. trianguliceps* est considéré comme un vecteur non négligeable en Slovénie [161], tandis qu'*I. gibbosus* fonctionne comme vecteur de remplacement d'*I. ricinus* dans certains foyers méditerranéens de Croatie [315]. En raison de leurs préférences trophiques [207], ces tiques

doivent cependant n'être considérées que comme des agents occasionnels de transmission du virus à l'homme - à l'exception peut-être d'*I. gibbosus*, dont de nombreux spécimens ont été retrouvés fixés sur l'homme [207].

La transmission transstadiale a été vérifiée chez *Dermacentor reticulatus* [157], *D. andersoni* [144] et *D. marginatus* [157], des isolats de virus ayant en outre été obtenus à partir de spécimens sauvages de cette dernière espèce [182]. Les taux d'infection naturelle et de transmission transstadiale assez bas de *D. marginatus* et *D. reticulatus*, par rapport aux *Haemaphysalis* et aux *Ixodes*, n'en feraient des vecteurs importants que dans certains foyers [157]. Selon Nosek [217], ils pourraient jouer un rôle, quoique faible, dans l'infection des animaux de traite, et par là contribuer au cycle d'infection humaine par le lait cru. Enfin, *I. (Ph.) arboricola*, une tique d'oiseau, s'est révélé un vecteur compétent en laboratoire [183].

Les Argasides ne semblent pas jouer de rôle significatif dans la circulation du virus CEE. Selon Streissle [301], les virions ne parviendraient pas à traverser l'épithélium intestinal. Dans ses travaux en effet, la tique *Ornithodoros maubata* n'a pu transmettre le virus à des poussins que lorsqu'elle avait été infectée par voie transcutanée.

Le rôle potentiel des insectes dans l'épidémiologie de la maladie a également été étudié: moustiques [231], puces [122, 257, 258, 292], et même coléoptères carnivores [122]. D'une manière générale, la virémie chez les insectes est de courte durée (1-7 jours), et la transmission virale, de ces arthropodes à l'hôte, n'a pas pu être réalisée expérimentalement. La présence du virus chez les coléoptères a été vérifiée après 24 h, mais ces insectes avaient été infectés par ingestion de viande contaminée et les auteurs n'excluaient pas que des reliqs de nourriture, restés collés à la cuticule, soient en fait à l'origine de la virémie observée. Notons que certains coléoptères, tels les Carabes, sont prédateurs de tiques [90]; les insectes pourraient donc théoriquement compléter le processus de transmission "classique" du virus CEE entre *I. ricinus* et les insectivores (cf I.2.6.3.2.).

Kocianova et Kozuch [147] ont pour leur part démontré la présence du virus CEE dans des broyats mixtes d'acariens euryphages et hématophages récoltés dans des nids d'hiver de taupe, sans établir cependant le rôle de vecteurs de ces arthropodes.

1.2.6.2. Hôtes et réservoirs

Chez les hôtes naturels, le virus CEE peut être mis en évidence dans le sang circulant (virémie) mais, bien qu'il puisse dans certains cas y avoir multiplication dans le cerveau, il n'y a que très rarement apparition de symptômes de maladie [277]. La virémie - soit la période durant laquelle le

virus est accessible au vecteur - est courte: de l'ordre d'une semaine (généralement 2-3 jours) [73, 119]. Pour cette raison, on parle d'«hôtes d'amplification» plutôt que de réservoirs.

De nombreuses espèces de rongeurs ont été impliquées comme hôtes d'amplification du virus CEE en Europe. Les plus importantes sont les mulots *Apodemus flavicollis* et *A. sylvaticus*: ces animaux sont nombreux, abondamment parasités par *I. ricinus*, et ils développent une virémie suffisamment élevée pour permettre la transmission des virions aux tiques [98, 252].

Le campagnol roussâtre (*Clethrionomys glareolus*) est également considéré comme un hôte important, bien que sa virémie n'atteigne pas toujours le seuil d'infection pour les tiques [73, 194]. La taupe (*Talpa europaea*) intervient surtout au début du printemps, lorsque la densité de rongeurs est encore faible [153]. La musaraigne (*Sorex araneus*), la souris (*Mus musculus*), le campagnol souterrain (*Pitymys subterraneus*) et le rat des moissons (*Micromys minutus*) semblent également jouer un rôle non négligeable dans la circulation du virus CEE [160, 221]. Matile [197] a pour sa part relevé la présence d'anticorps spécifiques chez le campagnol agreste, *M. agrestis*. Enfin, certains mammifères hibernants présentent une virémie latente prolongée durant leur sommeil hivernal [159, 220]. Ainsi, des hérissons (*Erinaceus roumanicus*) et des loirs (*Glis glis*), infectés expérimentalement, ont présenté une virémie décelable pendant plus de 30 jours (y compris la période d'hibernation); le virus s'est multiplié à nouveau au réveil et a disparu du sang circulant après 7-8 jours [159].

Des virémies élevées, suivies parfois d'encéphalites pouvant entraîner des paralysies, ont été observées chez le renard (*Vulpes vulpes*) et le mouton (*Ovis aries*) [234, 251]. Une virémie brève et faible a été relevée chez des blaireaux (*Meles meles*) infectés par injection sous-cutanée [251]; l'infection de ces mustélidés par des tiques infectieuses n'a pas entraîné de multiplication virale. Chez la belette (*Mustela nivalis*), les mêmes auteurs ont décelé des virémies courtes et variables selon les individus.

Chez les oiseaux, une souche de virus CEE a été isolée à partir du sang d'un chevalier cul-blanc (*Tringa ochropus*) capturé dans la nature [103]. La buse variable (*Buteo buteo*), le faucon crécerelle (*Falco tinnunculus*), le merle (*Turdus merula*) et le moineau domestique (*Passer domesticus*) présentent quant à eux une résistance naturelle au virus CEE: l'inoculation naturelle ou expérimentale (périphérique ou intracérébrale) n'entraîne pas de multiplication du virus [75, 261].

Chez les reptiles enfin, des virémies après infection expérimentale ont été mises en évidence chez le lézard vert (*Lacerta viridis*) [97], tandis que des anticorps spécifiques étaient décelés dans le sang de l'orvet (*Anguis fragilis*),

de la couleuvre d'Esculape (*Elaphe longissima*) et de la couleuvre à collier (*Natrix natrix*) [290].

1.2.6.3. Modes de transmission particuliers

1.2.6.3.1. Contamination par le lait cru

En conditions expérimentales, le virus CEE a été isolé du lait de chèvre [94, 307], de mouton [96] et de vache [95] jusqu'à 8 jours après l'infection [307]. Les habitudes alimentaires de certaines populations d'Europe centrale, qui boivent du lait cru, les exposent donc à un risque supplémentaire d'infection par le virus CEE. De fait, plusieurs cas de maladie, isolés ou épidémiques, ont été mentionnés en Europe.

Entre 1951 et 1952, une épidémie d'encéphalite à tiques affecta plus de 600 personnes dans une ville du sud-est de l'actuelle Slovaquie; le lait de chèvre fut incriminé comme source probable d'infection [36, cité par 37]. En 1989, Sixl *et al* [291] décrivent des cas d'encéphalite à tiques survenus en Styrie (Autriche) chez un couple âgé consommateur de lait de chèvre; ces auteurs mentionnèrent en outre un cas de maladie consécutif, selon toute vraisemblance, à l'ingestion de lait de vache.

Le lait cru de bovin a également été mis en cause lors d'une épidémie d'encéphalite à tiques en Pologne; le tableau clinique de la maladie ne différait pas des cas d'infection par piqûre de tiques [315]. En 1984, Jezyna *et al* [134] estimaient que 6% des cas d'encéphalite à tiques du nord-est de la Pologne étaient dus à l'ingestion de lait de vache.

Enfin, une épidémie d'encéphalite à tiques consécutive à l'absorption de lait de brebis a été décrite en Slovaquie par Gresikova *et al* [104].

1.2.6.3.2. Contamination par ingestion de viande contaminée

Ce type d'infection a été observé chez le hérisson [156]. Ces animaux peuvent en certaines circonstances devenir prédateurs de petits mammifères tels que *M. minutus*, *C. glareolus* ou *A. flavicollis*, surtout si ceux-ci sont affaiblis par le virus.

I.2.6.3.3. Contamination par aérosols

La plupart des infections de laboratoire sont dues à la respiration d'aérosols [13], produits lors d'une mauvaise manipulation des suspensions virales.

Bien que le virus CEE ait été décelé dans les fèces d'*I. ricinus* [30], aucun cas de contamination de vertébré par contact avec des excréments contaminés de tiques n'a été décrit à ce jour.

Dans les cas d'ingestion d'aliments infectés ou d'inhalation d'aérosols contaminés, le virus CEE atteint le cerveau par le nerf olfactif [132].

I.2.7. L'ENCÉPHALITE À TIQUES EN SUISSE

Les premières mentions d'encéphalite à tiques dans notre pays remontent à 1969: cette année-là, Krech *et al* [165] et Spiess *et al* [293] mettent en évidence des anticorps spécifiques chez 2 patients atteints d'affections du système nerveux central. En 1970, Wandeler *et al* [319] en isolent l'agent étiologique à partir du cerveau d'un chien de la région de Hallau/SH mort de méningo-encéphalite. Les premiers isollements de virus CEE à partir de tiques sont effectués par Wyler *et al* [330] et Radda *et al* [253] en 1972, avec des *I. ricinus* capturés dans le canton de Schaffhouse et le nord du canton de Zürich. Des souches de virus ont ensuite été isolées d'autres populations d'*I. ricinus* entre 1978 et 1981; les tiques du genre *Dermacentor* (*D. marginatus*, *D. reticulatus*), analysées il est vrai en faible nombre, sont restées négatives [197].

Des isolats ont été obtenus à partir d'un *A. flavicollis* [197], d'une hermine (*Mustela erminea*) (Steck, comm. pers., cité par [197]) et d'un poney de Horgen/ZH euthanasié à la suite d'une encéphalite en 1979 [317]. En 1982, un cas d'encéphalite à tiques a été diagnostiqué chez un bouc de Seewis im Prättigau/GR [338].

Des études sérologiques entreprises en 1973 par Wandeler *et al* [318] sur des renards ont révélé un taux d'infection de 16,2 % et une répartition de l'incidence uniforme dans le nord et l'est du pays. Entre 1978 et 1981, Matile [197] met en évidence des anticorps spécifiques chez des *C. glareolus* et *M. agrestis* de la région de Thoune. Il relève également des sérologies positives chez des chiens des cantons de Zürich (4,8%), Bâle (5,6%) et Berne (1,9%), ainsi que chez des moutons de la vallée du Haut-Rhin (0,2%).

Dès 1973, des enquêtes sérologiques menées chez des patients d'hôpitaux, des forestiers, des chasseurs et des donneurs de sang font état de prévalences

comprises entre 0 et 5,4% selon l'origine géographique, et révèlent des zones à risque dans les cantons de Zürich, de Schaffhouse, de Berne et des Grisons [198, 199, 211, 281, 330].

Il est à noter qu'en dépit de l'isolement du virus CEE chez un bouc des Grisons, on ne déplore à ce jour aucun cas de contamination par le lait en Suisse. La consommation crue de ce liquide est du reste exceptionnelle dans notre pays.

L'encéphalite à tiques se distribue géographiquement selon des zones d'endémie bien délimitées, appelées "foyers naturels" [168]. Pour cette raison, le taux d'infection d'*I. ricinus* par le virus CEE est variable et discontinu: il est inférieur à 0,2% en moyenne, mais peut dépasser 0,8% dans des régions endémiques [197].

En 1984, Wyler et Matile [329] reconnaissaient 12 foyers d'encéphalite à tiques, établis sur la base d'isolements de virus ou de cas cliniques répétés: Horgen/ZH, Eglisau/ZH, Glattfelden/ZH, Hallau/SH, Osterfingen/SH, Stein am Rhein/SH, Rheinau/SH, Grösch-Seewis-Landquart/GR, Thun/BE, Spiez/BE, Steffisburg/BE et Ins/BE.

1.3. LA BORRELIOSE DE LYME

1.3.1. DÉFINITION ET SYSTÉMATIQUE

On désigne sous le nom de Borréliose de Lyme l'ensemble des manifestations cliniques dues à une infection par *Borrelia burgdorferi sensu lato*, un complexe de bactéries Gram négatives appartenant à la Famille des Spirochetaceae.

De forme hélicoïdale, flexible, *B. burgdorferi s.l.* mesure 4-30 µm de long et 0,18-0,25 µm de diamètre. 7 flagelles en moyenne sont fixés à chacune de ses extrémités et se croisent en son milieu. Elle est microaérophile et se déplace par mouvements de rotation et de translation [135]. Son génome comprend un chromosome linéaire d'environ 1'000 kb et plusieurs plasmides linéaires ou circulaires de 15-60 kb [24]. Elle possède au moins 4 protéines majeures de surface, de nature lipoprotéique et de fonction encore non définie: l'OspA (Outer surface protein A), de 30-33 kDa, l'OspB, de 33-36 kDa, l'OspC, d'environ 20-24 kDa et l'OspD, de 28 kDa [23, 80, 216, 325, 326].

De nombreuses souches différentes de *B. burgdorferi s.l.* ont été isolées jusqu'à ce jour, essentiellement en Europe. Un spirochète non déterminé a, quant à lui, été isolé d'*I. ricinus* de Tunisie [334]. Si les souches américaines

semblent assez homogènes, une certaine diversité antigénique est observée parmi les isolats européens. Baranton *et al* [21] distinguent 3 espèces: *B. garinii*, *B. burgdorferi sensu stricto* et le groupe VS461, chaque type étant vraisemblablement responsable d'un aspect particulier de la symptomatologie de la maladie.

Dans le présent travail, nous n'avons pas fait de distinction entre ces différents groupes. Par commodité, nous utiliserons simplement le terme "*B. burgdorferi*" pour désigner ce complexe.

1.3.2. MANIFESTATIONS CLINIQUES

La borréliose de Lyme est une maladie à évolution lente. Elle comprend théoriquement 3 phases successives, mais une ou plusieurs de ces phases peuvent ne pas survenir. La qualité et la fréquence des symptômes sont différentes aux Etat-Unis de celles que l'on rencontre dans l'Ancien Monde [69]. Nous décrivons ci-dessous les manifestations cliniques observées ordinairement en Europe [55, 69, 128, 316].

La phase primaire commence 1-32 jours après la piqûre de tique; elle se traduit par l'apparition d'un érythème (ECM, ou Érythème chronique migrant) à l'endroit de la piqûre de tique. Cette rougeur, de structure généralement annulaire, s'étend, persiste quelques jours à quelques semaines puis disparaît spontanément. En fait, l'érythème n'est chronique que dans la minorité des cas [69].

Cette période peut s'accompagner ou être suivie de manifestations de type grippal (douleurs diverses, fatigue, malaise généralisé) [15].

La phase secondaire survient quelques semaines à plusieurs mois après la première. Elle se manifeste typiquement par des arthrites ou des douleurs articulaires [15, 121, 316], affectant essentiellement le genou. Des douleurs radiculaires peuvent apparaître, ainsi que des complications cardiaques [15, 69, 316] ou oculaires (conjonctivites, uvéites, kératites) [124, 128, 285]. Le spirochète a également été mis en évidence dans les organes internes (foie, rate, poumons) [129]. Une paralysie de la moitié de la face, consécutive à une atteinte des nerfs crâniens, est également caractéristique de ce stade [69, 128, 316].

La phase tertiaire peut apparaître des années après la piqûre infectieuse. Elle se traduit par des manifestations dermatologiques telles que l'acrodermatite chronique atrophiante (ACA, ou maladie de Pick-Herxheimer) ou des sclérodermies localisées [55], par des arthrites chroniques [55, 121], ou par des atteintes neurologiques et psychiatriques (encéphalomyélite évoquant la sclérose en plaques, troubles de la mémoire,

démence, dépression, anorexie, hallucinations, troubles de la personnalité [69, 229].

Un nodule d'infiltration lymphoréticulaire, souvent localisé sur le lobe de l'oreille ou au niveau du sein, peut se former: c'est le lymphocytome bénin cutané (LBC). En l'absence de traitement, il peut persister plusieurs mois, voire des années, avant de disparaître progressivement [55]. Le LBC apparaît simultanément ou plusieurs mois après la piqûre de tique; pour cette raison, il est classé selon les auteurs parmi les symptômes de la phase primaire, secondaire ou tertiaire de la maladie [69, 296, 316, 333].

Les cas d'issue fatale lors d'infections à *B. burgdorferi* chez l'adulte sont rares et pas toujours formellement démontrés. Un décès dû à des complications cardiaques a été décrit chez un patient présentant une infection mixte à *B. burgdorferi* et *Babesia microti* [196]; un autre cas mortel a été observé chez une personne atteinte d'une double infection à *B. burgdorferi* et virus CEE [225]; deux patients ont succombé l'un à un arrêt respiratoire, l'autre à une coagulation intravasculaire disséminée, atteintes attribuées à des complications secondaires de la maladie [25, 145].

D'une manière générale, si des tiques ont été trouvées infectées simultanément par *B. burgdorferi* et le virus de l'encéphalite à tiques [151], les cas décrits d'infection mixte sont souvent sujets à discussion. En effet, le diagnostic en est extrêmement délicat, et il n'est pas toujours possible de démontrer que les symptômes observés sont dus à l'action conjuguée des deux microorganismes [3, 166, 324].

En comparaison, les avortements et les décès précoces sont plus fréquemment décrits; ils concernent des foetus et nouveaux-nés contaminés par voie transplacentaire (cf 1.3.6.3.1).

I.3.3. TRAITEMENT, PRÉVENTION

Le traitement de la borréliose de Lyme se fait par antibiothérapie. Il n'existe pas encore de vaccin humain contre cette maladie. Le fait d'avoir été en contact avec le spirochète ne semble pas protéger d'une nouvelle infection, quoique tous les auteurs ne s'accordent pas sur ce point [109, 232, 233, 321].

I.3.4. HISTORIQUE

Comme souvent dans des cas de maladies faisant intervenir un hôte intermédiaire ou un vecteur, la découverte du cycle épidémiologique de la

borréliose de Lyme a pris un certain temps. Les symptômes des différentes phases de la maladie, notamment l'ACA, étaient déjà connus en Europe au siècle dernier [49, 243 cité par [69]], mais ce n'est que dans le courant de ce siècle que la relation entre les signes cliniques et la notion de piqûre de tique, puis la parenté existant entre les symptômes eux-mêmes, ont été mises en évidence.

On doit la première description de manifestations primaires de la borréliose de Lyme au Suédois Afzélius qui, en 1909, relate le cas d'une patiente ayant développé une lésion cutanée annulaire migrante après avoir été piquée par une tique [11]. Le terme d'érythème chronique migrant (ECM), qui désigne ce type d'affection, est proposé 4 ans plus tard par Lipschütz [188]. En 1922, Garin et Bujadoux décrivent en France un cas de "paralysie à tique" faisant suite à une piqûre d'*I. (Ph.) hexagonus* et à un érythème [83].

En 1946, Svartz [304] démontre l'efficacité de la pénicilline dans le traitement de l'ACA. Hollström [125] fait de même, 5 ans plus tard, avec l'ECM. A cette époque, l'agent étiologique de ces dermatoses n'a toujours pas été isolé, cela bien que Lennhoff, en 1948, ait observé des organismes rappelant des spirochètes sur des coupes histologiques d'érythèmes [180].

Jusqu'en 1955, un doute subsistait quant à la nature (toxique ou infectieuse) de l'agent responsable de cette maladie. En 1955, Binder *et al* [34] inoculent des fragments de biopsies d'ECM à quatre volontaires, qui développent à leur tour un ECM. Traitées à la pénicilline, ces 4 personnes voient leurs symptômes disparaître en quelques jours. L'origine infectieuse de la maladie est dès lors établie.

Il faudra attendre les années 70 pour que la connaissance de la maladie progresse sensiblement. En 1970, Scrimanti [287] effectue la première description d'ECM contracté aux Etats-Unis, dans le Wisconsin. Dès 1972, des arthrites inflammatoires, parfois précédées d'érythèmes, apparaissent chez des adultes et surtout des enfants de trois agglomérations du sud du Connecticut, aux Etats-Unis: Lyme, Old Lyme et East Haddam. Le regroupement insolite de ces cas, ainsi que leur prévalence élevée, vont amener Steere *et al* [299] à entreprendre une enquête épidémiologique et étiologique. Ces auteurs établiront rapidement le lien entre ces manifestations cliniques et les piqûres de tiques [297].

En 1981 est décrit le premier cas européen d'«arthrite de Lyme». Cette affection, précédée d'un ECM, fait suite à une piqûre d'arthropode non identifié survenue en 1979 à Payerne/VD [89].

Ce sont Burgdorfer *et al*, en découvrant des spirochètes dans l'intestin d'*I. scapularis** américains et en les isolant, qui envisagent les premiers le rôle

* Anciennement *I. dammini*. (Selon la révision de Oliver *et al* [226]).

d'un spirochète transmis par des tiques, [52]. En 1983, Barbour *et al* isolent des borrélioses à partir d'*I. ricinus* capturés en Suisse en 1982 [22]. La même année, Benach *et al* [28] isolent le spirochète à partir du sang de deux patients atteints d'ECM et de myalgies, tandis que Steere [298] démontre que les spirochètes isolés d'une tique et d'un patient réagissent avec les mêmes sérums immuns.

En 1984 enfin, la bactérie reçoit de Johnson *et al* son nom de *B. burgdorferi*, en l'honneur de son découvreur [135].

1.3.5. DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE

Depuis la description de la borréliose de Lyme au tournant de ce siècle, la présence du spirochète a été relevée dans de nombreux pays d'Europe: Finlande [276], Norvège [201], Danemark [173], Pays-Bas [35], Suède [110], Irlande [209], Grande-Bretagne [111, 209], Belgique [33], Allemagne [121, 210], Autriche [283], France [68], Suisse [10, 89], Italie [310], Portugal [64], Espagne [108], Croatie [50], Slovénie [302], Grèce [56], Hongrie [172], Slovaquie [260], République tchèque [236], Russie [65], Pays baltes [65]. Schmidt *et al* [279] mentionnent encore la Turquie, sans citer leurs sources; nous n'avons pas pu trouver confirmation de cette affirmation.

En Afrique et au Proche-Orient, des cas sporadiques ou des sérologies positives ont été reportés en Algérie [270], en Tunisie [335], en Egypte [114], en Israël [2], en Afrique noire [91, 275, 294, 309] et en Afrique du sud [46].

Dans le Nouveau Monde, *B. burgdorferi* est reconnue dans au moins 41 états des Etats-Unis [205, cité par [295]]. La question de la présence du spirochète au Canada [66], en Amérique centrale [328], au Chili [113], au Pérou [214] et au Brésil [20] a également été soulevée.

L'Asie et l'Océanie ne sont pas en reste puisque des cas de borréliose ont été décrits en Chine [12], au Japon [142] et en Australie [79].

1.3.6. CYCLE ÉPIDÉMIOLOGIQUE

1.3.6.1. Vecteurs

I. scapularis Say et *I. pacificus* Cooley et Kohls sont les principaux vecteurs de *B. burgdorferi* aux Etats-Unis. La capacité d'*I. dentatus* de transmettre le

spirochète a été démontrée par Telford et Spielman [305], ainsi que la transmission transstadiale chez *Hm. leporispalustris*, dont des exemplaires ont été trouvés naturellement infectés dans la nature [174]. Les essais peu concluants de transmission expérimentale de *B. burgdorferi* par *A. americanum* et *I. cookei* laissent à penser que ces deux espèces ne constituent que de pauvres vecteurs [246, 271]. Enfin, des spirochètes ont été observés chez des stades libres ou gorgés de *D. variabilis*, *D. occidentalis*, *D. parumapertus*, *Hm. leporispalustris*, *A. maculatum*, *I. neotomae* et *Rh. sanguineus*, sans que leur capacité de transmettre le spirochète à un nouvel hôte ait été démontrée [16, 174, 175, 256].

En Asie, la transmission du spirochète est assurée par *I. persulcatus* [142, 151, 213]. Un spirochète, considéré comme un variant peu virulent de *B. burgdorferi*, a par ailleurs été trouvé en abondance chez *I. avatus* [213].

I. ricinus apparaît comme le vecteur le plus vraisemblable de *B. burgdorferi* en Afrique du nord [334].

En Europe, *I. ricinus* a longtemps été considéré comme l'unique vecteur de *B. burgdorferi*. Mais en 1989, Liebisch *et al* [184] observaient des borrélioses chez des *I. (Ph.) hexagonus* capturés sur un hérisson (*Erinaceus europaeus*). Le rôle de vecteur important de cette tique, qui pourrait remplacer *I. ricinus* en zone urbaine, n'a été démontré que 2 ans plus tard par Gern *et al* [88]. Des spirochètes ont également été mis en évidence en France chez des larves et nymphes d'*I. trianguliceps* et *I. acuminatus* [67], ainsi que, sur une île suédoise, chez *I. uriae* [227]. En Allemagne, Kahl *et al* [137] ont observé des borrélioses, morphologiquement identiques à *B. burgdorferi*, dans des adultes de *D. reticulatus* collectés en phase de quête. Enfin, le rôle éventuel d'*Argas reflexus* dans la circulation urbaine du spirochète a été évoqué [85].

L'isolement du spirochète à partir d'insectes hématophages (puces, moustiques, tabanides) a soulevé la question de leur rôle dans l'épidémiologie de la borréliose [17, 66, 67, 118, 187, 190, 191, 192, 193]. Leur capacité de vecteurs n'a toutefois pas été formellement démontrée.

I.3.6.2. Hôtes et réservoirs en Europe

Les micromammifères jouent un rôle prépondérant dans l'épidémiologie de la borréliose de Lyme. Parmi eux, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus* et *C1. glareolus* apparaissent comme les réservoirs principaux du spirochète [131, 143, 289, 312]. Ces rongeurs restent spirochètémiques toute leur vie et peuvent ainsi infecter un grand nombre de tiques [131, 289].

Chez les oiseaux, le rôle des Turdidés, hôtes importants des stades immatures - notamment des nymphes - d'*I. ricinus*, a été étudié. Selon des investigations menées par Turrian-Vittoz et Humair [312] dans la forêt du Staatswald (Grosses Moos/BE), les merles noirs (*T. merula*), les grives musiciennes (*T. philomelos*) et, dans une moindre mesure, les rouges-gorges (*Erithacus rubecula*), joueraient un rôle non négligeable dans la transmission et la dispersion de *B. burgdorferi*. En Suède, Olsén *et al* ont par ailleurs mis en évidence la circulation de *B. burgdorferi* selon un cycle ne faisant apparemment intervenir que des oiseaux marins (pingouins) et *I. uriae* [227].

Les chevreuils (*C. capreolus*) ont quant à eux révélé des séroprévalences élevées (59% selon Kessler [143]); un spirochète non identifié a en outre été observé dans le sang de l'un d'eux [143].

1.2.6.3. Modes de transmission particuliers

1.2.6.3.1. Transmission transplacentaire

Il a été relevé quelques cas de contamination transplacentaire chez la femme enceinte lors de la phase secondaire de la maladie. L'infection du fœtus se solda généralement par un avortement spontané ou par un décès rapide du nourrisson, conséquences de malformations graves dues à l'envahissement des organes vitaux par les spirochètes [130, 278].

1.2.6.3.2. Contamination par contact

Un curieux cas d'ECM a été décrit en 1989 par Rockstroh *et al* [269]. Le patient, souffrant d'une plaie superficielle, s'était infecté en manipulant du fumier de volaille contenant des asticots porteurs de spirochètes.

Enfin, la transmission directe de *B. burgdorferi*, sans piqûre d'arthropode, a été observée dans des élevages de rongeurs; cette contamination résulte vraisemblablement de contacts avec l'urine des animaux infectés, d'où des spirochètes vivants ont été isolés [45]. La théorie de la transmission par ingestion est étayée par les travaux de Burgess et Patrican [53], qui ont démontré que des *Peromyscus maniculatus* (rongeurs présents dans les foyers américains de borréliose), infectés par voie orale, développaient une spirochétiémie suffisante pour infecter des larves d'*I. scapularis*.

I.3.7. LA BORRÉLIOSE DE LYME EN SUISSE

En Suisse, la distribution des infections humaines à *B. burgdorferi* (ECM, ACA) recouvre celle de son principal vecteur [10]. Le nombre moyen de nouveaux cas annuels de borréliose (tous symptômes confondus) a été estimé par Chamot [55] à plus de 500, soit une incidence de 1,1 à 12,9 selon les cantons. D'après cet auteur, l'ECM, qui survient dans 43% des cas, est le symptôme le plus fréquent de la maladie; les atteintes articulaires sont relevées dans 24% des cas, les complications neurologiques chez 38% et les ACA chez 19% des patients; les LBC et les complications cardiaques n'apparaissent que dans quelques pour-cent des cas [55].

Toutes les populations d'*I. ricinus* étudiées à ce jour ont été trouvées porteuses du spirochète [204]. Sur le Plateau, leur prévalence varie entre 5 et 34%, le taux d'infection des tiques s'abaissant avec l'élévation en altitude [10]. 3,1% des larves de cette espèce ont été trouvées transovarierement infectées dans la nature [336]. Au Valais, le pourcentage de tiques parasitées a été déterminé, selon les sites, entre 4,4 et 55% pour les nymphes et 3-43% pour les adultes [240]. Au Tessin, Miserez a mis en évidence le spirochète chez 36,2% des nymphes, 25% des adultes et 3,2% des larves [203]. Des espèces sympatriques, telles *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *Rh. sanguineus* et *Hm punctata*, n'ont jamais été trouvées infectées par *B. burgdorferi* [10, 204].

En ce qui concerne les insectes, Kessler [143] a recherché sans succès *B. burgdorferi* chez le diptère hématophage de chevreuil *Lipoptena cervi* et chez 4 puces de micromammifères (*Megabothris walkeri*, *Palaeopsylla sorecis*, *Ct. agyrtes impavidus* et *Typhloceras poppei*).

I.4. IXODES RICINUS

I.4.1. SYSTÉMATIQUE

Les tiques sont des arthropodes hématophages de la classe des Arachnida et de l'ordre des Acari. Elles forment la super-famille des Ixodoidea, qui compte quelque 800 espèces [127]. Les tiques se répartissent en 3 familles: les Argasidae, ou "tiques molles", dépourvues de scutum, les Ixodidae, ou "tiques dures", au scutum toujours présent, et la famille des Nuttalliellidae, qui réunit certaines caractéristiques des deux autres familles et ne compte qu'une seule espèce, du reste fort mal connue: *Nuttalliella namaqua* Bedford, 1931.

I. ricinus L., 1758, appartient à la famille des Ixodidae; c'est l'espèce de tique la plus commune en Suisse.

I.4.2. RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE

La distribution géographique d'*I. ricinus* comprend les régions tempérées d'Europe, ainsi que certains pays d'Afrique du nord et du Proche-Orient [207, 331]. Au sein de son aire de répartition, cette tique colonise les milieux assurant les conditions thermiques et hygrométriques nécessaires à son développement [90]. La prédilection de cette tique pour les milieux forestiers n'exclut pas sa présence en milieu milieu découvert, comme en Grande-Bretagne, ou dans des sites urbains: parcs, jardins, terrains en friche, vergers [150, observations personnelles]. En Suisse, *I. ricinus* abonde dans les haies, bosquets, buissons, sous-bois et lisières des forêts de feuillus. La densité de ses populations décroît avec l'altitude; l'espèce se fait rare dès 1'000 m et aucune population d'*I. ricinus* n'a été recensée au-dessus de 1'500 m [6, 139, 202].

I.4.3. CYCLE ÉPIDÉMIOLOGIQUE

Le développement d'*I. ricinus* comprend 3 stades successifs (larve, nymphe et adulte) séparés chacun par une mue. Les trois stades doivent obligatoirement se nourrir de sang de vertébré pour pouvoir poursuivre leur développement. Ce repas, unique pour chaque stade, dure 2-6 jours pour les larves, 2-7 jours pour les nymphes et 6-14 jours pour les femelles [6], après quoi la tique se laisse tomber au sol à la recherche d'un endroit adéquat pour muer ou - si c'est une femelle - pour pondre. C'est lors d'un de ces trois repas que des agents pathogènes peuvent être transmis à l'hôte nourricier.

Il est à noter que les mâles d'Ixodides ne se gorgent pas de sang; ils sont cependant capables de piquer et, de par l'activité de leurs glandes salivaires, peuvent transmettre les microorganismes qu'ils transportent [14].

Le cycle de vie d'*I. ricinus* se déroule sur 2- 3 ans, voire plus en conditions défavorables [6]. Son activité de quête, tous stades confondus, s'étend de mars à décembre, mais on l'observe essentiellement d'avril à octobre; des pics d'abondance apparaissent en mai-juin ou juin-juillet, selon la région, et de septembre à début octobre, ce second pic étant toutefois beaucoup moins important que le premier [90, 197].

Dans des conditions favorables, *I. ricinus* est une tique exophile [6]. Elle attend à l'affût sur des herbes, des branches basses, voire des champignons, des mousses ou des feuilles mortes [90], s'accrochant à tout hôte potentiel venant la frôler. Elle ne se fixe pas tout de suite, se promenant quelque temps à la surface du corps à la recherche d'un endroit adéquat pour piquer. Triphasique et télotrope, elle se fixe à chaque stade de son développement sur un animal différent et se nourrit sur un large éventail d'hôtes. Elle manifeste néanmoins certaines préférences trophiques: les larves se fixent sur des animaux de petite taille (essentiellement rongeurs, mais aussi lagomorphes, insectivores, oiseaux, lézards), tandis que les nymphes parasitent plutôt les oiseaux, les lièvres et de plus grands mammifères comme le renard; les adultes, quant à eux, se nourrissent presque exclusivement sur des hôtes de grande taille tels que les canidés, les ongulés sauvages et le bétail [6, 143, 237, 312]. Tous les stades sont susceptibles de piquer l'homme.

L'occupation de la végétation par les tiques en période de quête peut être mise en relation avec ces préférences trophiques: larves et nymphes occupent les couches basses de la végétation, tandis que les adultes privilégient les hauteurs supérieures à 30 cm, parfois jusqu'à plus de 150 cm [90]. En fonction des conditions microclimatiques, les tiques vont effectuer des déplacements verticaux fréquents. Par contre, les migrations horizontales, liées à la recherche d'un support ou d'un site de mue, sont peu importantes et s'effectuent sur de courtes distances, de l'ordre du mètre [90].

I.4.4. IMPORTANCE MÉDICALE ET VÉTÉRINAIRE

Outre *B. burgdorferi* et le virus CEE, *I. ricinus* a été trouvé porteur de nombreux agents pathogènes affectant l'homme ou les animaux: Filaire (*Dipetalonema rugosicauda*) [8], Trypanosome (*Trypanosoma theileri*) [8], Rickettsies et autres bactéries (*Rickettsia helvetica* [8, 241], dont le statut taxonomique n'a été confirmé que récemment [26], *R. slovaca* [8], *Coxiella burnetii* [8], *Ehrlichia phagocytophila*) [242] et piroplasmes (*Babesia divergens*) [86]. En cas de charge parasitaire élevée, les tiques sont également responsables d'anémies. Enfin, leurs piqûres servent de voie d'entrée à des infections secondaires.

En fréquentant les milieux forestiers, l'homme intervient dans le cycle de vie naturel d'*I. ricinus*. Ce faisant, il encoure le risque d'être infecté par les microorganismes que cette tique abrite. De par sa sensibilité au virus CEE et à *B. burgdorferi*, il agit ainsi comme un révélateur de l'existence des foyers de maladie.

II. CONTEXTE ET BUTS DU TRAVAIL

Les buts de ce travail ont consisté à mettre en évidence les quatre aspects suivants:

II.1. RECHERCHE D'UNE METHODE PERMETTANT DE VISUALISER LE VIRUS CEE DIRECTEMENT DANS LA TIQUE, SANS DEVOIR RECOURIR A L'INFECTION DE PETITS RONGEURS

Les faibles quantités de virus CEE présentes dans les tiques rendent sa détection malaisée. La méthode considérée comme étant la plus sensible consiste à infecter des souriceaux nouveaux-nés et à observer l'apparition de symptômes d'encéphalite, avant de caractériser le virus isolé à partir du cerveau de ces animaux. Outre le fait qu'elle pose des problèmes d'éthique à l'heure où l'on tente de réduire le recours à l'expérimentation animale, cette méthode présente le désavantage d'impliquer d'importants élevages de rongeurs, plusieurs souriceaux étant requis pour chaque isolement. Pour cette raison, elle se prête mal à l'analyse individuelle des tiques, pourtant nécessaire à une bonne compréhension de l'épidémiologie du virus.

Nous avons donc cherché à établir, puis introduire, un protocole de mise en évidence du virus CEE constituant une alternative satisfaisante aux méthodes conventionnelles de détection.

II.2. MISE A JOUR DE LA DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES FOYERS D'ENCEPHALITE A TIQUES

En Suisse, le diagnostic des cas cliniques d'encéphalite à tiques est soumis à déclaration obligatoire auprès de l'Office fédéral de la santé publique, et cela depuis 1984. Cette centralisation des données a permis de mettre en évidence l'apparition de nouveaux cas en-dehors des foyers naturels de virus CEE reconnus par les travaux de Wyler et Matile [329], relançant du même coup la question de l'éventuelle progression du virus vers l'ouest et le sud de la

Suisse [163]. Pour tenter d'y répondre, nous avons recouru aux méthodes suivantes:

- analyse de la répartition géographique des cas cliniques de maladie déclarés depuis 1984;
- recherche d'anticorps spécifiques (IgG) dans le sang de populations humaines peu ou fortement exposées aux piqûres de tiques, et cela essentiellement dans l'ouest du pays;
- isollements de virus à partir de tiques capturées dans la nature, principalement dans les régions où des foyers d'encéphalite à tiques semblent émerger.

III.3. EVALUATION DU RISQUE COMPARE D'ENTRER EN CONTACT AVEC LE VIRUS CEE ET/OU *B. BURGENDORFERI*

Du fait que *B. burgdorferi* et le virus CEE sont propagés par le même vecteur, les personnes exposées à l'encéphalite à tiques le sont aussi à la borréliose de Lyme. Nous avons tenté d'estimer le risque, pour différentes populations humaines, d'entrer en contact - ou d'être infecté - avec l'un ou l'autre de ces agents pathogènes. Nous avons pour cela procédé à

- une recherche systématique d'anticorps spécifiques (IgG) dirigés contre *B. burgdorferi*, cela dans tous les échantillons analysés pour le virus CEE;
- un suivi sérologique (IgG, IgM) et clinique des personnes piquées par des tiques porteuses du virus ou du spirochète;
- une analyse des connaissances acquises concernant la distribution et la proportion des *I. ricinus* infectés.

III.4. ETABLISSEMENT D'UN CENTRE DE DIAGNOSTIC-CONSEIL POUR L'ENCEPHALITE A TIQUES A L'INSTITUT DE ZOOLOGIE DE NEUCHATEL

Enfin, il était souhaité que les connaissances acquises au cours de ce travail soient mises à la disposition de l'Institut de Zoologie de Neuchâtel et de son Laboratoire de diagnostic parasitaire, cela dans le but d'enrichir les compétences de ce centre déjà spécialisé dans l'épidémiologie de la borréliose de Lyme et son diagnostic.

III. MISE EN OEUVRE DE L'ETUDE

Pour atteindre les buts fixés, nous avons procédé, simultanément ou successivement, selon les étapes suivantes:

- **Recherche d'une méthode de détection du virus CEE dans la tique**

Ces investigations visaient à satisfaire au but exposé sous II.1.; elles ont par ailleurs servi à l'analyse virologique de tiques capturées dans diverses régions de Suisse.

Trois protocoles de détection du virus CEE dans les tiques ont été comparés avec la méthode conventionnelle d'isolement sur souriceaux: l'ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), la PCR (Polymerase chain reaction) et l'Immunofluorescence indirecte sur cultures de cellules (IF/C). En cours de travail, une variante de l'IF/C a en outre été introduite: l'immunofluorescence sur "squashes" (IF/S); son protocole a été appliqué directement, sans comparaison de son pouvoir de détection avec les autres techniques.

- **Etude des cas cliniques d'infection par le virus CEE déclarés depuis 1984 à l'OFSP**

Cette analyse nous a permis, dans un premier temps, de dégager la surface de la zone à investiguer; dans un second temps, ces données ont été exploitées de manière à pouvoir réaliser une carte de distribution géographique des zones à risque d'encéphalite à tiques, et donc de satisfaire au but exposé sous II.2.

- **Investigations sérologiques chez des personnes fortement ou faiblement exposées aux piqûres de tiques**

La recherche d'anticorps spécifiques dirigés contre le virus CEE et *B. burgdorferi* avait pour but d'évaluer le risque comparé d'entrer en contact avec l'un ou l'autre de ces agents pathogènes (cf II.3.). D'autre part, les résultats sérologiques concernant le virus CEE sont venus compléter les déclarations de l'OFSP pour l'établissement de la carte des foyers d'encéphalite à tiques (II.2).

Plusieurs types de populations, représentant des facteurs de risque différents, ont été étudiés:

- les forestiers-bûcherons, cantonniers et autres personnes fréquentant régulièrement le milieu forestier;
- les donneurs de sang participant aux campagnes de la Croix-Rouge suisse;
- les patients d'hôpitaux de divers cantons, les causes de la consultation ne nous étant pas connues;
- les militaires dans le cadre des Ecoles de recrues d'été.

Les sérums ont été analysés, selon les objectifs poursuivis, par ELISA, ELISA-Capture, Western blot ou Immunofluorescence indirecte.

- Analyse virologique des tiques

La recherche dans *I. ricinus* de *B. burgdorferi*, mais surtout du virus CEE, devait nous permettre de comparer le risque, pour les populations humaines, d'entrer en contact avec l'un ou l'autre de ces agents pathogènes (but II.3). La mise en évidence de l'agent viral dans des populations de tiques devait en outre permettre de déceler - ou de confirmer - l'existence de nouveaux foyers naturels, ces données s'ajoutant aux résultats des investigations cliniques et sérologiques pour la réalisation de la carte de distribution géographique du virus en Suisse (II.2.).

Les tiques ont été analysées, individuellement ou par lots, selon les méthodes appropriées à chaque cas (IF/C, IF/S, PCR).

Enfin, les connaissances acquises, les contacts établis et les techniques maîtrisées au cours de ce travail devaient être mis à la disposition de l'Institut de Zoologie de Neuchâtel et de son Laboratoire de diagnostic parasitaire (II.4.).

IV. MATERIEL ET METHODES

Nous avons utilisé, pour nos analyses, du matériel infectieux de provenances diverses. Pour plus de clarté, nous en présentons ci-dessous l'origine et les caractéristiques.

Sources de virus CEE:

Souche 1.40: Souche isolée à partir d'*I. ricinus* capturés en 1972 dans la région de Schaffhouse [330]. Ce virus est maintenu à - et nous a été remis par - l'Institut de Virologie de Zürich. Il a été utilisé dans nos tests:

- sous forme d'antigène purifié, dans l'ELISA pour la détection des anticorps (IgG) dirigés contre le virus CEE (cf IV.4.1.1);

- sous forme de dilutions d'une suspension à 20% de cerveaux de souris infectés, dans les tests de PCR (cf IV.5.5.1.) et, comme témoin de contrôle positif, lors des étapes d'amplification sur cultures cellulaires (IF/C, cf IV.5.3.3.).

Souche Hypr: virus isolé en 1953 à partir d'un patient atteint d'encéphalite à tiques, en ancienne Tchécoslovaquie [24g, cité par 181]. Il représente le virus-type du virus TBE d'Europe centrale. La souche utilisée est maintenue à - et nous a été remise par - l'Institut de Virologie et de microbiologie de l'environnement d'Oxford (GB). Nous avons utilisé ce virus, sous forme de dilutions de suspensions à 20% de cerveaux de souris, dans les tests d'IF/C (cf IV.5.3.3.) et de PCR (cf IV.5.5.1.), et lors des titrations sur cellules PS (cellules rénales de porc) (cf IV.5.4.). Des broyats de *Rh. appendiculatus* infectés par la même souche virale ont été utilisés, comme témoins de contrôle positifs, dans l'ELISA pour la détection du virus dans les tiques (cf IV.5.6.).

Source de *B. burgdorferi*:

Nous avons utilisé pour nos tests la souche-type borrélienne B31, isolée d'*I. scapularis* aux Etats-Unis. Cette souche, présente en Europe, est maintenue à l'Institut de Zoologie de Neuchâtel. Ces spirochètes ont été utilisés, sous forme d'antigène soniqué, pour la réalisation du test ELISA pour la détection des anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* (cf IV.4.1.3.), ainsi que comme antigène dans les tests d'IFAT (cf IV.4.4.) et de Western blot (IV.4.3.).

IV.1 ANALYSE DES CAS DECLARES D'ENCEPHALITE A TIQUES ET CHOIX DE LA ZONE D'INVESTIGATIONS

Les données relatives aux cas cliniques d'encéphalite à tiques recensés en Suisse depuis 1984 nous ont été communiquées annuellement, sous forme de tableaux récapitulatifs, par l'OFSP. Le report cartographique des lieux de morsure et du domicile des patients nous a permis de mettre en évidence des zones suspectes dans la moitié septentrionale de la Suisse.

Par conséquent, notre étude s'est concentrée sur les cantons situés à l'ouest du pays, soit BE, NE, JU, FR, VD, GE et VS (cf Annexe 1). Toutefois, pour répondre aux demandes qui nous ont été faites au cours de ce travail, nous avons élargi notre surface d'étude à d'autres cantons. A des degrés divers, la presque totalité du territoire suisse a ainsi été couverte.

IV.2 CHOIX DES POPULATIONS HUMAINES ET OBTENTION DES ECHANTILLONS DE SANG

Nous avons concentré nos investigations sérologiques sur des groupes humains fortement exposés aux piqûres de tiques en raison soit de leur profession (forestiers, cantonniers), soit d'activités forestières sporadiques mais relativement intenses (militaires dans le cadre des écoles de recrues). Nous y avons adjoint des patients d'hôpitaux cantonaux ou régionaux, ainsi que des donneurs de sang pris au hasard. Ce choix nous a permis de couvrir un large échantillon de la population.

Les sérums ont été collectés selon le principe de la libre participation. Lorsque les conditions de prises de sang le permettaient, les participants ont eu à compléter des questionnaires, établis d'après Zhioua [333] en collaboration avec les autorités concernées (OFSP, Office fédéral des affaires sanitaires de l'armée: OFSAN). Les questions posées visaient à établir la fréquence des contacts des participants avec la forêt, leurs antécédents médicaux, ainsi que d'éventuels souvenirs de piqûres de tiques.

L'analyse des échantillons sanguins de forestiers, cantonniers, patients d'hôpitaux et donneurs de sang avait pour but de mettre en évidence de précédents contacts avec *B. burgdorferi* et le virus CEE. Pour cette raison, nous avons procédé à une seule prise de sang et recherché des anticorps de classe IgG uniquement (cf IV.4.).

Au contraire, l'étude entreprise parmi les militaires visait à établir le risque d'une infection par l'un ou l'autre des agents pathogènes au cours de l'école de recrues. Nous avons par conséquent procédé à un minimum de 2 prises de sang, celles-ci étant suffisamment espacées dans le temps pour permettre de

déceler une éventuelle séroconversion. Les échantillons de sang ont été analysés pour la présence d'anticorps de classes IgM et IgG.

IV.2.1. COLLECTES DE SANG AUPRÈS DU PERSONNEL FORESTIER ET DES CANTONNIERS

Les prises de sang ont été opérées entre janvier 1989 et janvier 1990 parmi les élèves de l'École forestière de Lyss/BE et les forestiers ou cantonniers des cantons de NE, JU, VS, VD, GE, FR, BE et GR.

A Lyss et dans les cantons de NE, JU et VS, les échantillons de sang ont été collectés en notre présence. Chaque séance de prise de sang était précédée d'une séance d'information, illustrée de diapositives, sur les tiques et les maladies étudiées. Les questionnaires étaient ensuite remplis sous notre contrôle.

Pour les forestiers des cantons de GE, FR, BE (excepté les élèves forestiers de Lyss) et GR, ainsi que pour la plupart des forestiers et cantonniers du canton de VD, les séances de prises de sang ont été organisées par les autorités sanitaires cantonales. Nous n'avons exercé de contrôle ni sur l'information dispensée à cette occasion, ni sur le remplissage des questionnaires.

Quelques semaines avant le début de cette étude, les forestiers du canton de GE ont été analysés pour la recherche d'anticorps dirigés contre le virus CEE. Ces tests ont été effectués par l'Institut de virologie de Zürich. Les résultats nous en ayant été communiqués, nous n'avons pas procédé à de nouvelles prises de sang. Par conséquent, seuls 5 forestiers ont pris part à notre enquête dans ce canton.

Le questionnaire présenté aux forestiers et cantonniers est reproduit en Annexe 2.

IV.2.2. COLLECTES AUPRÈS DES DONNEURS DE SANG

Ces collectes ont été organisées dans les cantons des GR et du VS par les centres régionaux de la Croix-Rouge lors de leurs campagnes de don de sang, respectivement en août-septembre et en octobre 1989.

Dans le canton des Grisons, les donneurs de sang habitant à proximité du foyer d'encéphalite à tiques de Grünsch-Seewis-Landquart [329] ont rempli le questionnaire (Annexe 2) sous le contrôle des équipes locales de prises de sang. Les autres donneurs du canton des GR, ainsi que ceux du canton du

VS, n'ont pas reçu de questionnaire; la Croix-Rouge nous a néanmoins fait parvenir des informations concernant leurs âge, sexe et domicile.

IV.2.3. ECHANTILLONS DE SANG EN PROVENANCE DES PATIENTS D'HÔPITAUX

Nous avons analysé des prélèvements sanguins effectués, entre mars et juin 1987, chez des patients de l'Ospedale civico de Lugano/TI ainsi que dans les cliniques neurologiques universitaires de Bâle/BS, Zürich/ZH, Berne/BE et Lausanne/VD. Ces échantillons, collectés sans avoir connaissance des symptômes ayant conduit les patients en milieu hospitalier, avaient déjà été analysés par d'autres auteurs pour la recherche d'anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* [15, 203].

Nous avons en outre reçu, entre mars et juillet 1989, des échantillons de sang prélevés au hasard chez des patients de l'hôpital régional de La Béroche (St-Aubin)/NE.

Les patients d'hôpitaux n'ont pas rempli de questionnaire.

IV.2.4. COLLECTES DE SANG AUPRÈS DES MILITAIRES DANS LE CADRE DES ECOLES DE RECRUES (ER)

Cette enquête a porté sur l'ensemble des ER de Suisse lors de leur exercice d'été, entre juillet et novembre 1991. Au début des Ecoles de recrues, les soldats ont été sensibilisés au problème des tiques et des maladies qui leur sont associées. Cette information leur a été délivrée par le médecin d'ER ou au moyen de panneaux illustrés élaborés par nos soins. A la découverte d'une piqûre de tique, les militaires recevaient un questionnaire à remplir avec l'aide du médecin d'ER (Annexe 3), et une première prise de sang était effectuée. Un second échantillon sanguin était prélevé au moins 4 semaines plus tard.

Certains militaires ont été recontactés 1 année après la piqûre pour une nouvelle prise de sang. A cette occasion, ils ont eu à remplir un questionnaire supplémentaire (Annexe 4).

IV.3. CHOIX ET CAPTURE DES POPULATIONS DE TIQUES

Les investigations virologiques et bactériologiques ont porté essentiellement sur les phases libres (en période de quête, ou à jeun) du vecteur principal de *B. burgdorferi* et du virus CEE: *I. ricinus*. Dans le cadre de l'enquête entreprise au sein des écoles de recrues, nous avons analysé les tiques prélevées sur les militaires.

IV.3.1. CAPTURE ET CONSERVATION DES TIQUES EN PHASE DE QUÊTE

Les tiques à l'affût ont été capturées selon la méthode dite "du drapeau" [6], qui consiste à traîner sur la végétation un linge éponge blanc d'une surface de 1 m². Après quelques essais de quadrillage systématique des zones de capture, il est rapidement apparu que les tiques étaient particulièrement abondantes en bordure des voies d'accès, sur 50 cm à 1 m de part et d'autre des chemins. Pour cette raison, et parce que les promeneurs se contentent généralement de suivre les chemins tracés, nous avons concentré nos captures sur les sentiers forestiers, le plus souvent selon des bandes de 50-100 m de long sur environ 1 m de large. Sur les chemins carrossables, nous avons séparé les tiques provenant de chaque côté de la voie; sur les sentiers étroits, où la portion de terrain à découvert ne constituait pas un obstacle au passage des tiques, les deux côtés n'ont pas été distingués.

En raison du très faible pourcentage de larves infectées par voie transovarienne par les deux agents pathogènes dans la nature - et, par conséquent, de leur rôle négligeable d'indicateurs de foyers - nous n'avons analysé que des nymphes et des adultes.

Les tiques ont été brièvement lavées dans une solution de H₂O₂ à 3% puis dans de l'éthanol à 70°, ensuite de quoi elles ont été rincées et placées par groupes de 5-60 individus, selon le stade évolutif et le sexe, dans un milieu de congélation stérile (solution saline selon Hank, pH 7,4, enrichie de 0,05% d'albumine sérique de bovin (BSA) et additionnée de 100 U.I./ml de pénicilline (Gibco BRL) et 100 µg/ml de kanamycine (Gibco BRL). Elles ont ensuite été congelées et conservées à -60 °C* jusqu'au moment de leur analyse.

* Les diverses étapes de notre travail ont été effectuées dans des laboratoires différents, disposant de congélateurs de températures variables, comprises entre -60 °C et -80 °C. Nous indiquons dans ce chapitre la température maintenue par chacun des congélateurs considérés.

IV.3.2. CAPTURE ET CONSERVATION DES TIQUES EN COURS DE GORGEMENT

Les tiques découvertes par les militaires en train de piquer ont été soit directement préparées pour la détection du virus CEE et de *B. burgdorferi* par immunofluorescence (cf IV.5.2.), soit congelées à -60°C , individuellement et à sec, en prévision des tests de PCR (cf IV.5.5.).

IV.4. ANALYSE DES ECHANTILLONS DE SANG

L'irruption d'un corps étranger dans un organisme déclenche une avalanche de processus de défense, spécifiques ou non. Parmi les mécanismes spécifiques, l'immunité à médiation humorale est caractérisée par la production d'anticorps, notamment les immunoglobulines M (IgM) et les immunoglobulines G (IgG). Les IgM apparaissent rapidement, atteignent un titre maximal en quelques semaines, puis disparaissent progressivement. Les IgG sont produites plus tardivement, mais persistent durant des mois, voire des années. Le dosage d'anticorps spécifiques permet donc de mettre en évidence des cas d'infection par des microorganismes, alors même que ceux-ci ont disparu du sang circulant ou ne peuvent être mis en évidence par des méthodes directes.

Dans notre étude, nous avons procédé à la recherche des anticorps de classe IgG pour la mise en évidence de contacts anciens avec *B. burgdorferi* ou le virus CEE, les IgM n'étant quantifiées que pour vérifier l'existence d'une infection récente.

IV.4.1. ELISA

Cette technique permet la mise en évidence d'antigènes ou d'anticorps contenus dans un échantillon, par formation d'un complexe immun révélé par une réaction enzymatique.

Dans l'ELISA pour la détection des anticorps, l'antigène viral ou bactérien est adsorbé sur une surface de plastique (plaques de microtitration). Une dilution du sérum à tester est ajoutée. Si l'échantillon contient des anticorps spécifiques, ceux-ci vont se fixer à l'antigène immobilisé sur le plastique. Un conjugué (globulines dirigées contre les anticorps recherchés), marqué avec une enzyme, est ajouté; il va se fixer au complexe antigène-anticorps précédemment formé. Chaque étape est suivie d'une série de rinçages

destinés à éliminer les éléments non fixés qui pourraient provoquer des réactions non spécifiques. Le substrat est enfin ajouté. Sa dégradation par l'enzyme va provoquer une réaction colorée, d'autant plus intense que la quantité d'anticorps spécifiques présents est importante. L'ELISA permet donc, à partir d'une seule dilution de sérum, d'obtenir des résultats à la fois qualitatifs et quantitatifs.

IV.4.1.1. ELISA pour la détection des anticorps de classe IgG dirigés contre le virus CEE

Ce test a été adapté d'après Matile [197].

L'antigène viral (souche 1.40 du virus CEE, isolée à partir d'*I. ricinus* capturés dans la région de Schaffhouse [330]) a été produit sur cultures primaires de fibroblastes de poulet et purifié sur gradient de saccharose selon la méthode décrite par Matile [197]. Il a été dilué dans un tampon TEA (Triethanolamine 0,05M, NaCl 0,1M - pH 8,0), puis aliquoté et conservé à -60 °C. Le même lot d'antigène nous a servi pour la totalité des tests.

Pour le test ELISA, l'antigène est dilué à 0,8 µg de protéines par ml [197] dans un tampon carbonate-bicarbonate 0,05M, pH 9,6. 60 µl en sont pipetés dans chacune des cupules d'une plaque de microtitration à fond plat (Dynatech Microelisa Plates M129A, Dynatech Produkte AG). Pour éviter un "effet de bord" indésirable, les puits situés en périphérie de la plaque ne sont pas utilisés. La plaque est incubée durant la nuit à 4 °C en chambre humide. Elle est ensuite rincée trois fois avec du tampon PBS enrichi de 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween).

Les sérums à tester et le sérum de contrôle négatif sont dilués à 1:40 dans du tampon Tris (NaCl 0,15M, Na₂EDTA 1mM, Tris-HCl 0,05M, BSA 0,1%, Tween 20 0,05% - pH 7,4). Ils sont ajoutés à raison de 50 µl par puits (2 puits par sérum). 2 cupules ne sont remplies que de tampon Tris ("blancs"): elles permettront de déterminer le "bruit de fond" du test. Une courbe standard est établie au moyen de dilutions successives (1:20, 1:40 ... 1:640) d'un sérum positif de référence (dans notre cas: sérum provenant d'une personne ayant récemment subi une immunisation active complète, et dont le titre d'IgG s'est avéré supérieur à 480 VIEU (Vienna Units) du test de référence commercialisé en kit [Immunozyz FSME IgG, Immuno]). La plaque est incubée pendant 1h30 à 37 °C en chambre humide, puis rincée trois fois dans du PBS-Tween.

Le conjugué (Goat anti-Human IgG (Fc)/Po, Nordic, Biogenzia Lemania SA) est dilué à 1:1'000 dans le tampon Tris. 50 µl en sont pipetés dans les cupules et la plaque mise à incuber 3h à température ambiante. Après avoir

été rincée comme décrit plus haut, la plaque est encore lavée 3 fois avec de l'eau distillée.

Le substrat (Orthophénylène diamine (OPD), Fluka AG) est dilué à 0,4 mg/ml dans un tampon phosphate-citrate 0,1M - pH 5,0 additionné de 0,4 µl/ml de H₂O₂ à 30%. 200 µl de cette solution sont pipetés dans les cupules. Après environ 30 minutes d'incubation à l'obscurité, la réaction colorimétrique est stoppée avec 50 µl de H₂SO₄ 2,5M. La densité optique est mesurée à 490 nm avec un ELISA-Reader (Dynatech, MR 580).

Le seuil de positivité a été établi sur la base de l'analyse d'échantillons de sang provenant de 66 donneurs de sang habitant des régions situées au-dessus de 1'000 m. d'altitude - où le risque de contacts avec des tiques est très faible - et de 39 personnes vaccinées contre le virus CEE (forestiers ayant subi au minimum 3 injections, la dernière effectuée moins de 3 ans avant la prise de sang) ou ayant souffert d'une encéphalite à tiques. Les résultats ont été exprimés en logarithmes de la dilution correspondante du sérum positif de référence (courbe standard), abrégés log.dil ($\log_{10} \text{dil} = a \cdot \text{DO} + b$, où a=pente, DO=densité optique et b=constante). La valeur log.dil. de 2,6 a été choisie comme seuil de positivité, avec un risque d'erreur (faux négatifs) de 7,7%; elle correspond à une valeur comprise entre 30 et 60 VIEU (Vienna Units) du test commercialisé de référence (Immunozyzm FSME IgG, Immuno).

IV.4.1.2. ELISA pour la détection des anticorps de classe IgM dirigés contre le virus CEE

Pour la détection des IgM dans les sérums, nous avons recouru au test de référence commercialisé en kit (Immunozyzm FSME IgM, Immuno), en respectant le protocole conseillé. Conformément aux instructions du fabricant, tous les sérums présentant une DO supérieure au sérum de référence IgM-positif "low level" (livré avec le kit) sont considérés comme positifs.

IV.4.1.3. ELISA pour la détection des anticorps de classe IgG dirigés contre *B. burgdorferi*

Les caractéristiques du test utilisé ont été décrites par Fahrner et al [76].

Brièvement, l'antigène, constitué de sonicats de *B. burgdorferi* (souche B31), est dilué à 5 µg de protéines/µl; 50 µl de cette suspension sont répartis dans chacun des puits d'une plaque de microtitration à fond plat (Dynatech

Microelisa Plates M129A, Dynatech Produkte AG). Les cupules périphériques ne sont pas utilisées en raison de l'effet de bord. L'antigène est laissé à adsorber toute une nuit en chambre humide à 4 °C. La plaque est ensuite lavée 3 fois dans du PBS-Tween (cf IV.4.1.1.).

Les sérums à tester sont dilués à 1:200 dans une solution de dilution composée de tampon PBS additionné de 2% de BSA et 2% de Tween 20. Le sérum de contrôle négatif est dilué à 1:300. Une courbe standard est effectuée avec 6 dilutions (1:300, 1:600, 1:1'200, ..., 1:9'600) d'un sérum de référence positif ("pool" de sérums définis comme fortement positifs lors d'autres études sérologiques). 2 puits sont utilisés pour le contrôle du "bruit de fond". La plaque est incubée durant 2 heures à 37 °C en chambre humide, puis lavée.

50 µl du conjugué à la peroxydase (Goat anti-Human IgG (Fc)/Po, Nordic, Biogenzia Lemania SA, Lausanne) sont ajoutés à la dilution 1:1'000, puis incubés 1 heure à 37 °C en chambre humide.

Après rinçage, 100 µl de substrat sont distribués dans les cupules (Orthophénylène diamine (OPD), Fluka AG) dilué à 0,4 mg/ml dans un tampon phosphate-citrate, pH 5,0, additionné de 0,4 µl/ml de H₂O₂ à 30%. La réaction est stoppée après environ 5 min. avec 50 µl de H₂SO₄ 2,5M. La densité optique est mesurée à 490 nm (ELISA-Reader, Dynatech, MR 580).

Le seuil de positivité a été établi par les auteurs du test à la valeur log.dil de 3,74 [76]. On considère qu'il y a variation significative du titre si la valeur du log.dil. augmente ou diminue d'au moins 0,38 [333] et fanchit le seuil de positivité.

Le titre d'anticorps peut être également exprimé en "unités ELISA". Le seuil de positivité (correspondant au log.dil. de 3,74) y a été établi à 123 unités ELISA. Contrairement au log.dil, dont les valeurs basses indiquent un taux élevé d'anticorps, les unités ELISA augmentent avec le titre.

IV.4.2. TEST DE CAPTURE (ELISA-CAPTURE) POUR LA DÉTECTION DES ANTICORPS DE CLASSE IGM DIRIGÉS CONTRE *B. BURGENDORFERI*

Dans ce test sérologique, plus sensible qu'un ELISA classique, les anticorps contenus dans un échantillon sont "capturés" entre des immunoglobulines anti-humaines fixées sur le plastique et l'antigène bactérien. La démarche est ensuite la même que pour un ELISA classique.

Ce test a été effectué, alternativement, et avec les mêmes résultats, selon le protocole décrit par Robert [268], ou au moyen d'un test commercialisé

(Dako ELISA μ -capture Lyme Borreliosis Kit, Instrument Gesellschaft), en respectant le protocole indiqué.

Le seuil de positivité correspond à la valeur atteinte par le plus faible de trois sérums positifs de référence, livrés avec le kit.

IV.4.3. TEST DE WESTERN BLOT POUR LA DÉTECTION DES ANTICORPS DE CLASSE IGG DIRIGÉS CONTRE *B. BURGDORFERI*

La technique de Western blot permet l'identification des anticorps dirigés contre un ou plusieurs antigènes présents dans un échantillon protéique. Dans le cas qui nous intéresse, les protéines de *B. burgdorferi* (antigène) sont fragmentées sur un gel d'électrophorèse et transférées sur filtre de nitrocellulose. Après blocage des sites non spécifiques, le sérum à tester est ajouté, puis le conjugué qui se fixera sur le complexe antigène-anticorps fixé sur la nitrocellulose. La révélation fera apparaître les bandes correspondant aux antigènes contre lesquels les anticorps spécifiques ont été formés.

Les tests de Western blot ont été effectués par R. Lienhard, du Laboratoire de diagnostic parasitaire de l'Institut de Zoologie de Neuchâtel; il utilise un test modifié d'après Laemmli [171], Knecht *et al* [146] et Leary *et al* [177]. Les principes et les étapes en ont été détaillés par Bovet [47] et Lienhard [185], et son application à *B. burgdorferi* par Garcia [82].

L'antigène utilisé correspond à la souche-type B31 de *B. burgdorferi* (Deutsche Sammlung von Mikroorganismus, D-3300 Braunschweig, No 4680). Il est dilué dans un tampon d'échantillon selon Laemmli [171] à une concentration déterminée par turbidimétrie et correspondant à environ 10^8 bactéries/ml (Lienhard, comm. pers.).

Les protéines sont fragmentées par migration sur gel d'électrophorèse 12% (SDS-PAGE) selon Laemmli [171]. Le transfert sur filtre de nitrocellulose 0,2 μ m (Schleicher & Schuell) est effectué par électrotransfert en milieu semi-sec utilisant le système Novablot (LKB).

Les sites non spécifiques sont saturés durant 1h avec un tampon PBS-lait 5% (PBS 10mM, NaCl 150mM, lait 5%, pH 7,35). Après rinçage, les bandes sont mises à incuber avec le sérum à tester, dilué à 1:200 dans du tampon de dilution (PBS-lait 1%).

La révélation est effectuée d'après Leary *et al* [177]. Après un nouveau rinçage, le conjugué (anticorps anti-IgG (γ) humaines de chèvre marqués à la phosphatase alcaline, KPL), est ajouté et incubé pendant 2h, dilué à 1:2'000 dans le tampon de dilution. La solution de révélation consiste en un mélange de 50 μ l de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate dans du

diméthyl-formamide à 33 mg/ml, et de 100 µl de nitro blue tetrazolium dans de l'éthylèneglycol monométhyléther à 10 mg/ml, le tout dans 10 ml de tampon phosphate AP.

IV.4.4. IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (IFAT: IMMUNO-FLUORESCENCE ANTIBODY TEST) POUR LA DÉTECTION DES ANTICORPS DE CLASSE IGG DIRIGÉS CONTRE *B. BURGDORFERI*

Dans ce test d'immunofluorescence, le complexe immunitaire formé par l'antigène et l'anticorps recherché est mis en évidence en lumière UV par un conjugué marqué à la fluorescéine.

La préparation de l'antigène et sa fixation ("spots") sur des lames de microscopie ont été décrites en détail par Chamot [55] et Zhioua [333].

Le sérum à tester est dilué à 1:8, 1:16, ... 1:1024 dans du tampon PBS 0,3M - pH 7,35 - et distribué sur les "spots" d'antigène. Deux "spots" sont réservés aux sérums de contrôle positif et négatif. Après 30 min. d'incubation à 37 °C en chambre humide, les lames sont lavées dans le tampon PBS et séchées.

Le conjugué (Fluorine-G, Globuline anti-IgG humaine marquée à la fluorescéine, Bio Mériex), dilué à 0,5% dans le PBS, est distribué sur chaque "spot".

Après incubation, rinçage et séchage, les lames sont montées dans un mélange Glycérol/PBS 9:1 et lues au microscope UV (Olympus BH-2) au grossissement 400x.

Le seuil de positivité est fixé à 1/256. Une différence de 2 dilutions correspond à une variation significative du titre (séroconversion).

IV.5. ANALYSE DES TIQUES

L'analyse des tiques a été effectuée soit à partir d'échantillons homogénéisés, soit avec des tiques écrasées sur des lames de microscopie.

IV.5.1. PRÉPARATION DES HOMOGÉNATS DE TIQUES

Les tiques, individuellement ou par lots ("pools") de même stade, même lieu et même date de capture, sont broyées dans des homogénéisateurs de verre

contenant 1 ml de milieu de maintenance pour cultures de cellules PS (voir ci-dessous: IV.5.3.3.). Le broyat est filtré sur membrane millipore de 0,22 μm (Millipore Corporation), puis aliquoté en prévision des analyses ultérieures (homogénat).

IV.5.2. PRÉPARATION DES TIQUES SUR LAMES DE MICROSCOPIE ("SQUASHES")

Des lames de microscopie téflonnées sont dégraissées au moins 48 h dans un mélange acétone-éther 3:1. La tique, à l'état frais, est maintenue sur un "spot" au moyen d'un instrument appuyé sur le scutum. A l'aide d'une brucelle pointue, l'extrémité de l'abdomen est percée, puis la tique est vidée de ses entrailles par pressage ("squash"). Au cours de cette opération, la tique est déplacée sur d'autres "spots" de manière que son contenu ne forme qu'une fine pellicule sur chaque "spot". La lame est ensuite séchée toute une nuit en incubateur à 37 °C, puis fixée 10 min dans de l'acétone froid. Elle peut ensuite être conservée à -20 °C jusqu'à la réalisation du test d'immunofluorescence.

IV.5.3. IMMUNOFLUORESCENCE (IF)

Dans cette technique, l'agent pathogène recherché est mis en évidence grâce à un anticorps spécifique marqué à la fluorescéine.

IV.5.3.1. Immunofluorescence indirecte sur "squash" (IF/S) pour la détection du virus CEE

Nous avons utilisé pour la détection du virus CEE une méthode de détection indirecte basée sur les particularités chimiques de la biotine et de la streptavidine. La streptavidine possède des sites de forte affinité pour la biotine et ne se fixe pas de manière non spécifique aux lectines et autres composants cellulaires. Il en résulte une amplification de l'intensité du signal avec réduction du "bruit de fond" et augmentation de la sensibilité et de la fiabilité [93].

La sensibilité accrue du complexe streptavidine/biotine, par rapport aux méthodes conventionnelles d'immunofluorescence, a été démontrée par

Gould *et al* en 1985 [93]. Le protocole d'immunofluorescence que nous avons utilisé est inspiré des travaux de ces auteurs.

Les lames préparées selon IV.5.2. sont lavées 5 min. dans du PBS, puis égouttées. Un anticorps monoclonal de souris dirigé contre les Flavivirus (TCF H86.13, produit à l'Institut de Virologie et de microbiologie de l'environnement d'Oxford/GB, ci-après IVEM) est ajouté non dilué. Les lames sont incubées 45 min. à 37 °C en chambre humide, puis rincées 10 min. dans du PBS et égouttées.

Le conjugué (Sheep anti-mouse Ig, biotinylated whole antibody, Amersham, UK), dilué à 1:50 dans du PBS, est ajouté. Les lames sont remises à incuber 45 min. à 37 °C.

Après un nouveau rinçage et égouttage, le complexe streptavidine/fluorescéine (Amersham) est ajouté et incubé 10 min. à température ambiante. Après un dernier rinçage dans le PBS, les lames sont égouttées, montées dans du glycérol/PBS 9:1 et observées en lumière UV (Olympus BH-2) au grossissement 200x.

Les contrôles positifs et négatifs utilisés pour ce test sont, respectivement, des nymphes d'*I. ricinus* infectées à l'état larvaire par le virus Louping III, et des adultes d'*I. ricinus* d'élevage indemnes de tout virus.

IV.5.3.2. Immunofluorescence directe sur "squash" (IF/S) pour la détection de *B. burgdorferi*

Sur chaque "squash" sont déposés quelques microlitres d'un conjugué marqué à la fluorescéine (IgG anti-*B. burgdorferi* humaines, préparées selon Peacock *et al* [235], dont la dilution a été déterminée lors de tests préalables). Après 30 minutes d'incubation à 37°C, les lames sont rincées dans du tampon PBS (0,15M, pH 7,35); elles sont ensuite séchées, puis montées dans du glycérol/PBS 9:1. La lecture est effectuée en lumière UV au grossissement 400x (Olympus BH-2).

Cette méthode est applicable, avec obtention d'une excellente fluorescence, à des tiques préalablement conservées à sec à -20 °C [observation personnelle].

IV.5.3.3. Immunofluorescence indirecte sur cultures de cellules (IF/C) pour la détection du virus CEE

Le test d'immunofluorescence proprement dite est effectué sur des lamelles couvre-objet après multiplication préalable du virus dans des cellules susceptibles.

Les protocoles de mise en culture et d'immunofluorescence ont été modifiés d'après Gould *et al* [93] en collaboration avec cet auteur.

4 lamelles couvre-objet de verre (1 cm de diamètre) sont disposées après stérilisation dans des boîtes de Petri de 5 cm de diamètre. Dans chaque boîte sont distribués 2,5 ml de suspension de cellules rénales de porc (PS, lignée continue), à une concentration de 2×10^7 cellules/ml dans du milieu de croissance [Eagle's Minimum Essential Medium modifié (E-MEM) (Gibco BRL) additionné de 2mM de L-glutamine, 1,5 g/l de NaHCO_3 , 50'000 UI/l de pénicilline (Gibco BRL), 150 mg/l de streptomycine (Gibco BRL) et 5% de sérum de veau foetal inactivé (FCS, Gibco BRL) - pH 7,2]. Les cultures sont mises à incuber 4 h à 37 °C pour permettre aux cellules de se fixer. 1,5 ml de milieu est ensuite retiré de chaque culture, de façon que seule une fine pellicule de liquide recouvre les cellules. 100 µl d'homogénat ou de solution de contrôle sont inoculés (témoin de contrôle négatif: milieu de maintenance, voir plus loin; témoin positif: suspension de cerveaux de souris infectées par le virus CEE, souches Hypr ou I.40). Après 1 h 30 d'incubation à 37 °C, le liquide est entièrement retiré et remplacé par 2,5 ml de milieu de maintenance frais (milieu de croissance avec seulement 1% de FCS). Cette opération a pour but d'éliminer les substances contenues dans les tiques qui pourraient s'avérer toxiques pour les cellules. Les cultures sont remises à incuber. Après 4 jours à 37 °C, le surnageant cellulaire est recueilli et conservé à -70 °C en prévision des tests ultérieurs. Les lamelles couvre-objet sont retirées, rincées 5 min. dans du PBS, séchées et fixées 10 min. dans de l'acétone à -20 °C. Si nécessaire, elles peuvent être conservées à -20 °C.

Le protocole d'immunofluorescence est ensuite le même que décrit sous IV.5.3.1. Deux lamelles au moins sont lues pour chaque échantillon.

IV.5.4. TITRATION DU VIRUS CEE SUR CULTURES CELLULAIRES ("PLAQUE ASSAY")

Des dilutions décimales (10^{-1} ... 10^{-5}) de l'échantillon à tester sont effectuées dans du PBS. Parallèlement, des cellules PS sont diluées à 4×10^5 cellules/ml dans du milieu de maintenance (milieu de croissance contenant 3% de FCS). 0,5 ml de la suspension cellulaire sont répartis dans chacun des 24 puits d'une plaque de titration (Linbro Plates, Flow Laboratories). 100 μ l de chaque dilution d'échantillon, ainsi que des témoins de contrôle négatif (PBS) et positif (suspension dans du PBS de cerveaux de souris infectées par le virus CEE, souche Hypr), sont immédiatement ajoutés, à raison de 2 puits par inoculum. La plaque est mise à incuber 4 h à 37 °C.

Les cultures sont ensuite recouvertes par 0,5 ml/puits d'une solution à 1,25% de carboxyméthylcellulose (CMC) dans du milieu de maintenance ("overlay"). Les plaques sont alors remises en incubateur et ne sont plus manipulées durant 5 jours.

Passé ce délai, les cultures de virus sont inactivées au moyen de quelques gouttes (environ 0,5 ml) d'une solution saline de formol à 10%. Après 10 minutes de fixation, le surnageant est éliminé, puis les cellules colorées au violet cristal durant 2 minutes. Après rinçage, les plages (zones de destruction cellulaire) sont comptées et le titre établi. Par convention, chaque plage correspond au site d'infection d'un seul virion de l'inoculum; connaissant la dilution et la quantité d'inoculum de chaque puits, il est aisé de calculer le titre viral de la suspension testée. Le titre est exprimé en PFU (Plaque Forming Units)/ml de la suspension d'origine.

IV.5.5. PCR

La technique de PCR est une méthode d'amplification *in vitro*, au travers d'une série de réactions catalysées par une enzyme polymérase, de segments spécifiques choisis d'ADN compris entre deux régions de séquence connue. Deux oligonucléotides (amorces, ou "primers") de séquences différentes, complémentaires de celles du double brin d'ADN, flanquent chaque extrémité de la portion choisie d'acide nucléique. Par une succession de cycles de dénaturation de l'ADN, fixation des amorces et polymérisation, la quantité d'ADN initialement contenue dans l'échantillon testé sera augmentée de façon théoriquement exponentielle. Ce fort pouvoir d'amplification permet la détection de très faibles quantités d'ADN, et cela même en présence importante d'acides nucléiques non spécifiques [72, 272].

Pour assurer l'uniformité des tests, les réactifs ont été préparés et mélangés immédiatement avant la PCR; ce "cocktail" était ensuite aliquoté selon le nombre d'échantillons à tester.

IV.5.5.1. PCR pour la détection du virus CEE

Le protocole de PCR nous a été communiqué par le Dr E. Gould, de l'IVEM. Nous avons amplifié une séquence du gène codant pour la glycoprotéine E. Après des essais préliminaires, notre choix s'est porté sur les amorces LIE 3 (5'-CATGAGGAGCGCCAAA-3') et LIE 4 (5'-CCCCG GGGGAAGCTGCATCTCTATGA-3'), qui correspondent respectivement aux nucléotides 1600-1615 et 1982-2008 du virus Louping Ill [288]. Ces amorces permettent l'amplification d'une séquence de 409 bases comprises entre les nucléotides 1682 et 2090 du virus CEE [195]. Des tests préalables ont montré que ces amorces assurent la détection de différentes souches de virus CEE et ne réagissent pas avec des virus n'appartenant pas à la famille des Flaviviridae.

IV.5.5.1.1. Extraction de l'ARN

L'ARN viral est extrait selon Chomczynski et Sacchi [57] dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml.

100 µl d'homogénat de tiques sont ajoutés à 500 µl de solution de dénaturation (thiocyanate de guanidinium 4M, citrate de sodium 25 mM (pH 7,0), 2-mercaptoethanol 0,1 M, sarcosyl 0,5%). Y sont ajoutés successivement, et après mélange par inversion: 100 µl d'acétate de sodium 2M (pH 4,0), 500 µl de phénol saturé d'eau et 100 µl d'une solution de chloroforme/alcool isoammyl 49:1. Le mélange est homogénéisé (vortex) pendant 10 secondes, puis refroidi 15 min. dans de la glace.

Après 20 min. de centrifugation à 4 °C (10'000 g), la phase aqueuse (supérieure) est transférée dans un nouveau récipient, mélangée à 1 ml d'isopropanol et placée 1 h à -20 °C (ou 20 min. dans de l'azote liquide) pour permettre à l'ARN de précipiter.

Une nouvelle sédimentation à 4 °C (10'000 g) pendant 20 min est effectuée. Le culot est resuspendu dans 150 µl de solution de dénaturation et précipité dans 150 µl d'isopropanol, pendant 1 h à -20 °C.

Après 10 min. de centrifugation à 4 °C, l'ARN est rincé dans de l'éthanol 75% à -20 °C, sédimenté et séché sous vide d'air. Il est conservé dilué dans 10 µl d'H₂O milliporée.

IV.5.5.1.2. Transcription réverse

1 µl de l'amorce LJE 4 est ajouté à 10 µl de suspension d'ARN pour un volume total de 12 µl dans de l'H₂O milliporée. Les "primers" sont appariés à l'ARN par chauffage durant 10 min. à 70 °C. L'ARN viral est converti en ADNc dans 25 µl de réactif de transcription (Annexe 5-1) à 37 °C durant 1h. La synthèse d'ADNc est stoppée par maintien durant 10 minutes dans un bain à 70 °C.

IV.5.5.1.3. PCR

La PCR est effectuée avec 10 µl d'ADNc dans du réactif de PCR (Annexe 5-2) pour un volume total de 100 µl. Le programme d'amplification consiste en 1 cycle initial de dénaturation de 3 min. à 95 °C, suivi de 35 cycles de dénaturation (1 min.30 à 95 °C), appariement (2 min. à 55 °C) et polymérisation (2 min. à 72 °C). Une étape finale d'extension (10 min. à 72 °C) est ajoutée en fin de programme.

Le produit de la réaction est visualisé aux rayons UV après migration sur gel d'électrophorèse à l'agarose 1,3% et coloration au bromure d'éthidium.

IV.5.5.2. **PCR pour la détection de *B. burgdorferi***

Nous avons recouru à un protocole de PCR développé par le Dr D. Carey, de l'IVEM (non publié), faisant intervenir le principe dit des "nested primers": une seconde amplification est effectuée avec le produit de la première, en utilisant un set d'amorces correspondant à une portion de la séquence amplifiée.

Pour la première amplification, nous avons utilisé la paire d'amorces OspA-N1 (5'-GAGCTTAAAGGAACTTCTGATAA-3') et OspA-C1 (5'-GTATTGTTGTAAGTAATTGT-3'), correspondant respectivement aux nucléotides Nos 334-356 et 874-894 du gène codant pour la protéine OspA de la souche borrélienne B31 [32, 112].

Pour la seconde amplification, nous avons introduit les amorces OspA-N2 (5'-ATGGATCTGGAGTACTTGAA-3') et OspA-C2 (5'-CTTAAAGTAACAGTTCCTTCT-3'), complémentaires des nucléotides Nos 362-381 et 693-713 du même gène [32, 112].

IV.5.5.2.1. Extraction de l'ADN

A 100 µl d'homogénat de tiques sont ajoutés 400 µl de solution de dénaturation (voir IV.5.5.1.1.). Après mélange par inversion, 500 µl d'une solution de phénol/chloroforme 3:1 sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé (Vortex) puis centrifugé 5 minutes (IEG Centra-microcentrifuge).

400 µl de la phase aqueuse (surnageant) sont transférés dans un tube propre contenant 40 µl d'acétate de sodium 3M, pH 5,2. 900 µl d'alcool absolu à -20 °C sont ajoutés. Les protéines sont laissées à précipiter au moins 30 minutes à -20 °C.

L'ADN est sédimenté 1 minute (IEG Centra-microcentrifuge), séché sous vide d'air puis resuspendu dans 10 µl d'H₂O.

IV.5.5.2.2. PCR

La première amplification est effectuée dans du réactif de PCR (Annexe 5-3) avec 1 µl de suspension d'ADN pour un volume total de 25 µl.

La seconde amplification est réalisée avec 1 µl du produit de la première PCR pour un volume total de 100 µl (réactif selon Annexe 5-4).

Le programme de PCR utilisé pour les deux amplifications consiste en 1 cycle préliminaire de dénaturation de 5 min. à 94 °C, suivi de 30 cycles de dénaturation-appariement-polymérisation (respectivement et successivement 30 sec. à 94 °C, 45 sec. à 37°C et 1 min. à 72 °C). La PCR est achevée sur un ultime cycle de polymérisation de 10 min. à 72 °C.

Le produit de la réaction est visualisé aux rayons UV après migration sur gel d'électrophorèse à l'agarose 1,3% et coloration au bromure d'éthidium.

IV.5.6. ELISA POUR LA DÉTECTION DU VIRUS CEE

Le protocole d'ELISA et les immunoglobulines anti-CEE (souche Hypr) ont été mis à notre disposition par le Dr J. Kopecky, de l'Institut de Parasitologie de České Budejovice (Rép. tchèque). Il s'agit d'un test de "capture" d'antigène. Son principe est le même que pour la détection des anticorps, sauf qu'ici l'antigène viral contenu dans l'échantillon est "capturé" entre un anticorps spécifique immobilisé sur le plastique et un sérum hyperimmun dirigé contre l'antigène. Sa sensibilité en a été augmentée par l'utilisation d'un complexe streptavidine/biotine.

5 µg de gammaglobulines lyophilisées anti-CEE (souche Hypr) de chèvre (Institut de parasitologie, České Budejovice, Rép. tchèque) sont dilués dans 5 ml de tampon carbonate-bicarbonate, pH 9,6. 50 µl de cette solution sont distribués dans les puits d'une plaque de microtitration à fond plat (Dynatech Immulon). Les rangées de cupules périphériques sont utilisées, des essais préalables ayant démontré l'absence d'un "effet de bord". Après une nuit d'adsorption à 4 °C, la plaque est rincée 3 fois avec une solution de lavage (PBS - 0,05% Tween 20).

Les sites non spécifiques sont bloqués avec 200 µl/puits de solution de lavage enrichie de 5% de FCS. La plaque est alors incubée 30 min. à 37 °C en chambre humide, puis rincée 3 fois comme décrit plus haut.

Les homogénats (préalablement inactivés durant la nuit avec une solution de β-propiolactone (Sigma) d'une concentration de 1:1'000), ainsi que les contrôles positifs (*Rh. appendiculatus* infectés avec le virus CEE, souche Hypr) et négatifs (*I. ricinus* d'élevage), sont ajoutés non dilués à raison de 50 µl/puits (2 puits par échantillon).

Après 1 h d'incubation à 37 °C, un nouveau cycle de rinçages est effectué.

50 µl de sérum hyperimmun anti-CEE (souche Hypr) de lapin (Institut de Parasitologie, České Budejovice, Rép. tchèque), dilué à 1:2'000 dans la solution de lavage enrichie de 2% de FCS (solution de dilution), sont pipetés dans chaque cupule et incubés 1 h à 37 °C.

Après rinçage, les puits sont incubés 1 h à 37 °C avec 50 µl d'immunoglobulines conjuguées à de la biotine (Donkey anti-Rabbit serum, biotinylated, Sigma), diluées à 1:500 dans la solution de dilution.

Une nouvelle série de rinçages est effectuée, puis 100 µl de streptavidine conjuguée à de la peroxydase (Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex, Amersham), diluée à 1:500 dans la solution de dilution, sont distribués dans chaque puits. La plaque est incubée 15 min. à 37 °C, puis rincée.

Le substrat (OPD, dilué à 0,45 mg/ml dans un tampon acétique, additionné de 1 μ l/ml de H₂O₂) est ajouté à raison de 100 μ l par puits. Après 2-3 min à l'obscurité, le développement colorimétrique est stoppé avec 100 μ l de 4N H₂SO₄. La densité optique est mesurée à 490 nm (ELISA-Reader). Un échantillon d'une densité optique (DO) supérieure à 0.200 (soit environ 4x la valeur du contrôle négatif) est considéré comme positif. Une DO comprise entre 0.150 et 0.200 est interprétée comme "douteuse".

IV.5.7. INFECTION DE SOURICEAUX POUR LA DÉTECTION DU VIRUS CEE

Les souriceaux d'une portée de 2-3 jours (souris blanches, souche TO, IVEM, Oxford/GB) sont infectés par injection intracérébrale de 10 μ l d'homogénat de tiques. L'état de santé des rongeurs est contrôlé quotidiennement durant 21 jours. Les animaux présentant des signes de paralysie sont tués par décapitation, et leurs cerveaux conservés à -70 °C.

V. RECHERCHE D'UNE METHODE DE DETECTION DU VIRUS CEE DANS LA TIQUE

Nous avons comparé le pouvoir de détection et l'intérêt pratique de 4 méthodes de détection du virus CEE:

- l'infection intracérébrale de souriceaux de 2-3 jours (cf IV.5.7.),
- l'ELISA (cf IV.5.6.),
- l'immunofluorescence sur cultures de cellules (IF/C) (cf IV.5.3.3.),
- la PCR (cf IV.5.5.1.).

Les tiques utilisées pour ces tests ont été capturées dans les foyers suspects de Fribourg/FR, Lyss/BE, Belp/BE, du bas-Simmental/BE (2 sites) et de la colline du Santenberg/LU. Les lots importants de tiques ont été fractionnés selon la notation suivante (exemple):

- Z 1: ensemble des tiques capturées à une date et sur un site donnés;
- Z 1/1: ensemble des tiques contenues dans un seul tube de congélation et correspondant au même jour et au même lieu de capture;
- Z 1/1-1: fraction de cet ensemble, constituant 1 homogénat.

Les tiques ont été homogénéisées par "pools" de 4-30 selon la méthode décrite sous IV.5.1. Les expériences faisant intervenir le pouvoir infectieux du virus (inoculation à des souriceaux, mise en culture) ont été effectuées sans attendre. Pour les autres tests, les aliquots ont été congelés et conservés à -70 °C.

V.I. COMPARAISON DE LA FIABILITE DES METHODES TESTEES

Les différentes méthodes de détection du virus ont été appliquées aux homogénats et aux sumageants des cultures de cellules selon le schéma de la Figure 1:

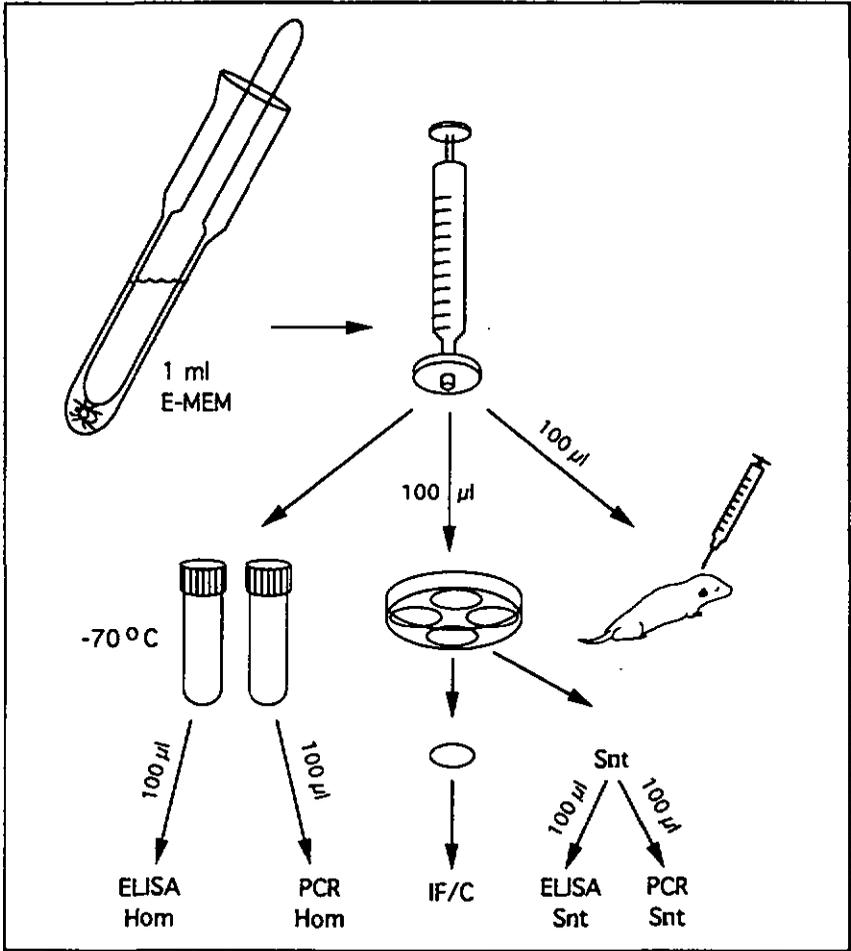


Figure 1: Etapes de la comparaison des méthodes de détection du virus CEE.
 Hom: Homogénat
 Snt: Surnageant cellulaire.

100 µl d'homogénat ont été affectés sans attendre à l'infection d'une portée de souriceaux; dans le même temps, 100 µl étaient inoculés aux cellules PS. Le reste a été aliquote (100 µl) en prévision des tests ultérieurs de PCR et ELISA, et congelé immédiatement à -70 °C. Après 4 jours d'amplification, le surnageant des cultures cellulaires (snt) a été recueilli et aliquote (100 µl) en prévision des analyses par ELISA et PCR. Les lamelles ont été préparées

pour l'IF/C (cf IV.5.3.3. et IV.5.3.1.). Nous avons pu ainsi analyser, pour chaque échantillon, l'homogénat par PCR, ELISA et inoculation à des souriceaux, et le produit d'amplification virale par PCR, ELISA et IF/C.

Nous avons également testé, par les mêmes méthodes, les milieux de congélation ou de maintenance de certains lots, ainsi que des tiques d'élevage (*I. ricinus*, Institut de Zoologie, Neuchâtel) indemnes de tout virus.

Au total, 28 échantillons ont été analysés par infection de souriceaux, IF/C, ELISA et/ou PCR. Les résultats en sont résumés dans le Tableau 1.

No de l'échantillon	Nature de l'échantillon	Méthodes d'analyse					
		Souris	IF/C	ELISA		PCR	
				hom	snt	hom	snt
Z 40/1-1	10 M	+	/	+	/	/	/
Z 40/1-2	5 M	+	/	+	/	/	/
Z 40/1-3	10 F	+	/	+	/	/	/
Z 52/1-1	10 F	-	/	/	/	/	/
Z 52/1-2	6F/1M	-	/	+	/	/	/
Z 52/1-3	10 M	-	/	/	/	/	/
Z 52/1-4	4 M	-	/	d	/	/	/
Z 54/1	5 F	-	/	-	/	/	/
Z 42/1-1	10 M	+	+	+	+	-	+
Z 42/1-2	10 M	-	-	-	-	-	-
Z 42/1-3	10 F	+	+	+	+	-	+
Z 42/1-4	10 F	-	-	/	-	-	-
Z 42/1-5	10 F	-	-	+	-	-	-
Z 42/1-6	10 F	+	+	+	+	-	+
Z 42/1-7	30 N	-	-	-	-	-	-
Z 42/1-8	30 N	-	-	-	-	-	-
MMZ 42	MM	-	-	-	-	-	-
<i>I. ricinus</i>	5M /5F	-	-	/	-	/	/
MCZ 40/1	MC	-	-	-	-	/	/
MCZ 42/1	MC	-	-	-	-	/	/
Z 61/1	10 F	+	+	+	-	/	/
Z 70/1-1	10 F	-	-	+	-	/	/
Z 70/1-2	11 F	-	-	+	-	/	/
Z 60/1-1	10 M	-	-	+	-	/	/
Z 60/2-1	10 F	-	-	+	-	/	/
Z 60/2-2	6 F	-	-	+	-	/	/
XL 10/1	11 F	-	-	+	-	/	/
XL 10/3	12 M	-	-	+	-	/	/

Tableau 1: Analyse comparative de différentes méthodes de détection du virus CEE dans des "pools" de tiques (*I. ricinus*).
M: Mâles F: Femelles N: Nymphe *I. ricinus*: tiques d'élevage.
MC: Milieu de congélation MM: Milieu de maintenance.
MMZ 42: Milieu de maintenance utilisé dans l'analyse des lots Z 42/1-1 à 8.
MCZ 40/1 ou 42/1: Milieu de congélation des tubes Z 40/1 ou Z 42/1.
+: Positif -: Négatif d: Douteux /: Non effectué.

La fiabilité des différentes méthodes, en comparaison avec l'isolement sur souriceaux, est résumée dans le Tableau 2 et schématisée sur la Figure 2. L'IF/C et la PCR sur surageant cellulaire apparaissent comme les méthodes les plus fiables, avec 100% de correspondance pour les échantillons tant positifs que négatifs. Par contre, la PCR appliquée aux homogénats ne permet pas la détection du virus. Enfin, l'ELISA donne des résultats mitigés: si tous les homogénats positifs ont été détectés par cette méthode, plus de la moitié des homogénats négatifs (9/17) apparaissent faussement positifs; en outre, 1/4 des surageants cellulaires contenant des virus ne provoque pas de réaction mesurable. Des analyses ultérieures ont démontré l'existence d'importantes réactions non spécifiques lors de l'examen des homogénats à partir de "pools" de tiques.

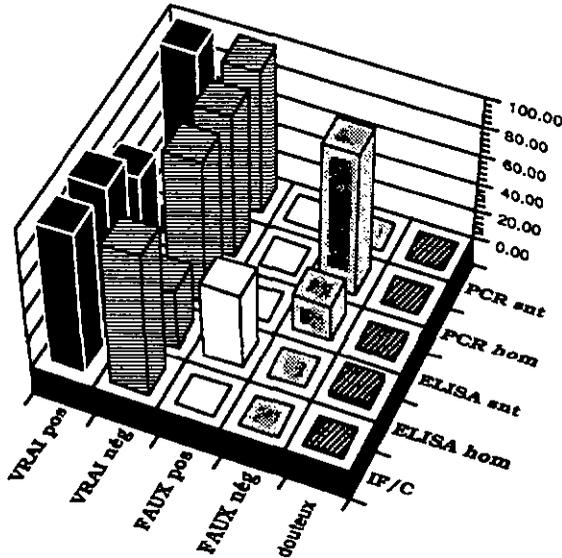


Figure 2: Schéma comparatif de la fiabilité de diverses méthodes d'analyse employées pour la détection du virus CEE dans des "pools" de tiques. Méthode de référence: infection IC de souriceaux.

Qualité du diagnostic	IF/C	ELISA (hom)	ELISA (snt)	PCR (hom)	PCR (snt)
	% effectifs*				
Correct	100 (20/20)	58,3 (14/24)	95,0 (19/20)	62,5 (5/8)	100 (8/8)
Incorrect	0 (0/20)	37,5 (9/24)	5,0 (1/20)	37,5 (3/8)	0 (0/8)
Douteux	0 (0/20)	4,2 (1/24)	0 (0/20)	0 (0/8)	0 (0/8)

Tableau 2: Concordance de diverses méthodes d'analyse avec l'infection IC de sourceaux pour la détection du virus CEE dans des "pools" de tiques.
* nombre d'échantillons répondant aux critères/nombre d'échantillons analysés.

V.2. COMPARAISON DU POUVOIR DE DETECTION DES METHODES TESTEES

Comme matériel infectieux, nous avons utilisé des dilutions décimales de suspensions à 20% dans du PBS de cerveaux de souris infectées par le virus CEE, souches I.40 et Hypr. Les dilutions ont été réparties en aliquots de 100 µl en prévision des tests à effectuer, puis congelées et conservées à -70 °C jusqu'aux tests.

Le titre des dilutions a été déterminé par titration sur cellules PS après 5 jours d'incubation (cf IV.5.4.).

100 µl de chaque dilution ont été analysés respectivement par ELISA, par PCR et par inoculation à des cultures de cellules (cf Figure 1, en gardant à l'esprit que tous les échantillons ont préalablement été congelés pour assurer une identité de leur pouvoir infectieux). Après 4 jours d'incubation, les lamelles ont été testées par IF/C et le surnageant cellulaire par ELISA (50 µl/puits).

Les limites de détection observées pour chaque méthode sont reportées dans le Tableau 3. La multiplication virale durant les 4 jours de culture est suffisante pour permettre la détection par IF/C d'un titre initial d'environ 10 PFU/100 µl. L'ELISA appliqué au surnageant cellulaire est en tout cas dix fois moins sensible, avec un seuil de détection compris entre 95 et 950 PFU/100 µl de titre initial.

En ce qui concerne l'analyse des échantillons non soumis à l'amplification par culture (homogénats de cerveaux), c'est la PCR qui donne les meilleurs résultats, avec un pouvoir de détection permettant de déceler 10 à 100 PFU. Quant à l'ELISA appliqué à l'échantillon initial, sa sensibilité ne lui permet de détecter que 10⁵ PFU ou plus de virus.

Souche virale	Titre	Avant culture		Après culture (4 jours)	
		ELISA /dil ¹	PCR /dil	ELISA /snt ²	IF/C ²
I.40	9,5 x 10 ⁵ PFU/100 µl*	+		+	L
	9,5 x 10 ⁴ PFU/100 µl*	d		+	L
	9,5 x 10 ³ PFU/100 µl*	-		+	+
	9,5 x 10 ² PFU/100 µl*	-		+	+
	9,5 x 10 ¹ PFU/100 µl*	-		d	+
	9,5 PFU/100 µl*	-		-	+
	9,5 x 10 ⁻¹ PFU/100 µl*	-		-	-
	9,5 x 10 ⁻² PFU/100 µl*	-		-	-
Hypr	10 ⁵ PFU**	+	+		
	10 ⁴ PFU**	-	+		
	10 ³ PFU**	-	+		
	10 ² PFU**	-	+		
	10 ¹ PFU**	-	+/-		
	1 PFU**	-	-		
	10 ⁻¹ PFU**	-	-		
	10 ⁻² PFU**	-	-		

Tableau 3: Pouvoir de détection des différentes méthodes de mise en évidence du virus CEE.

¹: La contenance de chaque puits est de 50 µl (2 puits/échantillon).

²: Résultat après 4 jours de culture, pour 100 µl d'inoculum.

*: Titre de la dilution/de l'inoculum.

** : Titre de l'échantillon (ELISA: 50 µl; PCR: 10 µl).

ELISA/dil: ELISA effectué sur 50 µl/puits de dilution (2 puits).

PCR/dil: PCR effectuée sur l'ADN extrait de 100 µl de dilution.

ELISA/snt: ELISA effectué sur le surnageant cellulaire.

IF/C: Immunofluorescence sur culture cellulaire.

L: Lyse complète des cellules +: Positif -: Négatif

d: Douteux +/-: Parfois positif, parfois négatif selon l'expérience.

Il apparaît donc qu'appliquée à des suspensions "pures" de virus, la PCR est une méthode de grande sensibilité. Cette constatation étant en contradiction avec les résultats présentés sous V.1. (cf Tableaux 1 et 2 et Figure 2), nous avons vérifié l'influence du matériel génétique provenant des tiques sur le déroulement de la PCR. Pour ce faire, nous avons procédé de la manière suivante:

- L'ARN viral a été extrait d'une suspension de virus CEE, souche Hypr, de titre connu. Après transcription, l'ADN_c obtenu a été dilué de manière décimale de 10⁵ à 10⁻² PFU/25 µl. Les aliquots ont été stockés à -20 °C.

- Parallèlement, une extraction d'ARN a été entreprise à partir d'un lot de 5 mâles et 5 femelles d'*I. ricinus* non infectés (élevage). Une transcription fictive, selon le protocole utilisé pour le virus CEE, a été effectuée, puis le produit a été dilué et aliquoté de manière à disposer d'un extrait équivalent à 1 tique/25 µl. Les aliquots ont été stockés à -20 °C.

L'extrait de tiques et l'ADN viral ont été maintenus à la dilution de 1 part pour 25 µl afin de correspondre à la concentration théoriquement obtenue après extraction et transcription à partir d'un exemplaire de tique capturé sur le terrain.

Une PCR a ensuite été effectuée simultanément avec 10 µl de chaque dilution de virus, en présence ou non de 10 µl d'extrait de tique, et le produit visualisé sur gel d'agarose (Figure 3).

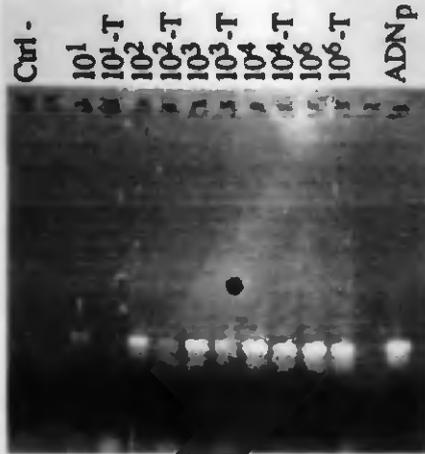


Figure 3: Comparaison du pouvoir de détection de la PCR appliquée à diverses dilutions de virus CEE, en présence ou non d'extrait d'*I. ricinus*.
 10¹: titre d'ADN viral (PFU) dans le produit de transcription réverse (25 µl).
 10¹-T: ADN viral (PFU) additionné d'extrait d'*I. ricinus*.
 ADNp: ADN plasmidial correspondant à la séquence recherchée (409 pb), utilisé comme marqueur.
 Ctrl-: Témoin de contrôle négatif (réactif de PCR+H₂O).

Si la détection du virus seul est encore possible avec 10 PFU dans l'échantillon de départ (10 PFU/25 μ l, soit 4 PFU/échantillon de PCR), la même quantité de virus, mêlée à de l'extrait de tique, n'est plus décelée. La même différence d'intensité de la réaction est observée avec 100 PFU dans l'échantillon de départ. Il apparaît donc que le matériel extrait d'*I. ricinus* contient des facteurs qui soit inhibent l'action de l'enzyme *Taq* polymérase, soit interfèrent avec l'amplification de la séquence désirée. La sensibilité du test s'en trouve réduite d'environ 10x.

V.3. DISCUSSION

Nous avons comparé et déterminé le seuil de détection de trois méthodes alternatives à l'expérimentation animale pour la mise en évidence du virus CEE dans les tiques.

L'intérêt majeur de l'ELISA et de la PCR réside dans leur rapidité d'exécution et le nombre élevé d'échantillons pouvant être testés simultanément. Basés respectivement sur la reconnaissance de l'antigène et la séquence génétique du virus, ils présentent un certain avantage sur les méthodes de détection faisant intervenir son infectivité. On sait en effet que le virus CEE connaît une phase d'éclipse, avec perte du pouvoir infectieux, lors de la mue de la tique [218, 252]. En outre, des souches peu pathogènes de ce virus ont été mises en évidence.

L'efficacité de ce type d'ELISA a déjà été démontrée [149] avec un variant à pathogénicité réduite du virus CEE: le virus "Skalica", isolé de *C. glareolus* dans l'ouest de la Slovaquie [101] (ce virus thermosensible n'est pas pathogène pour la souris adulte après inoculation extracérébrale). Elle s'est vérifiée dans notre cas avec un broyat de *Rh. appendiculatus* infectés par une autre souche thermosensible du virus CEE (ts 263, isolée de tiques capturées dans le sud de la Bohême (Rép. tchèque) [148], aimablement mise à notre disposition par le Dr Kopecky), ainsi qu'avec une suspension pure de cette même souche (résultats non reproduits; DO respectivement 0.265 et 0.695 au-dessus de la DO du témoin négatif constitué de *Rh. appendiculatus* sains). Matile avait également relevé la supériorité de cette technique appliquée à des organes contenant des virions à faible pouvoir infectieux [197]. Théoriquement, la PCR et l'ELISA permettraient donc la mise en évidence d'éventuels variants peu ou non pathogènes du virus CEE en Suisse.

La quantité de virus CEE contenue dans *I. ricinus* varie considérablement. Ainsi, Labuda *et al* [170] ont déterminé pour des nymphes infectées expérimentalement des titres maximums de $2,0 \log_{10}$ (soit 10^2) PFU/tique sur cellules PS. Kozuch *et al* [155] ont pour leur part établi sur des cellules primaires d'embryon de poule des taux de 12-24 PFU/ml pour les nymphes et de $0,2-28 \times 10^3$ PFU/ml pour les adultes, le titre observé dans les exemplaires capturés dans la nature n'excédant pas 180 PFU/ml (femelle). Toujours avec *I. ricinus*, Faivre (résultats non publiés) a mesuré des titres compris entre 2,50 et $6,25 \log_{10}$ ID₅₀ (Infectious Dosis 50% - dilution virale pour laquelle 50% des animaux infectés tombent malades ou meurent) chez des femelles infectées à l'état nymphal sur souris virémiques (titre viral établi entre 4 et 75 jours après la mue imaginale). L'ELISA tel que nous l'avons effectué se situe donc en-dessous de la limite de détection pour l'analyse individuelle d'*I. ricinus* capturés dans la nature. Nos résultats corroborent ceux d'autres auteurs, pour qui un passage préliminaire sur sourceaux ou sur cultures de cellules reste recommandé [149].

L'existence de facteurs inhibant l'activité de l'enzyme *Taq* polymérase dans les tests de PCR a déjà été observée dans des éléments tels que le sang, l'urine ou le liquide céphalo-rachidien [178, 228, 320]; Lebech et Hansen [178] relèvent que le pouvoir de détection de *B. burgdorferi* par la PCR est réduit de 10 fois en présence d'urine ou de liquide céphalo-rachidien. Ward *et al* [320], appliquant la PCR à l'amplification du virus Dugbe (Bunyaviridae), observent le même phénomène en présence de sang de rongeur, sans établir quelle étape du protocole serait plus particulièrement affectée par ce facteur antagoniste. Bien que des protocoles de PCR aient déjà été appliqués à la recherche d'agents pathogènes chez les tiques, tels *B. burgdorferi* chez *I. scapularis* [239], ou le virus Dugbe chez *A. variegatum* [320], c'est à notre connaissance la première fois qu'un tel phénomène est relevé chez des tiques à jeun.

Outre une inhibition partielle de l'activité de l'enzyme *Taq* polymérase, des interférences par excès d'acides nucléiques peuvent survenir lorsque l'échantillon est trop important [320]. Une moindre quantité d'ADNc (moins de $10 \mu\text{l}/100 \mu\text{l}$ de réaction de PCR) contribuerait peut-être à augmenter la sensibilité du test, la dilution des acides nucléiques compensant celle de l'ADN viral.

Nous n'avons pas cherché à déterminer la nature du facteur antagoniste observé, ni s'il intervient également lors de la transcription. Notons qu'un cycle supplémentaire de dénaturation dans la solution de guanidinium, lors de l'extraction, n'a pas entraîné un accroissement notable du pouvoir de détection de la PCR.

La sensibilité de la PCR pourrait sans doute être augmentée grâce à l'hybridisation par dot-blot, dont Ward *et al* [320], pour la mise en évidence

du virus Dugbe chez *A. variegatum*, ont relevé le pouvoir de détection accru par rapport à l'électrophorèse sur gel d'agarose; peut-être l'utilisation de "nested primers", impliquant deux amplifications successives, abaisserait-elle également le seuil de détection du test.

L'immunofluorescence sur cultures de cellules est une méthode relativement longue, puisque 4 jours d'amplification virale sont nécessaires; elle est toutefois plus rapide que l'infection de souriceaux (5-7 jours). L'inconvénient de cette méthode est qu'elle ne permet pas la mise en évidence d'éventuels variants apathogènes du virus CEE. Par contre, des trois protocoles examinés, c'est celui qui a montré la plus grande sensibilité; il s'applique donc à l'analyse individuelle des tiques, tout au moins des adultes; pour les nymphes, il serait nécessaire d'augmenter la quantité de l'inoculum d'au moins 2 fois, ou de réduire d'autant la dilution lors de l'homogénéisation (1 tique dans 500 μ l).

Des trois protocoles examinés, l'immunofluorescence sur cultures de cellules est donc apparue comme étant la méthode la plus appropriée à l'examen des tiques capturées dans la nature, tout en satisfaisant aux exigences évoquées sous II.1. En conséquence, nous l'avons appliquée à l'ensemble des tiques récoltées sur la végétation, avec des inoculums de 200 μ l (Figure 4).

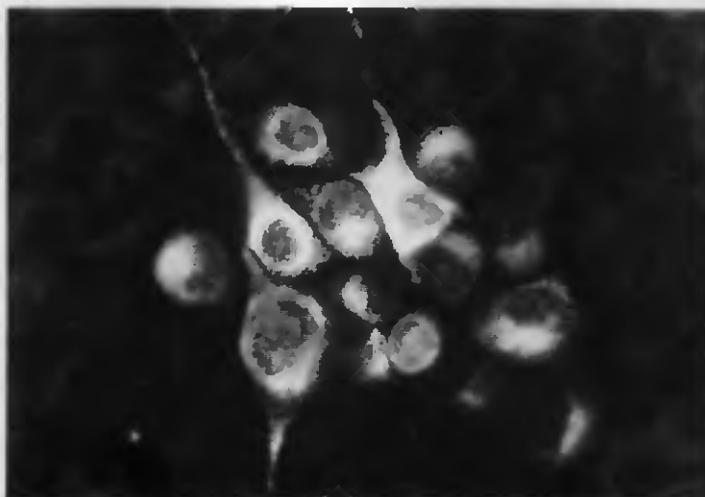


Figure 4: Détection par IF/C du virus CEE dans des cellules PS, après 4 jours d'incubation. Inoculum: broyat de 10 tiques (*I. ricinus*) capturées dans un foyer d'encéphalite à tiques.

On distingue les sites de multiplication virale localisés à la périphérie des noyaux cellulaires.

VI. CAS CLINIQUES D'ENCEPHALITE A TIQUES DECLARES A L'OFSP DE 1984 A 1992

271 cas cliniques de maladie ont été recensés par l'OFSP pour la période janvier 1984 - décembre 1992. Ce chiffre ne tient pas compte des personnes s'étant fait piquer au Liechtenstein ou dans des pays où des foyers de virus CEE sont reconnus (Allemagne, Autriche, ancienne Yougoslavie). Nous avons également écarté de nos statistiques une déclaration de 1984 relative à un cas d'encéphalite survenu en 1983.

Par contre, nous avons tenu compte de deux personnes domiciliées à l'étranger (respectivement en Allemagne et en Afrique du Sud), dont la piqûre est survenue en Suisse.

Dans 21 des 271 cas recensés, le diagnostic d'encéphalite à tiques n'a pas pu être posé avec certitude. Sauf indication contraire, notre analyse ne tient compte que des 250 cas restants.

VI.1. APPARITION SAISONNIERE DES CAS (DIAGNOSTIC SUR)

En moyenne, 28 cas cliniques certains de maladie ont été déclarés chaque année en Suisse pendant la période considérée. 51,6% des cas sont apparus en juillet et en août (Figure 5).

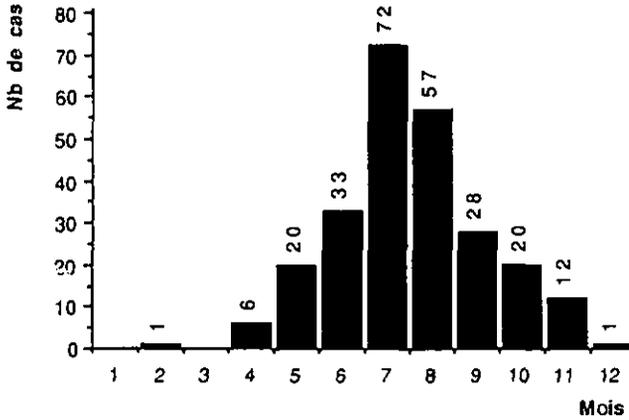


Figure 5: Apparition saisonnière des cas cliniques d'encéphalite à tiques (diagnostic sûr). Période 1984-1992. n = 250.

Cette distribution a été établie sur la base des dates de déclaration des laboratoires ou des médecins, la date d'apparition des symptômes n'étant pas toujours mentionnée. Dans les 135 cas où la date de la piqûre a pu être établie avec exactitude, la première annonce de diagnostic (via le laboratoire ou le médecin) est arrivée environ 1 mois plus tard (Figure 6).

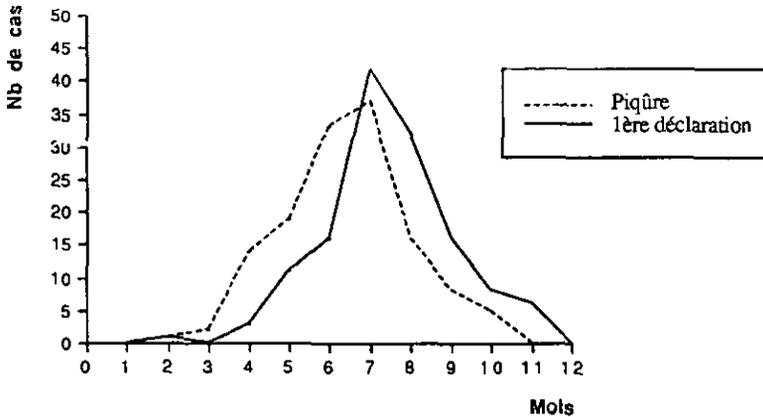


Figure 6: Dynamique saisonnière des piqûres de tiques et des cas cliniques consécutifs d'encéphalite à tiques (diagnostic sûr). Période 1984-1992. n = 135 (sans donnée: 115/250).

Ce laps de temps, qui correspond à la durée d'incubation du virus jusqu'au déclenchement de la deuxième phase de la maladie, nous autorise à considérer la date de la première déclaration comme étant celle de l'apparition des symptômes.

La distribution mensuelle des cas d'encéphalite à tiques suit globalement l'évolution de l'activité saisonnière d'*I. ricinus* telle qu'elle a été établie par d'autres auteurs [90, 197]. Toutefois, bien que cette tique connaisse un second pic d'activité en septembre-octobre, on n'observe pas d'augmentation du nombre de déclarations à cette période. Ce phénomène se répète chaque année, à l'exception de 1988 qui a vu un second pic d'incidence apparaître en octobre-novembre (Figure 7). Les éléments dont nous disposons ne nous permettent pas pour l'heure de déterminer les causes de cette exception.

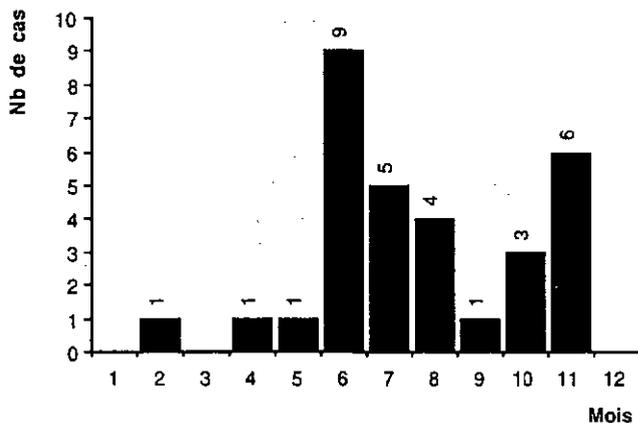


Figure 7: Distribution mensuelle des cas d'encéphalite à tiques en 1988 (diagnostic sûr). n = 31.

VL2. AGE, SEXE ET ACTIVITES "A RISQUE" (DIAGNOSTIC SUR)

Toutes les catégories d'âge sont touchées par le virus (Figure 8); le plus jeune patient enregistré est un enfant de 2 ans et le plus âgé, un retraité de 88 ans (médiane: 41 ans). 4% des patients ont moins de 10 ans, 18% ont plus de 65 ans. L'incidence annuelle moyenne (rapport entre le nombre annuel moyen de patients et le nombre d'habitants), pour l'ensemble de la population suisse, atteint 0,4/100'000 hab. Les personnes les plus fortement touchées sont celles de 30-39 ans et les retraités (Tableau 4).

Catégorie d'âge	Nb de cas	Incidence annuelle moyenne (pour 100'000 hab. ¹ de chaque catégorie d'âge)
0-9	10	0,15
10-19	33	0,41
20-29	25	0,28
30-39	51	0,56
40-49	40	0,50
50-59	35	0,53
60-69	26	0,49
70-79	26	0,66
≥ 80	3	0,16
Sans indication	1	-
Total	250	0,43

Tableau 4: Incidence annuelle moyenne de l'encéphalite à tiques selon les classes d'âge. Période 1984-1992.

¹: Population résidente permanente (moyenne des populations au 31 décembre 1980, 1985 et 1990). Source: [1].

Des activités régulières en forêt (principales ou accessoires) accroissent le risque d'exposition aux piqûres de tiques. Nous considérons comme activités à risque la chasse, la randonnée en forêt, le ramassage de champignons, le jogging, le scoutisme, la course d'orientation, le travail en milieu forestier et l'agriculture. L'indication relative aux risques encourus par les patients figure sur 214 des 250 annonces de cas sûrs qui nous sont parvenues (Tableau 5).

Activité à risque	Hommes	Femmes	Total
oui	96	26	122
non	56	36	92
Total	152	62	214

Tableau 5: Répartition par sexe et existence d'activités à risque chez les patients atteints d'encéphalite à tiques. Période 1984-1992.

Une activité à risque est relevée dans 57% des cas (63% des hommes, 42% des femmes). Parmi les personnes encourant un risque élevé de piqûres, 79% sont des hommes; pour les personnes sans contacts particuliers avec la forêt, le pourcentage de patients de sexe masculin s'abaisse à 61%. Sur l'ensemble des déclarations, 71% des patients sont des hommes. Il y a prédominance masculine dans toutes les catégories d'âge (Figure 8). Par rapport à la population suisse (48,75% d'hommes, moyenne des années

1980, 1985 et 1990 [1]), la proportion élevée d'individus de sexe masculin atteints d'encéphalite à tiques est significative ($p < 0,0001$, test de Fischer-exact).

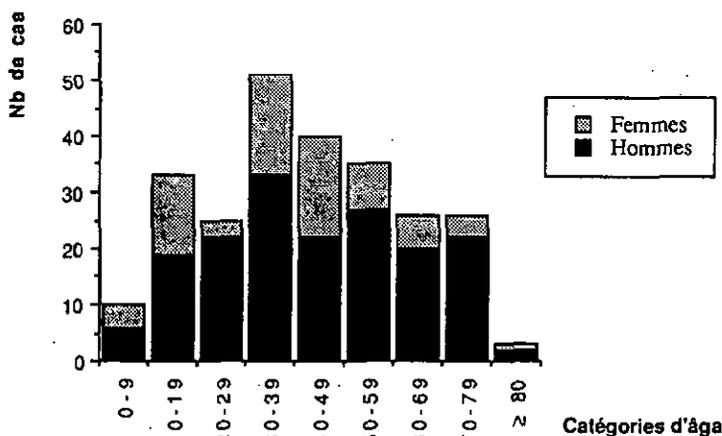


Figure 8: Distribution par âge et sexe des cas cliniques d'encéphalite à tiques. Période 1984-1992. $n = 249$ (sans indication: 1/250).

Seuls 17,1% des patients atteints d'encéphalite à tiques (39/228 - l'indication de la profession manque dans 22 des 250 cas recensés) sont professionnellement fortement exposés aux piqûres de tiques: les forestiers et gardes-chasse (7, dont deux âgés de plus de 65 ans) et les agriculteurs (32, dont neuf âgés de plus de 65 ans). 11/228 patients - dont un âgé de plus de 65 ans - courent, de par leur métier, un risque éventuel d'entrer en contact avec des biotopes à tiques ou des animaux parasités par ces acariens. Il s'agit des jardiniers et fleuristes, policiers (cf VII.1.), géomètres, bouchers et vétérinaires. Le reste des patients est constitué d'enfants et écoliers âgés de moins de 16 ans (34), d'étudiants et apprentis (13), de personnes travaillant dans des bureaux ou n'ayant pas de contacts avec les tiques (professions techniques et artistiques, médecins, employés du bâtiment et de l'hôtellerie, vendeurs, enseignants, concierges, secrétaires) (80, dont deux âgés de plus de 65 ans), de personnes n'exerçant pas d'activité lucrative (femmes au foyer et personnes en incapacité de travail) (21+1), et enfin de retraités (29).

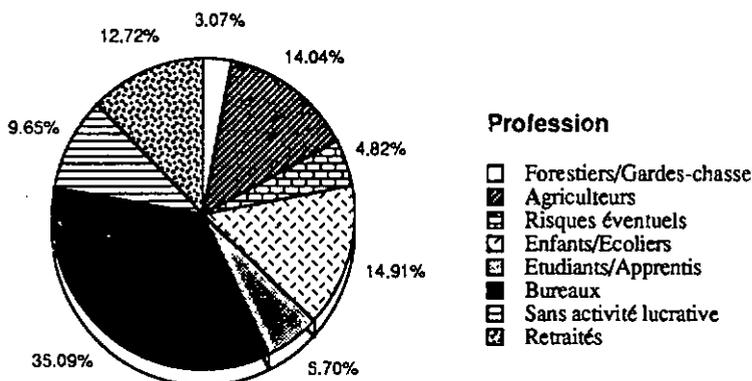


Figure 9: Proportions relatives des diverses professions exercées par les patients atteints d'encéphalite à tiques (diagnostic sûr). Période 1984-1992. n = 228 (sans indication: 22/250).

A notre connaissance, 2 décès (0,8% des cas sûrs, 0,7% de l'ensemble des 271 déclarations) sont imputables au virus de l'encéphalite à tiques. Il s'agit de deux retraités âgés de 73 et 75 ans, infectés respectivement en 1985 et 1990. Le premier a été piqué dans les environs de Trüllikon/ZH; le second, domicilié à Stein am Rhein/SH, n'a pas pu déterminer le lieu d'infection.

VI.3. ORIGINE GEOGRAPHIQUE DES PIQURES INFECTIEUSES (TOUS CAS CONFONDUS)

L'origine des cas déclarés d'encéphalite à tiques est représentée sur la Figure 10. Considérant que 68% des patients ayant pu désigner le lieu d'infection se sont fait piquer à proximité immédiate de leur domicile (dans un rayon de 5 Km, soit 1h de marche), nous avons également reporté les lieux d'habitation des personnes ne se rappelant pas l'endroit de la piqûre. Enfin, nous y avons inclus les cas de diagnostic douteux.



Figure 10: Origine géographique des cas déclarés d'encéphalite à tiques, d'après les indications des patients. Période 1984-1992. n = 269 (2 cas, de lieu de piqûre et de domicile inconnus, ne sont pas représentés).

- : localisation exacte de la piqûre
- : localisation approximative de la piqûre
- ▲ : domicile des patients ne se rapportant pas le lieu de piqûre

En noir: diagnostic sûr En blanc: diagnostic douteux

Tous cas confondus, c'est du canton de Zürich que provient le plus grand nombre de déclarations, avec en moyenne 15 cas cliniques par année, suivi de BE (4) et SH (3). Le canton de ZH comptabilise à lui seul 49% (134/271) des annonces et 46% (72/157) des lieux de piqûre connus. Sur les 13 cas déclarés dans les cantons de l'ouest et du sud de la Suisse (NE, GE, VD, VS, FR, TI), 10 (77%) sont soit de diagnostic douteux (1 cas), soit de lieu de piqûre inconnu (9 cas, dont 4 douteux). Dans les autres cantons, la proportion des cas douteux ou d'origine inconnue n'atteint que 43%.

Par rapport à la population résidante, Schaffhouse apparaît comme étant le canton le plus sévèrement touché par la maladie, suivi de ZH et TG. L'apparition d'encéphalites à tiques dans les cantons de SO, BS/BL, VS, VD, GE et TI est exceptionnelle (Tableau 6).

Canton	Nombre de cas				Total	Incidence annuelle moyenne (pour 100'000 hab. ¹ de chaque canton)
	(lieu de piqûre connu)		(lieu de piqûre inconnu)			
	Diag. sûr	Diag. dtx	Diag. sûr	Diag. dtx		
SH	17	-	5	3	25	3,95
ZH	67	5	59	3	134	1,31
TG	10	1	6	-	17	0,96
BE	26	1	8	1	36	0,43
AG	12	-	4	-	16	0,37
SG	4	-	8	1	13	0,35
LU	7	-	2	-	9	0,32
FR	1	-	2	2	5	0,28
ZG	1	-	1	-	2	0,27
NE	-	1	2	-	3	0,21
GR	2	-	1	-	3	0,20
BS/BL	-	-	2	-	2	0,05
SO	-	-	-	1	1	0,05
VS	-	-	1	-	1	0,05
TI	1	-	-	-	1	0,04
VD	1	-	-	1	2	0,04
GE	-	-	-	1	1	0,03
Total	149	8	101	13	271	0,46*

Tableau 6: Distribution par canton des cas déclarés d'encéphalite à tiques.

Période 1984-1992.

Diag.: Diagnostique dtx: Douteux

¹: Population résidante permanente (moyenne des populations recensées pour les années 1980, 1985 et 1987-90). Source: [1].

*: Pour l'ensemble de la Suisse.

VI.4. DYNAMIQUE DES FOYERS (TOUS CAS CONFONDUS)

La localisation annuelle des piqûres de tiques et du domicile des personnes ne se rappelant pas le lieu de piqûre est reportée sur la Figure 11. On n'y observe aucune évidence de progression des lieux d'infection dans une quelconque direction.

- Figure 11:** (Déplier le feuillet)
Distribution annuelle des cas d'encéphalite à tiques en Suisse.
Période 1984-1992.
n = 269 (2 cas, de lieu de piqûre et de domicile inconnus, ne sont pas représentés).
- : localisation exacte de la piqûre
 - : localisation approximative de la piqûre
 - ▲ : domicile des patients ne se rappelant pas le lieu de piqûre
- En noir: diagnostic sûr En blanc: diagnostic douteux











Sur la base du nombre de cas d'encéphalite à tiques diagnostiqués dans les cantons de St-Gall et de Zürich de 1970 à 1981, Matile, en 1982, relevait un apparent cycle triennal du virus, des "années records" apparaissant en 1973, 1976 et 1979 [197]. La Figure 12 montre que cette tendance s'est maintenue entre 1982 et 1992, à l'exception de 2 pics biennaux en 1984 et 1986.

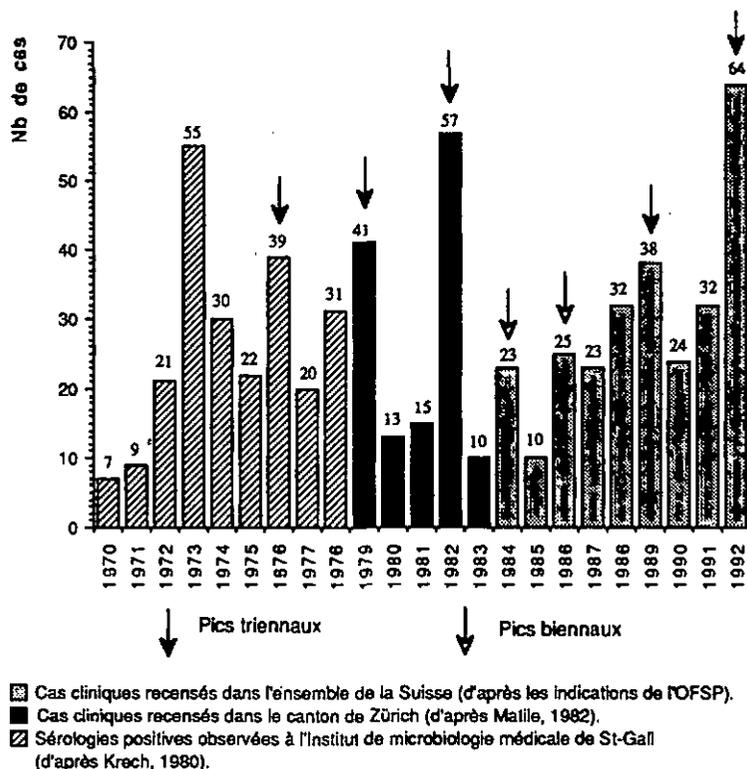


Figure 12: Distribution annuelle des cas diagnostiqués d'encéphalite à tiques.
n = 641.

Nous avons cherché à établir si un tel "cycle" existait au niveau des foyers eux-mêmes. Nous avons donc comparé le nombre annuel de cas survenus dans les principales zones à risque de Suisse: la colline du Santenberg/LU (coord. 640-645/226-229), le Bas-Simmental/BE (603-613/167-169), et les régions de Horgen-Rüschlikon/ZH (683-689/230-242), Marthalen/ZH (686-

699/271-283, rive gauche du Rhin), Neuhausen/SH (683-692/277-286, rive droite) et Stammheim/ZH (700-705/272-280), étant bien entendu que les zones sélectionnées sont susceptibles d'abriter plusieurs foyers distincts. Au sein d'un même foyer comme dans l'ensemble des zones considérées, l'apparition de ces cas, quantitativement et chronologiquement, ne répond pas à un schéma particulier et semble plutôt procéder du hasard (Figure 13).

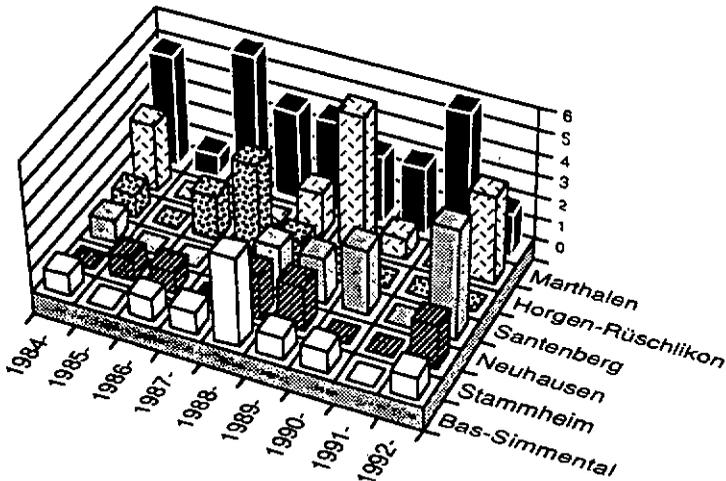


Figure 13: Distribution annuelle des cas cliniques d'encéphalite à tiques (sûrs et douteux) dans les principaux foyers et zones à risque d'encéphalite à tiques en Suisse.

VL5. DISCUSSION

Certains pays d'Europe connaissent un seul pic saisonnier d'apparition des cas d'encéphalite: Suède [126], Albanie [70]. Une recrudescence en septembre-octobre a été relevée en Autriche [162, 315, 322], en Pologne [44], ainsi qu'en Slovaquie certaines années [39] et en Suisse en 1979 [197] et 1988 (cf Figure 7). Certains auteurs ont invoqué l'apparition de souches de virus thermosensibles pour expliquer l'absence d'un second pic saisonnier [197]. Un autre facteur pourrait être une moindre fréquentation des forêts à cette période de l'année, bien que l'activité des chercheurs de champignons

s'intensifie en automne. Relevons toutefois que le pic automnal d'activité d'*I. ricinus* est moins important que le premier. Par conséquent, et si l'on considère que la prévalence des tiques infectieuses n'augmente pas d'une saison à l'autre, le risque de contracter une encéphalite à tiques se trouve de toute manière diminué.

L'incidence annuelle moyenne observée pour l'ensemble de la population (0,43-0,46/100'000 hab., selon qu'on ne considère que les cas sûrs ou non) s'inscrit dans la moyenne des valeurs relevées dans le reste de l'Europe, où l'incidence des cas varie considérablement d'une année, d'un pays et d'une région à l'autre. En Suède, Holmgren et Forsgren [126] ont relevé une incidence annuelle de 1,6-3,4/100'000 hab. selon la région. En République tchèque, entre 1980 et 1990, l'incidence de l'encéphalite à tiques a été évaluée entre moins de 2/100'000/an et plus de 3/100'000/an, les valeurs pouvant s'élever jusqu'à 14/100'000/an dans les zones fortement endémiques [100]. En Slovaquie, Blaskovic *et al* [39] ont déterminé, entre 1953 et 1963, des taux d'incidence de 1,4-9,2/100'000/an, la fourchette annuelle s'étendant dans certaines régions de 3,3 à 107,9/100'000; entre 1980 et 1990, les valeurs observées dans ce pays oscillaient entre 0 et moins de 2/100'000/an [100]. Relevons cependant qu'en Europe centrale, l'incidence annuelle peut être considérablement influencée par l'apparition d'épidémies, souvent familiales, consécutives à l'ingestion de lait cru contaminé. L'incidence moyenne déterminée en Slovénie entre 1983 et 1990 s'élevait à 7,6/100'000/an [161]. Celles qui ont été relevées en Pologne variaient de 0,05 à 0,16/100'000/an entre 1975 et 1981 [315], et de 0,02 et 0,07/100'000 entre 1982 et 1990 [140]. Dans l'ancienne Allemagne de l'Est, les taux observés atteignaient 0,7/100'000/an dans les années 1960; avant de décroître progressivement jusqu'à 0,02/100'000 en 1990 [303]. Au Liechtenstein, Krech [164] mentionne, pour la période 1972-1990, une incidence annuelle moyenne de 0,7/100'000. En France enfin, une dizaine de cas d'infection par le virus CEE a été recensée en Alsace et dans les Vosges, essentiellement depuis 1988 [60, 115, 189].

Il faut relever que l'introduction d'un vaccin humain contre l'encéphalite à tiques peut abaisser considérablement l'incidence de la maladie. Ainsi, dans la province autrichienne de Carinthie, à la suite d'une massive campagne de vaccination initiée en 1981, le nombre de cas diagnostiqués est tombé de 140/an en moyenne (pour la période 1972-1976) à 12 cas en 1990 [169]. Il faut toutefois garder à l'esprit que, l'homme n'étant qu'un hôte occasionnel d'*I. ricinus*, la vaccination reste sans effet sur la circulation du virus dans la nature; le risque d'infection reste donc entier pour toute personne non immunisée.

Les incidences observées dans les différents cantons ne dépendent ni de la densité de population, ni de l'abondance des zones boisées (Tableau 7). Comme il est peu vraisemblable que les habitudes récréatives de la

population varient significativement d'un canton à l'autre, les causes de ces différences sont certainement à rechercher dans l'abondance des foyers, la proportion de tiques infectieuses, voire l'importance de la faune ixodienne elle-même. Nous y reviendrons dans le Chapitre IX.

Canton	Incidence annuelle moyenne (pour 100'000 hab. de chaque canton)	Densité de population ¹ (hab./Km ²)	Densité de forêt ² (% de la surface totale de chaque canton)
SH	3,95	237	42,8
ZH	1,31	661	30,8
TG	0,96	196	21,6
BE	0,43	155	31,1
AG	0,37	344	37,0
SG	0,35	204	30,1
LU	0,32	210	29,9
FR	0,28	120	26,4
ZG	0,27	347	27,6
NE	0,21	198	39,0
GR	0,20	24	25,3
BS/BL	0,05	2878	37,4
SO	0,05	282	43,4
VS	0,05	46	22,2
TI	0,04	100	48,1
VD	0,04	176	31,7
GE	0,03	1314	13,8
Total*	0,46*	161*	30,3*

Tableau 7: Incidence annuelle, densité de population et densité des zones boisées dans les cantons présentant des cas cliniques d'encéphalite à tiques.

- 1: Moyenne des valeurs recensées pour les années 1985 et 1990. Source: [1].
- 2: Forêt, forêt buissonnante et autres surfaces boisées (statistique de la superficie 1979/85). Source: [1].
- *: Pour l'ensemble de la Suisse.

Une surreprésentation des hommes par rapport aux femmes chez les patients atteints d'encéphalite à tiques a déjà été observée dans d'autres pays européens: Allemagne [315], Autriche [266], Hongrie [315], Suède [77, 126]. Le fait que cette proportion soit maintenue dans les populations ayant des contacts fréquents avec la forêt est troublant. Malheureusement, nous ne disposons pas d'informations concernant la fréquence et le type d'activités à risque pratiquées par les hommes et les femmes au niveau national; il nous est par conséquent difficile d'exploiter statistiquement les chiffres observés. Il faut peut-être rechercher les causes de cette différence dans des

comportements distincts: les femmes sont souvent moins enclines que les hommes à quitter les chemins ou à emprunter des sentiers étroits, où le risque d'entrer en contact avec les tiques est accru. Du reste, la proportion de garçons par rapport aux filles chez les enfants jusqu'à 14 ans, qui ont des activités assez semblables, est proche de l'équivalence: 56%. Ce taux monte à 62% entre 15 et 19 ans; il augmente ensuite fortement entre 20 et 29 ans (88% d'hommes), fléchit entre 30 et 49 ans (60%), puis croît à nouveau dès 50 ans pour atteindre 78% en moyenne.

Nous avons tenté de comparer la proportion des différentes professions exercées par les patients atteints d'encéphalite à tiques avec les valeurs de l'ensemble de la population suisse. Bien que les statistiques fédérales [1] n'établissent pas les mêmes distinctions que nous en ce qui concerne les activités professionnelles, nous avons pu dégager quelques grands groupes: la sylviculture emploie 0,1% de l'ensemble de la population; l'agriculture et l'horticulture, 2,9%; les secteurs secondaire et tertiaire (que l'on peut comparer aux groupes "bureaux" et "risques éventuels" de la Figure 9), environ 50%; enfin, les enfants de moins de 16 ans représentent 18,2% de la population totale et les retraités (65 ans et plus), 14,2%.

Par conséquent, le faible pourcentage de forestiers chez les patients atteints d'encéphalite à tiques n'est qu'apparent: la proportion observée (3,07%) est en fait 30 fois plus élevée que dans l'ensemble de la population. Ce chiffre est d'autant plus remarquable que le recours à la vaccination est largement répandu parmi les forestiers de tout le pays [19% de l'ensemble des forestiers intégrés à notre étude (1-74% selon le canton) ont déclaré être vaccinés contre l'encéphalite à tiques (cf chap. VII.)]; en outre, la Caisse nationale des assurances (CNA) et les associations professionnelles assurent auprès de ces personnes une bonne information en ce qui concerne les tiques et les maladies qui leur sont associées; le risque de contracter une encéphalite à tiques s'en trouve en principe considérablement réduit.

La proportion d'agriculteurs chez les patients atteints d'encéphalite à tiques est 5 fois plus élevée que dans l'ensemble de la population; par contre, on n'observe pas de différence remarquable, dans la distribution des autres activités professionnelles, entre les patients et l'ensemble de la population.

La répartition géographique des lieux de piqûre semble suivre les principaux cours d'eau du pays. Bien sûr, les données dont nous disposons ne nous permettent que d'estimer, bien que le plus précisément possible, le lieu de piqûre: il est rare qu'un patient puisse certifier que la tique se trouvait en bordure d'un ruisseau plutôt que dans un quelconque endroit de la forêt que celui-ci traverse. En outre, nombre de localités ont été bâties en bordure de rivières. Néanmoins, les cours d'eau constituent une attraction tant pour les promeneurs que pour les pique-niqueurs, et de nombreux chemins pédestres longent des rivières. Moins "entretenus" souvent que le reste des forêts, ils peuvent abriter une faune abondante, favorable aux tiques.

On peut également envisager l'existence d'un cycle endophile du virus CEE, assuré par des espèces animales inféodées aux bords de cours d'eau - ou les fréquentant volontiers - et les tiques qui leur sont spécifiques. A titre d'exemple, citons la tique *I. apronophorus*, dont Aeschlimann *et al* [9] ont suggéré la possibilité d'un rôle dans l'épidémiologie du virus CEE; cette espèce est connue dans les foyers d'Europe centrale pour parasiter fortement *Sorex araneus* - l'un des principaux hôtes d'amplification du virus CEE [160]. Notons toutefois que cette espèce n'a été que rarement observée en Suisse [9] et qu'il est peu probable qu'elle joue un rôle prépondérant dans la circulation du virus CEE.

Enfin, Danielova [61] a mis en évidence l'importance d'une humidité relative élevée dans l'infectivité du virus CEE chez la tique; peut-être le milieu péri-aquatique offre-t-il de ce point de vue des conditions optimales de transmission.

Les éléments dont nous disposons ne permettent pas de répondre à cette question. Néanmoins, les cours d'eau présentent des conditions favorables à la constitution de voies de passage des tiques et des hôtes d'amplification d'un foyer à l'autre, d'un espace de maintien du cycle épidémiologique du virus et d'un lieu d'infection privilégié pour l'homme.

Une forte variation du nombre de cas annuels d'encéphalite à tiques n'est pas inhabituelle en Europe [39, 70, 100, 140, 162]. Une recrudescence triennale des cas cliniques d'encéphalite à tiques a été relevée en ex-Yougoslavie entre 1953 et 1966 [115]. Ce phénomène ne semble pourtant pas se vérifier dans les autres pays. Bien qu'il soit encore trop tôt pour affirmer que l'apparition des encéphalites à tiques suit un cycle triennal (le nombre d'événements dont nous disposons - 7 pics d'abondance à partir de 1973 - est trop faible pour permettre une analyse statistique rigoureuse), nous nous permettons d'émettre quelques hypothèses qui, si cette tendance devait se confirmer, pourraient être investiguées.

Les rongeurs et autres petits vertébrés étant les hôtes principaux des stades immatures d'*I. ricinus*, de fortes variations de leurs populations se répercuteront sur l'abondance des tiques et, partant, sur le risque d'infection. Certains micromammifères connaissent d'importantes fluctuations numériques. Ainsi, Saucy [274] a observé une périodicité d'une durée moyenne de 6 ans chez la forme fouisseuse du campagnol terrestre (*Arvicola terrestris Scherman*), avec de grandes variations d'un site à l'autre. Malheureusement, les données chiffrées manquent concernant l'évolution sur de longues périodes des populations de micromammifères sylvatiques. Selon Mermod (comm. pers.), un rythme triennal d'un des hôtes principaux d'*I. ricinus* n'est pas à exclure *a priori*.

Ce "cycle" pourrait dès lors être perturbé par des facteurs climatiques. Rappelons que l'hiver 1984-85 a été particulièrement rigoureux et aurait pu,

en décimant les populations de rongeurs ou les tiques elles-mêmes (qui hibernent à faible profondeur, le plus souvent dans la litière végétale [90]), réduire le cycle momentanément de 3 à 2 ans.

En ce qui concerne les incidences "records" de 1973, 1983 et 1992, on peut remarquer que les années 1983 et 1992 ont été relativement moroses en raison du fléchissement des marchés européens, de la guerre du Golfe et des tensions dans l'ancienne Yougoslavie. La renonciation aux voyages à l'étranger aurait-elle eu pour conséquence une fréquentation accrue des forêts, et par là, une augmentation des cas d'infection?

Quoi qu'il en soit, il ressort de l'examen des cas cliniques d'encéphalite à tiques que le virus CEE est bien implanté en Suisse. Il touche toutes les catégories de population, les personnes fréquentant régulièrement le milieu forestier étant naturellement les plus exposées. Il affecte une proportion non négligeable de la population et se manifeste régulièrement dans les foyers d'endémie.

La presque totalité des cas recensés entre 1984 et 1992 se situe à l'intérieur du périmètre délimité par les foyers naturels reconnus en 1984 [329]. Au sein de cette zone, de nouveaux foyers, ou tout au moins des lieux de concentration des cas, sont apparus: la colline du Santenberg/LU, la vallée du Bas-Simmental/BE, la région de Belp-Münsingen/BE, les alentours de Brugg/AG et de Lyss/BE, ainsi que de nombreux lieux suspects dans le canton de SH et le nord du canton de ZH. Par contre, on n'observe aucune évolution chronologique des cas vers l'extérieur de ce périmètre ou dans une direction particulière. De plus, la presque totalité des cas cliniques recensés en Suisse romande sont soit de diagnostic incertain, soit de lieu de piqure inconnu; une telle particularité avait déjà été relevée par Krech [163].

La dynamique et la distribution géographique des cas cliniques d'encéphalite à tiques ne vérifient donc pas l'hypothèse d'une extension des foyers vers l'ouest et le sud de la Suisse.

VII. FORESTIERS, DONNEURS DE SANG ET PATIENTS D'HOPITAUX

Initialement, il était prévu de n'étudier que des populations de forestiers, de patients d'hôpitaux et de donneurs de sang. Cependant, les collectes de sang organisées pour les forestiers et bûcherons ont attiré des personnes exerçant d'autres professions, mais s'estimant également exposées aux piqûres de tiques et aux maladies qui leur sont associées. Le facteur principal de risque étant, à nos yeux, la fréquence des contacts avec le milieu forestier, nous avons regroupé les données non pas en fonction de la profession des participants, mais en fonction du type d'activités qu'ils effectuent en forêt. En outre, en raison du biaisage dû à la libre participation des individus, nous avons distingué d'une part les personnes s'étant présentées spontanément aux séances de prise de sang organisées pour les forestiers, et d'autre part les donneurs de sang de la Croix-Rouge et les patients d'hôpitaux, qui ont réellement été pris au hasard.

Les participants à notre étude ont donc été répartis selon les catégories suivantes:

1. Personnes ayant des contacts réguliers d'au moins 1/2-heure par semaine avec la forêt, dans le cadre de leur travail;
2. Personnes ayant des contacts réguliers d'au moins 1/2-heure par semaine avec la forêt, pour les loisirs;
3. Personnes n'ayant pas de contacts réguliers avec la forêt;
4. Donneurs de sang auprès des centres de transfusion de la Croix-Rouge et patients d'hôpitaux.

VIII. PERSONNES AYANT DES CONTACTS REGULIERS D'AU MOINS 1/2-HEURE PAR SEMAINE AVEC LA FORET, DANS LE CADRE DE LEUR TRAVAIL

649 personnes se sont présentées comme ayant des contacts réguliers avec la forêt pour le travail. Il s'agit de forestiers/bûcherons, d'agriculteurs, de cantonniers et employés communaux, d'inspecteurs de la faune, de policiers,

d'un biologiste et de chauffeurs d'engins forestiers. Tous ont en commun le fait de travailler au moins une heure par semaine en forêt. Une seule femme se trouve parmi eux.

Leurs réponses aux questionnaires (fréquence des contacts avec la forêt, nombre de piqûres de tiques, symptômes éventuels de borréliose ou d'encéphalite à tiques, etc.) les font apparaître comme une population homogène. Par conséquent, ils seront traités dans ce chapitre de manière groupée et nous les désignerons, par commodité, par le terme de "forestiers".

VII.1.1. RÉSULTATS SÉROLOGIQUES

Les séroprévalences d'anticorps IgG observées vis-à-vis du spirochète et du virus CEE sont résumées dans le Tableau 8. 25,7% de l'ensemble des sérums analysés (167/649) présentent des IgG dirigées contre *B. burgdorferi*. Au contraire, les IgG anti-CEE n'ont été décelées que dans 1,0% (5/522) des échantillons. A l'instar de Zhioua [333], nous n'avons pas observé de réactions croisées entre les deux agents pathogènes, notamment avec les personnes vaccinées contre l'encéphalite à tiques. Deux sérums (0,4%) ont présenté des anticorps dirigés à la fois contre *B. burgdorferi* et le virus CEE.

Canton	Nb sérums positifs / Nb sérums analysés (<i>B. burgdorferi</i>)	% (<i>B. b.</i>)	Nb sérums positifs / Nb sérums analysés* (Virus CEE)	% (CEE)	Nb doubles positifs*
GR	3 / 14	21,4	1 / 11	9,1	0
BE	43 / 182	23,6	4 / 139	2,9	2
FR	29 / 107	27,1	0 / 81	0	0
NE	43 / 130	33,1	0 / 124	0	0
JU	10 / 75	13,3	0 / 74	0	0
VD	19 / 53	35,8	0 / 14	0	0
GE	1 / 5	20,0	0 / 5	0	0
VS	19 / 83	22,9	0 / 74	0	0
Total	167 / 649	25,7	5 / 522	1,0	2

Tableau 8: Prévalence des anticorps IgG (tests ELISA) dirigés contre *B. burgdorferi* (*B. b.*) ou le virus CEE chez des populations professionnellement exposées aux piqûres de tiques.

* non compris les sérums provenant de personnes vaccinées.

Les dosages d'anticorps anti-CEE effectués par l'Institut de virologie de Zürich chez 14 forestiers du canton de Genève (non représentés) n'ont pas fait apparaître de cas d'infection par le virus.

Les 5 personnes présentant des anticorps dirigés contre le virus CEE sont un inspecteur de la chasse opérant dans le Jura bernois/BE, et 4 forestiers travaillant respectivement dans la région du Grosses Moos/BE (où un foyer d'encéphalite à tiques a déjà été identifié [329]), de Burgdorf/BE, d'Eriz, Zwieselberg et le lac de Thoune/BE, et enfin de Fläsch/GR, ce dernier forestier ayant auparavant travaillé dans la région de Malans-Landquart/GR, où un foyer de virus CEE a également été décelé [329]. Tous exercent des activités forestières depuis plus de 10 ans. Leur lieu de travail, au moment des collectes de sang, est reporté sur la Figure 25.

Les deux sérums ayant présenté des anticorps contre *B. burgdorferi* et le virus CEE proviennent des forestiers opérant dans le Grosses Moos et à Burgdorf.

Aucun gradient de séroprévalences n'a pu être mis en évidence dans l'ensemble des cantons étudiés. Il faut toutefois relever qu'en raison de leurs effectifs insuffisants, les cantons de GE et des GR ont dû être exclus de l'analyse statistique. Seul le canton du Jura, avec 13,3% de forestiers séropositifs, se distingue statistiquement d'autres cantons, en l'occurrence de FR ($p = 0,028$, test de Fischer-exact), de NE ($p = 0,003$, test de Fischer-exact) et de VD ($p = 0,005$, test de Fischer-exact).

En ce qui concerne le virus CEE, les différences de séroprévalences observées entre les GR, BE et les autres cantons ne sont pas statistiquement significatives.

VII.1.2. ANAMNÈSE ET SYMPTÔMES DE BORRÉLIOSE OU D'ENCÉPHALITE À TIQUES

Sur 626 personnes ayant correctement complété le questionnaire, 58 (9,3%) ont déclaré avoir observé une affection cutanée évoquant un ECM; un traitement médical a été entrepris dans 16 cas (27,6%), dont un pour un ECM et une méningite. Parmi ces 16 personnes, 8 sont apparues positives pour *B. burgdorferi*. Aucun participant n'a souffert de paralysie faciale, d'atteintes articulaires pouvant être associées à une borréliose, d'encéphalite à tiques, de lupus érythémateux ou de syphilis.

VII.1.3. SÉROLOGIES ANTI-*B. BURGDORFERI*

VII.1.3.1. Séroprévalence et âge

Parmi les 649 participants professionnellement exposés aux piqûres de tiques, 647 ont mentionné leur année de naissance; leur âge s'étend de 15 à 75 ans (moyenne d'âge: 35 ans; médiane: 33 ans) (Figure 14).

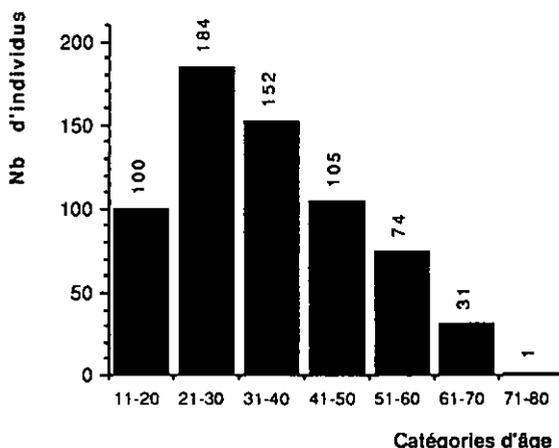


Figure 14: Distribution des âges chez la population étudiée de personnes professionnellement exposées aux piqûres de tiques. n = 647 (sans donnée: 2/649).

Pour ces 647 personnes, il existe une très forte corrélation entre l'âge et la séroprévalence vis-à-vis de *B. burgdorferi* (Figure 15); la probabilité d'apparaître séropositif est 2,5 fois plus importante à 60 ans qu'à 20 ans ($p=0,0001$, régression logistique).

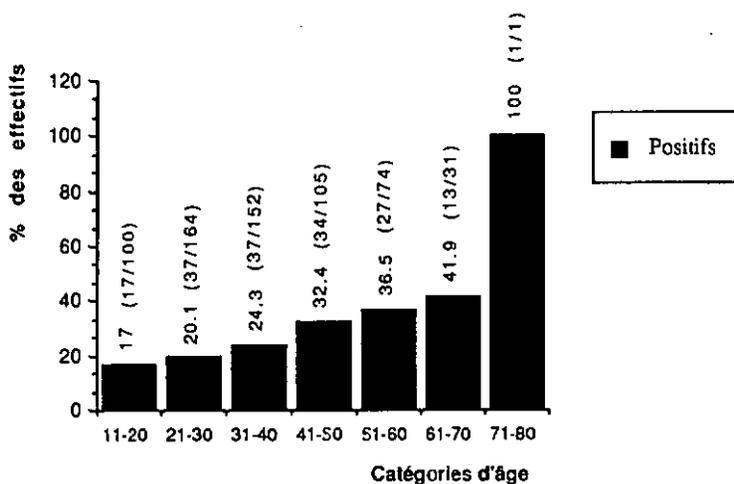


Figure 15: Relation entre l'âge et la séroprévalence anti-*B. burgdorferi* (IgG, test ELISA) chez les personnes professionnellement exposées aux piqûres de tiques. $n = 647$ (sans donnée: 2/649). La dernière colonne n'est pas représentative, car basée sur une seule observation.

Si la proportion de personnes présentant des anticorps contre *B. burgdorferi* augmente avec l'âge, il en va de même, sur un plan plus quantitatif, du taux de ces anticorps. Ainsi, il existe une étroite corrélation entre l'âge et le titre d'IgG dirigées contre le spirochète ($R=0,1649$, $p=0,0001$, corrélation sur les rangs de Spearman). Toutefois, il est évident que l'âge ne doit être considéré que comme un indicateur du degré d'exposition aux piqûres de tiques, et non comme un facteur de risque en soi. En fait, l'âge est strictement corrélé avec le nombre total d'années de travail en forêt déclaré par les forestiers ($R=0,7056$, $p=0,0001$, corrélation sur les rangs de Spearman), ainsi qu'avec le nombre estimé de piqûres de tiques ($R=0,1897$, $p=0,0001$, corrélation sur les rangs de Spearman).

La distribution des titres en fonction de l'âge des participants est représentée sur la Figure 16:

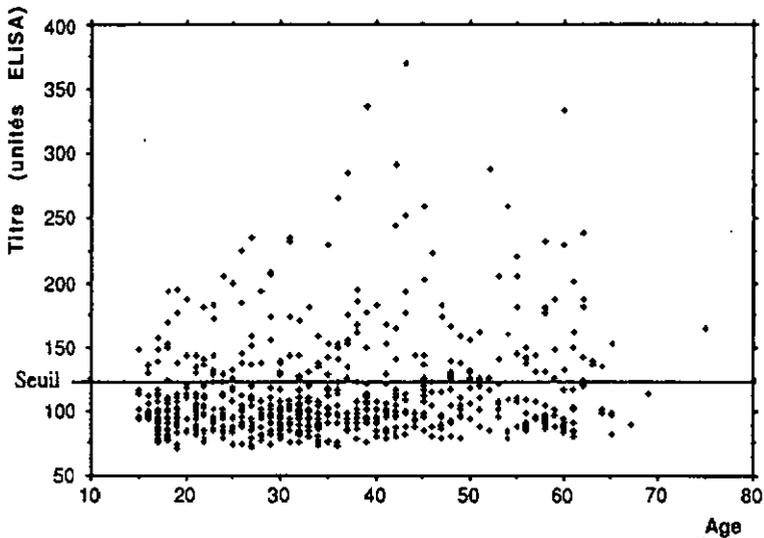


Figure 16: Relation entre l'âge et le titre d'anticorps anti-*B. burgdorferi* (IgG, test ELISA) chez les personnes professionnellement exposées aux piqûres de tiques.
 n = 647 (sans donnée: 2/649).
 Le seuil de positivité se situe à 123 unités ELISA.

VII.I.3.2. Séroprévalence et piqûres de tiques

Sur les 649 personnes interrogées, 6 n'ont pas répondu aux questions 6-8 du questionnaire (Annexe 2). Parmi les 643 autres personnes, 421 (65,5%) se souviennent avoir été piquées au moins une fois par des tiques. 34 d'entre elles (8,1%) ont été piquées l'année de la prise de sang uniquement.

188 forestiers (44,7% des personnes piquées) estiment avoir été en contact avec 1-5 tiques; 76 (18,1%) reconnaissent 6-10 piqûres; 106 (25,2) déclarent en avoir subi 11-50 et 51 participants (12,1%) ont observé plus de 50 tiques.

Sur les 167 personnes sérologiquement positives pour le spirochète (cf Tableau 8), 165 ont correctement complété le questionnaire; 44 d'entre elles (26,7%) ne se souviennent pas d'avoir été en contact avec des tiques. Parmi les 421 personnes piquées par des tiques, 121 (28,7%) présentent des anticorps (IgG) dirigés contre *B. burgdorferi*.

Globalement, le pourcentage de forestiers présentant des anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* est proportionnel au nombre de piqûres subies (Figure 17) ($\chi^2= 17,180$, $p=0,000$, Chi-carré de Mantel-Haenszel). Une telle correspondance n'apparaît pas au niveau cantonal.

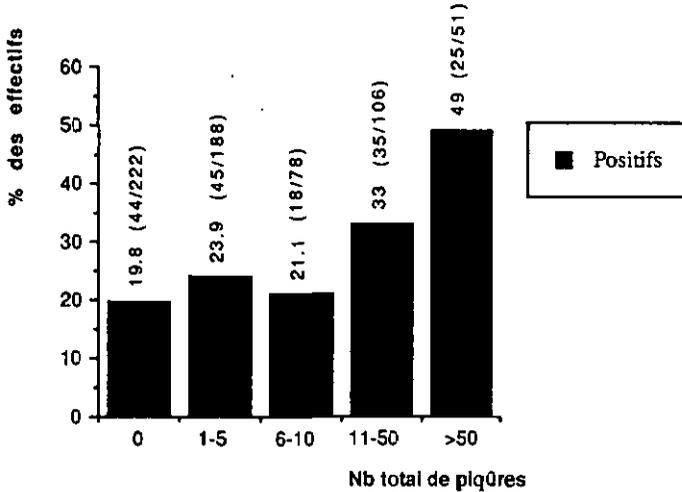


Figure 17: Relation entre les piqûres de tiques et la séropositivité anti-*B. burgdorferi* (IgG, test ELISA) chez les personnes professionnellement exposées aux piqûres de tiques.
n = 643 (sans donnée: 6/649).

Sur le plan quantitatif, il apparaît que le taux d'anticorps augmente significativement, bien que d'une manière moins strictement corrélée, avec le nombre de piqûres de tiques ($R = 0,0954$, $p = 0,0162$, corrélation sur les rangs de Spearman).

VII.1.3.3. Séroprévalence et durée de travail en forêt

Sur les 649 participants à l'enquête, 613 ont indiqué leurs horaires hebdomadaires de travail en forêt, et 645 le nombre total d'années d'activités forestières.

Pour les 613 personnes ayant précisé leur horaire hebdomadaire, on n'observe pas de proportionnalité entre le nombre d'heures passées en forêt et la prévalence d'anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* ($\chi^2 = 0,193$, $p = 0,661$, Chi-carré de Mantel-Haenszel). De même, la proportion de personnes piquées est relativement constante quelle que soit la durée hebdomadaire de travail en zone à risque (Figure 18) ($\chi^2 = 0,177$, $p = 0,674$, Chi-carré de Mantel-Haenszel).

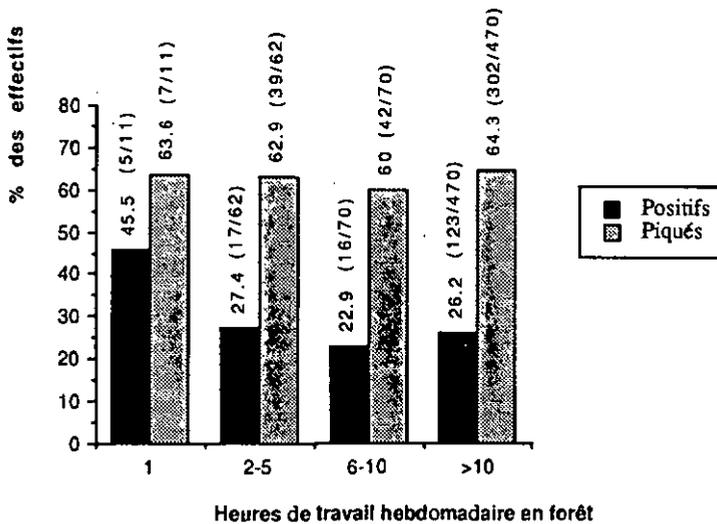


Figure 18: Relation entre la durée de travail hebdomadaire en forêt, le fait d'avoir été piqué par des tiques et la présence d'anticorps anti-borréliens (IgG, test ELISA) chez les personnes professionnellement exposées aux piqûres de tiques.
n = 613 (sans donnée: 36/649).

Au niveau quantitatif, il n'apparaît également aucune corrélation entre la durée hebdomadaire de présence en forêt et le titre d'anticorps ($R = 0,0154$, $p = 0,7046$, corrélation sur les rangs de Spearman).

Par contre, chez les 645 personnes ayant indiqué la durée de leurs contacts avec la forêt, la séroprévalence anti-*B. burgdorferi* est étroitement liée au nombre d'années de travail forestier ($\chi^2 = 11,063$, $p = 0,001$, Chi-carré de Mantel-Haenszel): si plus de 14% des personnes professionnellement exposées aux piqûres de tiques présentent des anticorps anti-*B. burgdorferi* après 1-2 années d'activités forestières, ce taux est deux fois plus important après 10 ans d'exposition. Le pourcentage de forestiers piqués par des tiques

augmente dans les mêmes proportions (Figure 19) ($\chi^2= 39,779$, $p=0,000$, Chi-carré de Mantel-Haenszel).

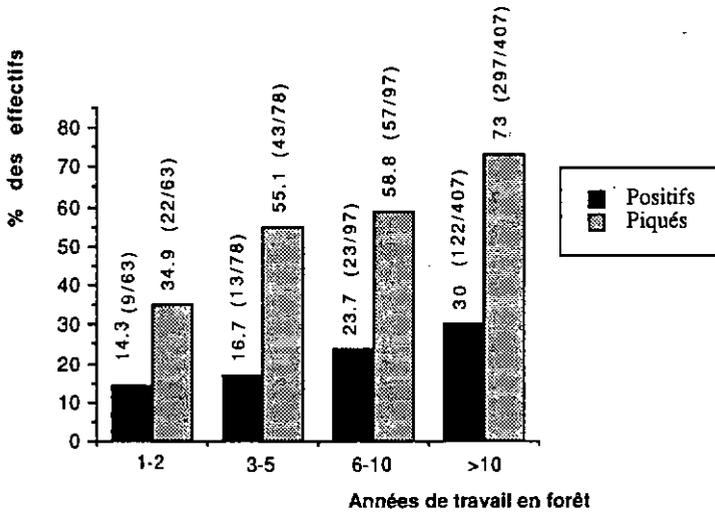


Figure 19: Relation entre la durée totale de travail en forêt, le fait d'avoir été piqué par des tiques et la présence d'anticorps anti-borréliens (IgG, test ELISA) chez les personnes professionnellement exposées aux piqûres de tiques. $n = 645$ (sans donnée: 4/649).

Cette corrélation est confirmée au niveau quantitatif ($R=0,1341$, $p=0,0007$, corrélation sur les rangs de Spearman).

VII.I.4. SÉROLOGIES ANTI-VIRUS CEE

Parmi les 421 personnes piquées par des tiques, 5 (1,2%) présentent des anticorps dirigés contre le virus CEE; trois d'entre elles affirment avoir subi plus de 10 piqûres.

Les séroprévalences obtenues vis-à-vis du virus CEE, très faibles dans leur immense majorité, ne permettent pas d'établir une comparaison (qualitative ou quantitative) avec l'âge des participants, la durée et la fréquence des contacts avec la forêt ou les piqûres de tiques.

VII.1.5. PIQÛRES DE TIQUES ET DURÉE DE TRAVAIL EN FORÊT

Par rapport au nombre d'années de travail en forêt, on observe, parallèlement à l'accroissement de la proportion de personnes piquées, une augmentation du nombre de piqûres: Si 11,1% des personnes travaillant depuis 1-2 ans en forêt estiment avoir subi plus de 5 piqûres de tiques, cette proportion monte à 21,8% après 3-5 ans, 30,9% après 6-10 ans et 44% après plus de 10 ans de fréquentation régulière des forêts (Figure 20) ($\chi^2=45,058$, $p=0,000$, Chi-carré de Mantel-Haenszel). Néanmoins, certains forestiers fréquentant depuis plus de 10 ans des biotopes à tiques ont affirmé n'avoir subi aucune piqûre ni développé des symptômes de borréliose ou d'encéphalite à tiques, déclarations corroborées par des sérologies totalement négatives.

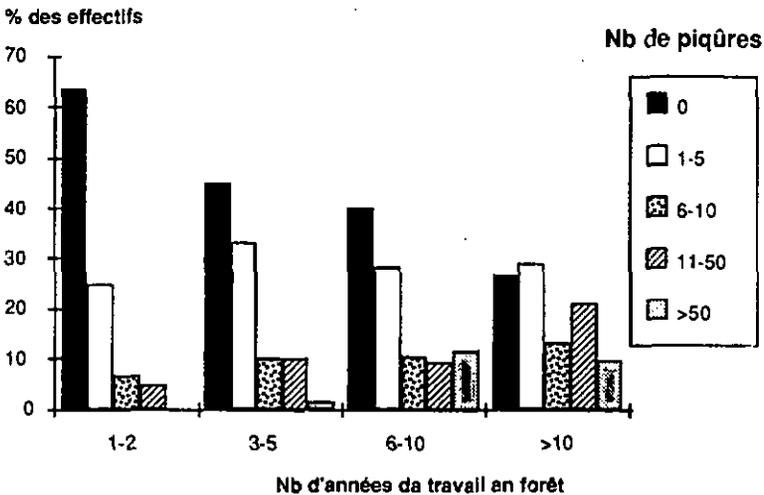


Figure 20: Relation entre le nombre d'années d'exposition et les piqûres de tiques subies, chez les personnes professionnellement exposées aux piqûres de tiques.
n = 639 (sans données: 10/649).

De même, une correspondance, bien moins marquée cependant, est observée entre le nombre de piqûres de tiques et le nombre d'heures de travail hebdomadaire ($\chi^2=9,922$, $p=0,002$, Chi-carré de Mantel-Haenszel).

VIL2. PERSONNES AYANT DES CONTACTS REGULIERS D'AU MOINS I/2-HEURE PAR SEMAINE AVEC LA FORET, POUR LES LOISIRS

27 personnes des cantons de BE et VD (hommes: 26, femme: 1; âge: 22-60, médiane: 37 ans) ont déclaré effectuer des excursions régulières en forêt pour les loisirs. Dans ces deux cantons, la fréquence de leurs contacts avec la forêt s'échelonne entre 1 heure et plus de 10 heures par semaine, tandis que la durée de ces contacts va de 1-2 ans jusqu'à plus de 10 ans.

Le Tableau 9 présente une synthèse des résultats d'analyses sérologiques entreprises chez ces 27 participants:

Canton	Nb sérums positifs / Nb sérums analysés (<i>B. burgdorferi</i>)	% (<i>B.b.</i>)	Nb sérums positifs / Nb sérums analysés* (Virus CEE)	% (CEE)	Nb doubles positifs*
BE	3 / 17	17,6	0 / 16	0	0
VD	2 / 10	20,0	0 / 7	0	0
Total	5 / 27	18,5	0 / 23	0	0

Tableau 9: Prévalence des anticorps (IgG, tests ELISA) dirigés contre *B. burgdorferi* (*B.b.*) ou le virus CEE chez des populations exposées aux piqûres de tiques lors de leurs loisirs.

* non compris les sérums provenant de personnes vaccinées.

Douze individus (44,4%) (tous des hommes), dont 2 sont séropositifs pour *B. burgdorferi*, estiment avoir subi au moins une piqûre de tique. Trois personnes présentant des anticorps spécifiques de *B. burgdorferi* ne se souviennent pas d'avoir été piquées.

Aucun participant n'a souffert par le passé de quelconques symptômes de borréliose ou d'encéphalite à tiques.

VII.3. PERSONNES N'AYANT PAS DE CONTACTS REGULIERS AVEC LA FORET

10 participants (hommes: 9, femme: 1; âge: 23-63, médiane: 45 ans), domiciliés dans les cantons de BE (2 cas), NE (1) et VD (7), se sont présentés aux séances de prises de sang bien qu'affirmant ne pas fréquenter les milieux forestiers.

A nouveau, le faible nombre de personnes appartenant à cette catégorie de participants rend invalide toute tentative de corrélation entre séroprévalence - ou titre d'anticorps - et âge ou nombre de piqûres de tiques.

VII.3.1. Sérologies anti-*B. burgdorferi*

Parmi les 10 participants de cette catégorie, deux (20,0%) (homme: 1, femme: 1) présentent des anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* (NE, VD); deux (dont un séropositif), se rappellent avoir été piqués au moins une fois par des tiques.

Des douleurs du genou ont été relevées chez une personne (NE), qui présentait du reste un titre extrêmement élevé d'anticorps (IgG) contre le spirochète (log.dil.< 2,4, soit plus de 320 unités ELISA). Cette patiente a, par la suite (en 1991), suivi un traitement anti-borrélien (Pénicilline trois fois par jour durant deux semaines, par voie orale). Les symptômes ne se sont plus manifestés depuis lors.

VII.3.2. Sérologies anti-virus CEE

Les analyses sérologiques n'ont pas révélé de titres positifs vis-à-vis du virus CEE chez les 10 personnes examinées. Aucun symptôme d'encéphalite à tiques n'a été reporté.

VII.4. DONNEURS DE SANG (CENTRES DE TRANSFUSION DE LA CROIX-ROUGE) ET PATIENTS D'HOPITAUX

VII.4.1. DONNEURS DE SANG AUPRÈS DES CENTRES DE TRANSFUSION

361 sérums (hommes: 258, femmes: 103; âge: 19-65, médiane: 39 ans) nous sont parvenus des centres régionaux de transfusion de la région sédunoise (VS, 204 sérums) et des GR (157). Ils représentent la totalité des collectes de plusieurs séances de don de sang.

Seuls les donneurs de sang grisons ont complété le questionnaire; les Valaisans n'ont mentionné que leur année de naissance.

Les séroprévalences observées parmi ces échantillons sont résumées sur le Tableau 10:

Canton	Nb sérums positifs / Nb sérums analysés (<i>B. burgdorferi</i>)	% (<i>B.b.</i>)	Nb sérums positifs / Nb sérums analysés (Virus CEE)	% (CEE)	Nb doubles positifs
GR	29 / 157	18,5	1 / 157	0,6	0
VS	24 / 204	11,8	1 / 204	0,5	0
Total	53 / 361	14,7	2 / 361	0,6	0

Tableau 10: Prévalence des anticorps (IgG, tests ELISA) dirigés contre *B. burgdorferi* (*B.b.*) ou le virus CEE chez des donneurs de sang.

VII.4.1.1. Sérologies anti-*B. burgdorferi*

VII.4.1.1.1. Analyse globale: GR et VS

14,7% des hommes (38/258) et 14,6% des femmes (15/103) ont été trouvés porteurs d'anticorps dirigés contre *B. burgdorferi*.

Un seul donneur de sang (GR) a déclaré avoir souffert par le passé d'un ECM, cela sans consultation médicale; son sérum est apparu positif pour *B. burgdorferi*.

Les séroprévalences anti-spirochète des donneurs de sang des Grisons et du Valais ne peuvent pas être distinguées statistiquement ($p > 0,09$, test de Fischer-exact). Prise globalement, la prévalence des donneurs de sang des deux cantons est inférieure à celle de l'ensemble des forestiers ($p < 0,000$, test de Fischer-exact).

L'année de naissance ne nous a pas été mentionnée dans 3 cas; pour les 358 autres donneurs des deux cantons, les séroprévalences anti-*B. burgdorferi* n'augmentent pas avec l'âge des participants (Figure 21).

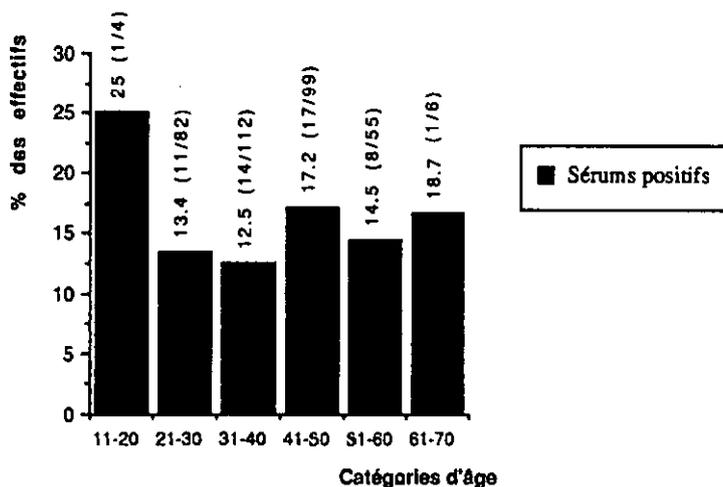


Figure 21: Relation entre l'âge et la présence d'anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* (IgG, test ELISA) chez les donneurs de sang du Valais et des Grisons. $n = 358$ (sans donnée: 3/361).

Les valeurs correspondant à la première et à la dernière catégories d'âge ne sont pas représentatives, car basées sur un trop faible nombre d'observations.

Au niveau quantitatif, les titres d'anticorps dirigés contre le spirochète ne sont pas plus corrélés avec l'âge ($R = 0,0144$, $p = 0,7863$, corrélation sur les rangs de Spearman). La distribution des titres d'anticorps chez les donneurs de sang du Valais et des Grisons est représentée sur la Figure 22 (valeurs non transformées).

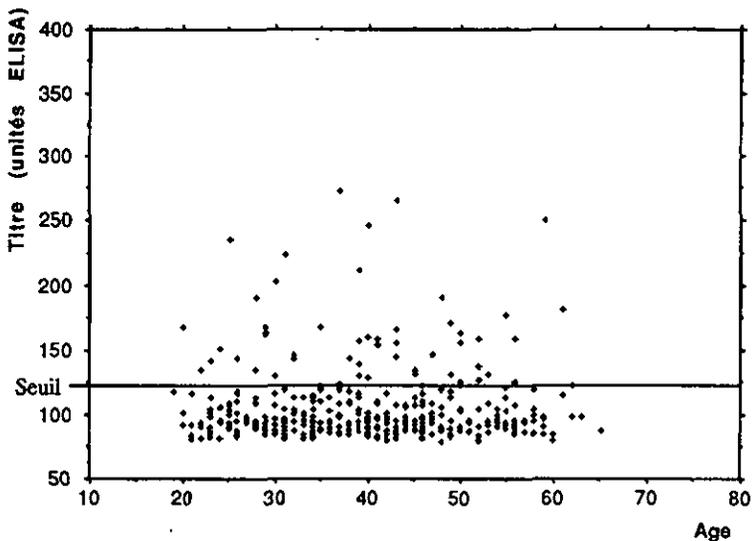


Figure 22: Relation entre l'âge et le titre d'anticorps anti-*B. burgdorferi* (IgG, test ELISA) chez les donneurs de sang du Valais et des Grisons. n = 358 (sans donnée: 3/361).
Le seuil de séropositivité est établi à 123 unités ELISA.

VII.4.1.1.2. Analyse plus détaillée: GR

Pour les 157 Grisons ayant complété un questionnaire, la mention de l'âge figure dans 154 cas; le nombre de piqûres subies est précisé dans 155 cas, dont 152 avec mention de l'âge.

La proportion de Grisons piqués n'est pas corrélée avec l'âge (Figure 23). Graphiquement, il semble en revanche se dégager une certaine proportionnalité entre l'âge et le pourcentage de personnes séropositives vis-à-vis de *B. burgdorferi* (Figure 23); cette tendance n'est toutefois pas confirmée au niveau des titres sérologiques.

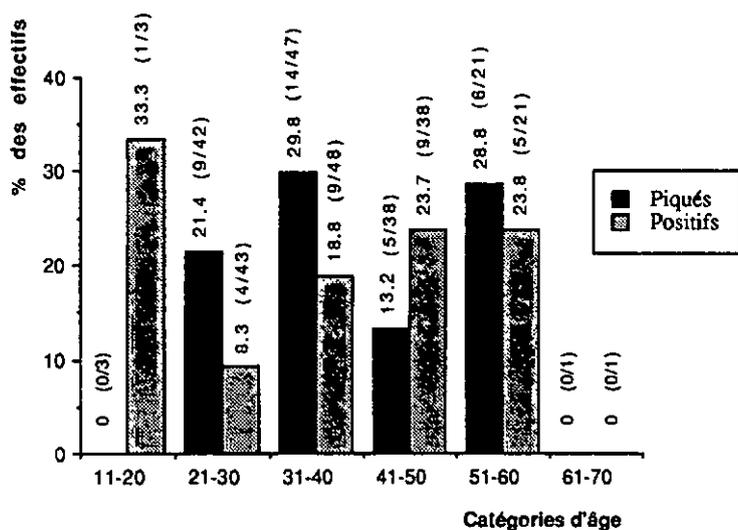


Figure 23: Relation entre l'âge, la séroprévalence et le nombre de piqûres de tiques chez les donneurs de sang des Grisons.
Les valeurs correspondant à la première et à la dernière catégories d'âge ne sont pas représentatives, car basées sur un trop faible nombre d'observations.

Sur les 155 Grisons ayant indiqué le nombre de piqûres subies, 121 (78,1%) ne se rappellent pas avoir eu un contact avec des tiques, dont 23 (19%) présentent des anticorps dirigés contre *B. burgdorferi*. Des 34 personnes piquées, 26 (76,5%) ne mentionnent que 1-5 piqûres de tiques, parmi lesquelles 5 (19,2%) sont séropositives vis-à-vis du spirochète; quatre donneurs de sang (11,8% des personnes piquées), tous séronégatifs, se rappellent 6-10 piqûres, 3 (8,8%) (également séronégatifs) mentionnent 11-50 piqûres; enfin, une seule personne (2,9%), séropositive pour *B. burgdorferi*, affirme avoir été piquée plus de 50 fois. Sur les 29 donneurs de sang séropositifs ayant indiqué le nombre de piqûres subies, 23 (79,3%) ne se rappellent pas avoir été en contact avec des tiques.

VII.4.1.2. Sérologies anti-virus CEE

Les deux donneurs de sang présentant des sérologies positives pour le virus CEE sont domiciliés respectivement à Leytron/VS et à Filisur/GR. Leur domicile est reporté sur la Figure 25.

Parmi les 157 donneurs de sang du canton des Grisons, 32 personnes proviennent des environs immédiats du foyer d'encéphalite à tiques de Grusch-Seewis-Landquart. Aucun des 31 membres non vaccinés de ce groupe ne présente un titre positif d'anticorps dirigés contre le virus CEE.

Les faibles titres d'anticorps anti-virus CEE observés chez les donneurs de sang des deux cantons ne permettent pas d'établir une comparaison entre la sérologie et l'âge ou les facteurs de risque que sont le nombre de piqûres de tiques et les contacts avec la forêt.

La prévalence globale d'anticorps chez ces donneurs ne se distingue pas de celle de l'ensemble des forestiers ($p > 0,7$, test de Fischer-exact).

VII.4.1.3. Caractéristiques des donneurs de sang des Grisons

Une "composition-type" de donneurs de sang en milieu rural peut être estimée à partir des donneurs des Grisons. 152 d'entre eux ont en effet fourni des indications concernant leurs activités professionnelles. Mis à part les écoliers, qui ne participent pas aux campagnes de don de sang, toutes les catégories d'occupation sont représentées (Figure 24). Les professions comportant un risque élevé de contacts avec les tiques (forestiers, gardes-faune, agriculteurs, cantonniers) y participent à raison de 17,8% de l'effectif (27/152); sept de ces 27 personnes professionnellement exposées (25,9%) présentent des anticorps spécifiques de *B. burgdorferi*, ce qui représente 13,2% (7/53) de l'ensemble des donneurs séropositifs.

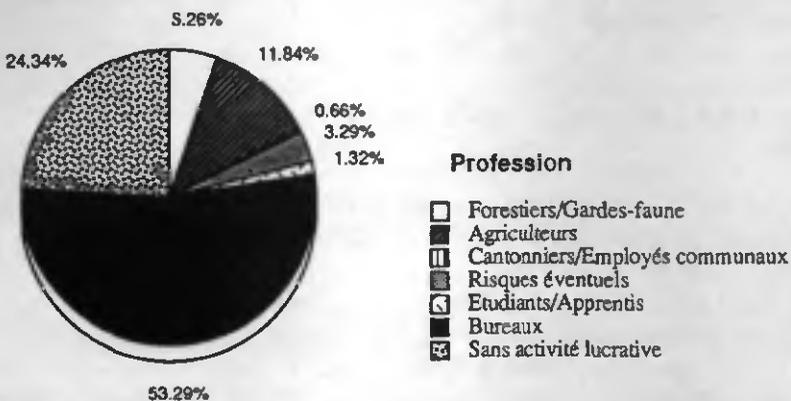


Figure 24: Proportions relatives des diverses professions exercées par les donneurs de sang grisons. n = 152 (sans indication: 5/157).

VII.4.2. PATIENTS DE L'HÔPITAL DE LA BÉROCHE/NE (ENVOIS DU DR LAPERROUZA)

82 échantillons de sang provenant de patients choisis au hasard (hommes: 37, femmes: 43, sans indication du sexe: 2; âge: 4-91, médiane: 58 ans) nous sont parvenus de l'hôpital régional de La Béroche. Les résultats des analyses sérologiques en sont présentés dans le Tableau 11. Un seul patient (1,2%) présente des anticorps à la fois contre le spirochète et contre le virus CEE.

Nb sérums positifs / Nb sérums analysés (<i>B. burgdorferi</i>)	% (<i>B.b.</i>)	Nb sérums positifs / Nb sérums analysés (Virus CEE)	% (CEE)	Nb doubles positifs
18 / 82	22,0	2 / 82	2,4	1

Tableau 11: Prévalence des anticorps (IgG, tests ELISA) dirigés contre *B. burgdorferi* (*B.b.*) ou le virus CEE chez des patients de l'hôpital de La Béroche.

Ces personnes n'ayant pas été invitées à compléter le questionnaire, nous disposons d'informations limitées sur ces cas; le médecin qui nous a fait parvenir les sérums n'a pas connaissance que ces patients aient souffert de symptômes de borréliose, ni d'encéphalite à tiques. On peut cependant noter que durant la période de collecte de sérums, 4 patients du médecin précité (non présentés dans le Tableau 11) ont développé une borréliose confirmée sérologiquement, mettant en évidence le haut risque d'infection par *B. burgdorferi* dans cette localité.

VII.4.2.1. Sérologies anti-*B. burgdorferi*

35,1% des hommes (13/37) et 11,6% des femmes (5/43) ont présenté des anticorps dirigés contre *B. burgdorferi*. Cette différence est significative ($p = 0,016$, test de Fischer-exact).

87% des patients ayant indiqué leur âge (66/76) ont plus de 40 ans; parmi eux, 16 (24,2%) présentent des anticorps dirigés contre *B. burgdorferi*, ce qui représente 89% (16/18) de l'effectif total de patients séropositifs vis-à-vis du spirochète. Néanmoins, la faiblesse de l'effectif dans chaque catégorie d'âge ne permet pas d'établir, pour *B. burgdorferi* comme pour le virus CEE, une quelconque corrélation entre l'âge et la séoprévalence ou le titre d'anticorps.

La séroprévalence vis-à-vis de *B. burgdorferi* observée chez les patients de La Béroche (22,0%) ne se distingue pas, statistiquement, de celle de l'ensemble des forestiers ou des donneurs de sang ($p > 0,1$, test de Fischer-exact).

VII.4.2.2. Sérologies anti-virus CEE

Les deux patients de l'hôpital de La Béroche présentant des anticorps dirigés contre le virus CEE sont respectivement, un homme de 29 ans et une femme de 49 ans. Nous ne disposons pas d'informations complémentaires concernant ces patients. Leur domicile est reporté sur la Figure 25.

La séroprévalence anti-virus CEE relevée chez les patients de La Béroche n'est pas significativement différente de celle de l'ensemble des forestiers ou des donneurs de sang ($p > 0,2$, test de Fischer-exact).

VII.4.3. PATIENTS DE L'OSPEDALE CIVICO DE LUGANO

Les résultats des analyses sérologiques des 556 patients de l'Ospedale civico de Lugano (hommes: 289, femmes: 267; âge: 0-92 ans, moyenne: 54 ans [203]) sont résumés dans le Tableau 12. Deux des 430 patients examinés à la fois pour *B. burgdorferi* et pour le virus CEE (0,5%) présentent des anticorps (IgG) dirigés contre ces deux agents pathogènes.

Nb sérums positifs / Nb sérums analysés (<i>B. burgdorferi</i>)	% (<i>B.b.</i>)	Nb sérums positifs / Nb sérums analysés (Virus CEE)	% (CEE)	Nb doubles positifs
51 / 556	9,2	15 / 430	3,5	2

Tableau 12: Prévalence des anticorps (IgG, tests ELISA) dirigés contre *B. burgdorferi* (*B.b.*) ou le virus CEE chez des patients de l'Ospedale civico de Lugano. Les résultats des analyses concernant *B. burgdorferi* sont extraits des travaux de Miserez [203].

VII.4.3.1. Sérologies anti-*B. burgdorferi*

10,4% des hommes (30/289) et 7,9% des femmes (21/267) ont présenté des anticorps dirigés contre *B. burgdorferi*. Cette différence n'est pas significative ($p=0,378$, test de Fischer-exact).

La séroprévalence enregistrée par rapport à *B. burgdorferi*, chez les patients de Lugano, se distingue nettement des valeurs moyennes observées chez les donneurs de sang ($p=0,011$, test de Fischer-exact) et chez les forestiers ($p<0,000$, test de Fischer-exact). Parmi les six cantons d'origine des forestiers dont l'effectif cantonal excède 20 individus (BE, FR, NE, JU, VD et VS), seul le canton du Jura présente une séroprévalence comparable à celle des patients de Lugano ($p > 0,2$, test de Fischer-exact).

La prévalence d'anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* n'est pas liée à l'âge des patients [203].

VII.4.3.2. Sérologies anti-virus CEE

La séroprévalence anti-virus CEE observée chez les 430 patients de Lugano est significativement supérieure aux valeurs moyennes relevées chez les forestiers ($p=0,011$, test de Fischer-exact) et les donneurs de sang ($p=0,005$, test de Fischer-exact); elle est toutefois comparable aux chiffres observés, chez les forestiers, dans les cantons de BE et des GR.

Cette prévalence élevée est en contradiction avec l'unique cas clinique d'encéphalite recensé au Tessin (cf Chapitre VI.). Cinq patients présentaient des titres importants d'anticorps anti-CEE (log.dil.=1,15-2,06). Nous ne disposons pas d'autres informations concernant ces patients, sinon qu'ils sont tous domiciliés dans le canton du Tessin.

Il n'apparaît pas de corrélation entre l'âge et la présence d'anticorps dirigés contre le virus CEE.

Le domicile des patients positifs est reporté sur la Figure 25.

VII.4.4. PATIENTS DES CLINIQUES DE NEUROLOGIE DE BÂLE, ZÜRICH, BERNE ET LAUSANNE

378 sérums ont été collectés dans les hôpitaux précités et analysés pour la recherche d'anticorps (IgG) dirigés contre *B. burgdorferi* [15]. Parmi eux,

272 ont été analysés à la fois pour le spirochète et le virus CEE. Les résultats en sont exposés dans le Tableau 13. Un seul sérum (0,4%) s'est révélé porteur d'anticorps dirigés à la fois contre la bactérie et contre le virus.

Nous ne disposons pas d'informations concernant les profession de ces patients, leur âge ou la fréquence de leurs contacts avec la forêt.

Canton	Nb sérums positifs / Nb sérums analysés (<i>B. burgdorferi</i>)	% (<i>B.b.</i>)	Nb sérums positifs / Nb sérums analysés (Virus CEE)	% (CEE)	Nb doubles positifs
BS	5 / 90	5,6	0 / 86	0	0
ZH	12 / 92	13,0	2 / 60	3,3	1
BE	12 / 104	11,5	1 / 61	1,6	0
VD	8 / 92	8,7	0 / 65	0	0
Total	37 / 378	9,8	3 / 272	1,1	1

Tableau 13: Prévalence des anticorps (IgG, tests ELISA) dirigés contre *B. burgdorferi* (*B.b.*) ou le virus CEE chez des patients des services de neurologie des hôpitaux cantonaux de Bâle (BS), Zürich (ZH), Berne (BE) et Lausanne (VD).

Les résultats des analyses concernant *B. burgdorferi* sont extraits des travaux de Altpeter et Meier [15].

VII.4.4.1. Sérologies anti-*B. burgdorferi*

Les pourcentages de patients positifs vis-à-vis de *B. burgdorferi* ne sont pas significativement différents d'une clinique de neurologie à l'autre ($p > 0,1$, test de Fischer-exact).

La prévalence globale d'anticorps anti-*B. burgdorferi* observée chez ces patients est comparable à la séoprévalence enregistrée chez les patients de Lugano ($p > 0,8$, test de Fischer-exact), mais inférieure à celle des patients de La Béroche ($p = 0,003$, test de Fischer-exact), ainsi que de l'ensemble des donneurs de sang du VS et des GR ($p = 0,043$, test de Fischer-exact) et des forestiers ($p = 0,000$, test de Fischer-exact).

VII.4.4.2. Sérologies anti-virus CEE

La prévalence globale d'anticorps dirigés contre le virus CEE, pour l'ensemble des patients neurologiques, ne peut être distinguée de celle des autres populations humaines étudiées.

L'origine géographique de l'ensemble des sérums trouvés porteurs d'anticorps contre le virus CEE est reportée sur la Figure 25:



Figure 25: Lieu de travail ou domicile des personnes ayant présenté des anticorps dirigés contre le virus CEE.
n = 23 (les patients de neurologie et un patient tessinois, de domicile inconnu, ne sont pas représentés).

- : lieu de travail des forestiers et du chasseur positifs.
- : domicile des donneurs de sang positifs.
- ▲ : domicile des patients positifs.

VII.5. DISCUSSION

VII.5.1. SÉROPRÉVALENCES VIS-À-VIS DE *B. BURGDORFERI*

Séroprévalence et populations

A l'exception du canton du Jura, les séroprévalences anti-*B. burgdorferi* observées chez les forestiers sont élevées et relativement homogènes dans l'ensemble des cantons étudiés. Seuls les forestiers du Jura, de par leur relativement faible séroprévalence, se démarquent de l'ensemble de leurs collègues. Nous y reviendrons dans la suite de ce chapitre.

Les valeurs relevées chez les patients de l'Ospedale civico de Lugano et des cliniques de neurologie sont nettement plus faibles et comparables entre elles.

Les donneurs de sang du VS et des GR présentent une séroprévalence légèrement supérieure à celle des patients précités, cette différence étant toutefois très faiblement significative par rapport aux patients des cliniques de neurologie. Altpeter et Meier [15] avaient du reste montré que le taux d'infection par *B. burgdorferi* n'était pas plus élevé chez les patients des cliniques de neurologie que dans une population de donneurs de sang de contrôle. Par contre, la prévalence d'anticorps dirigés contre *B. burgdorferi*, chez les donneurs de sang des deux cantons, apparaît nettement inférieure à celle des forestiers.

Les patients de La Béroche constituent une population intermédiaire, indiscernable statistiquement des donneurs de sang et autres patients d'hôpitaux (Lugano, cliniques de neurologie) d'une part, et des forestiers d'autre part. On peut rappeler que les patients de La Béroche constituent une population relativement âgée (médiane: 58 ans); en outre, La Béroche est une localité située en milieu semi-boisé, où les cas annuels d'ECM sont nombreux [176]. Ces particularités expliquent à notre avis la prévalence relativement élevée que nous y avons observée.

Des études entreprises par d'autres auteurs parmi les forestiers ont fait apparaître des séroprévalences anti-*B. burgdorferi* élevées dans toute l'Europe: 3,7-38,5% en France [68, 84], plus de 25% en Italie [311], 25% en Grande-Bretagne [111], 13,7%-33,6% en Bavière [210, 215], 47,8% en République tchèque [236]. Une enquête similaire auprès d'une population rurale d'Allemagne a établi une proportion de 15,7% de personnes positives [280].

Dans le sud de l'Allemagne, l'analyse sérologique de donneurs de sang a révélé des séroprévalences de 2,7-5,5% selon le test employé [41]. Dans l'Orléanais (France), 2,6% (19/731) des donneurs de sang se sont révélés porteurs d'anticorps contre le spirochète, dont 21,1% (4/19) avec historique d'ECM [31]. En Suède, 2% de donneurs de sang et 9% de citoyens sont apparus positifs pour *B. burgdorferi* [110].

En Suisse, Nadal *et al* [212] ont observé chez les forestiers du canton de Soleure des séroprévalences comprises entre 33 et 35%, selon le test de diagnostic utilisé. Une population rurale de la région d'Aarberg/BE a montré une prévalence supérieure à 26% [87], soit l'équivalent de nos forestiers. Chez des coureurs d'orientation de tout le pays (autre population fortement exposée aux piqûres de tiques), Fahrner *et al* ont relevé un taux d'infection de 26,1%, et 1,9-3,1% de personnes symptomatiques [76]. A titre de comparaison, ces auteurs ont établi, dans des populations non exposées aux piqûres de tiques (personnes domiciliées au-dessus de 1'000 m. d'altitude et citoyens sans contacts particuliers avec la forêt), des pourcentages respectifs de 3,9 et 6%. Dans un hôpital de Männedorf/ZH, 9,5% des patients sont apparus porteurs d'anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* [273]. Enfin, aucun des 150 patients du Valais examinés en 1990 par Péter [240] n'a révélé de contacts antérieurs avec *B. burgdorferi*, cela bien que ce spirochète soit bien représenté parmi les populations de tiques de ce canton.

Il ressort de l'ensemble de ces études et de nos propres résultats que, si les forestiers représentent clairement les populations les plus exposées à *B. burgdorferi*, le risque encouru par les autres groupes de population est beaucoup plus variable et dépend essentiellement des opportunités de contacts avec la forêt.

Séroprévalence et origine géographique

Si certains auteurs ont observé une différence significative de prévalence selon l'origine géographique des sérums [15, 68, 236], nos échantillons n'ont pas fait apparaître de "gradient" sérologique d'un endroit à l'autre du pays.

En ce qui concerne les forestiers, qui constituent notre population d'étude la plus importante et, par conséquent, permettent la meilleure comparaison, des différences régionales (Préalpes, Plateau, Haut- et Bas-Valais) n'ont pas pu être mises en évidence. Il faut cependant relever que nombre d'entre eux travaillent ou ont travaillé précédemment dans des lieux géographiquement distincts, et que l'origine de la piqûre infectieuse est souvent difficile à établir. Seule la proportion de forestiers trouvés positifs dans le canton du Jura est surprenante: 13,3% des Jurassiens sont séropositifs (autres cantons: 20,0-35,8%); 77% des Jurassiens interrogés exercent une activité régulière

en forêt depuis plus de 10 ans (autres cantons: 49,4-71,7%). Or, nous avons vu qu'une activité forestière de longue durée accroît le risque de piqûres de tiques, et par conséquent d'infection par le spirochète (cf VII.1.). Du reste, 68% des forestiers jurassiens estiment avoir subi une ou plusieurs piqûres de tiques (autres cantons: 20,0-78,6%); la plupart se sont fait piquer en Ajoie et dans le Clos du Doubs, où le taux d'infection des tiques par *B. burgdorferi* n'a pas été évalué. Ces chiffres suggèrent que, contrairement à la situation observée sur le Plateau, le spirochète pourrait y être relativement peu abondant.

En ce qui concerne nos deux populations de donneurs de sang (VS et GR), les séroprévalences enregistrées ne montrent pas de différence du taux d'infection entre les deux cantons.

Quant aux patients d'hôpitaux, aucune différence significative ni aucun gradient n'ont pu être établis entre les cantons de ZH, BS, BE et VD.

Séroprévalence, âge et contacts avec la forêt

Chez les professionnels de la forêt, nous avons vu que la séroprévalence anti-*B. burgdorferi*, de même que les titres d'anticorps, sont corrélés avec le nombre de piqûres de tiques, lequel dépend moins de l'intensité des contacts avec la forêt (nombre d'heures par semaine), que de leur durée (années). Un indice supplémentaire de l'importance de ces contacts à long terme est apporté par l'étroite corrélation existant entre le taux d'anticorps et l'âge. Il faut néanmoins relever que nous avons été limités, dans l'estimation de ce degré de corrélation, par le libellé de nos questionnaires: une description exacte du nombre d'heures hebdomadaires de travail en forêt, d'années d'activité, voire de piqûres de tiques, plutôt qu'un regroupement par catégories, aurait permis une analyse plus fine du rapport existant entre ces facteurs et la sérologie. C'est, à notre avis, un élément dont il faudrait tenir compte lors d'enquêtes ultérieures.

Le lien existant entre la présence d'anticorps anti-borréliens et l'âge, la durée totale de travail en forêt et/ou le nombre de piqûres de tiques subies a été relevé également par d'autres auteurs [68, 110, 210, 212, 215, 236]. Parmi les coureurs d'orientation suisses, Zhioua [333] n'a pas observé de corrélation entre le nombre d'heures passées en forêt et la séroprévalence; il estime toutefois le risque d'entrer en contact avec le spirochète plus élevé à partir de 6h/semaine. Gern *et al* [87] et Miserez [203] n'ont pour leur part observé aucune corrélation entre l'âge et la fréquence des anticorps dans la population rurale d'Aarberg et chez les patients du Tessin.

Chez les donneurs de sang et les patients d'hôpitaux, il n'a pas été possible d'établir de telles corrélations, soit en raison de données incomplètes (questionnaires non distribués), soit pour des raisons d'effectifs insuffisants.

Séroprévalence et sexe

Les prévalences observées d'anticorps anti-*B. burgdorferi* ne font ressortir une différence entre hommes et femmes que chez les patients de La Béroche. Rappelons cependant que la population de forestiers était composée presque exclusivement d'hommes, et qu'une comparaison n'a pas pu y être établie entre les deux sexes. Gern *et al* ont relevé une différence significative de séroprévalence entre hommes (33,1%) et femmes (19,4%) dans la population d'Aarberg [87]. Altpeter et Meier ont pour leur part observé une telle distinction chez des donneurs de sang, mais pas chez les patients des cliniques de neurologie [15]. La différence d'exposition relevée pourrait, ici encore, être expliquée par des comportements distincts (cf VI.5.). De fait, les séroprévalences observées chez les coureurs d'orientation, qui abordent la forêt de la même manière quel que soit leur sexe, n'ont fait apparaître aucune différence entre hommes et femmes [333].

Il ressort de l'ensemble de ces résultats que les opportunités de contact avec la forêt (à long terme surtout) et les comportements personnels, bien plus que l'appartenance à un type de population, sont un facteur de risque décisif d'infection par *B. burgdorferi*. Nous rejoignons en cela l'opinion de Gem *et al* [87].

En conclusion de ce chapitre, nous relèverons que l'analyse sérologique de différents groupes de population a confirmé l'étroite relation existant entre la fréquentation des forêts et le risque d'entrer en contact avec *B. burgdorferi*. Elle a mis en évidence la haute prévalence d'infection par ce spirochète chez des populations ayant d'intenses contacts avec la forêt (forestiers), la grande majorité des cas prenant une forme subclinique - à moyen terme en tout cas. Il faut cependant rappeler que la borréliose de Lyme est un syndrome à évolution lente, et qu'une manifestation future, tardive, de la maladie, chez les personnes actuellement asymptomatiques, ne peut être exclue. Il est en outre apparu que le titre d'anticorps dirigés contre le spirochète augmente avec le nombre d'années passées en forêt; cette évolution suggère que les forestiers subiraient, au hasard des piqûres de tiques porteuses de borrélias, une réactivation du système immunitaire. Cette stimulation a-t-elle un effet protecteur? Nos données ne permettent pas de répondre à cette question, faute d'un nombre suffisant de participants symptomatiques; rappelons toutefois que l'effet protecteur des titres élevés d'anticorps n'est pas unanimement reconnu [109, 232, 233, 321].

Les séroprévalences observées reflètent la large répartition de *B. burgdorferi* parmi les tiques du Plateau. Ces résultats complètent en outre les données des investigations sérologiques entreprises précédemment dans le canton du Valais [240] et y établissent un taux d'infection des forestiers

comparable au reste de la Suisse. Enfin, ils suggèrent que le spirochète serait moins répandu dans le canton du Jura que sur le Plateau.

VII.5.2. SÉROPRÉVALENCES VIS-À-VIS DU VIRUS CEE

En Europe, les prévalences d'anticorps dirigés contre le virus CEE varient considérablement d'un pays à l'autre. En Suède, 11,6% des habitants des environs de Lisö - ville située dans un foyer d'encéphalite à tiques - ont montré une sérologie positive vis-à-vis du virus CEE, dont 27,8% (3,0% de la population étudiée) avec historique de méningoencéphalite. 2% de donneurs de sang et 5% de citadins du même pays sont apparus porteurs d'anticorps spécifiques [110]. En Autriche, 16,1% de forestiers, 4,9% de fermiers et 0,9% d'écoliers ont été trouvés positifs pour le virus CEE [105]. En Allemagne, des anticorps spécifiques ont été mis en évidence chez 2,4-3,3% des forestiers et chez 0,6-2,1% des agriculteurs [4, 5]. Au Liechtenstein par contre, aucun des 31 forestiers analysés par Krech n'a présenté d'anticorps contre le virus CEE; sur un effectif de 331 sérums de diverses provenances, seuls 2 (0,6%), issus de patients sans symptômes particuliers mais âgés de plus de 50 ans, ont été trouvés positifs [164]. En France, des anticorps spécifiques ont été décelés chez 8% des forestiers de 10 départements de l'est du pays [60], tandis qu'en Italie 1,1% des forestiers et chasseurs de la province de Trento (nord du pays) ont été trouvés positifs vis-à-vis du virus CEE [313]. En Suisse enfin, Matile a observé des taux de séropositivité de 0-5,4% chez les forestiers de cantons alémaniques (AG, TG, BE, SO, SH et ZH), un seul sérum positif étant observé en Suisse romande (investigations dans les cantons de VD et FR) [197].

Contrairement à la plupart des auteurs précités, nous n'avons pas réalisé notre enquête auprès de populations connues pour fréquenter des foyers naturels d'encéphalite à tiques, mais chez des forestiers, donneurs de sang et patients d'hôpitaux ayant leurs activités en majorité dans des cantons où l'implantation de foyers était seulement supposée. La faible prévalence observée dans notre étude chez les professionnels de la forêt (1,0%) n'est donc pas surprenante et peut être interprétée comme l'indice d'une faible implantation, voire d'une absence du virus CEE en Suisse romande.

Sérologiquement parlant, il n'est pas possible de distinguer statistiquement les populations ayant des contacts fréquents avec la forêt - pour le travail ou pour les loisirs - des donneurs de sang, des patients de La Béroche ou des patients des cliniques de neurologie. Le degré d'exposition des patients tessinois apparaît supérieur à celui de l'ensemble des forestiers, mais est comparable à celui des forestiers des cantons de BE et GR. Ces personnes

n'ayant pu être recontactées, les causes de cette séroprévalence élevée restent indéterminées, mais il n'est pas exclu d'envisager la présence d'un ou plusieurs foyers d'encéphalite à tiques au Tessin. Nous y reviendrons dans la Discussion générale.

En résumé, les faibles sérologies observées vis-à-vis du virus CEE dans les populations étudiées n'ont pas permis de définir des taux d'infection propres à différents groupes de risque. Il ne nous a pas non plus été possible de mettre en évidence d'éventuels foyers naturels de virus, si ce n'est peut-être au Tessin, où la forte séroprévalence enregistrée chez les patients de Lugano reste inexpiquée. La présence du virus CEE en Suisse romande n'est donc pas confirmée.

VIII. MILITAIRES DANS LE CADRE DES ECOLES DE RECRUES

VIII.1. NOMBRE ET ORIGINE DES PIQURES DE TIQUES

Sur les quelque 20'000 personnes concernées par cette enquête, 269 militaires âgés de 18 à 30 ans (médiane: 20 ans), issus de 38 ER, ont annoncé au moins une piqûre de tique survenue en Suisse. 3 personnes ont été piquées à deux reprises, respectivement à 2, 29 et 40 jours d'intervalle, en juillet et en août-septembre. Au total, 272 annonces nous sont donc parvenues.

Les militaires se sont fait piquer entre juin et octobre; 46,4% des piqûres sont survenues en août (Figure 26).

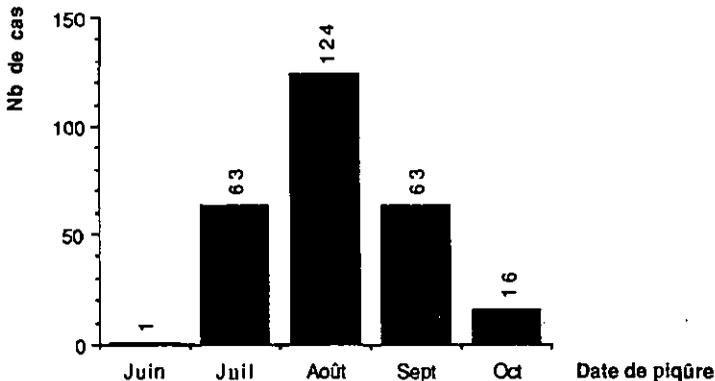


Figure 26: Distribution mensuelle des piqûres de tiques survenues chez les recrues suisses en 1991 (y compris 3 militaires piqués à deux reprises).
n = 267 (sans donnée: 5/272).

L'origine des piqûres recouvre toute l'aire de répartition d'*I. ricinus* (Figure 27). La presque totalité des recrues s'est fait piquer sur le Plateau. Dans de nombreux cas, plusieurs personnes (2-8) se sont fait piquer en même temps, lors d'un bivouac ou d'un exercice de tir par exemple.

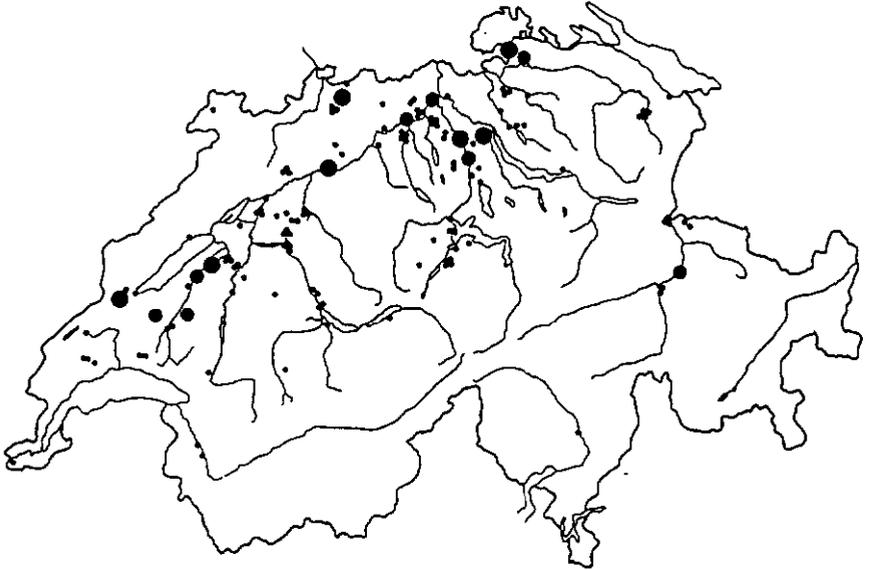


Figure 27: Origine des piqûres de tiques survenues chez les recrues suisses en 1991.
n = 252 (sans donnée: 20/272).

● : 1 cas ● : 5-9 cas ● : ≥ 10 cas

Sur les 272 annonces de piqûre, 4 ne contiennent pas d'indication concernant le nombre de tiques observées en train de se nourrir. Un seul acarien était incriminé dans 249 des 268 annonces restantes (92,9%), 2 tiques dans 12 cas (4,5%), 3 dans 4 cas (1,5%) et 4 dans 3 cas (1,1%). Au total, et si l'on considère que les déclarations sans indication concernent une seule piqûre, 301 tiques ont été observées en train de se nourrir.

Si, pour la plupart des 269 participants, l'Ecole de recrues a été l'occasion d'un premier contact avec des tiques, 97 d'entre eux (36,1%) indiquent avoir déjà été piqués avant 1991. 3,3% des militaires interrogés (9/269) déclarent avoir été piqués sur plusieurs années, consécutives ou non.

Les tiques découvertes en train de piquer ont été retirées par les médecins d'ER, ou par les militaires eux-mêmes. Elles nous ont été envoyées dans des tubes de plastique contenant un morceau de papier absorbant humidifié. Après détermination de l'espèce, leur degré de gorgement a été évalué sur la base des connaissances acquises lors d'élevages répétés d'*I. ricinus* en laboratoire.

177 tiques nous ont été envoyées: 8 larves, 74 nymphes et 90 femelles à différents degrés de gorgement, 2 mâles - qui piquent mais ne se nourrissent pas - et 3 échantillons de stade indéterminable (petits fragments). Dans de nombreux cas de piqûres multiples, seul un exemplaire de tique nous a été expédié.

Pour autant qu'on puisse en juger (certains envois se résumant à des débris non identifiables), tous les exemplaires recueillis appartiennent à l'espèce *I. ricinus*.

L'estimation du degré de gorgement a pu être effectuée sur 141 des 177 tiques seulement, 2 spécimens étant des mâles et 34 échantillons étant trop abîmés. Pour les 141 stades déterminables et susceptibles de se nourrir, le degré de gorgement au moment de la capture varie entre 0-1 et 5-6 jours (Figure 28).

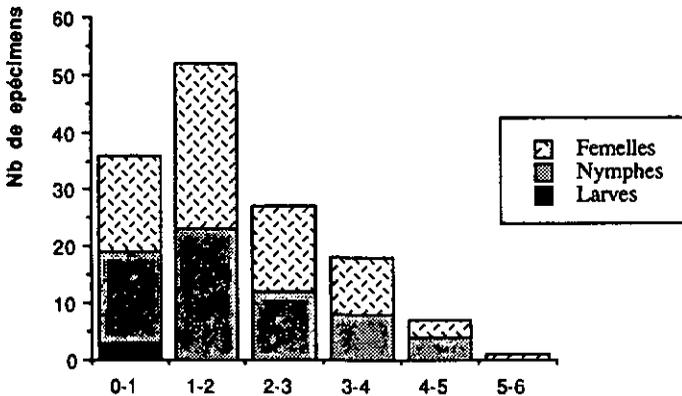


Figure 28: Degré de gorgement atteint par les tiques trouvées fixées sur les militaires. n = 141.

5 tiques (3,5%) avaient pratiquement terminé leur repas sanguin, compte tenu de la durée de fixation de leur stade: 4 nymphes de 4-5 jours et 1 femelle de 5-6 jours. 88 tiques (62,4%) ont été remarquées moins de 48 heures après la piqûre.

La taille d'une tique à jeun est approximativement la même que celle du stade précédent gorgé. Le fait que la majorité des acariens, y compris les stades de petite taille comme les larves, aient été remarqués et retirés 1-2 jours après la piqûre indique que la découverte d'une tique ne dépend pas de sa taille, mais plutôt de l'attention de la personne-hôte. La découverte

précoce de la piqûre est importante dans la mesure où le risque de transmission de *B. burgdorferi* est d'autant plus élevé que le temps de nutrition est important [244, 245]; en ce qui concerne le virus CEE, l'infection est difficilement évitable si l'on considère qu'une heure seulement suffit pour la transmission des virions [254].

VIII.2. ANALYSE VIROLOGIQUE ET BACTERIOLOGIQUE DES TIQUES

Les tiques ont été analysées individuellement par IF/S ou par PCR selon les protocoles décrits sous IV.5.3.1., IV.5.3.2, IV.5.5.1 et IV.5.5.2. Si la PCR appliquée à la détection du virus CEE montre une sensibilité réduite par la présence de tissus de tique (cf V.2.), cette méthode nous est apparue comme étant la seule susceptible de mettre en évidence des particules virales dans des échantillons ne se prêtant pas à la mise en culture ou à la préparation de "squashes" (petits fragments, matériel desséché, etc.). Quant à l'IF/S, des tests préalables ont été effectués sur des tiques (*I. ricinus*) provenant d'un foyer britannique de virus Louping Ill, ainsi que sur des empreintes de cerveaux de souriceaux infectés par le virus CEE (Hypr); ces expériences ont montré une sensibilité et une clarté de diagnostic suffisantes pour permettre l'analyse des tiques capturées sur les militaires (Figure 29).

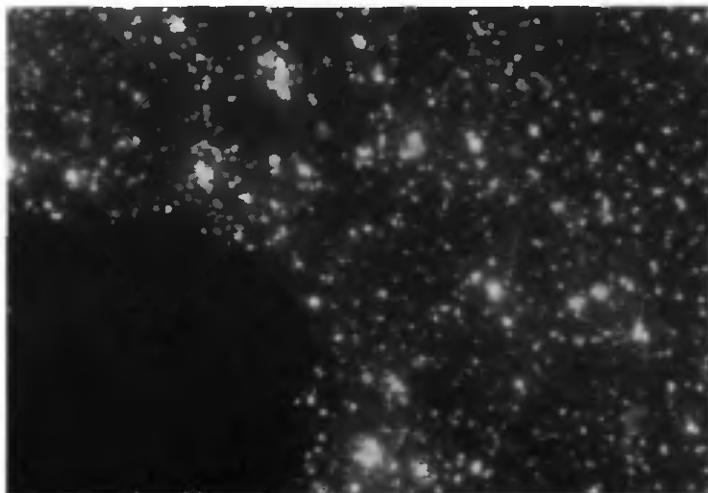


Figure 29: Détection par IF/S du virus Louping Ill chez une nymphe d'*I. ricinus* en provenance d'un foyer naturel d'infection (Grande-Bretagne).

Chaque tique a été testée par la même méthode pour les deux agents pathogènes. Les tiques destinées aux tests de PCR ont été manipulées individuellement et avec précaution, de manière à éviter tout transfert de matériel génétique d'un échantillon à l'autre.

Sur les 177 tiques qui nous sont parvenues, certaines étaient dans un état de détérioration tel que leur analyse n'a pas été possible. Au total, 154 exemplaires seulement ont pu être testés. Les 62 premiers acariens qui nous sont parvenus ont été examinés par IF/S, les 92 suivants par PCR (Tableau 14).

Vingt-deux de ces 154 échantillons (14,3%) se sont avérés contenir des spirochètes.

Une autre tique, analysée par IF/S, présentait 2 structures atypiques rappelant *B. burgdorferi*, mais il n'a pas été possible d'établir avec certitude son infection par le spirochète: il faut rappeler en effet que, lors de la préparation des "squashes", la totalité de l'échantillon est utilisée; par conséquent, des investigations complémentaires ne peuvent être entreprises. Nous nous contenterons donc de considérer ce spécimen comme "douteux", avec une très forte suspicion de positivité.

Une dernière tique, analysée par IF/S elle aussi, a réagi positivement à la mise en évidence de virus CEE; toutefois, l'image obtenue, bien que très différente de celle des témoins de contrôle négatifs, ne correspondait pas totalement à celle des témoins positifs: les particules fluorescentes y étaient moins nombreuses, comme si la tique avait été faiblement infectée. En raison de l'impossibilité, évoquée ci-dessus, d'entreprendre des investigations supplémentaires, nous considérerons également ce spécimen comme "douteux".

Dans le Tableau 14, ces deux échantillons au diagnostic incertain sont représentés par un chiffre suivi d'une astérisque*.

Aucune tique ne s'est avérée contenir à la fois des spirochètes et des virus.

Type test	Nb tiques testées	Nb positifs <i>B. b.</i>	%	Nb positifs CEE	%	Nb doubles positifs
IF/S	62	5 (6*)	8,1 (9,7*)	0 (1*)	0 (1,6*)	0
PCR	92	17	18,1	0	0	0
Total	154	22 (23*)	14,3 (14,9*)	0 (1*)	0 (0,6*)	0

Tableau 14: Résultats des analyses bactériologiques et virologiques effectuées sur les tiques recueillies sur les militaires suisses.

B. b.: *B. burgdorferi*

IF/S: Immunofluorescence sur "squashes"

CEE: Virus CEE

PCR: Polymerase Chain Reaction.

*: Y compris 1 cas douteux (cf texte).

L'origine géographique des tiques analysées par IF/S ou par PCR est comparable. La différence de prévalence observée entre les deux groupes n'est pas significative ($p=0,100$, test de Fischer-exact).

Le lieu de piqûre des 22 tiques ayant réagi positivement et des 2 arthropodes "suspects" est reporté dans le Tableau 15:

No	type de test	Résultat d'analyse		Date de piqûre	Lieu de piqûre	Canton
		<i>B. b.</i>	CEE			
56	IF/S	-	(+)	30.7.91	Sichtern, stand de tir (Liestal)	BL
250	PCR	+	-	17.9.91	Ofringen	AG
225	PCR	+	-	11.9.91	Grosshau (Wohlen)	AG
6	IF/S	+	-	17.7.91	Kirchberg, bord de l'Emme	BE
121	PCR	+	-	13.8.91	Wangen a.Aare	BE
122	PCR	+	-	13.8.91	Chrajholz (Hindelbank)	BE
261	PCR	+	-	24.9.91	Worblaufen, stand tir	BE
9	IF/S	+	-	19.7.91	Sichtern (Liestal)	BL
290	PCR	+	-	30.10.91	Chutes de Bülchen	BL
128	PCR	+	-	13.8.91	Bois de Farzin (Romont)	FR
227	PCR	+	-	11.9.91	Chancy	GE
238	PCR	+	-	11.9.91	Schwändelberg (Kriens)	LU
123	PCR	+	-	12.8.91	Kernwald (Kerns)	OW
253	PCR	+	-	17.9.91	Kernwald (Kerns)	OW
289	PCR	+	-	26.10.91	Wittenwald (Goldach)	SG
47	IF/S	+	-	30.7.91	Messen	SO
277	PCR	+	-	4.10.91	Grenchenberg	SO
284	PCR	+	-	9.10.91	Wolfsbühl-Ebni (Mettendorf)	TG
286	PCR	+	-	9.10.91	Wolfsbühl-Ebni (Mettendorf)	TG
287	PCR	+	-	9.10.91	Bietenhart-Ebni (Mettendorf)	TG
78	IF/S	+	-	5.8.91	Bois de Châtel (Donartyre)	VD
134	PCR	+	-	14.8.91	Cabane du Chasseur (Froideville)	VD
108	IF/S	+	-	8.8.91	Birmensdorf	ZH
90	IF/S	(+)	-	7.8.91	"Felix" (Birmensdorf)	ZH

Tableau 15: Origine des tiques, recueillies sur les militaires, ayant réagi positivement aux tests de détection de *B. burgdorferi* et du virus CEE (PCR ou IF/S).

Classement par agent pathogène et par canton.

B. b.: *B. burgdorferi*

IF/S: Immunofluorescence sur "squashes"

CEE: Virus CEE

PCR: Polymerase Chain Reaction.

+: Positif

-: Négatif

(+): Douteux, avec forte suspicion de positivité.

Les données relatives aux tiques infectées par *B. burgdorferi* ne révèlent pas de "nouveaux" foyers de borréliose, puisque l'on considère comme acquis que toutes les populations de *I. ricinus* de Suisse hébergent le spirochète, dans

des proportions variables [204]. Par contre, il est possible que la forêt entourant le stand de tir de Liestal (Figure 30) abrite un foyer naturel d'encéphalite à tiques (selon que l'on considère les particules fluorescentes comme des virus ou non). L'analyse par IF/S de 40 nymphes et 4 femelles d'*I. ricinus* capturées ultérieurement sur le même site, de même que l'examen sérologique des recrues piquées à Liestal, n'ont pas fourni d'indications permettant de confirmer la présence du virus CEE à cet endroit.



Figure 30: Le site du stand de tir de Liestal. Photo mai 1993.

VIII.3. ANALYSES SEROLOGIQUES

Nous avons procédé à 2, voire 3 séries de prises de sang: la première, effectuée à la découverte de la piqûre de tique, devait permettre d'établir l'état sérologique initial des participants; la seconde, effectuée au moins 4 semaines plus tard, avait pour but de déceler une infection par *B. burgdorferi* ou le virus CEE; la troisième, enfin, a été organisée plus d'une année après la piqûre, afin de vérifier l'évolution sérologique des personnes piquées par une tique porteuse de l'un ou l'autre des agents pathogènes.

VIII.3.1. MILITAIRES N'AYANT PARTICIPÉ QU'À LA PREMIÈRE PRISE DE SANG

Les échantillons de sang prélevés à la découverte de la piqûre de tique ont été analysés, par ELISA, pour la recherche des anticorps de classe IgG dirigés contre *B. burgdorferi* (cf IV.4.1.3) et le virus CEE (IV.4.1.1.). Les IgM n'ont pas été quantifiées.

Sur les 269 personnes ayant annoncé une piqûre de tique, 31 n'ont participé qu'à une prise de sang. Ces prélèvements ont eu lieu 0-32 jours (médiane: 2 jours) après la piqûre. 4 militaires ont procédé à la prise de sang plus de 7 jours (respectivement 22, 27, 28 et 32 jours) après la découverte de la tique.

VIII.3.1.1. *B. burgdorferi*

Sur les 31 personnes n'ayant procédé qu'à une prise de sang, une seule (3,2%) présente des anticorps (IgG) dirigés contre *B. burgdorferi*. Ce militaire ne s'est toutefois présenté pour la prise de sang que 28 jours après la piqûre. Il mentionne avoir souffert d'une "rougeur étendue de la peau" (question 12a du questionnaire, Annexe 3) évoquant un ECM, sans en indiquer la date mais en précisant que cette affection n'a pas entraîné de consultation médicale; il se rappelle également avoir été piqué par une ou plusieurs tiques, avant 1989, dans la région du Vully/FR.

VIII.3.1.2. Virus CEE

Une recrue indique avoir reçu, une année avant l'ER, une injection de vaccin contre le virus CEE. Aucun des 30 militaires restants n'a présenté un taux positif d'anticorps (IgG) résultant d'une exposition naturelle au virus.

VIII.3.2. MILITAIRES AYANT PARTICIPÉ À DEUX PRISES DE SANG

Les échantillons de sang prélevés 1 mois après la piqûre ont été analysés pour la présence d'anticorps de classes IgM et IgG.

Les IgM et IgG dirigées contre *B. burgdorferi* ont été recherchées dans tous les sérums de seconde prise, respectivement par ELISA (cf IV.4.1.3.) et par ELISA-Capture (IV.4.2.). Si, à l'examen de la seconde prise de sang, un diagnostic positif était posé (IgM, IgG), les sérums de première et seconde

prises étaient à nouveau analysés, ensemble et par le même test. Les IgM n'ont donc été quantifiées, dans les sérums de première prise, que dans des circonstances particulières, lorsque le second échantillon s'avérait positif.

En ce qui concerne le virus CEE, les IgG ont été recherchées dans tous les échantillons au moyen du test ELISA (IV.4.1.1.); les IgM ont été quantifiées dans le second échantillon, par ELISA (IV.4.1.2.), chez les individus ayant manifesté une légère augmentation du titre d'IgG, les personnes piquées par des tiques porteuses de virus, ou les militaires ayant subi une seconde prise de sang moins de 4 semaines après la première. Chaque augmentation apparente du titre, entre le premier et le deuxième prélèvements, était confirmée en testant à nouveau, ensemble, les échantillons des 1^{ère} et 2^{ème} prises. Ici encore, les IgM n'ont donc été quantifiées, dans la première mais aussi dans la seconde prises de sang, que dans des circonstances particulières.

Sur les 269 personnes ayant participé à l'enquête, 238 ont accepté le prélèvement minimum de 2 échantillons de sang nécessaire à l'étude de l'évolution sérologique.

Six cas ont été exclus de cet effectif de 238 soldats: un militaire n'ayant pas précisé la date de la piqûre de tique, 4 recrues qui se sont présentées pour la première prise de sang plus de 14 jours (21-54) après la piqûre, et enfin 1 recrue ayant procédé au second prélèvement sanguin moins de 21 jours (8) après le premier. Bien qu'éliminés de nos statistiques, les sérums de ces soldats ont été analysés pour la recherche d'anticorps spécifiques; tous se sont révélés négatifs pour les deux prises de sang, tant en IgG qu'en IgM (*B. burgdorferi*, virus CEE).

L'étude a donc porté sur les 232 cas restants. Pour ceux-ci, les prises de sang ont eu lieu en moyenne 2 jours (0-12) après la découverte de la piqûre. La période séparant le premier prélèvement du second est de 22-102 jours (médiane: 39 jours).

Parmi les 232 cas considérés, 3 recrues, piquées par des tiques à deux reprises (respectivement à 2, 29 et 40 jours d'intervalle, cf VIII.1), ont participé, selon le délai séparant les piqûres et l'initiative des médecins d'ER, à trois, voire quatre prises de sang (respectivement 4, 4 et 3 prises). Ces personnes n'ont montré de variation du titre d'anticorps ni vis-à-vis de *B. burgdorferi*, ni vis-à-vis du virus CEE. Dans les résultats présentés ci-dessous (Tableau 16), les résultats sérologiques de leurs diverses prises sont regroupés, chaque "cas" se rapportant à un individu et non pas à une déclaration de piqûre.

Le Tableau 16 résume l'évolution sérologique et les caractéristiques des militaires analysés à deux reprises. Sur les 232 personnes étudiées, 220 ont présenté, vis-à-vis de *B. burgdorferi*, des sérologies négatives dans les deux prises de sang. Parmi ces dernières, trois ont montré une augmentation (forte dans un cas, faible dans les deux autres) du titre d'IgG dirigées contre

le virus CEE, les IgM restant, dans les deux séries de prises de sang, à la limite du seuil de séropositivité ("douteux"). Sept recrues ont présenté des titres élevés, mais constants, d'IgG ou d'IgM anti-spirochète, sans manifester de signes sérologiques de contact avec le virus CEE. Enfin, 5 militaires ont montré une séroconversion vis-à-vis de *B. burgdorferi* (IgM seulement, les taux d'IgG restant négatifs), sans que des anticorps dirigés contre le virus CEE ne soient détectés.

Aucune recrue n'a présenté des signes de séroconversion à la fois en IgM et en IgG, que ce soit pour le spirochète ou pour le virus.

Combinaison sérologique (<i>B. burgdorferi</i>) IgM / IgG	Nb de cas	Dont combinaison sérologique (virus CEE) IgM / IgG	Nb de cas
- * / -	220	d / ↑	1 (3) **
- * / +	2	ND / -	210 ***
+ / -	5	ND / -	2
↑ / -	5	ND / -	5
Total	232		225 ***

Tableau 16: Evolution globale des taux d'anticorps spécifiques dirigés contre *B. burgdorferi* et le virus CEE, chez les recrues ayant participé à deux prises de sang. Tests ELISA et ELISA-Capture (cf texte).

Seules les combinaisons d'anticorps rencontrées dans notre étude sont représentées.

* : Titre déterminé dans la seconde prise de sang (le titre d'IgM dans le premier échantillon n'a alors pas été établi).

** : Deux des trois sérums n'ont montré qu'une faible augmentation du titre d'IgG (cf VIII.3.2.2.).

*** : 7 militaires ayant subi une immunisation active ou passive contre le virus CEE, avant ou entre les deux prises de sang, ne sont pas considérés.

- : Titre négatif et constant entre les deux prises de sang.

+ : Titre positif et constant entre les deux prises de sang.

↑ : Augmentation du titre entre les deux prises de sang.

d : Titre à la limite du seuil de positivité, constant entre les deux prises de sang.

ND : Titre non déterminé (conditions d'analyse non requises, cf texte).

Le détail des résultats significatifs est reporté dans le Tableau 17.

No recrue	Analyses <i>B. burgdorferi</i>				Analyses virus CEE				Délai séparant les prises de sang (jours)	Examen des tiques (B.b./ CEE)
	Evolution sérologique			Sympt. cliniques	Evolution sérologique			Sympt. cliniques		
	IgM 1ère / 2ème prises	IgG	Bilan IgM/IgG		IgM 1ère / 2ème prises	IgG	Bilan IgM/IgG			
172	ND/-	+/+	- / +	aucun	ND / ND	- / -	ND / -	aucun	78	- / -
251	ND/-	+/+	- / +	aucun	ND / ND	- / -	ND / -	aucun	48	NP
10	+/+	- / -	+ / -	aucun	ND / ND	- / -	ND / -	aucun	41	- / -
58	+/+	- / -	+ / -	aucun	ND / ND	- / -	ND / -	aucun	30	NT
121	+/+	- / -	+ / -	aucun	ND / ND	- / -	ND / -	aucun	36	+ / -
225	+/+	- / -	+ / -	aucun	ND / ND	- / -	ND / -	aucun	45	+ / -
233	+/+	- / -	+ / -	aucun	ND / ND	- / -	ND / -	aucun	34	NP
4	- / +	- / -	↑ / -	aucun	ND / ND	- / -	ND / -	aucun	47	- / -
40	- / +	- / -	↑ / -	aucun	ND / ND	- / -	ND / -	aucun	38	NP
124	- / +	- / -	↑ / -	aucun	ND / ND	- / -	ND / -	aucun	37	NP
129	- / +	- / -	↑ / -	aucun	ND / ND	- / -	ND / -	aucun	71	- / -
238	- / +	- / -	↑ / -	aucun	ND / ND	- / -	ND / -	aucun	54	+ / -
167	ND / -	- / -	- / -	aucun	d / d	- / +	d / ↑	aucun	40	NP
262	ND / -	- / -	- / -	aucun	d / d	d / +	d / (↑)	aucun	47	- / -
272	ND / -	- / -	- / -	aucun	d / d	- / +	d / (↑)	FSME	31	- / -

Tableau 17: Récapitulatif des personnes ayant présenté des titres positifs d'anticorps (IgM ou IgG), une séroconversion ou des symptômes de borréliose ou d'encéphalite à tiques, entre la première et la seconde prises de sang.

Classement par profil sérologique.

- : Négatif + : Positif d : Douteux. ↑ : Séroconversion.

(↑) : Faible augmentation du titre (cf VIII.3.2.2.) entre la première et la seconde prises de sang.

ND: Non déterminé (conditions d'analyse non requises, cf texte).

NT: Non testé (fragment inutilisable).

NP: La tique ne nous est pas parvenue.

VIII.3.2.1. *B. burgdorferi*

Sur les 232 recrues testées à deux reprises, aucune n'a montré, entre la première et la seconde prises de sang, d'augmentation du titre d'IgG.

Deux militaires (Nos 172 et 251) ont présenté, dans les deux échantillons sanguins, des taux élevés et constants d'IgG dirigées contre le spirochète. Ces deux personnes ne se rappellent pas avoir souffert de quelconques symptômes de borréliose.

Cinq recrues (Nos 10, 58, 121, 225, 233) ont présenté un titre élevé mais constant d'IgM dans les deux prélèvements, cela sans que des IgG ne soient

décélées. En l'absence d'évolution sérologique et compte tenu des possibles réactions croisées avec d'autres affections (autres spirochètoses, mononucléose [virus Epstein-Barr], toxoplasmose), nous ne pouvons conclure à une infection par *B. burgdorferi*.

Cinq autres personnes (2,2%) ont présenté une augmentation du titre d'anticorps de classe IgM pour *B. burgdorferi*, sans qu'il nous ait été fait part de l'apparition de symptômes de borréliose (cas Nos 4, 40, 124 et 129, 238). Il est à noter que les tiques examinées pour les recrues Nos 4 (lieu de piqure: bords du lac de Brienz/BE, ou Wauwil/LU) et 129 (Eiken-Aarau/AG) sont restées négatives tant pour *B. burgdorferi* que pour le virus CEE. Les tiques ayant piqué les recrues Nos 40 et 124 ne nous ont pas été envoyées. Le militaire No 238 est la seule personne piquée par une tique reconnue infectée par *B. burgdorferi* qui ait développé rapidement des anticorps (IgM) contre le spirochète. (N.B.: l'évolution sérologique des recrues piquées par des tiques porteuses de *B. burgdorferi* ou du virus CEE sera traitée de manière plus détaillée dans le paragraphe VIII.3.3).

Enfin, et bien qu'il ne fasse pas partie de l'effectif de recrues considéré, nous mentionnerons encore un cas d'infection clinique par *B. burgdorferi* qui nous a été annoncé en juillet 1991 (cas No 27, Tableau 18). Ce lieutenant de l'ER 243 de Dübendorf/ZH, piqué à la hauteur du Pont de Lorraine à Berne, a développé après 20 jours un érythème avec induration, récidivant après 1 mois pour atteindre un diamètre de 10 cm, considéré par le médecin d'ER comme un ECM typique et traité comme tel. Un premier échantillon de sang, prélevé le jour du début de l'antibiothérapie, présentait un titre d'IgM positif mais pas d'IgG décelables. Un second prélèvement, effectué 3 mois plus tard, s'est révélé négatif tant pour les IgG que pour les IgM, confirmant l'efficacité du traitement. L'absence d'IgG au moment de l'apparition des symptômes - ici environ 2 mois après la piqure infectieuse - n'est pas exceptionnelle: ce phénomène a déjà été observé par d'autres auteurs, avec des cas d'ECM le plus souvent, mais aussi de neuroborréliose et d'ACA [92, 327, 333]. La tique à l'origine de cette affection n'a pas été conservée.

No soldat	Analyses <i>B. burgdorferi</i>		Analyses virus CEE		Délai séparant les prises de sang (jours)	Examen des tiques (<i>B.b./</i> CEE)
	Evolution sérologique IgM / IgG	Symptômes cliniques	Evolution sérologique IgM / IgG	Symptômes cliniques		
27*	↓ / -	ECM	- / -	aucun	103	NP

Tableau 18: Récapitulatif d'un lieutenant de l'ER de Dübendorf ayant présenté un érythème chronique migrant (ECM) suite à une piqûre de tique.

- *: Le premier prélèvement de sang a été effectué au début d'un traitement anti-borrélien, environ deux mois après la piqûre infectieuse.
- : Titre négatif et constant entre les deux prises de sang.
- ↓: Diminution du titre entre la première et la seconde prises de sang.
- NP: La tique ne nous est pas parvenue.

VIII.3.2.2. Virus CEE

Sur les 230 personnes non vaccinées ayant accepté le second prélèvement, 5 (incorporées à l'ER 256 de Brugg) ont recouru à une immunisation passive (immunoglobulines) entre les deux prises de sang.

Parmi les 225 militaires restants, aucun n'a présenté d'IgG dirigées contre le virus CEE dans les deux échantillons; un (0,4%), voire 3 (1,3%) ont montré une séroconversion (Tableau 17):

- dans le premier cas (No 167), l'augmentation du titre d'IgG était importante, mais n'a pas été accompagnée de symptômes caractéristiques de la seconde phase de l'encéphalite à tiques, ni d'une variation du titre d'IgM, qui est resté à la limite du seuil de positivité dans les deux échantillons de sang. Rappelons que la phase clinique de la maladie ne se développe, en Suisse, que dans moins de 10% des cas d'infection par le virus CEE [197, 329]. La tique à l'origine de la piqûre, observée à Bremgarten/AG, ne nous est pas parvenue.

- dans le deuxième cas (No 262), l'augmentation du titre d'IgG, bien qu'ayant eu pour conséquence un franchissement du seuil de séropositivité, était relativement faible. Elle était néanmoins supérieure aux variations observées dans les 222 autres couples de sérums analysés - diagnostiqués comme "négatifs". Considérant que le deuxième échantillon de sang avait peut-être été prélevé au début de la phase de production d'IgG, nous avons inclus ce cas dans nos résultats positifs, avec toutefois une réserve (représentée par des parenthèses (†) dans le Tableau 17). Le taux d'IgM est

resté constant, à la limite du seuil de positivité, dans les deux échantillons de sang. La recrue No 262 n'a pas présenté de signes cliniques d'encéphalite à tiques. L'acarien incriminé, capturé à Spiezwiler/BE, est resté négatif pour le virus CEE et *B. burgdorferi*.

- dans le troisième cas (No 272), une augmentation faible du taux d'IgG, accompagnée d'un titre douteux et constant d'IgM, a été décelée chez un militaire ayant souffert d'une légère méningo-encéphalite entre la première et la seconde prises de sang. L'arthropode incriminé, capturé sur les hauts de Neuchâtel, à l'Abbaye de Fontaine-André, s'est révélé négatif tant pour *B. burgdorferi* que pour le virus CEE. Bien que le patient ne nous ait annoncé que cette piqûre, il est vraisemblable qu'il se soit infecté en un autre lieu. En effet, son école de recrues, cantonnée à Thounne, est située dans une région à haut risque d'encéphalite à tiques [197].

VIII.3.3. EVOLUTION SÉROLOGIQUE DES RECRUES PIQUÉES PAR DES TIQUES INFECTÉES PAR *B. BURGDORFERI* OU LE VIRUS CEE

Sur les 24 militaires piqués par une tique suspecte ou porteuse de l'un ou l'autre des agents pathogènes, un seul a montré une augmentation du titre d'anticorps à la seconde prise de sang, soit dans les premières semaines qui ont suivi la piqûre (No 238, IgM anti-*B. burgdorferi*) (Tableau 19). Testée en Western blot (cf IV.4.3. - résultats non représentés), cette recrue présentait dans les deux sérums une bande de 41 kDa, tandis que le second échantillon voyait l'apparition d'une protéine de 14 kDa et la disparition d'une bande de 37 kDa; l'infection de ce militaire par *B. burgdorferi* n'est donc pas formellement démontrée. Les titres d'anticorps décelés chez les 23 autres personnes étaient soit négatifs, soit positifs mais constants (Nos 121 et 225) entre les deux prises de sang, et cela même pour des périodes séparant les prises de sang élevées (jusqu'à 84 jours).

Des symptômes cliniques de borréliose ou d'encéphalite à tiques ne nous ont été annoncés pour aucune de ces recrues.

Le degré d'infection des tiques ("intensité de la réaction") et la durée du repas sanguin ne semblent pas avoir eu d'influence sur la transmission des microorganismes.

Les résultats de ces analyses sont résumés dans le Tableau 19.

No soldat	Sérologie 1ère prise de sang IgM/IgG	Sérologie 2ème prise de sang IgM/IgG	Séro-conversion	Délai piq/pr.1 (jours)	Délai pr.1/pr.2 (jours)	Stade de la tique	Nb jours garge-ment de la tique	Intensité infection de la tique
6	-/-	-/-	non	0	40	F	1-2	+
9	ND/-	-/-	non	2	44	F	1-2	+
47	ND/-	-/-	non	0	35	F	1-2	+
78	ND/-	-/-	non	2	34	N	1-2	+
90	-/-	-/-	non	0	47	F	2-3	(+)
108	ND/-	-/-	non	1	87	N	0-1	+
121	+/-	+/-	non	0	36	F	2-3	+
122	ND/-	-/-	non	1	37	F	2-3	++
123	ND/-	-/-	non	2	35	F	2-3	++
128	ND/-	-/-	non	0	84	F	1-2	+++
134	ND/-	-/-	non	5	45	F	1-2	+++
225	+/-	+/-	non	2	45	f	Indét.	+
227	ND/-	-/-	non	1	36	F	3-4	+++
238	-/-	+/-	oui	4	54	F	3-4	+++
250	ND/-	-/-	non	3	48	f	indét	++
253	ND/-	-/-	non	2	50	N	3-4	++
261*	ND/-	ND/ND	-	1	-	f	0-1	++
277	ND/-	-/-	non	3	31	N	3-4	++
284	ND/-	-/-	non	2	28	N	1-2	++
286	ND/-	-/-	non	2	28	F	0-1	+++
287	ND/-	-/-	non	0	30	F	3-4	++
289	ND/-	-/-	non	2	32	F	3-4	++
290	ND/-	-/-	non	1	8	n	Indét.	+++
56	ND/-	-/-	non	1	29	F	1-2	(++)

Tableau 19: Evolution sérologique des recrues piquées par des tiques positives.
 Nos 6-290: Résultats des analyses pour *B. burgdorferi*.
 No 56: Résultats des analyses pour le virus CEE.
 Délai piq/pr.1: Délai séparant la piqûre de la 1ère prise de sang.
 Délai pr.1/pr.2: Délai séparant la 1ère de la 2ème prises de sang.
 -: Négatif +: Positif ND: Analyse non effectuée.
 F: Femelle, corps entier f: Femelle, fragment.
 N: Nymphe, corps entier n: Nymphe, fragment.
 * La recrue No 261 n'a pas participé à la seconde prise de sang.

VIII.3.4. TROISIÈME PRISE DE SANG: ÉVOLUTION SÉROLOGIQUE SUR UN AN DES MILITAIRES PIQUÉS PAR UNE TIQUE INFECTÉE.

Les 23 soldats n'ayant pas présenté de séroconversion ont été recontactés 1 an après leur Ecole de recrues, pour un nouveau prélèvement sanguin. Ce

troisième échantillon a été analysé pour la recherche d'IgG uniquement, par ELISA et IFAT pour *B. burgdorferi* (IV.4.1.3., IV.4.4.), et ELISA pour le virus CEE (IV.4.1.1.). En outre, les séries entières d'échantillons (1ère, 2ème et 3ème prises de sang) ont été analysées par la technique de Western blot pour la recherche d'IgG dirigées contre *B. burgdorferi* (IV.4.3.).

Seules 11 personnes ont répondu positivement à notre demande (Tableau 20). Toutes avaient été piquées par des tiques porteuses de spirochètes.

Une inflammation articulaire (question 3d du questionnaire, cf Annexe 4) a été reportée chez l'une d'elles (No 289) après le deuxième prélèvement sanguin; un exanthème maculo-urticarien a été observé chez la recrue No 261, en mai 1992. Des symptômes de borréliose ou d'encéphalite à tiques n'ont été observés chez aucun des autres soldats durant l'année écoulée entre la deuxième prise de sang et la troisième.

L'analyse des sérums par les méthodes d'ELISA et d'IFAT ne met en évidence aucune augmentation du titre d'anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* (Tableau 20). Tous les sérums sont restés négatifs pour le virus CEE (résultats non représentés sur le Tableau 20).

No soldat	Bilan 1ère prise de sang t = découverte tique	Bilan 2ème prise de sang t \approx 1 mois après piqûre	3ème prise de sang t \approx 1 an après piqûre (IFAT / ELISA)	Séro-conversion
6	IgM - / IgG -	IgM - / IgG -	IgG - / IgG -	non
9	IgG -	IgM - / IgG -	IgG - / IgG -	non
47	IgG -	IgM - / IgG -	IgG - / IgG -	non
108	IgG -	IgM - / IgG -	IgG - / IgG -	non
123	IgG -	IgM - / IgG -	IgG + / IgG d	douteux
250	IgG -	IgM - / IgG -	IgG d / IgG +	douteux
253	IgG -	IgM - / IgG -	IgG - / IgG d	non
261	IgG -	ND	IgG - / IgG -	non
277	IgG -	IgM - / IgG -	IgG d / IgG d	non
289	IgG -	IgM - / IgG -	IgG - / IgG -	non
290	IgG -	IgM - / IgG -	IgG d / IgG -	non

Tableau 20: Evolution sérologique sur 1 an des militaires piqués par des tiques infectées par *B. burgdorferi* (*B.b.*). Tests ELISA (IgG), IFAT (IgG) et ELISA-Capture (IgM).

L'examen de ces mêmes sérums par Western blot, pour la détection des anticorps dirigés contre *B. burgdorferi*, ne donne pas de résultats plus concluants (Figure 31):

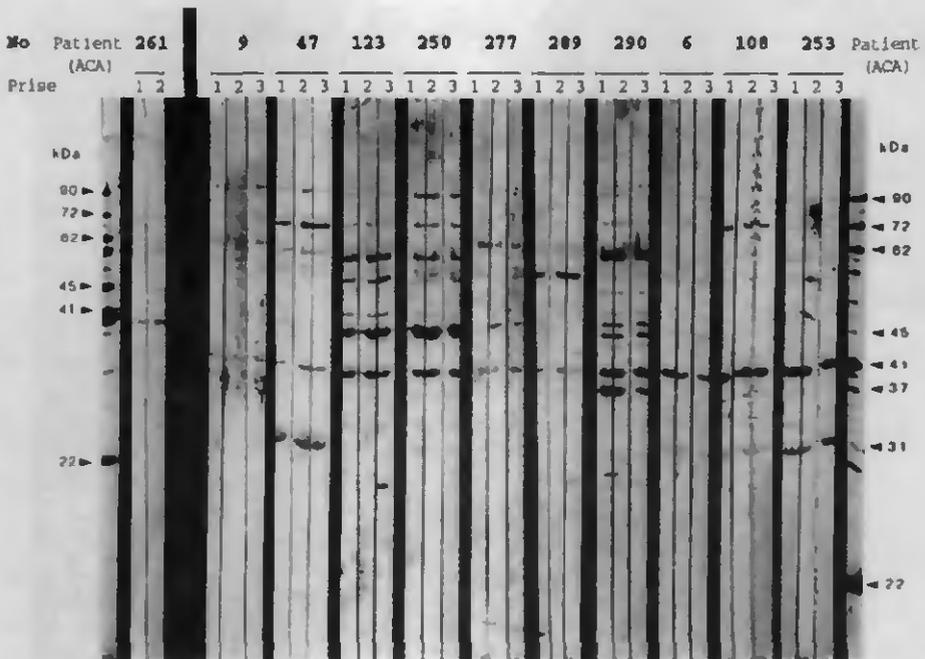


Figure 31: Evolution des anticorps de classe IgG chez les militaires piqués par des tiques porteuses de *B. burgdorferi*. Analyse par Western blot.

Le profil protéique est constant dans les trois échantillons de sang des recrues Nos 6, 9, 47, 250, 253, 277 et 289. Trois de ces militaires (Nos 6, 47 et 253) présentent des bandes à 31 et 41 kDa, correspondant respectivement à l'OspA et à la flagelline; ces sérums peuvent être considérés comme positifs, bien que, à en juger par la pâleur des bandes (surtout chez la recrue No 6), l'infection ne paraisse pas récente (Hu, Lienhard, comm. pers.); elle n'est en aucun cas liée à la piqûre de tique, puisque ces bandes apparaissent, avec la même intensité, sur les trois échantillons. Notons que, parmi ces trois personnes, seule la recrue No 47 se rappelle avoir été piquée par des tiques avant le début de notre étude, en l'occurrence avant 1989, à Davos/GR. Par ailleurs, on n'observe par Western blot aucun signe de séroconversion chez la recrue No 250, en

contradiction avec le diagnostic posé au moyen des tests IFAT ("douteux") et ELISA ("positif"); l'infection par le spirochète n'est donc pas clairement démontrée dans ce cas.

La recrue No 123 a vu l'apparition d'une nouvelle bande protéique, d'environ 27-28 kDa (OspD), entre la deuxième et la troisième prises de sang, soit entre novembre 1991 et mars 1993. Ce soldat affirme avoir été piqué par des tiques, en mai 1992, lors d'un séjour en Irlande (Ring of Berra). Ni lui, ni son médecin traitant n'ont observé de symptômes cliniques évoquant une borréliose. L'absence d'autres modifications du profil protéique ne permet pas, sur la base du seul test de Western blot, de conclure à l'effectivité d'une infection par *B. burgdorferi*. Rappelons cependant que le troisième échantillon de sang s'est révélé positif en IFAT et douteux en ELISA. Sans doute des analyses supplémentaires (par exemple avec, comme source protéique, d'autres souches de *B. burgdorferi* que l'isolat B31 utilisé dans nos Western blots) seraient-elles utiles à l'établissement d'un diagnostic définitif (cf Discussion, VIII.5.).

Une bande de 45 kDa est apparue entre le premier et le second prélèvements sanguins chez la recrue No 261. Rappelons que ce militaire n'a pas participé à la prise de sang prévue un mois après la piqûre de tique (cf Tableau 19). Il présente par ailleurs une bande, constante dans les deux échantillons, de 39 kDa. Lors du premier prélèvement, ce participant mentionnait avoir remarqué une "rougeur étendue de la peau" quelques semaines auparavant; il se rappelait également avoir été piqué par une tique dans la région de Stäfa/ZH, avant 1989. Par la suite, il a encore souffert d'un "exanthème maculo-urticarien de 2-4 cm²" (mai 1992), un nouvel exanthème apparaissant en juillet 1993, soit environ 2 mois avant la seconde prise de sang. L'absence de bandes spécifiques de *B. burgdorferi* et les résultats négatifs obtenus par ELISA et IFAT (cf Tableau 20) tendent à rejeter l'hypothèse d'une infection par *B. burgdorferi*.

Chez les recrues Nos 108 et 290, une bande protéique de 37 kDa, très nette à la première prise de sang, s'est progressivement estompée jusqu'à la troisième prise. Rappelons qu'une évolution similaire a été observée chez la recrue No 238 (cf VIII.3.3.). Nous ne sommes pas en mesure d'expliquer ce phénomène. Ces militaires ont déclaré ne souffrir d'aucune affection particulière (grippe, rhume, allergie, etc) au moment de la première prise de sang. La recrue No 108 présentait, dans le premier échantillon de sang, une réaction positive vis-à-vis des protéines de 31 et 41 kDa, témoignant d'une infection préexistante par *B. burgdorferi*. En revanche, la recrue No 290 réagissait positivement vis-à-vis des protéines de 41 kDa et (très faiblement) 27 kDa. Si le militaire No 290 affirme avoir été piqué avant le début de notre étude (en l'occurrence avant 1989, dans le Steiermark en Autriche), la recrue No 108 ne se rappelle aucune piqûre antécédente. Entre

la première et la troisième prises de sang, ces soldats n'ont ni présenté des symptômes de borréliose, ni subi de traitement anti-borrélien.

VIII.4. METHODES D'EXTRACTION DE LA TIQUE.

Si la transmission du virus CEE de la tique à l'homme emprunte la voie salivaire, l'inoculation de *B. burgdorferi* est plus problématique: plusieurs modes de transmission ont été proposés: salivation [265], régurgitation [51], voire les deux [29], sans qu'il ait été possible de les démontrer formellement. Selon Schwartz et Goldstein [286], la benzine parfois utilisée pour extraire les tiques pourrait provoquer un réflexe de régurgitation et, partant, favoriser la transmission de *B. burgdorferi*. Initialement, nous avions donc prévu d'étudier le rôle du mode d'extraction d'*I. ricinus* sur la transmission des agents pathogènes qu'il transporte. Toutefois, en raison du faible nombre de tiques trouvées porteuses de microorganismes, ainsi que du seul cas de séroconversion enregistré après 1 mois, cette recherche a dû être abandonnée. Les modes d'extraction sont donc présentés ici à titre indicatif de la variété des méthodes employées.

Sur les 272 annonces de piqûres qui nous sont parvenues, la méthode d'extraction employée nous a été communiquée dans 239 cas (Figure 32). Le plus souvent (85 cas), les parasites ont été retirés par des moyens mécaniques uniquement (doigts, brucelles, "pinces à tiques"). L'utilisation de corps gras (huile, graisse à traire, vaseline, paraffine, glycérine) est également très fréquente (64 cas), de même que l'extraction par anesthésie (glace, spray réfrigérant, gel de Syntocaïne). Enfin, divers autres produits ont été utilisés, tels l'alcool, l'iode (vraisemblablement teinture d'iode), l'éther, le vinaigre et des pommades diverses.

Des modes d'extraction différents ont été utilisés en combinaison dans 10 cas (compte non tenu de l'extraction mécanique, qui succède presque toujours à l'application des divers produits utilisés).

Les tiques se sont détachées naturellement ("drop-off") dans 9 cas.

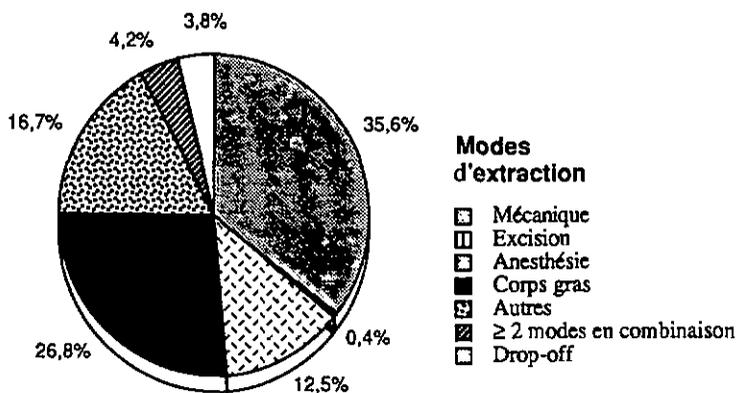


Figure 32: Proportions relatives des divers modes d'extraction de tiques utilisés par les militaires. n = 239.

Le détail des modes d'extraction utilisés en combinaison est donné dans le Tableau 21.

	Camomille	Anesthésique	Graisse	Alcool	Choc électrique
Excision			1		
Analgésique			1	1	
"Pommade"				1	
Graisse	1	1			1
Ether et dérivés		3			

Tableau 21: Modes d'extraction (autres que mécaniques) utilisés en combinaison par les militaires pour retirer les tiques. n = 10.

Nous n'avons pas de précisions quant à la nature de "l'électrochoc" (sic) appliqué par une recrue ou son médecin d'ER à l'extraction d'une tique.

Sur les 177 tiques qui nous ont été envoyées, 158 étaient accompagnées d'une description du mode d'extraction. Aucune des méthodes employées ne semble préférable aux autres en ce qui concerne la qualité de l'extraction: le risque de fragmentation de la tique reste aléatoire quels que soient le stade ou le degré de gorgement de la tique.

VIII.5. DISCUSSION

Nous avons pour ambition de déterminer le risque, pour un soldat commençant son Ecole de recrues, de se faire infecter par l'un ou l'autre des microorganismes étudiés.

Près de 20'000 recrues étaient concernées par cette étude. Au total, 301 tiques ont été observées par ces militaires entre juin et novembre 1991. Ce chiffre est cependant certainement sous-estimé: d'une part, les tiques - et surtout les stades immatures - peuvent facilement passer inaperçues (rappelons que près de 27% des forestiers séropositifs vis-à-vis de *B. burgdorferi* n'ont aucun souvenir de piqûre de tique, cf VII.1.3.2.); d'autre part, les recrues ne se sont pas systématiquement annoncées après une piqûre: plusieurs militaires ont en effet indiqué, lors de la première prise de sang, avoir subi, au cours de la même ER, d'autres piqûres de tiques que celle pour laquelle ils prenaient part à l'étude (questions 6-8 du questionnaire, cf Annexe 3); or, ces piqûres n'avaient pas été annoncées au médecin d'ER, et les prises de sang correspondantes n'avaient, par conséquent, pas été effectuées.

Un autre biais résulte de la méthode de détection simultanée des agents pathogènes dans *I. ricinus*. Nos techniques d'analyse des tiques, à la fois pour *B. burgdorferi* et le virus CEE, impliquaient que chaque échantillon soit divisé en deux. La performance de nos tests a pu s'en trouver abaissée. De fait, le nombre de spirochètes observés par IF/S dans les tiques définies comme "positives" dépassait rarement deux; de plus, de nombreux acariens nous sont arrivés déjà fragmentés. Il est donc possible que certaines bactéries aient échappé à notre observation; cela pourrait expliquer la prévalence relativement faible de tiques infectées par *B. burgdorferi* déterminée par IF/S (cf Tableau 14), ainsi que la différence de diagnostic observée entre les militaires Nos 4 et 129 et les tiques qui leur étaient associées (rappelons que ces deux recrues ont opéré une séroconversion en IgM, alors que les tiques, analysées respectivement par IF/S et PCR, étaient négatives pour *B. burgdorferi*).

Type de population étudiée	Age (méd ou moy)	Délai Piq/Pr1 (jours) (moy)	Délai Pr1/Pr2 (jours) (méd ou moy)	Nb piqués / Nb exposés (%)	Nb séropositifs / Nb analysés (%)	Nb séroconv. / Nb analysés deux fois* (%)	Nb sympto. / Nb séroconv. (%)	Réf.
Recrues, Tyrol, juil-sept 1985	18-48 (20)	1-15 (6)	13-47 (24)	84/-2'000 (4,2)	9/80 (11,2)	11/50 (22,0)	2/11 (18,2)	[283]
US Army, sud print-autom 1989	18-52 (26)	ND	6 mois	S.d.	40/511 (7,8)	18/488 (3,7)	0/18 (0)	[58], [59]
Parachutistes, Belgique, 1987-88	18-28 (21)	ND	10 mois	59/1067 (5,5)	33/1126 (2,9)	3/200 (1,5)	S.d.	[179]
Présente étude, Recrues (CH), juin-nov 1991	18-30 (20)	0-12 (2)	22-102 (39)	269/20'000 (1,3)	3/269 (1,1)	5/230 (2,2)	0/5 (0)	-

Tableau 22: Risque d'infection par *B. burgdorferi* chez des militaires stationnés en Europe.
méd: médiane

Délai Piq/Pr1: délai séparant la piqûre de la première prise de sang.

Délai Pr1/Pr2: délai séparant la première de la seconde prises de sang.

séroconv.: séroconversion

Réf: références bibliographiques

ND: non déterminé (prises de sang effectuées indépendamment de toute piqûre de tique).

*: non compris les personnes immunes (IgG-positives dès la première prise de sang).

sympto.: symptomatiques.

S.d.: Sans données (pas d'indications).

moy: moyenne.

Type de population étudiée	Age (méd ou moy)	Délai P1q/Pr1 (jours) (moy)	Délai Pr1/Pr2 (jours) (méd ou moy)	Nb piqués / Nb exposés (%)	Nb séropositifs / Nb analysés* (%)	Nb séroconv. / Nb analysés deux fois** (%)	Nb sympto. / Nb séroconv. (%)	Réf.
Recrues Tyrol, juil-sept 1985	18-48 (20)	1-15 (6)	13-47 (24)	84/-2'000 (4,2)	0/48 (0)	0/48 (0)	-	[283]
US Army, Europe centrale, avril-oct	S.d.	ND	NE	S.d.	3/194 (1,5)	-	-	[200]
US Army, sud Allemagne, print-aut 1989	18-52 (26)	ND	6 mois	S.d.	35-44(1)/614 (5,7-7,2(1))	6-14(1)/488 (1,2-2,9(1))	0/6-14(1) (0)	[58], [59]
Présente étude, Recrues (CH), juin-nov 1991	18-30 (20)	0-12 (2)	22-102 (39)	269/20'000 (1,3)	0/269 (0)	1-3(1)/225 (0,9-1,3(1))	1/3 (33,3)	-

Tableau 23: Risque d'infection par le virus CEE chez des militaires stationnés en Europe.

méd: médiane

moy: moyenne.

Délai P1q/Pr1: délai séparant la piqûre de la première prise de sang.

Délai Pr1/Pr2: délai séparant la première de la seconde prises de sang.

séroconv.: séroconversion

sympto.: symptomatiques.

Réf: Références bibliographiques

*: Non compris les personnes vaccinées

**: Non compris les personnes immunées (vaccinées ou IgG-positives dès la 1ère prise de sang).

ND: non déterminé (prises de sang effectuées indépendamment de toute piqûre de tique).

NE: non effectué (prise de sang unique).

Des enquêtes comparables à la nôtre ont été effectuées en Belgique, en Autriche, en Allemagne et en Europe centrale [58, 59, 179, 200, 283]. Les observations de leurs auteurs sont basées sur la comparaison du statut sérologique des participants, au moment de la piqûre et quelques semaines plus tard; l'infectivité de la tique n'y est jamais clairement établie. Les résultats, comparés avec nos propres observations, en sont résumés dans les Tableaux 22 et 23.

La séroconversion de la recrue No 123, piquée par d'autres tiques entre la deuxième et la troisième prises de sang (respectivement négative et positive en IgM/IgG), n'est pas comptabilisée dans le Tableau 22.

Le taux de séroconversion vis-à-vis de *B. burgdorferi* indiqué pour notre étude (5/230) concerne les anticorps de classe IgM uniquement, puisqu'aucun des autres militaires examinés n'a présenté d'augmentation du titre d'IgG.

L'important taux de séroconversion vis-à-vis de *B. burgdorferi* (11/50) indiqué par Schmutzhard *et al* [283] pour les militaires du Tyrol (Tableau 22) est attribué, par ces auteurs, à une prévalence élevée de tiques infectées par le spirochète dans cette province d'Autriche. Quant aux soldats américains étudiés par Clement *et al* [58, 59] dans le sud de l'Allemagne (Tableau 22), on peut relever que leur moyenne d'âge est plus élevée que dans les autres enquêtes (26 ans au lieu de 20-21 ans); ils ont donc théoriquement été plus exposés aux tiques et aux agents pathogènes qu'elles transportent, ce qui pourrait expliquer la prévalence relativement élevée observée chez eux dès la première prise de sang.

En ce qui concerne le virus CEE, nos données ne sont pas directement comparables avec celles des autres auteurs, puisque nos investigations portaient sur l'ensemble des recrues suisses, et non pas uniquement sur des militaires cantonnés dans une zone à risque.

Paul *et al* [232, 233] ont effectué une étude quelque peu similaire chez les participants d'un camp de vacances situé dans l'ouest de l'Allemagne. Si les tiques y ont été analysées, le statut sérologique des participants au moment de la piqûre n'y a cependant pas été déterminé. Ces auteurs relèvent une séroconversion dans moins de la moitié des cas d'infection présumée par *B. burgdorferi*, et une apparition de symptômes cliniques (ECM) dans 4% des cas.

En Suisse, Fahrer *et al* [76] ont étudié sur 6 mois l'évolution des anticorps anti-borréliens chez des coureurs d'orientation. Entre la première et la seconde prises de sang, ces auteurs ont observé une séroconversion chez 8,1% des personnes examinées, parmi lesquelles 2,2% ont développé des symptômes cliniques de borréliose. Là encore, les tiques n'ont pas été examinées.

A notre connaissance, c'est donc la première fois qu'une étude portant à la fois sur *B. burgdorferi* et le virus CEE est entreprise de manière aussi complète, en examinant tiques et sérums au moment de la piqûre et plusieurs semaines plus tard.

Les analyses de séroconversion par Western blot doivent être considérées avec prudence. En effet, nos sérums ont été analysés avec pour antigène la souche B31 de *B. burgdorferi*. Or, les nombreux spirochètes isolés en Europe présentent des profils protéiques hétérogènes; la réponse immunitaire de l'hôte étant fonction des caractéristiques antigéniques de l'agent pathogène, comme en témoignent les travaux de Garcia et de Wilske *et al* [82, 326], peut-être certaines bandes spécifiques n'ont-elles pas été détectées lors de nos tests. Par ailleurs, le profil sérologique peut être extrêmement variable d'un individu et d'un stade de l'infection à l'autre [82]. Le Western blot doit par conséquent être considéré comme une méthode de diagnostic non décisive, mais complémentaire.

Dans ce contexte, les résultats négatifs obtenus par ELISA et IFAT, l'absence de tout symptôme de borréliose et les profils obtenus par Western blot jouent en faveur d'une non-infection par *B. burgdorferi* consécutivement aux piqûres de tiques infectieuses. Toutefois, une analyse supplémentaire de ces sérums - en particulier celui de la recrue No 123 - avec d'autres isolats de *B. burgdorferi* ne serait pas inutile afin de confirmer ce diagnostic.

Dans l'état actuel de l'enquête, on retiendra donc que, sur les 23 recrues piquées par des tiques porteuses de *B. burgdorferi* qui ont pu être suivies sérologiquement pendant plus de quatre semaines, 3 seulement (13,0%) ont présenté des signes sérologiques de contact avec *B. burgdorferi* (Nos 123, 238 et 250). Encore la recrue No 123 a-t-elle été piquée entretemps par d'autres tiques et la séroconversion du soldat No 250 n'est-elle pas confirmée par le test de Western blot. A titre de comparaison, en Suède, Gustafson *et al* [109] ont évalué le risque de contracter une infection suite à une piqûre d'*I. ricinus* infecté à 1:70 pour *B. burgdorferi* et moins de 1:600 pour le virus CEE.

Les obstacles à la transmission des agents pathogènes peuvent être d'ordre temporel (durée d'exposition insuffisante, la tique étant retirée trop tôt), physiologique (tiques porteuses de spirochètes dans une phase non infectieuse [233]), immunologique (immunité à médiation humorale préexistante, même à un faible degré [232, 233], ou immunité à médiation cellulaire au site d'infection). Il faut cependant garder à l'esprit que la rapidité de la réponse immunitaire (humorale) varie d'un individu et d'un stade de la maladie à l'autre [92, 327]. Il est donc possible que nous n'ayons pu déceler des cas de séroconversion tardive. A cet égard, on peut regretter que seules 11 personnes aient accepté une troisième analyse de sang. Schmutzhard *et al* [283] ont observé des augmentations significatives du taux d'IgG anti-

borréliennes dans les 18 jours (moyenne) suivant la première prise de sang; ils n'excluaient pas, cependant, un effet "booster" chez les personnes piquées par des tiques avant l'étude (l'effet "booster" consiste en une réactivation des processus immunitaires avec, pour conséquence, une apparition des anticorps plus rapide que lors d'une primo-infection). Ce phénomène n'est pas prédominant dans notre population d'étude: sur les 85 personnes se rappelant des piqûres précédentes, aucune n'a montré d'augmentation du taux d'IgG dirigées contre *B. burgdorferi*. Vis-à-vis du virus CEE, une seule recrue (No 162) a montré une rapide séroconversion; malheureusement, la tique ne nous a pas été envoyée; cette personne se rappelait avoir été piquée, avant 1989, dans la région de Steinhusen/ZG. La possibilité d'un "effet booster" devrait donc être gardée à l'esprit lors de toute séroconversion rapide, surtout lorsque les tiques analysées se révèlent non infectées.

Il ressort de l'ensemble de ces données que l'infection de l'homme par *B. burgdorferi*, lors d'une piqûre de tique, ne se réalise pas aisément et prend le plus souvent une forme subclinique. Malgré l'aspect fragmentaire de certaines analyses, dû entre autres à la libre participation des personnes, il apparaît également que les militaires effectuant leur Ecole de recrues ne constituent pas à proprement parler une population "à risque" bien que, individuellement, chaque recrue se livrant à des exercices en forêt s'expose à un risque d'infection.

IX. RECHERCHE DU VIRUS CEE DANS DES TIQUES CAPTUREES EN PHASE DE QUETE

Les acariens capturés au drapeau entre 1988 et 1991, dans des sites susceptibles d'abriter le virus CEE, ont été classés et congelés selon la méthode décrite sous IV.3.1. Ils ont ensuite été analysés par immunofluorescence sur cultures de cellules (IF/C) pour la recherche du virus CEE. En raison de la faible proportion de tiques porteuses de virus dans la nature, et du fait que les zones de capture correspondaient au mieux à des foyers suspects, mais non reconnus d'encéphalite, les arthropodes ont tout d'abord été analysés par "pools" de 2-19 (généralement 10) adultes ou 2-80 (généralement 30) nymphes, dans le but de mettre en évidence les foyers recherchés. Sitôt l'existence de ces derniers confirmée, les tiques restantes provenant de la même zone de capture étaient analysées individuellement.

Les tiques provenant d'un même tube de congélation ont parfois été fractionnées en plusieurs "pools" testés séparément. Or, d'apparentes contaminations de tiques saines à partir des tiques porteuses de virus, à l'intérieur d'un même lot, peuvent résulter de la rupture des membranes cellulaires lors du cycle de congélation/décongélation. L'estimation de la fréquence des tiques virulentes peut s'en trouver faussée. Pour réduire un tel risque, nous avons systématiquement analysé le liquide de congélation, le même jour et selon les mêmes méthodes que les tiques qui y étaient conservées. Nous avons en effet considéré que si les virions en suspension sont assez nombreux pour être détectés parmi des "pools" de tiques, ils sont forcément aussi décelables dans le liquide lui-même.

Quel que soit le nombre de tiques analysées séparément pour chaque tube, nous avons testé 200 µl de liquide de congélation, soit, selon les tubes, environ 15-20% du volume total de liquide.

Les acariens capturés à titre complémentaire en 1993, notamment dans le foyer suspect de Liestal (cf VIII.2.), ont été examinés individuellement par immunofluorescence sur "squashes".

IX.1. ORIGINE DES TIQUES ET RESULTATS D'ANALYSES

Les tiques ont été capturées dans 13 zones réparties sur l'ensemble du Plateau (Figure 33). Ces zones correspondent à des sites suspectés d'abriter le virus CEE (sur la base des déclarations des patients atteints d'encéphalite à tiques, cf chapitre VI), ou simplement à des régions où le virus aurait pu se répandre, sans pour autant que des cas cliniques de maladie y aient été recensés.

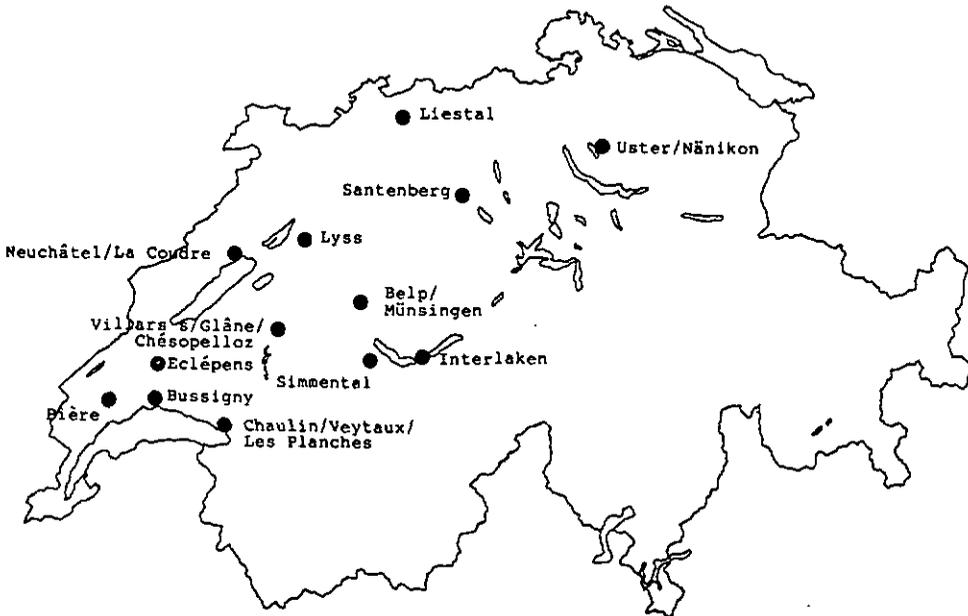


Figure 33: Origine des tiques capturées au drapeau entre 1988 et 1993.

Toutes les tiques capturées appartiennent à l'espèce *I. ricinus*. 6539 exemplaires ont été analysés pour déterminer la présence du virus CEE, dont 662 individuellement. Les résultats de ces analyses sont résumés dans les Tableaux 24-1 et 24-2.

Année Canton /Lieu (mois) de capture	Nb tiques analysées				(Dont indiv.)	Nb écht pos.	%
	Nymphes	Femelles	Mâles	Total			
1988							
VD Chaulin (6)	16			16		-	-
ZH Uster, "Oberstermerwald" (6)	7	5		12		-	-
Nänikon, "Näniker-Hard" (6)	69	3		72		-	-
BE Lyss, "Alte Aare" (7, 8)	5	10	14	29	(7)	-	-
Simmental, Erlenbach (Simme) (7)	11	28	20	59		-	-
Simmental, Ringoldingen (7)	1	2		3	(3)	-	-
Interlaken, "Goldswil" (7)	27	13	9	49		-	-
Total 1988	136	61	43	240	(10)	-	-
1989							
FR Villars-s/Glâne, "Bois de Moncor" (5)	47	13	11	71		-	-
Chésopelloz, "Le Gretson" (5)	23	3	6	32		-	-
Chésopelloz, "Verdilloud" (5)	63	20	14	97		-	-
BE Simmental, "Allmendenwald" (5)	137	40	20	197		3	1,52
Simmental, "Torwald" (5)	85	10	26	121	(11)	3	2,48
Simmental, "Talallmi" (5)	177	28	23	228	(53)	-	-
Simmental, "Balzenberg" (5)	421	62	52	535	(187)	-	-
LU Santenberg, "Santenberg" (5)	280	5	12	297	(127)	-	-
Santenberg, "Buechwald" (5)	323	5	9	337	(1)	2	0,59
Santenberg, "Buechlegi" (5)	103	29	29	161	(101)	-	-
Santenberg, "Landwald" (5)	9	1		10	(1)	-	-
Santenberg, "Stämpfel" (5)	136	12	12	160	(24)	-	-
Santenberg, "Steingrueben" (5)	145	2	3	150	(5)	-	-
Santenberg, "Wasserloch" (5)	158	5	5	168	(5)	-	-
Total 1989	2107	235	222	2564	(515)	8	0,31

Tableau 24-1: Résultats des analyses virologiques (virus CEE, test IF/C) des tiques capturées au drapeau en 1988 et 1989.

indiv: Tiques analysées individuellement.

Nb écht pos.: Nombre d'échantillons positifs.

Année Canton /Lieu (mois) de capture	Nb tiques analysées				(Dont individ.)	Nb écht pos.	%
	Nymphes	Femelles	Mâles	Total			
1990							
BE Lyss, clairière (5)		2	2	4	(4)	-	-
Lyss, chemin vers clairière (5)	12	14	12	38		-	-
Lyss, forêt bords piscine (5)	40	3	4	47	(7)	-	-
Lyss, "Alte Aare" (5)	288	34	30	352	(1)	-	-
Lyss, "Hinterholz" (5)	205	37	25	267		-	-
Belpberg, "Belpbergwald" (5)			3	3	(3)	-	-
Belpberg, "Breiten-Hohburg" (5)	78	1		79	(1)	-	-
Belpberg, "Hargarten-Tufteren" (5)	22	35	38	95	(32)	1	1,11
Münsingen, "Au" (5)	11	1	2	14	(1)	-	-
FR Villars-s/Glâne, "Bois de Châtillon" (5)		19	17	36	(1)	-	-
Chésopeilloz, "Verdilloud" (5, 6)	298	49	39	386		-	-
NE Neuchâtel, chat domestique (5)		1		1	(1)	-	-
La Coude (5)	690			690		-	-
Total 1990	1644	196	172	2012	(51)	1	0,05
1991							
BE Lyss, "Hinterholz" (4, 9, 10)	55	26	29	110	(3)	-	-
Lyss, "Alte Aare" (4, 9)	82	67	70	219	(20)	-	-
Lyss, "Enteninsel", nord route E27 (10)	1	3	2	6	(1)	-	-
Lyss, "Enteninsel", sud E27 (4, 9, 10)	25	41	51	117		-	-
VD Bière, La Cerniat (4)	14	6	5	25	(1)	-	-
Bussigny, la Venoge (5)	21	18	19	58		-	-
Eclépens, Canal d'Entreroches (5, 9)	320	108	131	559		-	-
Eclépens, "Sur Chaux" (9)		5	3	8		-	-
Les Planches, Gorge du Chauderon (4)	5	23	19	47	(1)	-	-
Veytaux, "Raveyre" (4)	111	13	16	140	(1)	-	-
NE Neuchâtel, "Bois de l'Hôpital" (5)	332	21	22	375		-	-
Total 1991	966	331	367	1664	(27)	-	-
1993							
BL Liestal, stand de tir (5)	40*	4*		44*	(44*)	-	-
BE Belpberg, "Hargarten" (5)	3*	6*	6*	15*	(15*)	-	-
Total 1993	43*	10*	6*	59*	(59*)	-	-
Total 1988-1993	4896	833	810	6539	(662)	9	0,14

Tableau 24-2: Résultats des analyses virologiques (virus CEE, test IF/C) des tiques capturées au drapeau entre 1990 et 1993.

*: Les tiques capturées en 1993 ont été analysées par IF/S.

indiv: Tiques analysées individuellement.

Nb écht pos.: Nombre d'échantillons positifs.

Au total, 9 souches de virus ont pu être isolées à partir de "pools" de tiques. Deux forêts du bas-Simmental ont fourni chacune 3 isolats; deux échantillons positifs proviennent d'un vallon du Santenberg et la dernière souche de l'entrée de la forêt du Belp. Aucun isolat de virus n'a été obtenu à partir des tiques analysées individuellement.

Deux isolats proviennent de nymphes, 4 de femelles et 3 de mâles. Le détail en est présenté dans le Tableau 25.

No de l'isolat	Pool	Date de capture	Lieu de capture
Z 40/1-1	10 M	04.05.89	Simmental, "Torwald"
Z 40/1-2	5 M	"	"
Z 40/1-3	10 F	"	"
Z 42/1-1	10 M	04.05.89	Simmental, "Allmendenwald"
Z 42/1-3	10 F	"	"
Z 42/1-6	10 F	"	"
Z 47/1-4	55 N	23.05.89	Santenberg, "Buechwald"
Z 47/1-5	52 N	"	"
Z 61/1	10 F	03.05.90	Belp, "Hargarten"

Tableau 25: Isolats de virus CEE obtenus à partir de tiques capturées au drapeau (test IF/C et inoculation intracérébrale à des souriceaux).

N: Nymphes

M: Mâles

F: Femelles.

Le comportement de toutes les souches en IF/C (intensité de la réaction), en titration sur cultures de cellules (taille des plages) et sur souriceaux (délai d'apparition et type des symptômes) correspondent aux caractéristiques du virus CEE.

Le milieu de congélation est resté négatif dans toutes les expériences. L'hypothèse d'une contamination entre tiques d'un même lot peut donc être exclue. Par conséquent, on peut affirmer que chacun des 9 isolats est original et correspond à au moins 1 tique infectée.

Nous avons déterminé pour les échantillons Z 47/1-4 et Z 47/1-5 (resp. 55 et 52 nymphes) des titres viraux de 12×10^2 et 5×10^2 PFU/ml, après recongélation de l'inoculum; par rapport aux valeurs relevées par Kozuch *et al* ($12-24$ PFU/ml/nymphes) [155] et par Labuda *et al* ($\leq 2,0 \log_{10}$ PFU/nymphes) [170], ces valeurs laissent supposer que plusieurs tiques étaient infectieuses dans un même "pool".

Par conséquent, il ne nous est pas possible de déterminer avec précision le pourcentage de tiques infectées dans un foyer. Nous indiquerons donc, dans

la suite de ce chapitre, des taux minimum d'infection des tiques par le virus CEE, en considérant arbitrairement qu'une seule tique par "pool" positif était porteuse du virus.

A la lecture du Tableau 25, on constate que tous les isolements de virus CEE ont été effectués, pour chaque site de capture, à partir de tiques du même stade évolutif. Cette observation nous a amenés à considérer les prévalences minimales respectives des nymphes et des adultes (mâles et/ou femelles), dans chaque foyer et pour chaque série de captures. Les résultats en sont résumés dans le Tableau 26. Les lots Z 60 et Z 61, prélevés sur deux jours consécutifs, y ont été regroupés, tandis que le lot BE 93, prélevé trois ans après les lots Z 60 et Z 61 sur le même site, a été distingué.

No de lot	Lieu de capture	Nb tiques positives / Nb tiques testées (%)			
		Nymphes	Femelles	Mâles	Adultes
Z 40	Simmental, "Torwald"	0/85 (0)	1/10 (10,0)	2/26 (7,7)	3/36 (8,3)
Z 42	Simmental, "Allmendenwald"	0/137 (0)	2/40 (5,0)	1/20 (5,0)	3/60 (5,0)
Z 47	Santenberg, "Buechwald"	2/323 (0,6)	0/5 (0)	0/9 (0)	0/14 (0)
Z 60 + Z 61	Belp, "Hergarten-Tufteren"	0/22 (0)	1/35 (2,9)	0/38 (0)	1/73 (1,4)
BE 93	"	0/3 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/15 (0)

Tableau 26: Pourcentage de tiques de chaque stade infectées par le virus CEE, dans 4 foyers (test IF/C, sauf BE 93: analyse par IF/S).

Les prévalences indiquées sont calculées en considérant qu'une seule tique par "pool" positif est porteuse du virus CEE.

IX.2. DESCRIPTION ET ANALYSE DES FOYERS

IX.2.1. SIMMENTAL/BE

Entre 1984 et 1992, 10 cas cliniques d'encéphalite à tiques ont été recensés dans le bas-Simmental (Figure 34-1). Tous proviennent du versant nord de la vallée, entre Därstetten et Stalden (Figures 34-1 et 34-3).

Les tiques y sont nombreuses: 1148 tiques y ont été capturées en mai en 1h30 min, soit un "rendement de capture" de 100 tiques/heure. Bien sûr, ce chiffre, basé sur quelques jours de capture et deux stades évolutifs seulement (nymphe et adultes), n'a aucune valeur statistique; toutefois, il donne une idée de la concentration de tiques que l'on peut trouver à cet endroit.

Au total, 1084 tiques ont été analysées, dont 830 en 40 "pools" de 4-73 tiques, et 254 individuellement. Six "pools" se sont révélés porteurs du virus CEE, ce qui représente un taux d'infection minimum de 0,55% (6/1084). Rappelons que ce pourcentage est peut-être sous-estimé si l'on considère, comme nous l'avons vu plus haut, que plusieurs tiques étaient probablement infectées dans chaque "pool" positif.

Les zones de capture de tiques et d'isolements viraux sont représentées sur la Figure 34-2.

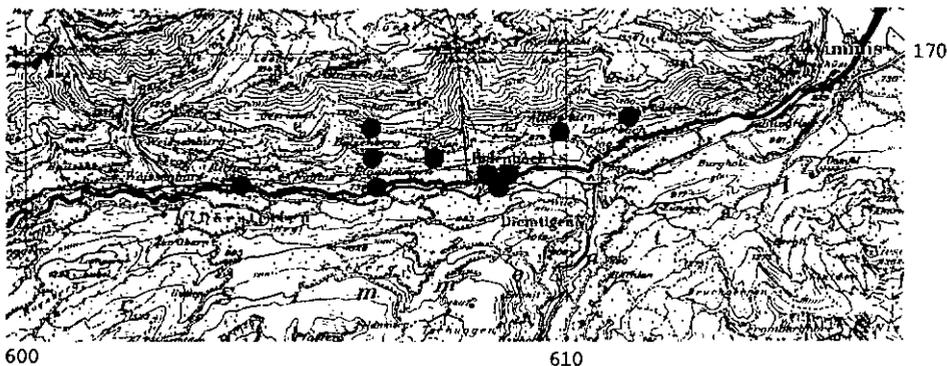


Figure 34-1: Les foyers du bas-Simmental. Quadrillage décakilométrique.

● : Origine des cas cliniques d'encéphalite à tiques.

(Reproduit avec l'autorisation de l'Office fédéral de topographie du 11.8.1994)

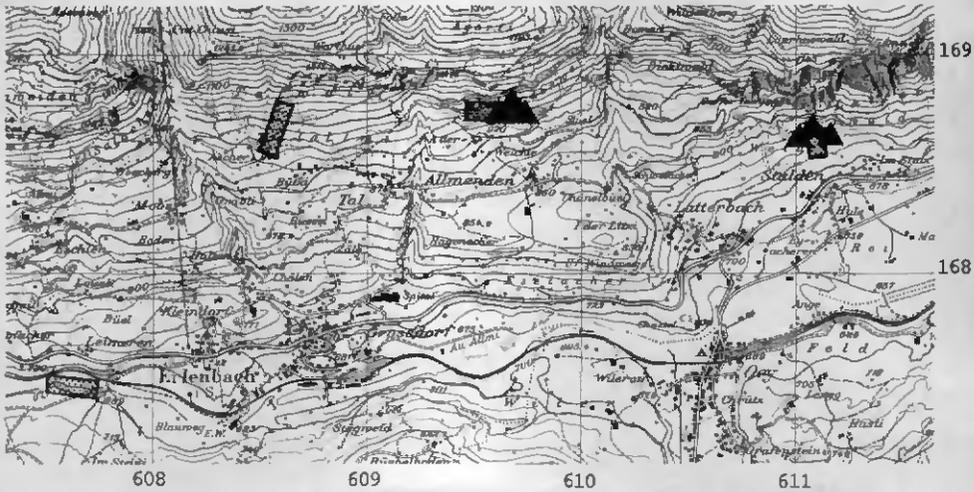


Figure 34-2: Les foyers du bas-Simmental. Quadrillage kilométrique.

- ▭ : Lieux de capture des tiques. Les zones de capture "Balzenberg" et "Ringoldingen", situés plus à l'ouest, ne sont pas représentées.
 ▲ : Origine des isolats de virus CEE.

(Reproduit avec l'autorisation de l'Office fédéral de topographie du 11.8.1994)



Figure 34-3: Les foyers du bas-Simmental. Photo mai 1993.

"Torwald" (coord. 611.1/168.6. Alt. 740-760 m.)

Il s'agit de la lisière ouest d'une langue de forêt s'avancant dans un pâturage (Figure 35). Le terrain, en forte pente, est exposé au sud; il est entouré sur trois côtés par le pâturage et limité au nord par un chemin carrossable. Une seule journée de capture y a été consacrée, en mai (lot Z 40), pour un rendement de 97 tiques/heure (même remarque que ci-dessus).

Au total, 121 *I. ricinus* ont été examinés, soit 110 en 7 "pools" de 5-30 spécimens, et 11 individuellement. Trois "pools" ont été trouvés infectés par le virus CEE (soit un taux d'infection minimum de 2,5% - même remarque que précédemment). A notre connaissance, une seule personne (un agriculteur de 50 ans) a contracté une encéphalite à tiques après avoir été piquée dans ce foyer, en 1988 (Figure 34-1).



Figure 35: Le foyer du "Torwald". Photo mai 1993.

"Allmendenwald" (coord. 609.7/168.75. Alt. 950-970 m.)

Il s'agit du foyer connu d'encéphalite à tiques le plus élevé de Suisse. Les tiques capturées proviennent du bord supérieur (nord) d'un chemin forestier carrossable longeant le flanc exposé au sud de la vallée (Figure 36). La zone de capture mesure environ 100 m. de long. Un seul prélèvement a été effectué à cet endroit (lot Z 42), avec un rendement de 88 tiques/heure en mai.

L'analyse virologique de 197 tiques (11 "pools" de 10-30 individus, aucune analyse individuelle) y a fait apparaître un taux d'infection minimum de 1,5% (3/197).

Géographiquement, le cas d'encéphalite à tiques le plus proche concerne un ouvrier en bâtiment de 34 ans domicilié à Allmenden, tombé malade en 1988 et ne se souvenant pas avec précision du lieu de piqûre (Figure 34-1).



Figure 36: Le foyer de l'"Allmendenwald". Photo mai 1993.

IX.2.2. BELPBERG/BE

Quatre cas cliniques d'encéphalite à tiques ont été recensés, entre 1984 et 1992, dans la région du Belpberg (Figure 37-2).

Les tiques y sont relativement peu nombreuses (62 tiques/heure en mai); leur taux d'infection par le virus CEE s'élève au minimum à 0,56% pour l'ensemble des captures (1 "pool" positif sur 177 *I. ricinus* analysés, dont 141 en 11 "pools" de 3-26 tiques, et 36 individuellement).

"Hargarten" (coord. 605.1/191.25-75. Alt. 510 m.)

Les tiques ont été capturées le long de deux chemins se rejoignant en V, sur le côté ouest de la colline boisée (Figure 37-2). L'un de ces chemins longe la

lisière de la forêt; l'autre, plus ombragé et plus court, conduit à un quartier de villas et à une piste VITA. Les tiques y ont été récoltées en 3 lots provenant de 3 séances de capture: Z 60, Z 61 (tous deux de 1990) et BE 93 (1993).

110 *I. ricinus* ont été analysés, dont 47 en 7 "pools" de 5-14 tiques, et 63 individuellement. Un seul "pool" a été trouvé infecté par le virus (issu des tiques capturées en 1990), soit un minimum de 0,9% d'acariciens positifs. Le rendement le long de ces deux chemins s'élève à moins de 40 tiques par heure en mai.

Il est à noter que, sur l'ensemble des récoltes effectuées dans ce foyer, tous les adultes (dont est issue la souche de virus isolée) proviennent des 100 premiers mètres de la zone considérée, essentiellement sur les bords du petit chemin, dans un massif d'ail sauvage (*Allium ursinum*) (Figure 37-1). Sur le plan médical, la présence d'un foyer dans cette région a été révélée par 2 cas cliniques d'encéphalite à tiques survenus en 1986. Le premier concerne une femme de 37 ans piquée "dans la forêt de Belp". Le second concerne une habitante du lieudit "Farhubel" (coord. 607/193,4), âgée de 44 ans, ne se rappelant pas le lieu de piqûre (Figure 37-2).

Deux cas supplémentaires sont apparus dans une localité proche, à Münsingen (coord. 608,5/191,5), en 1988 et 1992. Seul l'un des patients a pu désigner formellement le lieu de piqûre; l'autre avait seulement son domicile à Münsingen (Figure 37-2).



Figure 37-1: Le foyer du "Belpberg". Photo mai 1993.

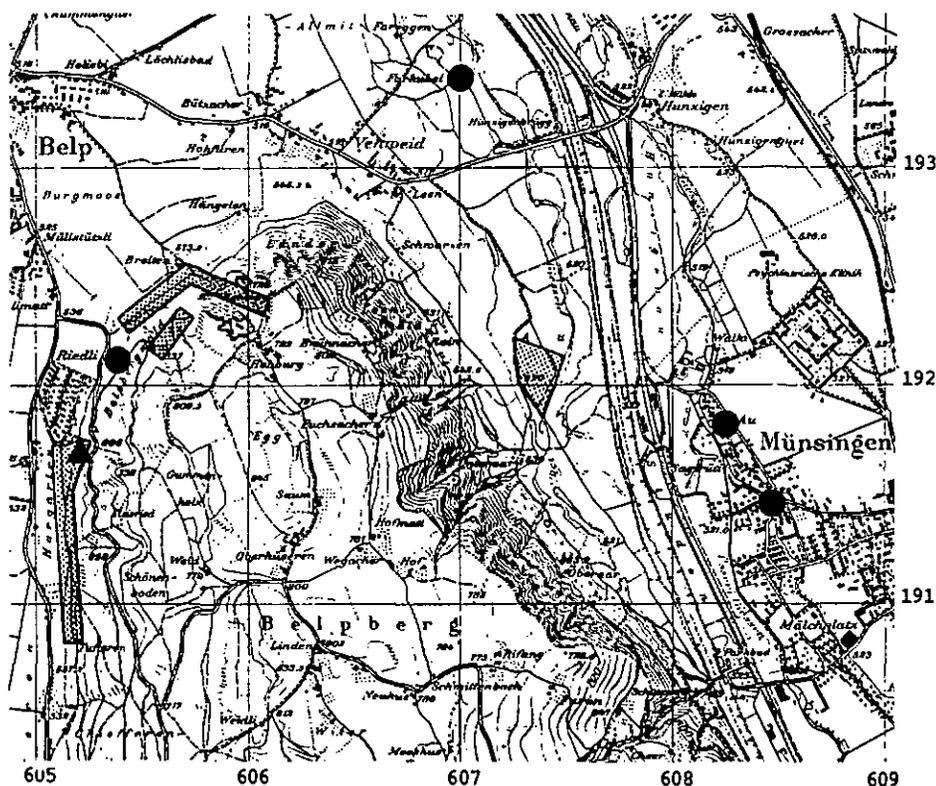


Figure 37-2: Le foyer du "Belpberg". Quadrillage kilométrique.

- : Origine des cas cliniques d'encéphalite à tiques.
- ▨ : Lieux de capture des tiques.
- ▲ : Origine de l'isolat de virus CEE.

(Reproduit avec l'autorisation de l'Office fédéral de topographie du 11.8.1994)

IX.2.3. SANTENBERG/LU

Huit cas cliniques d'encéphalite à tiques ont été recensés, dans la région du Santenberg, entre 1984 et 1992 (Figure 38-2).

La colline abrite une importante population de tiques: 1489 tiques y ont été dénombrées en 3 jours de capture, pour un rendement de plus de 112 tiques/heure en mai; leur taux d'infection s'élève à 0,16% au minimum (2 "pools" positifs pour 1283 tiques analysées, dont 1019 en 30 "pools" de 2-81 acariens, et 264 individuellement).

"Buechwald" (coord. 641.25/228.6. Alt 520-540 m.)

Les deux isolats (Z 47) provenant de ce foyer sont issus de tiques capturées le long d'un sentier forestier d'environ 250 m, bordé de hautes herbes (Figure 38-1). Les tiques (essentiellement des nymphes, d'où proviennent d'ailleurs les isolats) y étaient particulièrement nombreuses: 346 individus y ont été capturés en 2 heures, soit une moyenne de 173 tiques/heure; 0,6% d'entre elles au minimum ont été trouvées infectées par le virus CEE (2 "pools" positifs sur 337 *I. ricinus* analysés, dont 336 en 8 "pools" de 2-81 tiques, et 1 individuellement) .



Figure 38-1: Le foyer du "Santenberg". Photo mai 1993.

Entre 1984 et 1992, 8 cas cliniques d'encéphalite à tiques ont été déclarés sur ou au pied de cette colline (Figure 38-2). Aucune portion de la forêt n'est désignée en particulier comme lieu de piqûre; tous les patients ont leur domicile à proximité immédiate de la colline.

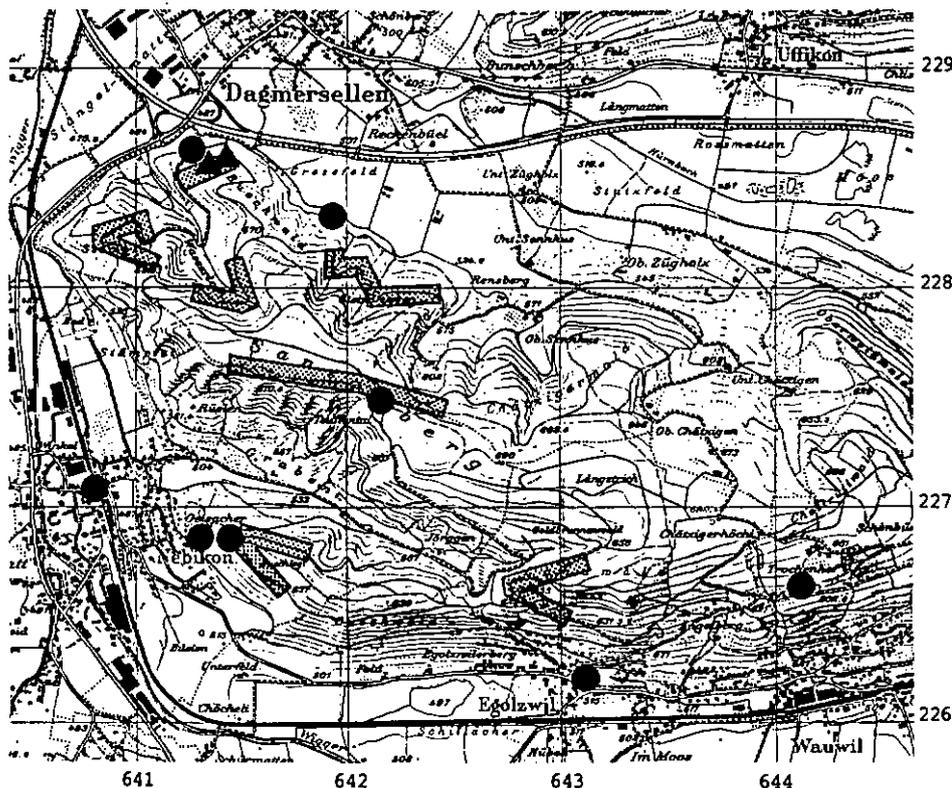


Figure 38-2: Le foyer du "Santenberg". Quadrillage kilométrique.

- : Origine des cas cliniques d'encéphalite à tiques.
- : Lieux de capture des tiques.
- ▲ : Origine des isolats de virus CEE.

(Reproduit avec l'autorisation de l'Office fédéral de topographie du 11.8.1994)

IX.3. DISCUSSION

Le pourcentage moyen de tiques infectées (0,14% pour l'ensemble des captures, 0,3% dans les foyers), ainsi que les variations relevées (0-2,48%), correspondent aux observations effectuées par d'autres auteurs en Europe centrale et occidentale [99, 126, 133, 238, 313, 315]. Dans son étude menée entre 1978 et 1981 dans les cantons de ZH, SH, AG, TG, ZG, BE, FR, NE, VS et TI, Matile [197] relève une prévalence globale de 0,17% (0-0,84%).

On constate que, dans chaque région investiguée, les isolats ont été obtenus à partir de tiques de même stade et provenant du même lieu de capture. Cette distribution particulière des tiques infectées suggère que les foyers ne sont pas homogènes, autrement dit que les tiques porteuses du virus CEE ne sont pas régulièrement réparties dans la végétation. Rappelons que les trois stades d'*I. ricinus* se nourrissent sur des hôtes distincts (triphase) et ont des préférences trophiques différentes, quoique larges (télotropisme). Par conséquent, on peut envisager que les tiques positives se soient détachées à peu près au même moment d'un hôte virémique de passage, ou que celui-ci ait fréquenté à plusieurs reprises cet endroit; les tiques infectées se seront ainsi accumulées sur une faible surface. Comme elles se déplacent peu horizontalement [90], elles constitueront, au sein d'un "foyer élémentaire" [168], un microfoyer d'où, grâce à leur prévalence élevée, plus favorable à l'infection d'un nouvel hôte de passage, elles pourront assurer une meilleure transmission du virus.

Larves, nymphes et adultes d'*I. ricinus* se nourrissant sur des hôtes différents, il convient également de distinguer la prévalence respective des trois stades évolutifs. Comme en témoignent les résultats de nos captures, résumés dans le Tableau 26, le pourcentage de tiques infectées de chaque stade, dans un lieu et à un moment donnés, peut atteindre des valeurs élevées. Ces valeurs se rapprochent de celles qui ont été observées par Perez-Eid *et al* [238] dans quatre sites d'un foyer naturel d'Alsace (0,4-8,7% d'adultes positifs au minimum, selon le site et le mois de capture).

Le risque, pour un hôte de passage, de se voir transmettre le virus s'en trouve considérablement augmenté. Par contre, un autre animal passant à quelques mètres de ce microfoyer sera épargné.

Cette organisation en zones d'endémie constituées de foyers plus petits (ci-après "microfoyers") a été proposée en 1972 déjà par Blaskovic et Nosek [38]; la distribution "par agrégats" des tiques infectées par le virus CEE a été observée par Pretzmann *et al* [249], de même que par Telford *et al* [306] pour le couple *I. scapularis* / *B. burgdorferi*.

Selon toute apparence, les foyers du Simmental et du Santenberg fonctionnent selon le même principe. Le nombre élevé de cas cliniques qui ont été enregistrés entre 1984 et 1992, ainsi que le nombre de souches isolées, suggèrent que les zones d'infection dans ces foyers sont nombreuses et disséminées, car il est peu probable que les patients se soient fait piquer au même endroit; d'autre part, et cela contrairement aux observations d'autres auteurs dans des foyers importants d'Europe centrale [99], il n'apparaît pas, dans les quatre foyers décelés, de proportionnalité entre le taux d'infection des tiques et le nombre de cas cliniques déclarés.

Du point de vue de la santé publique, l'importance d'un foyer semble donc davantage liée à l'abondance de la faune ixodidienne et à la distribution spatiale des foyers élémentaires - notamment en des sites favorables à la rencontre tiques-homme - qu'au pourcentage global de tiques infectieuses. De nombreuses captures supplémentaires, selon un quadrillage précis de quelques mètres carrés par exemple, seraient nécessaires afin de confirmer statistiquement cette affirmation. Cependant, il faut garder à l'esprit que le risque d'infection dépend finalement de l'homme lui-même, de par le type et la fréquence de ses contacts avec la forêt (sortie des chemins dégagés, activités forestières régulières, etc.). Ainsi, une portion de forêt très peu fréquentée pourra abriter un foyer de virus CEE stable, mais discret jusqu'à l'irruption de l'homme dans le cycle naturel de transmission du virus.

La plupart des zones de captures n'ont été investiguées qu'à une occasion, sur 2 ou 3 jours consécutifs. L'analyse des seules tiques ne nous permet donc pas d'évaluer la stabilité des foyers. Cependant, l'apparition répétée, sur plusieurs années, de cas d'encéphalite à tiques au Santenberg, au Belpberg et dans le Simmental permet d'affirmer que ces zones d'endémie sont stables et - en ce qui concerne le Santenberg et le Simmental en tout cas - étendues. Au sein de ces zones toutefois, il est vraisemblable que les sites d'infection (microfoyers) se déplacent au gré des comportements et des déplacements des hôtes.

Par contre, la faible prévalence globale de tiques virulentes rend délicate l'interprétation des résultats négatifs. L'absence de tout isolement dans la forêt de Lyss, et cela malgré des captures répétées et plusieurs cas cliniques recensés (cf VI.3., Figure 10), suggère que ce foyer - si foyer il y a - est relativement restreint, voire qu'il se situe dans une autre forêt. De même, on ne peut exclure que des foyers peu étendus ou peu actifs, notamment dans l'ouest de la Suisse, aient échappé à nos investigations.

X. DISCUSSION GENERALE

XI. RECHERCHE D'UNE METHODE DE DETECTION DU VIRUS CEE DANS LA TIQUE ET ETABLISSEMENT D'UN CENTRE DE DIAGNOSTIC-CONSEIL POUR L'ENCEPHALITE A TIQUES A L'INSTITUT DE ZOOLOGIE DE NEUCHATEL

Nous avons pour double objectif:

- d'établir un protocole de détection du virus CEE dans la tique, qui n'implique pas le recours à l'expérimentation animale,
- de transférer cette technologie à l'Institut de Zoologie de Neuchâtel, cela afin d'élargir les compétences de son centre de diagnostic.

Des trois méthodes que nous avons comparées à l'isolement sur souriceaux nouveaux-nés, l'ELISA n'a pas été retenu en raison de sa faible sensibilité et de l'existence de réactions non spécifiques. La PCR a révélé un pouvoir de détection élevé avec des suspensions pures de virus, mais s'est avérée peu performante pour la mise en évidence de faibles quantités de virus contenues dans les tiques (*I. ricinus*), cela en raison de facteurs d'inhibition ou d'interférence présents dans les tissus de l'arthropode. Cette méthode nous est cependant apparue comme étant la seule susceptible de mettre en évidence des particules virales dans des échantillons individuels ne se prêtant pas à la mise en culture ou à la préparation de "squashes" (petits fragments, matériel desséché, etc.)

L'immunofluorescence sur cultures de cellules (IF/C) a produit les résultats les plus satisfaisants, tant sur le plan de la sensibilité que de la fiabilité. Son inconvénient majeur réside dans la phase d'amplification virale, qui nécessite une infrastructure satisfaisant aux exigences minimales de sécurité concernant la manipulation de virus pathogènes.

Une variante de l'IF/C, l'immunofluorescence sur "squashes" (IF/S) a montré une sensibilité satisfaisante avec des échantillons de contrôle fraîchement préparés (*I. ricinus* capturés dans un foyer de Louping Ill, empreintes de cerveaux de souriceaux morts d'encéphalite [virus CEE, souche Hypr]); par contre, les résultats obtenus avec les tiques recueillies sur les militaires sont plus incertains, peut-être en raison du délai important (plusieurs mois) ayant séparé le "squash" du test proprement dit.

Chacune des méthodes mentionnées ci-dessus doit donc être appliquée dans un contexte particulier: si l'IF/C permet la mise en évidence et l'isolement de souches virales à partir de quantités importantes de tiques (pools), l'IF/S se prête mieux à l'analyse individuelle et à la quantification des acariens infectés dans un foyer connu d'encéphalite à tiques. Enfin, la PCR peut constituer un recours lorsque l'état des échantillons à analyser ne permet pas l'utilisation des autres méthodes.

Des études ponctuelles telles que la nôtre, celle de Matile [197] ou celle de Krech [163], fussent-elles complètes, n'apportent qu'une vision fragmentaire de la situation épidémiologique d'un agent pathogène tel que le virus CEE. Nous sommes d'avis qu'une poursuite de telles recherches, à une plus petite échelle mais sur une plus longue durée, fournirait des indications non négligeables sur la répartition des foyers, leur évolution, les taux de transmission du virus du vecteur à l'hôte, son éventuelle périodicité. Par exemple, l'analyse des tiques trouvées en train de piquer l'homme apporterait un complément bienvenu aux informations recueillies via les analyses sérologiques et les déclarations des médecins.

La méthode d'immunofluorescence sur "squashes" est aisément applicable dans n'importe quel laboratoire et permettrait, à peu de frais, de répondre à cette attente.

X.2. MISE EN EVIDENCE DE NOUVEAUX FOYERS NATURELS D'ENCEPHALITE A TIQUES

Les buts définis au début de ce travail étaient ambitieux: du fait de la faible prévalence du virus CEE dans les populations de tiques, une recherche exhaustive des foyers naturels aurait nécessité l'analyse de centaines de milliers d'acariens; encore des foyers très petits ou instables auraient-ils pu passer inaperçus. Nous avons donc recouru à des "indicateurs" de ces foyers, en l'occurrence les patients ayant contracté une forme clinique, diagnostiquée, d'encéphalite à tiques, et les personnes ayant de fréquents contacts avec la forêt. A titre complémentaire, nous avons également analysé d'autres types de populations.

Ni l'analyse géographique et chronologique des cas déclarés de maladie, ni l'examen sérologique des populations humaines n'ont permis de mettre en évidence une éventuelle progression du virus CEE dans l'ouest de la Suisse.

Au sud des Alpes par contre, une forte proportion de patients tessinois pris au hasard a présenté des anticorps spécifiques du virus CEE, valeur

comparable aux séroprévalences enregistrées parmi les forestiers des cantons abritant des foyers d'encéphalite à tiques (BE, GR). Sur le plan clinique, un seul cas de maladie a été déclaré au Tessin, en 1984, le lieu de piqûre étant du reste imprécis ("place de camping en forêt", sans indication de la localité); encore le patient était-il domicilié à Zollikon/ZH, dans un des cantons où les foyers d'encéphalite à tiques sont les plus abondants. La seule autre mention du Tessin parmi les déclarations centralisées par l'OFSP concerne un habitant de Turgi/AG, qui indique en 1989 avoir été piqué à proximité de son domicile ou, peut-être, au Tessin.

Sur le plan géographique et épidémiologique, le Tessin est coupé du reste de la Suisse par la chaîne continue des Alpes; le passage de tiques infectieuses en provenance de Suisse alémanique ou des Grisons y est improbable, sauf en cas de transport par des oiseaux migrateurs. Quant à l'Italie, les mentions les plus proches de maladie ou de sérologies positives concernent la région de Florence et la province de Trento [313].

Néanmoins, Miserez [203] a démontré que les tiques de l'espèce *I. ricinus* sont bien présentes au Tessin et, qui plus est, fortement infectées par *B. burgdorferi*. Cette population ixodienne, de même que l'existence d'une faune de micromammifères amplificateurs du virus (*C. glareolus*, *A. sylvaticus*, *A. flavicollis*, *S. araneus*, etc.) rendent possible l'implantation du virus CEE dans ce canton. Il est toutefois surprenant qu'une telle proportion de personnes positives parmi les patients d'un hôpital ne trouve pas de confirmation clinique. Peut-être sommes-nous là en présence d'une forme à pathogénicité réduite du virus, quoique les données épidémiologiques provenant des autres régions du pays, du Tyrol et de l'Italie nous permettent de douter de l'existence en Suisse de tels mutants atténués. Peut-être, aussi, ces patients ont-ils été vaccinés ou infectés dans d'autres cantons. Il serait par conséquent utile d'approfondir les investigations virologiques, sérologiques et épidémiologiques dans le canton du Tessin, en ayant recours notamment à des questionnaires conçus en ce sens.

En ce qui concerne l'analyse des tiques, trois foyers ou groupes de foyers, suspectés par le regroupement des cas cliniques de maladie, ont été confirmés virologiquement: le bas-Simmental (2 sites), Belp et le Santenberg. Un foyer éventuel de virus a également été relevé à Liestal, bien que la présence d'une zone d'endémie en périphérie de cette localité demande à être confirmée. Ici encore, l'origine des tiques trouvées porteuses de virus ne permet pas de mettre en évidence une quelconque progression des foyers.

L'activité des foyers est relativement constante et dénote une bonne implantation du virus en Suisse. Les variations de la fréquence des cas cliniques, au sein d'un même foyer, sont conformes à la situation observée dans le reste de l'Europe, où l'on a vu des foyers disparaître totalement sur le plan clinique, mais persister, même faiblement, sur le plan de la

circulation du virus [138]. L'apparition de cas isolés d'encéphalite à tiques en-dehors des foyers de maladie peut être la conséquence d'une extension occasionnelle du virus, par exemple lors du transport par un oiseau de tiques infectées [7]. Mais elle peut également être due, plus simplement, à une mauvaise estimation du lieu de la piqûre infectieuse. L'enquête entreprise parmi les militaires a clairement mis en évidence que les tiques en train de se gorger peuvent être remarquées très tardivement, après plusieurs jours. Les patients, voire les médecins, n'étant pas toujours à même de juger du temps de fixation de l'acarien, l'estimation du lieu d'infection peut s'en trouver faussée. De plus, nous avons pu constater qu'un interrogatoire "orienté" des patients, notamment en leur soumettant un choix de lieux de piqûre, contribue à préciser le site d'infection. Une patiente avait par exemple passé, environ trois semaines avant l'apparition de la seconde phase de la maladie, une demi-journée dans un foyer d'encéphalite à tiques; ignorant la présence du virus à cet endroit, elle n'avait pas jugé utile de le mentionner à son médecin.

Il faut conclure des données recueillies au cours de ce travail que, comme dans le reste de l'Europe [105, 315] les foyers suisses d'encéphalite à tiques sont stables, tant sur le plan de la taille que sur celui de la localisation. L'apparente émergence de nouveaux foyers en-dehors des sites reconnus par Wyler et Matile [329] est à notre avis la conséquence d'une meilleure attention portée à ce problème plutôt que d'une réelle progression géographique du virus.

La répartition géographique des foyers naturels d'encéphalite à tiques en Suisse, en l'état actuel de nos connaissances, est présentée sur la Figure 39.

X.3. ESTIMATION DU RISQUE COMPARE D'ENTRER EN CONTACT AVEC *B. BURGDORFERI* OU LE VIRUS CEE: CONSIDERATIONS SUR LE FONCTIONNEMENT DES FOYERS

La circulation de *B. burgdorferi* et celle du virus CEE dans la nature, si elles suivent des schémas comparables, obéissent néanmoins à des contraintes particulières:

Chez le rongeur infecté par *B. burgdorferi*, la spirochétémie - soit la période durant laquelle la bactérie est accessible au vecteur - dure toute la vie [131, 289]. L'animal est donc capable d'infecter un grand nombre de tiques. De fait, 3-55% des *I. ricinus* du Plateau, du Valais et du Tessin sont porteurs du spirochète [10, 203, 240, 336]. Conséquence de cette circulation

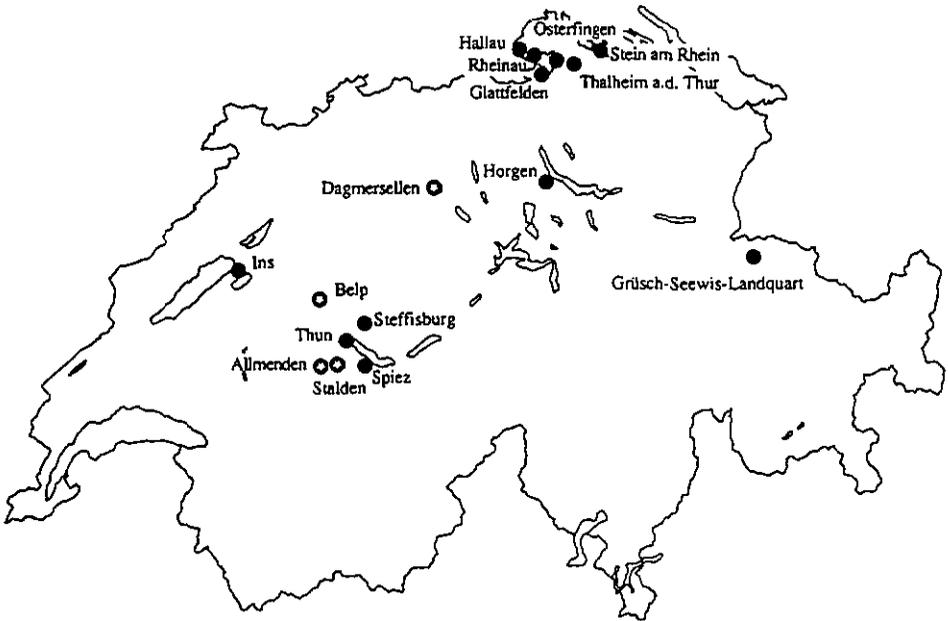


Figure 39: Répartition géographique des foyers naturels d'encéphalite à tiques. Etat décembre 1992.

- : Foyers naturels selon Wyler et Matile [329].
- ⊙ : Foyers naturels déterminés lors de la présente étude.

aisée du spirochète et de l'abondance des réservoirs naturels, les tiques infectieuses sont réparties régulièrement sur l'ensemble du Plateau [204]. On peut donc considérer que le risque de se faire piquer par une tique porteuse de spirochètes, au hasard d'une promenade en forêt, est élevé et relativement constant d'une région à l'autre.

Au contraire de *B. burgdorferi*, le virus CEE induit chez ses hôtes naturels une virémie courte, de quelques jours [73, 119]; l'animal ne pourra

transmettre le virus qu'aux acariens fixés durant cette période. Conséquence de cette particularité, les tiques infectées par le virus CEE sont peu nombreuses (moins de 1% en moyenne dans les zones d'endémie). Notre étude et celles d'autres auteurs [38, 249] ont, en outre, montré qu'au sein de ces foyers, la proportion de tiques virulentes varie considérablement. Le risque de contracter une encéphalite à tiques dépendra donc de la probabilité d'entrer en contact avec un microfoyer infectieux. A cet égard, on peut relever à nouveau que les tiques trouvées positives au Belpberg provenaient d'un massif d'ail sauvage, plante appréciée en salade pour ses vertus médicinales et gustatives.

Au sujet de l'apparente fragilité du cycle épidémiologique du virus CEE, il convient ici de mentionner les travaux remarquables de Labuda *et al* [170] sur la transmission "non virémique" du virus CEE: ces auteurs ont en effet démontré le passage du virus entre des tiques (*I. ricinus*) infectées expérimentalement par le virus CEE et des tiques saines se nourrissant sur le même rongeur (en l'occurrence un cobaye), cela sans que l'animal-hôte ne développe une virémie décelable. Ce mode particulier de transmission contribuerait à notre avis à renforcer la distribution par agrégats des tiques infectées, de même qu'à assurer le maintien du virus lorsque les hôtes virémiques se font rares.

En ce qui concerne les populations humaines, les sérologies établies durant cette étude révèlent une forte prévalence des cas - le plus souvent asymptomatiques - d'infection par le spirochète. Des anticorps spécifiques de *B. burgdorferi* sont apparus, à des degrés variables, dans tous les groupes étudiés. A l'exception des forestiers du canton du Jura, les séroprévalences relevées dans l'ensemble de la zone investiguée sont comparables pour chaque type de population, dénotant une répartition homogène des cas d'infection.

Au contraire, les analyses entreprises pour la recherche d'anticorps dirigés contre le virus CEE ont fait apparaître un très faible pourcentage d'individus séropositifs. L'examen des déclarations de patients atteints d'encéphalite à tiques a mis en évidence un regroupement des cas selon certaines zones bien délimitées. Le fait que les taux d'incidence enregistrés dans les cantons ne soient dépendants ni de la densité de la population humaine, ni de celle des forêts, renforce l'idée selon laquelle le risque d'entrer en contact avec le virus CEE dépend du hasard de pénétrer dans un microfoyer infectieux.

Il apparaît donc que la situation observée chez l'homme peut être rapprochée des particularités du cycle épidémiologique du virus et du spirochète dans la nature.

En ce qui concerne *B. burgdorferi*, le risque d'infection par les agents pathogènes s'est avéré d'autant plus élevé que les contacts avec la forêt (à

long terme surtout) sont importants. Nous avons vu du reste que le nombre de piqûres subies - et donc le risque d'infection par les deux agents pathogènes - dépendait de la durée de fréquentation régulière de la forêt (années) plus que de son intensité (heures/semaine), ce en quoi nous rejoignons les observations d'autres auteurs [333]. Autrement dit, une exposition prolongée est nécessaire à l'infection de l'homme. Le taux élevé d'échecs dans la transmission à l'homme sinon du virus CEE, du moins de *B. burgdorferi*, tel que nous l'avons observé chez les militaires lors de la piqûre d'une tique infectée, explique à notre avis cette particularité. Par ailleurs, le titre d'anticorps anti-*B. burgdorferi* présents dans le sang des forestiers tend à croître avec les années d'exposition en forêt. Ce phénomène pourrait contribuer à prévenir d'éventuelles réinfections. Toutefois, l'effet protecteur d'une telle stimulation du système immunitaire n'est pas unanimement reconnu [109, 232, 233, 321].

La fréquentation assidue de la forêt n'est cependant pas le seul facteur de risque. En effet, la surreprésentation des hommes par rapport aux femmes montrant des signes d'infection par le virus ou par *B. burgdorferi* laisse à penser que les attitudes personnelles (propension ou réticence à quitter les sentiers balisés) peuvent jouer un certain rôle. Ainsi, les populations manifestant en forêt les mêmes comportements (enfants, coureurs d'orientation) ne présentent pas de différence notable dans le taux d'infection. Cette tendance ne peut malheureusement être vérifiée chez les forestiers, cette profession étant avant tout exercée par des hommes.

Il apparaît donc que le risque comparé d'infection par l'un ou l'autre des agents pathogènes étudiés est délicat à établir: il dépend à la fois de la durée des contacts avec la forêt, des comportements personnels, de l'existence de foyers d'encéphalite à tiques à proximité, du hasard de pénétrer à l'intérieur d'un microfoyer et, probablement aussi, de l'état immunitaire de chaque individu.

L'écologie d'*I. ricinus* ne prédispose guère cette espèce à rencontrer un hôte humain aux habitudes peu sylvatiques. De fait, l'homme n'est qu'un hôte occasionnel des tiques et, par conséquent, des microorganismes qu'elles transportent. Néanmoins, les résultats sérologiques et épidémiologiques obtenus au cours de cette étude montrent que, malgré ces particularités, l'homme agit comme un révélateur non négligeable des zones d'endémie et reflète certains aspects de la circulation complexe de *B. burgdorferi* et du virus CEE dans la nature.

XI. CONCLUSIONS

XI.1. MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DETECTION DU VIRUS CEE DIRECTEMENT DANS LA TIQUE

Nous avons introduit un protocole de détection du virus CEE dans la tique qui n'implique pas le recours à l'infection de souriceaux nouveaux-nés: l'immunofluorescence sur cultures de cellules (IF/C). Son fort pouvoir de détection permet l'analyse individuelle des tiques capturées dans la nature, tout au moins des stades adulte et nymphal. Appliquée à l'examen de tiques prélevées dans de nombreux sites suspects, cette méthode a permis la mise en évidence de plusieurs foyers naturels, et l'obtention des isolats correspondants de virus.

L'inconvénient que représente la phase d'amplification virale sur cultures cellulaires, lors de l'IF/C, peut être contourné par le recours à l'immunofluorescence sur "squashes" (IF/S), dont le protocole est également proposé. Cette seconde méthode permet la détection de l'agent pathogène dans tous les stades de tiques; par contre, l'isolement ou la caractérisation des virus observés n'est pas possible; L'IF/S constitue donc un moyen pratique et rapide de quantification des tiques infectées dans un foyer connu, mais convient mal à la recherche de nouveaux foyers.

Nous avons appliqué un protocole de PCR pour la détection de *B. burgdorferi* à l'analyse des tiques en train de se nourrir sur l'homme. Bien que la proportion de tiques trouvées infectées par le spirochète (18,1%) ne soit pas très élevée par rapport à la moyenne suisse (jusqu'à 55% de tiques positives selon le stade et la région), cette méthode est apparemment au moins aussi fiable que l'IF/S, et suffisamment sensible pour mettre en évidence des spirochètes contenus aussi bien dans une tique gorgée que dans un simple fragment de nymphe.

Par contre, le protocole de PCR proposé pour la détection du virus CEE s'est avéré inopérant en présence de grandes quantités de tissus de tiques, les acides nucléiques d'un seul acarien réduisant de 10 fois le pouvoir de détection du test. Cet échec est probablement dû à un phénomène d'inhibition de l'enzyme *Taq* polymérase, ou à des interférences entre la séquence à amplifier et l'ADN d'*I. ricinus*.

XI.2. REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES FOYERS NATURELS D'ENCEPHALITE A TIQUES

Quatre foyers naturels de virus CEE ont été décelés ou confirmés par l'analyse des tiques capturées sur la végétation. Ces foyers correspondent à des sections de forêt du bas-Simmental/BE (2 foyers), du Belpberg/BE et du Santenberg/LU. L'apparition régulière de cas cliniques de maladie dans ces zones d'endémie en confirme la stabilité. L'éventuelle présence d'un cinquième foyer à Liestal - suggérée par la découverte d'une tique apparemment porteuse du virus - reste à confirmer.

Au nord des Alpes, la répartition des cas déclarés d'encéphalite à tiques, la distribution géographique des tiques infectées par le virus et l'origine des sérums humains présentant des anticorps spécifiques ne permettent pas de mettre en évidence une quelconque extension des foyers d'encéphalite à tiques vers l'ouest de la Suisse. Par ailleurs, tous les lieux d'infection sont inscrits à l'intérieur du périmètre délimité par les foyers naturels d'encéphalite déjà reconnus en 1984. L'apparition de cas cliniques en-dehors des zones d'endémie semble donc plutôt résulter d'une meilleure attention portée à cette maladie, voire d'un phénomène de "pulsation des foyers" dû à l'exportation du virus lors de déplacements importants des hôtes. On ne peut toutefois exclure formellement la présence de foyers de virus CEE en Suisse romande.

Un cas particulier est représenté par le Tessin, où la forte séroprévalence enregistrée, en totale contradiction avec les données cliniques de ce canton, mérite des investigations supplémentaires.

XI.3. RISQUE COMPARE D'ENTRER EN CONTACT AVEC *B. BURGDORFERI* ET/OU LE VIRUS CEE

Le risque d'entrer en contact avec *B. burgdorferi* ou le virus CEE est apparu dépendre à la fois de la durée des contacts avec la forêt (à long terme surtout), des comportements personnels, de la présence de foyers d'encéphalite à tiques et du fait de pénétrer à l'intérieur d'un microfoyer.

Chez les forestiers, la prévalence d'anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* est proportionnelle à la durée (années) des contacts réguliers avec la forêt et

au nombre de piqûres de tiques; par contre, elle n'est pas corrélée avec la fréquence des contacts (heures/semaine) avec les zones à risque. Par ailleurs, le taux d'anticorps, chez les forestiers, tend à croître avec les années d'exposition; cela suggère un phénomène de stimulation continuelle des processus immunitaires, à effet peut-être protecteur contre une réinfection.

La probabilité d'être infecté par *B. burgdorferi* lors de la piqûre d'une tique infectieuse est apparu extrêmement faible (2, voire 3/23 échantillons analysés 1 mois à un an après la piqûre). Le risque de contracter une forme clinique de borréliose est certainement encore moindre. Sur l'ensemble des populations étudiées, la proportion de personnes présentant des anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* est apparue environ dix fois plus importante que pour le virus CEE. Cette proportion globale peut toutefois varier considérablement. En effet, les foyers d'encéphalite à tiques semblent être organisés en "microfoyers" à haut pourcentage de tiques infectées. Leur importance - et par conséquent le risque encouru par la population de contracter la maladie - sont apparemment davantage liés à l'abondance des tiques et à la distribution spatiale des foyers élémentaires qu'au pourcentage global de tiques infectées. Au contraire, *B. burgdorferi* étant très largement et régulièrement répartie dans les populations de tiques du Plateau, le risque d'entrer en contact avec cette bactérie sera beaucoup plus constant.

La situation sérologique et clinique observée chez l'homme a pu être rapprochée des phénomènes observés dans les foyers d'endémie. Bien que ne constituant qu'un hôte accidentel d'*I. ricinus*, l'homme est apparu agir comme un reflet de certains aspects de la circulation de ces agents pathogènes dans la nature.

XI.4. ETABLISSEMENT D'UN CENTRE DE DIAGNOSTIC-CONSEIL A L'INSTITUT DE ZOOLOGIE DE NEUCHÂTEL

Les techniques mises au point permettent la détection du virus CEE et de *B. burgdorferi* directement dans les tiques, cela sans nécessité d'une infrastructure importante.

Certaines particularités du cycle épidémiologique de *B. burgdorferi* et du virus CEE restent encore méconnues. La politique à tenir face à un individu piqué par une tique continue d'être un sujet d'actualité. Un centre de recherche spécialisé à la fois dans l'épidémiologie, le diagnostic clinique et la détection des agents pathogènes constitue un apport important, tant dans la centralisation et l'analyse des données que dans le contrôle et la distribution

de l'information. Souhaitons qu'une étroite collaboration entre pouvoirs publics, milieux médicaux, population et chercheurs - notamment par le biais d'analyses et de suivis systématiques des personnes piquées - permettra bientôt de résoudre quelques-unes des nombreuses questions qui se posent encore concernant l'épidémiologie de la borréliose de Lyme et de l'encéphalite à tiques.

RESUME

La fiabilité et la sensibilité de 3 modes de détection du virus CEE dans les tiques (*I. ricinus*) ont été comparées avec la méthode conventionnelle d'isolation par inoculation intra-cérébrale à des souriceaux nouveaux-nés.

- l'ELISA présente un seuil de détection relativement faible (10^5 PFU) et des réactions non spécifiques; il en résulte une concordance avec les souris inférieure à 60% (24 échantillons analysés).

- la PCR présente une grande sensibilité (10 PFU) avec des suspensions pures de virus; les acides nucléiques provenant des tissus de la tique (*I. ricinus*) exercent cependant une action antagoniste de l'amplification, responsable d'une baisse de 10x du pouvoir de détection. La réaction est totalement inhibée en présence de quantités importantes d'acides nucléiques de tiques ("pools"), cela même lorsque le titre viral est élevé.

- l'immunofluorescence sur cultures de cellules (IF/C) présente un important pouvoir de détection (<10 PFU/inoculum) et une concordance de 100% avec l'isolement sur souriceaux (20 échantillons analysés).

Une variante de l'IF/C, l'immunofluorescence sur "squashes", s'est révélée suffisamment sensible pour déceler aisément le virus Louping Ill (antigéniquement très proche du virus CEE) directement dans la tique. L'efficacité - ou l'inefficacité - de cette méthode, appliquée à l'analyse de tiques collectées sur l'homme, n'a pas pu être démontrée.

Entre 1984 et 1992, en moyenne 28 cas cliniques certains d'encéphalite à tiques (30 cas, tous diagnostics confondus) ont été déclarés chaque année en Suisse. Leur apparition connaît un pic d'abondance en juillet-août; un second pic d'incidence, correspondant à la recrudescence automnale de l'activité d'*I. ricinus*, n'a été enregistré qu'en 1988.

Les hommes (71%) sont plus touchés que les femmes (29%) par l'encéphalite à tiques, cela même dans les populations exposées aux piqûres de tiques de par leurs activités en forêt (79% d'hommes) (250 patients étudiés). Cette différence liée au sexe se retrouvant dans certaines populations analysées pour *B. burgdorferi*, on peut envisager que les comportements personnels constituent un facteur de risque non négligeable d'exposition.

Les forestiers sont environ 30 fois plus concernés par l'encéphalite à tiques que le reste de la population; les agriculteurs le sont 5 fois plus. Les cantons de SH, ZH et TG connaissent les taux d'incidence annuelle les plus élevés

(resp. 3,95, 1,31 et 0,96/100'000 hab/an), les valeurs des autres cantons suisses s'échelonnent entre 0 et 0,4/100'000 hab). L'incidence n'est pas liée à la densité de population, ni à celle de la forêt.

L'apparition des cas cliniques d'encéphalite à tiques semble suivre un cycle triennal qui reste à confirmer (nombre d'années d'observation actuellement insuffisant).

L'évolution au cours du temps des lieux d'infection, de même que les analyses sérologiques et virologiques entreprises, ne permettent pas de mettre en évidence une quelconque progression des foyers d'encéphalite à tiques à l'ouest de la Suisse. Au Tessin par contre, une forte séroprévalence enregistrée auprès de patients d'hôpital suggère l'implantation du virus au sud des Alpes. Ces résultats devraient toutefois être confirmés par des investigations supplémentaires.

L'analyse de tiques capturées dans la nature pour la recherche du virus CEE a mis en évidence une nette tendance au regroupement des tiques virulentes (formation de "microfoyers"). Le pourcentage moyen de tiques infectées dans un foyer varie entre 0,6% et 2,5%, ce taux pouvant approcher 10%, selon le stade, dans les foyers élémentaires.

Quatre nouveaux foyers naturels d'encéphalite à tiques ont pu être déterminés par l'analyse virologique de tiques capturées dans la nature: le bas-Simmmental/BE (2 sites), la montagne de Belp/BE et le Santenberg/LU. Cela porte à 16 les zones d'endémie actuellement reconnues en Suisse. La présence du virus CEE à Liestal est également envisagée.

Sur l'ensemble des populations étudiées, la proportion de personnes présentant des anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* est apparue environ dix fois plus importante que pour le virus CEE. Cette proportion globale peut toutefois varier considérablement localement.

Les recherches d'anticorps spécifiques dirigés contre *B. burgdorferi* et le virus CEE font état de séroprévalences atteignant respectivement 25,7% et 1,0% chez les populations professionnellement exposées aux piqûres de tiques (649 sérums analysés), 18,5% et 0% chez les personnes ayant des activités régulières en forêt pour les loisirs (27 sérums), 14,7% et 0,6% chez des donneurs de sang (361 sérums) et, globalement, 10,4% et 2,4% chez des patients d'hôpitaux (1016 sérums). Toutefois, ces valeurs varient considérablement d'une région à l'autre.

La séroprévalence, du moins en ce qui concerne *B. burgdorferi*, est liée au nombre de piqûres de tiques subies, celles-ci étant fonction du nombre d'années passées en forêt. Il n'est ressorti aucune corrélation entre les heures hebdomadaires de fréquentation de la forêt et le nombre de piqûres ou la sérologie.

Chez les professionnels de la forêt, le titre d'anticorps croît avec le degré d'exposition en zone boisée; ce phénomène suggère une réactivation continue des défenses immunitaires des forestiers. Malheureusement, nous ne sommes pas en mesure de déterminer si cette stimulation joue un rôle protecteur face à une nouvelle infection par le spirochète.

Les recrues suisses, lors de leur exercice d'été, ne sont pas apparues particulièrement exposées au risque d'infection par l'un ou l'autre des agents pathogènes, les piqûres de tiques étant apparemment peu nombreuses et la transmission des microorganismes s'effectuant, selon toute apparence, avec une certaine difficulté. En ce qui concerne *B. burgdorferi*, 2,2% de ces recrues ont montré une séroconversion (IgM) 1 mois après une piqûre de tique (232 soldats étudiés), tandis que seuls deux militaires piqués par une tique infectée montraient des signes sérologiques d'infection après 1 an (11 personnes étudiées); en ce qui concerne le virus CEE, 1,3% des militaires présentaient une séroconversion (IgG) après 1 mois (225 personnes analysées).

La situation sérologique et clinique observée chez l'homme reflète certains aspects de la circulation complexe de *B. burgdorferi* et du virus CEE dans la nature.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes plus sincères remerciements à tous ceux qui, par leur confiance, leur intérêt, leur aide ou leur générosité, ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Plus particulièrement, je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Prof. A. Aeschlimann, qui a suscité mon enthousiasme pour la parasitologie et qui, en tant que directeur de thèse, m'a permis de réaliser ce travail.

Ma plus vive reconnaissance va également:

- au Dr L. Gern, de l'Institut de Zoologie de Neuchâtel, dont les qualités humaines, alliées à une grande rigueur scientifique et un sens critique toujours constructif, m'ont été d'un grand soutien lors des périodes de doutes qui accompagnent toute entreprise de ce genre. Qu'elle soit remerciée également pour son immense disponibilité;

- au Dr P.-A. Raeber, de l'Office fédéral de la santé publique, dont l'intérêt pour l'encéphalite à tiques est à l'origine du présent travail;

- au Dr H. P. Zimmermann, du même Office, qui m'a aimablement communiqué tous les renseignements souhaités concernant les cas cliniques recensés d'encéphalite à tiques;

- au Prof. R. Wyler et à son équipe de l'Institut de Virologie de Zürich, qui m'ont si aimablement accueillie et aidée pour la production de l'antigène viral;

- au Dr E. A. Gould, de l'Institut de Virologie et de microbiologie de l'environnement d'Oxford, qui m'a accueillie dans son laboratoire et a mis à ma disposition les protocoles d'IF/C et de PCR pour la détection du virus CEE;

- au Dr P. A. Nuttall, du même Institut, qui m'a si chaleureusement accueillie dans son groupe à deux reprises;

- au Dr D. Carey, du même Institut, qui m'a confié son protocole de PCR pour la détection de *B. burgdorferi*;

- au Dr J. Kopecky, de l'Institut de Parasitologie de Ceské Budejovice, qui m'a confié son protocole d'ELISA pour la détection du virus CEE;

- au Dr M. Labuda, de l'Institut de Virologie de l'Académie slovaque des Sciences, qui a pris part à la mise au point du test de PCR pour la détection du virus CEE, et qui a bien voulu m'accorder son amitié. Jamais je n'oublierai les

moments merveilleux passés auprès de sa famille, autour d'un café "spécial" et d'un verre d'authentique Becherovka;

- à l'Office fédéral des affaires sanitaires de l'armée, et en particulier au Dr J.-M. Daucourt, dont l'enthousiasme et l'active collaboration ont permis la réalisation d'un volet important de cette étude;

- au médecins d'ER de l'exercice d'été 1991, qui ont procédé auprès des recrues aux collectes d'échantillons de sang et de tiques trouvées en train de piquer;

- aux médecins cantonaux et inspecteurs forestiers cantonaux des cantons de GE, VD, VS, FR, NE, JU, BE et GR, qui m'ont apporté leur soutien et leurs conseils pour l'organisation des collectes de sang;

- aux centres régionaux de transfusion de la Croix-Rouge de Sion et de Coire, qui m'ont fait parvenir plusieurs centaines de sérums humains;

- au Dr C. Laperrouza, de l'hôpital de La Béroche, qui m'a aimablement fourni des échantillons de sang de ses patients;

- à M. O. Rais et Mmes C. M. Hu et A. Orlandini, qui ont, successivement, réalisé à la perfection de nombreuses analyses sérologiques;

- à M. R. Lienhart, grâce à qui les tests de Western blot et d'ELISA-Capture ont pu être effectués;

- à tous les collaborateurs du Laboratoire de diagnostic parasitaire de l'Université de Neuchâtel, qui ont mis à ma disposition les infrastructures nécessaires à la réalisation des tests sérologiques et m'ont donné de nombreux "coups de main";

- à ma soeur Christine, pour sa contribution non négligeable à la collecte des échantillons de sang en Valais et à l'obtention de conjugué pour nos tests;

- à Mlle L. Toutoungi, dont l'amitié et l'humour quelque peu emporté ont toujours su relancer ma combativité;

- à tous mes collègues, amis et proches, qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de ce travail.

Enfin, je tiens à remercier chaleureusement tous les forestiers, militaires et participants divers, qui ont surmonté une antipathie bien naturelle pour les seringues en acceptant de participer à cette étude.

Cette thèse a été effectuée sur mandat de l'Office fédéral de la santé publique, que je remercie de sa générosité.

- 1 Annuaire statistique de la Suisse (1992). Publié par l'Office fédéral de la statistique. Editions Birkhauser, Bâle.
- 2 Abraham, Z., Feuerman, E.J., Rozenbaum, M., Glück, Z. (1991): Lyme disease in Israel. *J.Amer.Acad.Dermatol.* 25 (4): 729.
- 3 Abshagen, R., Bahr, J. (1992): Doppelinfektion *Borrelia burgdorferi*-FSME-Virus. *Kinderärztl.Praxis.* 60 (3): 103.
- 4 Ackermann, R., Rehse-Küpper, B. (1979): Die zentraleuropäische Enzephalitis in der Bundesrepublik Deutschland. *Fortschr.Neurol.Psychiatr.* 47 (3): 103-122.
- 5 Ackermann, R., Rehse-Küpper, B., Löser, R., Scheid, W. (1968): Neutralisierende Serumantikörper gegen das Virus der zentraleuropäischen Enzephalitis bei der ländlichen Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland. *Dtsch.Med.Wschr.* 93: 1747-1754.
- 6 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.
- 7 Aeschlimann, A. (1981): The role of hosts and environment in the natural dissemination of ticks. Studies on a Swiss population of *Ixodes ricinus* L. 1758. *Rev.Adv.Parasit.* (Ed. W. Slusarski). Polish Scientific Publishers, Warszawa, 1981 (ICOPA IV). 859-869.
- 8 Aeschlimann, A., Burgdorfer, W., Matile, H., Péter, O., Wyler, R. (1979): Aspects nouveaux du rôle de vecteur joué par *Ixodes ricinus* L. en Suisse. Note préliminaire. *Acta Trop.* 36: 181-191.
- 9 Aeschlimann, A., Büttiker, W., Diehl, P.A., Eichenberger, G., Immler, R., Weiss, N. (1970): Présence d'*Ixodes trianguliceps* (Birula, 1895) et d'*Ixodes apronophorus* (Schulze, 1924) en Suisse (Ixodoidea, Ixodidae). *Rev. suisse Zool.* 77: 527-536.
- 10 Aeschlimann, A., Chamot, E., Gigon, F., Jeanneret, J.-P., Kesseler, D., Walthert, C. (1986): *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. *Zbl.Bakt.Hyg.A.* 263: 450-458.
- 11 Afzelius, A. (1910): Verhandlung der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. *Arch.Derm.Syph.* 101: 404-406.
- 12 Ai, C., Wu, X. (1989): Lyme disease in China. In: Lyme Borreliosis II, *Zbl.Bakt. Suppl.* 18 (Ed. Stanek). Gustav Fischer. 75-76.
- 13 Albrecht, P. (1968): Pathogenesis of neurotropic arbovirus infections. *Current Topics Microbiol.Immun.* 43: 44-91.
- 14 Alekseev, A.N., Chunikhin, S.P. (1990): [Transmission of the tick-borne encephalitis virus by ixodid ticks in the experiment (mechanisms, terms, species and sexual distinctions)] (en russe; résumé en anglais). *Parazitologia.* 24 (3): 177-183.

- 15 Altpeter, E.S., Meier, C. (1992): Epidemiologische Aspekte der neurologischen Komplikationen der Lyme-Borreliose in der Schweiz. *Schweiz.med.Wschr.* 122 (1-2): 22-26.
- 16 Anderson, J.F., Johnson, R.C., Magnarelli, L.A., Hyde, F.W. (1985): Identification of endemic foci of Lyme disease: isolation of *Borrelia burgdorferi* from feral rodents and ticks (*Dermacentor variabilis*). *J.Clin.Microbiol.* 22 (1): 36-38.
- 17 Anderson, J.F., Magnarelli, L.A. (1984): Avian and mammalian hosts for spirochete infected ticks and insects in a Lyme disease focus in Connecticut. *Yale J.Biol.Med.* 57: 627-641.
- 18 Anonymous (1989): Prophylaxe der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME). FSME-Immun® inject; FSME-Bulin®. Immuno AG, Wien. 24 p.
- 19 Antoniadis, A., Alexiou-Daniel, St., Polyzoni, Th. (1991): Tick-borne encephalitis in Greece (Abstract). 2nd Int.Symp. on tick-borne encephalitis, Baden, 6-7 June 1991.
- 20 Azulay, R.D., Azulay-Abulafia, L., Sodre, C.T., Azulay, D.R., Azulay, M.M. (1991): Lyme disease in Rio de Janeiro, Brazil. *Int.J.Dermatol.* 30 (8): 569-571.
- 21 Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J.-C., Assous, M., Grimont, P.A.D. (1992): Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp.nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 42: 378-383.
- 22 Barbour, A.G., Burgdorfer, W., Hayes, S.F., Péter, O., Aeschlimann, A. (1983): Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. *Curr.Microbiol.* 8: 123-126.
- 23 Barbour, A.G., Schruppf, M.E. (1986): Polymorphism of major surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Zbl.Bakt.Hyg.A.* 263: 83-91.
- 24 Baril, C., Richaud, C., Baranton, G., Saint Girons, I. (1989): Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. *Res.Microbiol.* 140: 507-516.
- 25 Barontini, F., Gori, F., Maurri, S. (1989): A case of Lyme borreliosis presenting as Bannwarth's syndrome with fatal outcome due to a disseminated intravascular coagulation. In: Lyme Borreliosis II, *Zbl.Bakt., Suppl.* 18. (Ed. Stanek). Gustav Fischer. 250-255.
- 26 Beati, L., Péter, O., Burgdorfer, W., Aeschlimann, A., Raoult, D. (1993): Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp.nov. is a distinct species of the Spotted fever group of *Rickettsiae*. *Int.J.Syst.Bact.* 43 (3): 521-526.
- 27 Bedjanic, M., Rus, S., Kmet, J., Vesenjaj-Zmijanac, J. (1955): Virus meningo-encephalitis in Slovenia. 2. Clinical observations. *Bull.W.H.O.* 12: 503-512.

- 28 Benach, J.L., Bosler, E.M., Hanrahan, J.P., Coleman, J.L., Habicht, J.S., Bast, T.P., Cameron, D.J., Ziegler, J.L., Barbour, A.G., Burgdorfer, W., Edelman, R., Kaslow, R. (1983): Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *N.Engl.J.Med.* 308: 740-742.
- 29 Benach, J.L., Coleman, J.L., Skinner, R.A., Bosler, E.M. (1987): Adult *Ixodes dammini* on rabbits: a hypothesis for the development and transmission of *Borrelia burgdorferi*. *J.Infect.Dis.* 155: 1300-1306.
- 30 Benda, R. (1958): The common tick, *Ixodes ricinus* L., as a reservoir and vector of tick-borne encephalitis. 1. Survival of the virus (strain B3) during the development of the tick under laboratory conditions. *J.Hyg.Epidemiol.Microbiol.Immunol.* 2: 314-330.
- 31 Benhamou, C.L., Gauvain, J.B., Assous, M.V., Conte, P., Vindia, C., Soufflet, L., Dournon, E. (1990): Anticorps anti-*Borrelia burgdorferi* chez des donneurs de sang de la région orléanaise: examen de 19 séro-positifs au seuil de 1/256 (Abstract). *Rev.Rhum.Malad.Ostéo-artic.* 10: 729.
- 32 Bergström, S., Bundoc, V.G., Barbour, A.G. (1989): Molecular analysis of the linear plasmid-encoded major outer surface proteins OspA and OspB of the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Mol.Microbiol.* 3: 479-486.
- 33 Bigaignon, G., Tomasi, J.-P., Goubau, P., Martin, Ph., Pierard, D., Sindic, C.J.M., Dupuis, M., Marcelis, L., Degreef, H., Willocx, D., Grillet, B., Westhovens, R., Roger, F. (1989): A clinical and sero-epidemiological study of 190 Belgian patients suffering from Lyme borreliosis. *Acta Clinica Belgica.* 44 (3): 174-181.
- 34 Binder, E., Doepfmer, R., Hornstein, O. (1955): Experimentelle Übertragung des Erythema chronicum migrans von Mensch zu Mensch. *Hautarzt.* 6 (11): 494-496.
- 35 Blaauw, I., Nohlmans, L., van den Berg-Loonen, E., Rasker, J., van der Linden, S. (1991): Lyme arthritis in the Netherlands: a nationwide survey among rheumatologists. *J.Rheum.* 18: 1819-1822.
- 36 Blaskovic, D. (1954): [The epidemic of encephalitis in the Roznava natural focus of infection.] (en slovaque). *Slovak Acad.Sci., Bratislava* 265.
- 37 Blaskovic, D. (1967): The public health importance of tick-borne encephalitis in Europe. *Bull.W.H.O.* 36 (Suppl. 1): 5-13.
- 38 Blaskovic, D., Nosek, J. (1972): The ecological approach to the study of tick-borne encephalitis. *Progr.med.Virol.* 14: 275-320.
- 39 Blaskovic, D., Pucekova, G., Kubinyi, I., Stupalova, S., Oravcova, V. (1967): An epidemiological study of tick-borne encephalitis in the Tribec region, 1953-1963. *Bull.W.H.O.* 36 (Suppl. 1): 89-94.
- 40 Bodemann, H., Schmitz, H. (1978): Prophylaxe und Therapie der Zeckenzephalitis. *Dtsch.Med.Wschr.* 103: 1159-1160.

- 41 Böhme, M., Schwenecke, S. Fuchs, E., Wiebecke, D., Karch, H. (1992): Screening of blood donors and recipients for *Borrelia burgdorferi* antibodies: no evidence of *B. burgdorferi* infection transmitted by transfusion. *Infusionstherapie*. 19: 204-207.
- 42 Borcic, B. (1981): Some epidemiological data on TBE in Croatia. *In*: Tick-Borne Encephalitis. Internat. Symp. Baden/Vienna 1979. Facultas Verlag Wien. 273-278.
- 43 Borcic, B. (1991): The nosoarea of tick-borne encephalitis in Croatia. *Ellipse*. 29: 450-451.
- 44 Boron, P., Lapinski, T.W. (1991): The epidemiological and clinical analysis of Tick borne encephalitis and encephalomeningitis (TBE) in population from endemic district of Bialyosk - Poland (Abstract). 2nd Int.Symp. on tick-borne encephalitis, Baden, 6-7 June 1991.
- 45 Bosler, E.M., Schulze, T.L. (1986): The prevalence and significance of *Borrelia burgdorferi* in the urine of feral reservoir hosts. *Zbl.Bakt.Hyg.A*. 263: 40-44.
- 46 Botha, P., Fivaz, B., Stanek, G., McLeod, I., Bohmer, L., Hodgkinson, B.J. (1989): Lyme borreliosis in South Africa (letter). *S.Afr.Med.J.* 76 (10): 581.
- 47 Bovet, L. (1987): Caractérisation d'antigènes d'extraits totaux et de cellules en culture d'*Ixodes ricinus* L. Mémoire de licence. Faculté des Sciences, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.
- 48 Brummer-Korvenkontio, M., Saiku, P., Korhonen, P., Oker-Blom, N. (1973): Arboviruses in Finland. I. Isolation of tick-borne encephalitis (TBE) virus from arthropods, vertebrates and patients. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 22 (3): 382-389.
- 49 Buchwald, A. (1883): Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut-Atrophie. *Dem.Vierteljahresschr.* 10: 553-556.
- 50 Burek, V., Misic-Mayerus, L., Maretic, T. (1992): Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in various population groups in Croatia. *Scand.J.Infect.Dis.* 24 (5): 683-684.
- 51 Burgdorfer, W. (1984): Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J.Biol.Med.* 57: 515-520.
- 52 Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Benach, J.J., Grunwaldt, E., Davis, J.P.: (1982) Lyme disease - a tick-borne spirochetosis? *Science*. 216: 1317-1319.
- 53 Burgess, E.C., Patrican, L.A. (1987): Oral infection of *Peromyscus maniculatus* with *Borrelia burgdorferi* and subsequent transmission by *Ixodes dammini*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 36 (2): 402-407.

- 54 Chambouris, R., Sixl, W., Stunzner, D., Kock, M. (1989): Antikörper bei Hunden gegen das Virus der Zeckenencephalitis (FSME/TBE) in Griechenland. Geogr.Med. Suppl. 3: 11-14.
- 55 Chamot, E. (1989): Contribution à l'étude de l'«Erythema-migrans-Krankheit» (maladie de Lyme) en Suisse. Thèse. Faculté des Sciences, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.
- 56 Chatzipanagiotou, S., Papandreou-Rakitzis, P., Malamou-Ladas, H., Antoniou, P. (1992): Determination of antibody titres for *Borrelia burgdorferi* in the serum of Gypsies living in Attika, Greece. Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. 11: 477-478.
- 57 Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical biochemistry. 162: 156-159.
- 58 Clement, J., Leirs, H., Armour, V., Ward, D., Groen, J., Osterhaus, A., Kunz, Ch. (1992): Exposure of US troops in South-Germany to *Borrelia burgdorferi* (Bb) and tick-borne encephalitis (TBE) virus. Arthropod-borne Virus Information Exchange 1992 (Ed. Calisher). June: 58.
- 59 Clement, J., Leirs, H., Armour, V., Ward, D., Groen, J., Osterhaus, A., Kunz, Ch. (1992): Serologic evidence for tick-borne encephalitis (TBE) in North-American military stationed in Germany. Acta Leiden. 60 (2): 15-17.
- 60 Collard, M., Gut, J.P., Christmann, D., Hirsch, E., Nastorg, G., Sellal, F., Haller, X. (1993): L'encéphalite à tiques en Alsace. Rev.Neurol. (Paris). 149 (3): 198-201.
- 61 Danielova, V. (1990): Experimental infection of ticks *Ixodes ricinus* with tick-borne encephalitis virus under different microclimatic conditions. Folia Parasitol. (Praha). 37 (3): 279-282.
- 62 Danielova, V., Holubova, J. (1991): Transovarial transmission rate of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. In: Modern Acarology. (Eds F. Dusbabek and V. Bukva.) Academia, Prague and SPB Academic Publishing bv, The Hague. Vol.2: 7-10.
- 63 Davidson, M.M., Williams, H., Macleod, J.A. (1991): Louping ill in man: a forgotten disease. J.Infect. 23 (3): 241-249.
- 64 De Morais, J.D.A., Filipe, A.R., Nuncio, M.S. (1989): Doença de Lyme em Portugal. Caso clinico. Rev.Port.Doen.Inf. 12 (4): 261-276.
- 65 Dekonenko, E.J., Steere, A.C., Berardi, V.P., Kravchuk, L.N. (1988): Lyme borreliosis in the Soviet Union: a cooperative US-USSR report. J.Infect.Dis. 158 (4): 748-753.
- 66 Doby, J.M., Anderson, J.F., Couatarmanac'h, A., Magnarelli, L.A., Martin, A. (1986): Lyme disease in Canada with possible transmission by an insect. Zbl.Bakt.Hyg.A. 263: 488-490.

- 67 Doby, J.M., Bigaignon, G., Launay, H., Costil, C., Lorvellec, O., Lambert, M.C., Rolland, C. (1990): Présence de *Borrelia burgdorferi*, agent de spirochètoses à tiques, chez *Ixodes (Exopalpiger) trianguliceps* Birula, 1895 et *Ixodes (Ixodes) acuminatus* Neumann, 1901 (Acariens Ixodidae) et chez *Ctenophthalmus boeticus arvernus* Jordan, 1931 et *Megabathris turbidus* (Rothschild, 1909) (Insectes Siphonaptera), ectoparasites de micromammifères des forêts dans l'Ouest de la France. Bull.Soc.fr.Parasitol. **8** (2): 311-322.
- 68 Doby, J.M., Couatarmanac'h, A., Fages, J., Chevrier, S. (1989): Les spirochètoses à tiques chez les professionnels de la forêt. Enquête sérologique chez 653 sujets de 10 départements de l'ouest de la France. Arch.Mal.Prof. **50** (8): 751-757.
- 69 Dournon, E. (1988): La maladie de Lyme. (Ed. Beecham), 75782 Paris-Cedex 16, France. 69 p.
- 70 Eltari, E. (1991): Epidemiology of tick-borne encephalitis in Albania. Ellipse. **29**: 449-450.
- 71 Eltari, E., Cani, M., Sharofi, P. (1991): Epidemiology of tick-borne encephalitis in Albania (Abstract). 2nd Int.Symp. on tick-borne encephalitis, Baden, 6-7 June 1991.
- 72 Erlich, H.A. (1989): PCR technology: principles and applications for DNA amplification. (Ed. Stockton/McMillan), New York.
- 73 Ernek, E., Kozuch, O., Lichard, M., Nosek, J., Albrecht, P. (1963): Experimental infection of *Clethrionomys glareolus* and *Apodemus flavicollis* with tick-borne encephalitis virus. Acta Virol. **7**: 434-436.
- 74 Ernek, E., Kozuch, O., Nosek, J., Hudec, K. (1969): Study on the relationship between the tick-borne encephalitis virus and the wild duck, *Anas platyrhynchos*. I. Acute infection. Acta Virol. **13**: 296-301.
- 75 Ernek, E., Lichard, M. (1964): Role of the English sparrow (*Passer domesticus*) in the circulation of TBE-virus. J.Hyg.Epidemiol.(Praha) **8**: 375-379.
- 76 Fahrner, H., van der Linden, S., Sauvain, M.J., Gern, L., Zhioua, E., Aeschlimann, A. (1991): The prevalence and incidence of clinical and asymptomatic Lyme borreliosis in a population at risk. J.Infect.Dis. **163**: 305-310.
- 77 Forsgren, M., Holmgren, B. (1991): Epidemiology of tick-borne encephalitis in Sweden (Abstract). 2nd Int.Symp. on tick-borne encephalitis, Baden, 6-7 June 1991.
- 78 Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., Brown, F. (1991): Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch.Virol. Suppl. **2**: 450 p.

- 79 Fraser, J.R.E. (1982): Lyme disease challenges Australian clinicians. The implications of Australia's first reported case of Lyme arthritis. *Med.J.Aust.* **69**: 101-102.
- 80 Fuchs, R., Jauris, S., Lottspeich, F., Preac-Mursic, V., Wilske, B., Soutschek, E. (1992): Molecular analysis and expression of a *Borrelia burgdorferi* gene encoding a 22 kDa protein (pC) in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **6**: 503.
- 81 Gallia, F., Rampas, J., Hollender, L. (1949): [Laboratory infection with encephalitis virus] (en tchèque). *Cas.Lék.Cesk.* **88**: 224-229.
- 82 Garcia, S. (1990): Utilisation du Western blot pour le diagnostic de la maladie de Lyme. Mémoire de licence. Faculté des Sciences, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.
- 83 Garin, Ch., Bujadoux, M. (1922): Paralysie par les tiques. *J.Med.Lyon* **71**: 765-767.
- 84 Gauvain, J.B., Benhamou, C.L., Barthez, J.P. (1990): Anticorps anti-*Borrelia burgdorferi* chez des forestiers de l'Orléanais. *Rev.Rhum.Malad.Ostéo-artic.* **10**: 729.
- 85 Genchi, C., Magnino, S., Pacetti, A., Simeoni, J., Di Sacco, B., Falagiani, P. (1989): *Argas reflexus*, possible vectore di *Borrelia burgdorferi*. *Gior.Mal.infett.parassit.* **41** (4): 403-408.
- 86 Gern, L. (1984): Contribution à la connaissance de l'épidémiologie des babésioses de micromammifères et de bovins en Suisse. Thèse. Faculté des Sciences, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.
- 87 Gern, L., Frossard, E., Walter, A., Aeschlimann, A. (1989): Presence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* in a human population of the Swiss Plateau. In: Lyme Borreliosis II, *Zbl.Bakt., Suppl.* **18**. (Ed. Stanek), Gustav Fischer: 321-328.
- 88 Gern, L., Toutoungi, L.N., Hu, C.M., Aeschlimann, A. (1991): *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus*, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Med.Vet.Entomol.* **5**: 431-435.
- 89 Gerster, J.C., Guggi, S., Perroud, H., Bovet, R. (1981): Lyme arthritis appearing outside the United States: a case report from Switzerland. *Br.Med.J.* **283** (6297): 951-952.
- 90 Gigon, F. (1985): Biologie d'*Ixodes ricinus* L. sur le Plateau suisse - Une contribution à l'écologie de ce vecteur. Thèse. Faculté des Sciences, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.
- 91 Ginsburg, Ch., Saint-Val, C., Eizenbaum, J.F., Degos, J.D. (1991): Maladie de Lyme africaine (lettre). *Presse méd.* **20** (42): 2161-2162.
- 92 Golightly, M.G. (1993): Laboratory considerations in the diagnostic and management of Lyme borreliosis. *Am.J.Clin.Pathol.* **99** (2): 168-174.

- 93 Gould, E.A., Buckley, A., Cammack, N. (1985): Use of the biotin-streptavidin interaction to improve flavivirus detection by immunofluorescence and ELISA tests. *J.Virol.Meth.* 11: 41-48.
- 94 Gresikova, M. (1957): [Excretion of tick-borne encephalitis virus with goat's milk.] (en slovaque). *Vet.casopis* 5: 177-182.
- 95 Gresikova, M. (1957): [Isolation of tick-borne encephalitis virus from blood and milk of subcutaneously infected cow] (en slovaque). *Cs.Mikrobiol.* 2: 387.
- 96 Gresikova, M. (1957): [Isolation of tick-borne encephalitis virus from blood and milk of subcutaneously infected sheep.] (en slovaque). *Cs.Mikrobiol.* 2: 386.
- 97 Gresikova, M., Albrecht, P. (1959): Experimental pathogenicity of the TBE-Virus for the green lizard, *Lacerta viridis* (Laur.). *J.Hyg.Epidemiol.* 3: 258-262.
- 98 Gresikova, M., Calisher, C.H. (1988): Tick-borne encephalitis. In: *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol IV (ed. T.P. Monath). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 177-202.
- 99 Gresikova, M., Kozuch, O., Sekeyova, M., Nosek, J. (1986): Studies on the ecology of tick-borne encephalitis virus in the Carpathian and Pannonian types of natural foci. *Acta Virol. (Praha)* 30 (4): 325-331.
- 100 Gresikova, M., Masar, I. (1991): Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Czecho-Slovakia. *Ellipse.* 29: 451-453.
- 101 Gresikova, M., Mrciak, M., Brtek, V., Sekeyova, M. (1976): Isolation and identification of tick-borne encephalitis virus from a bank vole (*Clethrionomys glareolus*) trapped in the vicinity of Radimovsky forest (Western Slovakia). In: *2.Int.Arbeitskolloquium über Naturherde von Infektionskrankheiten in Zentraleuropa.* 25-28.2.1976, Graz. 105-110.
- 102 Gresikova, M., Nosek, J. (1966) : Isolation of tick-borne encephalitis virus from *Haemaphysalis inermis* ticks. *Acta Virol.* 10: 359-361.
- 103 Gresikova, M., Sekeyova, M., Prazniakova, E. (1975): Isolation and identification of Group B Arboviruses from the blood of birds captured in Czechoslovakia. *Acta Virol.* 19: 162-164.
- 104 Gresikova, M., Sekeyova, M., Stupalova, S., Necas, S. (1975): Sheep milk-borne epidemic of tick-borne encephalitis in Slovakia. *Intervirol.* 5: 57-61.
- 105 Gresikova, M., Thiel, W., Batikova, M., Stünzner, D., Sekeyova, M., Sixl, W. (1973): Haemagglutination-inhibiting antibodies against arboviruses in human sera from different regions in Steiermark (Austria). *I. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abh.Orig.A.* 224: 298-302.
- 106 Grinschgl, M.D. (1955): Virus Meningo-Encephalitis in Austria. 2. Clinical features, pathology and diagnosis. *Bull.W.H.O.* 12: 535-564.

- 107 Grubbauer, H.M., Spork, D., Stünzner, D., Zobel, G., Trop, M. (1991): Tick-borne encephalitis in a 3 months old child - case report (Abstract). 2nd Int.Symp. on tick-borne encephalitis, Baden, 6-7 June 1991.
- 108 Guerrero, A., Serrano, M.J. (1989): Frecuencia y espectro clinico de la infeccion por *Borrelia burgdorferi* en Espana. *Medica clinica*. 92: 438-439.
- 109 Gustafson, R., Svenungsson, B., Forsgren, M., Gardulf, A., Granström, M. (1992): Two-year survey of the incidence of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in a high-risk population in Sweden. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 11 (10): 894-900.
- 110 Gustafson, R., Svenungsson, B., Gardulf, A., Stiernstedt, G., Forsgren, M. (1990): Prevalence of tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in a defined Swedish population. *Scand.J.Infect.Dis.* 22: 297-306.
- 111 Guy, E.C., Bateman, D.E., Martyn, C.N., Heckels, J.E., Lawton, N.F. (1989): Lyme disease: prevalence and clinical importance of *Borrelia burgdorferi* specific IgG in forestry workers. *Lancet* 1: 484-486.
- 112 Guy, E.C., Stanek, G. (1991): Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *J.Clin.Pathol.* 44: 610-611.
- 113 Guzman, L., Neira, O. (1993): Lyme disease in Chile. *J.Rheum.* 20 (5): 774-775.
- 114 Haberberger, R.L. Jr, Constantine, N.T., Schwan, T.G., Woody, J.N. (1989): Lyme disease agent in Egypt? *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 83 (4): 556.
- 115 Hannoun, C. (1980): Les encéphalites à tiques en Europe. *Med.Trop.* 40 (5): 509-519.
- 116 Hannoun, C., Chatelain, J., Krams, S., Guillon, J-C. (1971): Isolement, en Alsace, du virus de l'encéphalite à tiques (Arbovirus, groupe B). *Note. C.R.Acad.Sc.Paris, Série D.* 272: 766-768.
- 117 Hannoun, C., Rodhain, F. (1975): Répartition géographique des encéphalites à arbovirus. *G.M. de France* 82 (32): 3761-3774.
- 118 Hard, S. (1966): Erythema chronicum migrans (Afzelii) associated with mosquito bite. *Acta Derm.Venereol.* 46: 473-476.
- 119 Heigl, Z., von Zeipel, G. (1966): Experimental infection with Tick-borne encephalitis virus in *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus* and *Mus musculus*. 1. Virological studies. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* 66 (4): 489-509.
- 120 Heinz, F.X., Kunz, Ch. (1981): Homogeneity of the structural glycoprotein from European isolates of tick-borne encephalitis virus: comparison with other flaviviruses. *J.Gen.Virol.* 57: 263-274.

- 121 Herzer, P., Wilske, B., Preac-Mursic, V., Schierz, G., Schattenkirchner, M., Zöllner, N. (1986): Lyme arthritis: clinical features, serological and radiographic findings of cases in Germany. *Klin.Wschr.* 64: 206-215.
- 122 Heyberger, K., Smetana, A., Rosicky, B. (1961): Experiments on tick-borne encephalitis virus transmission by fleas and other arthropods. *Proc.Symp.Biology of viruses of the tick-borne encephalitis complex, Smolenice, 1960* (Ed.H. Libikova). 414-417.
- 123 Hloucal, L., Gallia, F. (1949): [An epidemic of neurotropic virus disease in the district of Strakonice in 1948.] (en tchèque). *Cas.Lék.Cesk.* 88: 275-276.
- 124 Holak, H. (1991): Augenerkrankungen. In: *Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier.* (Ed. H. Horst). Perimed-Fachbuch-Verlagsgesellschaft mbH, Erlangen. 99-104.
- 125 Hollström, E. (1951): Successful treatment of erythema migrans Afzelius. *Acta Derm.Venereol.* 31: 235-243.
- 126 Holmgren, E.B., Forsgren, M. (1990): Epidemiology of tick-borne encephalitis in Sweden 1956-1989: a study of 1116 cases. *Scand.J.Infect.Dis.* 22: 287-295.
- 127 Hoogstraal, H., Aeschlimann, A. (1982): Tick-host specificity. *Mitteilungen Schweiz.Entomol.Ges.* 55: 5-33.
- 128 Horst, H. (1991): Klinik der *Borrelia-burgdorferi*-Infektionen-Allgemeiner Überblick. In: *Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier.* (Ed. H. Horst). Perimed-Fachbuch-Verlagsgesellschaft mbH, Erlangen. 55-58.
- 129 Horst, H. (1991): Erkrankungen innerer Organe. In: *Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier.* (Ed. H. Horst). Perimed-Fachbuch-Verlagsgesellschaft mbH, Erlangen. 105-108.
- 130 Horst, H. (1991): Borrelien-Infektion in der Schwangerschaft und durch Bluttransfusionen. In: *Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier.* (Ed. H. Horst). Perimed-Fachbuch-Verlagsgesellschaft mbH, Erlangen. 115-119.
- 131 Humair, P.-F., Turrian, N., Aeschlimann, A., Gern, L. (1993): *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: epizootiologic contribution of small mammals. *Folia Parasitol.* 40: 65-70.
- 132 Iliencko, V.J. (1957): Experimental facts concerning the mechanism of alimentary infection with the virus of biphasic meningoencephalitis. *Acta Virol.* 1: 46-56.
- 133 Jettmar, H.M. (1957): Über die Rolle der Zecken bei der Verbreitung der 2-welligen Virus-Meningoencephalitis in Österreich. *Anz.Schädlingk.* 30: 129-132.

- 134 Jezyna, C., Zajac, W., Ciesielski, T., Pancewicz, S. (1984): Epidemiologische und klinische Untersuchungen von Kranken mit Zecken-Enzephalitis aus Nord-Ostpolen. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.B. 178 (5-6): 510-521.
- 135 Johnson, R.C., Schmid, G.P., Hyde, F.W., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J. (1984): *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. Int.J.Syst.Bacteriol. 34 (4): 496-497.
- 136 Jusle, R.A., Fernandez de Luco, D., Gomez, M., Gonzalez, L., Saez de Ocariz, C., Sanzo, J.M., Dehesa, V. (1991) : A survey on Flavivirus infections in the Basque country (Spain): Louping-III and Tick-borne encephalitis (Abstract). 2nd Int.Symp. on tick-borne encephalitis, Baden, 6-7 June 1991.
- 137 Kahl, O., Janetzki, C., Gray, J.S., Stein, J., Bauch, R.J. (1992): Tick infection rates with *Borrelia: Ixodes ricinus* versus *Haemaphysalis concinna* and *Dermacentor reticulatus* in two locations in eastern Germany. Med.Vet.Entomol. 6: 363-366.
- 138 Kahl, O., Radda, A.C. (1988): Occurrence of Tick-borne encephalitis (TBE) virus in Berlin (West). Zbl.Bakt.Hyg.A 268: 482-486.
- 139 Kaltenrieder, M., Hess, E., Aeschlimann, A. (1985): Zum Vorkommen der Zecke *Ixodes ricinus* L. (Ixodoidea, Ixodidae) in der Schweiz. Rev. suisse Zool. 92 (3): 685-692.
- 140 Kantoch, M. (1991): Tick-borne encephalitis in Poland. Ellipse. 29: 461.
- 141 Karabatsos, N. (Ed.) (1985): International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. Am.Soc.trop.Med.Hyg., San Antonio, Texas. 3rd ed.
- 142 Kawabata, M., Baba, S., Iguchi, K., Yamaguti, N., Russell, H. (1987): Lyme disease in Japan and its possible incriminated tick vector, *Ixodes persulcatus*. J.Infect.Dis. 156 (5): 854.
- 143 Kessler, D. (1986): Mise en évidence de réservoirs de *Borrelia burgdorferi*, agent étiologique de l'Erythema chronicum migrans, et quelques aspects de son épidémiologie. Mémoire de licence. Faculté des Sciences, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.
- 144 Khod'ko, L.P., Mishaeva, N.P. (1974): [Experimental study on infection in arthropods in relation to feeding on vertebrates with different viremic levels.] (en russe). In: Ecology of viruses associated with birds (Votyakov, V.I. & L'vov, D.K. Eds), Mater.Resp.Simp.Kamenyuki "Belovezh.Pushcha", Minsk. 38-41. Traduction T1305, NAMRU 3, Le Caire, Egypte. 3 p.
- 145 Kirsch, M., Ruben, F.L., Steere, A.C., Duray, P.H., Norden, C.W., Winkelstein, A. (1988): Fatal adult respiratory distress syndrome in a patient with Lyme disease. JAMA 259: (18): 2737-2739.

- 146 Knecht, D.A., Dimond, R.L. (1984): Visualization of antigenic proteins on Western blots. *Analytical biochemistry*, 136: 180-184.
- 147 Kocianova, E., Kozuch, O. (1988): A contribution to the parasite fauna in winter nests of the common mole (*Talpa europaea* L.) and incidence of its infection with tick-borne encephalitis virus (TBE) and Rickettsia *Caxiella burnetii*. *Folia Parasit.* 35: 175-180.
- 148 Kopecky, J., Krivanec, K., Tomkova, E. (1991): Attenuated temperature-sensitive mutants of tick-borne encephalitis (TBE) virus isolated from natural focus. In: *Modern Acarology*. (Eds. F. Dusbabek and V. Bukva.) Academia, Prague and SPB Academic Publishing bv, The Hague, Vol.2: 11-19.
- 149 Kopecky, J., Tomkova, E., Krivanec, K. (1991): Identification of tick-borne encephalitis (TBE) virus using monoclonal antibodies and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In: *Modern Acarology*. (Eds. F. Dusbabek and V. Bukva.) Academia, Prague and SPB Academic Publishing bv, The Hague. Vol.2: 21-28.
- 150 Korenberg, E. (1974): Some contemporary aspects of natural focality and epidemiology of tick-borne encephalitis. *Folia Parasitol. (Praha)* 23: 357-366.
- 151 Korenberg, E.I., Shcherbakov, S.V., Bannova, G.G., Levin, M.L., Karavanov, A.S. (1990): Simultaneous infection of *Ixodes persulcatus* ticks with agents of Lyme's disease and tick-borne encephalitis (en russe; résumé en anglais). *Parazitologija*. 24 (2): 102-105.
- 152 Körting, H.J. (1981): Problems of diagnosis and epidemiology of tick-borne encephalitis. In: *Tick-Borne Encephalitis. Internat. Symp. Baden/Vienna 1979*. Facultas Verlag Wien. 247-250.
- 153 Kozuch, O., Grulich, I., Nosek, J. (1966): Serological survey and isolation of tick-borne encephalitis virus from the blood of the mole (*Talpa europaea*) in a natural focus. *Acta Virol.* 10: 557-560.
- 154 Kozuch, O., Labuda, M., Lysy, J., Weismann, P., Krippel, E. (1990): Longitudinal study of natural foci of Central European encephalitis virus in West Slovakia. *Acta Virol. (Praha)*. 34 (6): 537-544.
- 155 Kozuch, O., Mayer, V., Nosek, J. (1970): Quantitative study on tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. *Acta Virol.* 14: 53-58.
- 156 Kozuch, O., Nosek, J. (1964): Alimentary infection of the hedgehog with tick-borne encephalitis (TE) virus. *Acta Virol.* 8: 284.
- 157 Kozuch, O., Nosek, J. (1971): Transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks. *Acta Virol.* 15: 334.
- 158 Kozuch, O., Nosek, J. (1980): Experimental transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Haemaphysalis concinna* ticks (letter). *Acta Virol. (Praha)* 24 (5): 377.

- 159 Kozuch, O., Nosek, J., Ernek, E., Lichard, M., Albrecht, P. (1963): Persistence of tick-borne encephalitis virus in hibernating hedgehogs and dormice. *Acta Virol.* 7 (5): 430-433.
- 160 Kozuch, O., Nosek, J., Lichard, M., Chmela, J., Ernek, E. (1967): Transmission of the tick-borne encephalitis virus with nymphs of *Ixodes ricinus* and *Haemaphysalis inermis* to the common shrew, *Sorex araneus*. *Acta Virol.* 11: 256-259.
- 161 Kraigher, A., Avsic-Zupanc, T., Kovacevic, M., Matjasic, M., Maticic, M. (1991): Tick-borne encephalitis in Slovenia. *Ellipse.* 29:462-463.
- 162 Krausler, J. (1981): 23 years of TBE in the district of Neunkirchen (Austria). In: Tick-Borne Encephalitis. Internat. Symp. Baden/Vienna 1979. Facultas Verlag Wien. 6-12.
- 163 Krech, T. (1980): Die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in der Schweiz. Dissertation. Med. Fakultät Universität Bern.
- 164 Krech, T., Aberham, C., Risch, G., Kunz, C. (1992): Gefährdung der Bevölkerung in Liechtenstein durch das virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME). *Schweiz.med.Wschr.* 122 (34): 1242-1244.
- 165 Krech, U., Jung, F., Jung, M. (1969): Zentraleuropäische Zeckenzephalitis in der Schweiz. *Schweiz.med.Wschr.* 99: 282-285.
- 166 Kristoferitsch, W., Stanek, G., Kunz, C. (1986): Doppelinfektion mit Frühsommermeningoenzephalitis-(FSME)-Virus und *Borrelia burgdorferi*. *Dtsch.Med.Wschr.* 111 (22): 861-864.
- 167 Krivanec, K., Kopecky, J., Tomkova, E., Grubhoffer, L. (1988): Isolation of TBE virus from the tick *Ixodes hexagonus*. *Folia Parasit.* 35: 273-276.
- 168 Kucheruk, V.V., Rosicky, B. (1983): Diseases with natural foci: basic terms and concepts. *J.Hyg.Epidemiol.Microbiol.Immunol.* 27 (4): 353-364.
- 169 Kunz, Ch. (1991): The impact of a mass vaccination campaign on tick-borne encephalitis in Austria (Abstract). 2nd Int.Symp. on tick-borne encephalitis, Baden, 6-7 June 1991.
- 170 Labuda, L., Jones, L.D., Williams, T., Danielova, V., Nuttall, P.A. (1993): Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks. *J.Med.Entomol.* 30 (1): 295-299.
- 171 Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- 172 Lakos, A. (1989): Lyme borreliosis in Hungary: the first three years. In: Lyme Borreliosis II, Zbl.Bakt. Suppl. 18. (Ed. Stanek). Gustav Fischer. 55-59.
- 173 Landbo, A.S., Flöng, P.T. (1992): *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes ricinus* from habitats in Denmark. *Med.Vet.Entomol.* 6: 165-167.

- 174 Lane, R.S., Burgdorfer, W. (1988): Spirochetes in mammals and ticks (Acari: Ixodidae) from a focus of Lyme borreliosis in California. *J.Wildlife.Dis.* 24: 1-9.
- 175 Lane, R.S., Piesman, J., Burgdorfer, W. (1991): Lyme borreliosis: relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe. *Ann.Rev.Entomol.* 36: 587-609.
- 176 Laperrouza, C. (1985): La borréliose de Burgdorfer ou maladie de Lyme: expérience en zone endémique. *Méd. et Hyg.* 43 (1625): 2885-2896.
- 177 Leary, J.J., Brigati, D.J., Ward, D.C. (1983): Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 80: 4045-4049.
- 178 Lebech, A.-M., Hansen, K. (1992): Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples and cerebrospinal fluid samples from patients with early and late Lyme neuroborreliosis by Polymerase Chain Reaction. *J.Clin.Microbiol.* 30 (7): 1646-1653.
- 179 Lefevre, A., Ramon, A., Clement, J., Lievens, L., Vranckx, W., Maes, L., Krueger, G.R.F., Fain, A., Ackermann, R. (1990): Die seroprevalentie van Lyme Borreliose in Belgische Militairen. Een prospectieve vergelijkende studie tussen twee risicogroepen met een zelf ontwikkelde ELISA-test. *Ann.Med.Mil.Belg.* 4 (4): 171-177.
- 180 Lennhoff, C. (1948): Spirochaetes in aetiologically obscure diseases. *Acta Derm.Venerol.* 28: 295-324.
- 181 Libikova, H. (1969): Virus der Zeckenencephalitis. Biologische Kenntnisse und ihre praktische Anwendung. Verlag der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Bratislava. 339 p.
- 182 Libikova, H., Albrecht, P. (1959): [Pathogenicity of TBE virus isolated from *Dermacentor marginatus* for some laboratory, domestic and wild animals in Slovakia.] (en slovaque). *Vet.Cas.* 8: 461-469.
- 183 Lichard, M., Kozuch, O. (1967): Persistence of tick-borne encephalitis virus in nymphs and adults of *Ixodes arboricola* and its transmission to white mice. *Acta Virol.* 11: 480.
- 184 Liebisch, A., Olbrich, S., Brand, A., Liebisch, G., Mouretou-Kunitz, M. (1989): Natürliche Infektionen der Zeckenart *Ixodes hexagonus* mit Borrelien (*Borrelia burgdorferi*). *Tierärztl. Umsch.* 44: 809-810.
- 185 Lienhard, R. (1989): Vaccination de lapins contre les tiques *Rhipicephalus appendiculatus*. Mémoire de licence. Faculté des Sciences, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.
- 186 Likar, M., Kmet, J. (1956): Virus meningoencephalitis in Slovenia. IV. Isolation of the virus from the ticks *Ixodes ricinus*. *Bull.W.H.O.* 15: 275-279.

- 187 Lindsay, L.R., Barker, I.K., Surgeoner, G.A., McEwen, S.A., Elliott, L.A., Kolar, J. (1991): Apparent incompetence of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and fleas (Insecta: Siphonaptera) as vectors of *Borrelia burgdorferi* in an *Ixodes dammini* endemic area of Ontario, Canada. *J.Med.Entomol.* 28 (5): 750-753.
- 188 Lipschütz, B. (1913): Über die seltene Erythemform (Erythema chronicum migrans). *Arch.Dermatol.Syphilol.* 118: 349.
- 189 Lortholary, O., Dupont, B., Eliaszewicz, M., Chippaux, A., Rodhain, F. (1992): Meningoradiculitis due to Tickborne Encephalitis Virus in France. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 11: 954-956.
- 190 Luger, S.W.(1990): Lyme disease transmitted by a biting fly (letter). *N.Engl.J.Med.* 322: (24): 1752.
- 191 Magnarelli, L.A., Anderson, J.F. (1988) : Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*. *J.Clin.Microbiol.* 26 (8): 1482-1486.
- 192 Magnarelli, L.A., Anderson, J.F., Barbour, A.G. (1986): The etiologic agent of Lyme disease in deer flies, horse flies and mosquitoes. *J.Infect.Dis.* 154 (2): 355-358.
- 193 Magnarelli, L.A., Freier, J.E., Anderson, J.F. (1987): Experimental infections of mosquitoes with *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. *J.Infect.Dis.* 156 (4): 694-695.
- 194 Malkova, D., Smetana, A., Fischer, S., Marhoul, Z. (1965): Course of infection of *Clethrionomys glareolus* and white mice with tick-borne encephalitis virus freshly isolated from *Ixodes ricinus* ticks. *Acta Virol.* 9: 367-374.
- 195 Mandl, C.W., Heinz, F.X., Kunz, Ch. (1988): Sequence of the structural proteins of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis with other flaviviruses. *Virology* 166: 197-205.
- 196 Marcus, L.C., Steere, A.C., Duray, P.H., Anderson, A.E., Mahoney, E.B. (1985): Fatal pancarditis in a patient with coexistent Lyme disease and babesiosis. *Aon.Intern.Med.* 103: 374-376.
- 197 Matile, H. (1982): Etudes virologiques et épidémiologiques sur l'encéphalite à tiques en Suisse. Thèse. Faculté des Sciences, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.
- 198 Matile, H., Aeschlimann, A., Wyler, R. (1981): Seroepidemiologic investigations on the incidence of TBE in man and dog in Switzerland. 11: Tick-Borne Encephalitis. Internat. Symp. Baden/Vienna 1979., Facultas Verlag Wien. 227-234.

- 199 Matile, H., Ferrari, E., Aeschlimann, A., Wyler, R. (1981): Die Verbreitung der Zecken-Enzephalitis in der Schweiz. Ein Versuch zur Erstellung eines Katasters der Naturherde aufgrund einer seroepidemiologischen Untersuchung des Forstpersonals im Mittelland. *Schweiz.med.Wschr.* 111: (35): 1262-1269.
- 200 McNeil, J.G., Lednar, W.M., Stansfield, S.K., Prier, R.E., Miller, R.N. (1985): Central European tick-borne encephalitis: assessment of risk for persons in the armed services and vacationers (letter). *J.Infect.Dis.* 152 (3): 650-651.
- 201 Mehl, R., Bjerknes, T., Sandven, P., Vandvik, B. (1989): *Borrelia burgdorferi* i skogflatt *Ixodes ricinus* i Norge. *Fauna Norv.Ser.B.* 36: 87.
- 202 Mermod, C., Aeschlimann, A., Graf, J.F. (1975): Ecologie et éthologie d'*Ixodes ricinus* L. en Suisse. 4ème note: comparaison de deux populations d'altitude différente. *Acarologia* 17 (3): 442-451.
- 203 Miserez, V. (1988): *Borrelia burgdorferi* au Tessin. Enquêtes épidémiologique et sérologique. Mémoire de licence. Faculté des Sciences, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.
- 204 Miserez, V., Gern, L., Aeschlimann, A. (1990): *Borrelia burgdorferi* in ticks in the canton Tessin (Switzerland). *Parassitologia.* 32: 293-299.
- 205 MMWR (1989): Lyme disease - United States, 1987 and 1988. *MMWR.* 38 (39): 668-672.
- 206 Molnar, E., Gresikova, M., Kubaszova, T., Kubiny, L., Szabo, J.B. (1973): Arboviruses in Hungary. *J.Hyg.Epidemiol.Microbiol.Immunol.* 17: 1-10.
- 207 Morel, P.C. (1965): Les tiques d'Afrique et du bassin méditerranéen. Maisons-Alfort (I.E.M.V.T.). Document polycopié. 1342 p.
- 208 Moritsch, H., Krausler, J. (1957): Die endemische Frühsommer-Meningo-Enzephalo-Myelitis im Wiener Becken ("Schneidersche Krankheit"). *Wien.Klin.Wschr.* 69: 921-926, 961-965, 965-970.
- 209 Muhlemann, M.F., Wright, D.J.M. (1987): Emerging pattern of Lyme disease in the United Kingdom and Irish Republic. *Lancet.* 1 (8527): 260-262.
- 210 Münchhoff, P., Wilske, B., Preac-Mursic, V., Schierz, G. (1986): Antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Bavarian forest workers. *Zbl.Bakt.Hyg.A.* 263: 412-419.
- 211 Munzinger, J., Märki, H., Modde, H., Hiltbold, P., Schneider, M., Henn, V., Wyler, R. (1977): Seroepidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen der Zeckenzephalitis-Virus-Infektion in der Schweiz. *Schweiz.Rundsch.Med.Prax* 66: 968-972.
- 212 Nadal, D., Wunderli, W., Briner, H., Hansen, K. (1989): Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in forestry workers and blood donors from the same region in Switzerland. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 8: 992-995.

- 213 Nakao, M., Miyamoto, K., Uchikawa, K., Fujita, H. (1992): Characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus* ticks in Japan. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 47 (4): 505-511.
- 214 Need, J.T., Escamilla, J. (1991): Lyme disease in South America? *J.Infect.Dis.* 163: 681-682.
- 215 Neubert, U., Münchhoff, P., Völker, B., Reimers, C.D., Pflüger, K.H. (1988): *Borrelia burgdorferi* in Bavarian forest workers. A follow-up study. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 539: 476-479.
- 216 Norris, S.J., Carjer, C.J., Howell, J.K., Barbour, A.G. (1992): Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect.Immun.* 60: 4662-4672.
- 217 Nosek, J. (1972): The ecology and public health importance of *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks in central Europe. *Folia Parasitol. (Praha)*. 19: 93-102.
- 218 Nosek, J., Chunikhin, S.P., Gresikova, M., Korolev, M.B., Kozuch, O., Stefutkina, L.F., Ivannikova, T.I. (1986): Peculiarities of tick-borne encephalitis virus reproduction in *Haemaphysalis inermis* ticks and their explants. *Acta Virol.* 30 (5): 396-401.
- 219 Nosek, J., Ciampor, F., Kozuch, O., Rajcani, J. (1972): Localization of tick-borne encephalitis virus in alveolar cells of salivary glands of *Dermacentor marginatus* and *Haemaphysalis inermis* ticks. *Acta Virol.* 16: 493-497.
- 220 Nosek, J., Gresikova, M., Rehacek, J. (1961): Persistence of tick-borne encephalitis virus in hibernating bats. *Acta Virol.* 5: 112-116.
- 221 Nosek, J., Grulich, I. (1967): The relationship between the tick-borne encephalitis virus and the ticks and mammals of the Tribec mountain range. *Bull.W.H.O.* 36 (Suppl. 1): 31-47.
- 222 Nosek, J., Kozuch, O., Ernek, E., Lichard, M. (1967): Übertragung des Zeckenzephalitis Virus (TBE) durch die Weibchen von *Ixodes ricinus* und Nymphen *Haemaphysalis inermis* auf die Rehkitzen (*Capreolus capreolus*). *Zbl.Bakt.I.Orig.* 203: 162-166.
- 223 Nosek, J., Kozuch, O., Lichard, M. (1967): Persistence of tick-borne encephalitis virus in, and its transmission by *Haemaphysalis spinigera* and *H. turturis* ticks. *Acta Virol.* 11: 479.
- 224 Office fédéral de la santé publique (1990): Encéphalite à tiques. *Bull. OFSP* 16: 227.
- 225 Oksi, J., Viljanen, M.K., Kalimo, H., Peltonen, R., Marttila, R., Salomaa, P., Nikoskelainen, J., Budka, H., Halonen, P. (1993): Fatal encephalitis caused by concomitant infection with tick-borne encephalitis virus and *Borrelia burgdorferi*. *Clin.Infect.Dis.* 16 (3): 392-396.

- 226 Oliver, J.H. Jr, Owsley, M.R., Hutcheson, H.J., James, A.M., Chen, C., Irby, W.S., Dotson, E.M., McLain, D.K. (1993): Conspicuity of the ticks *Ixodes scapularis* and *I. dammini* (Acari: Ixodidae). *J.Med.Entomol.* **30** (1): 54-63.
- 227 Olsén, B., Jaenson, T.G.T., Noppa, L., Bunikis, J., Bergström, S. (1993): A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks (letter). *Nature.* **362**: 340.
- 228 Pachner, A.R., Ricalton, N., Delaney, E. (1993): Comparison of Polymerase Chain Reaction with culture and serology for diagnosis of murine experimental Lyme borreliosis. *J.Clin.Microbiol.* **31** (2): 208-214.
- 229 Pachner, A.R., Steere, A.C. (1986): CNS manifestations of third stage Lyme disease. *Zbl.Bakt.Hyg.A* **263**: 301-306.
- 230 Panov, A.G. (1956): [Tick-borne encephalitis.] (en russe). Leningrad, Medgiz.
- 231 Pattyn, S.R., Wyler, R. (1954): Méningo-encéphalite à virus en Autriche. 4. La virémie dans l'infection expérimentale. Essais de transmission par les moustiques. *Bull.W.H.O.* **12**: 581-589.
- 232 Paul, H., Ackermann, R., Gerth, H.J. (1989): Infection and manifestation rate of European Lyme borreliosis in humans. In: Lyme Borreliosis II, *Zbl.Bakt., Suppl. 18*. (Ed. Stanek). Gustav Fischer. 44-49.
- 233 Paul, H., Gerth, H.-J., Ackermann, R. (1986): Infectiousness for humans of *Ixodes ricinus* containing *Borrelia burgdorferi*. *Zbl.Bakt.Hyg.A* **263**: 473-476.
- 234 Pavlov, P., Daniel, M., Georgiev, B., Kolmann, J.M., Rashev, K.H., Arnaudov, D., Ignatov, D. (1972): The natural focus of tickborne encephalitis of sheep and man in the Rhodope mountains (Bulgaria). *Folia Parasitol. (Praha)* **19**: 33-40.
- 235 Peacock, M., Burgdorfer, W., Ormsbee, R.-A. (1971): Rapid fluorescent-antibody conjugation procedure. *Am.Soc.Microbiol.* **3** (2): 355-357.
- 236 Pejcoch, M., Kralikova, Z., Strnad, P., Stanek, G. (1989): Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in forestry workers of south Moravia. In: Lyme Borreliosis II, *Zbl.Bakt., Suppl. 18*. (Ed. Stanek). Gustav Fischer. 317-320.
- 237 Perez-Eid, C. (1990): Les relations tiques-petits mammifères dans le foyer alsacien d'encéphalite à tiques. *Acarologia.* **31** (2): 131-141.
- 238 Perez-Eid, C., Hannoun, C., Rodhain, F. (1992): The Alsatian tick-borne encephalitis focus: presence of the virus among ticks and small mammals. *Eur.J.Epidemiol.* **8** (2): 178-186.
- 239 Persing, D.H., Telford, S.R., Spielman, A., Barthold, S.W. (1990). Detection of *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes dammini* ticks with the polymerase chain reaction. *J.Clin.Microbiol.* **28** (3): 566-572.

- 240 Péter, O. (1990): Lyme Borreliosis in the state of Valais, Switzerland. *JIFCC*. 2 (3): 121-124.
- 241 Péter, O., Burgdorfer, W., Aeschlimann, A. (1981): Enquête épidémiologique dans un foyer naturel de rickettsies à *Ixodes ricinus* du Plateau suisse. *Ann.Parasitol.* 26 (1): 1-8.
- 242 Pfister, K., Roesti, A., Boss, P.H., Balsiger, B. (1987): *Ehrlichia phagocytophila* als Erreger des "Weidefiebers" in Berner Oberland. *Schweiz.Arch.Tierheilk.* 129: 343-347.
- 243 Pick, P.J. (1895): Ueber eine neue Krankheit "Erythromelie". *Verh.Ges.Dtsch.Naturf.66.Verslg.Wien.*, 1894. II. P336. Leipzig.
- 244 Piesman, J., Mather, T.N., Sinsky, R.J., Spielman, A. (1987): Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J.Clin.Microbiol.* 25 (3): 557-558.
- 245 Piesman, J., Maupin, G.O., Campos, E.G., Happ, C.M. (1991): Duration of adult female *Ixodes dammini* attachment and transmission of *Borrelia burgdorferi*, with description of a needle aspiration isolation method. *J.Infect.Dis.* 163: 895-897.
- 246 Piesman, J., Sinsky, R.J. (1988): Ability of *Ixodes scapularis*, *Dermacentor variabilis*, and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) to acquire, maintain and transmit Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *J.Med.Entomol.* 25 (5): 336-339.
- 247 Pogodina, V.V., Frolova, M.V., Erman, B.A. (Eds) (1986): [Chronic tick-borne encephalitis; aetiology, immunology, pathogenesis.] (en russe). Publ. House Nauka, Novosibirsk. 234 p.
- 248 Pospisil, L., Jandasek, L., Pesek, J. (1954): [Isolation of new strains of meningoencephalitis virus in Brno region in summer 1953.] (en tchèque). *Lek.Listy.* 2: 3.
- 249 Pretzmann, G., Radda, A., Loew, J. (1967): Die Verteilung virustragender Zecken in Naturherden der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME = CEE). *Zbl.Bakt.I.Orig.* 203 (1): 30-46.
- 250 Przesmycki, F., Taytsch, Z., Wroblewska, Z., Lachmayer, J. (1960): Investigation of encephalitis in the "Puszcza Bialowieska" natural park. *J.Infect.Dis.* 106: 276-283.
- 251 Radda, A. (1969): Virämie bei einigen heimischen Karnivoren nach Infektion mit Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME)-Virus durch Zecken. *Zbl.Bakt.Hyg.I.Abh.Orig.* 209 (4): 464-469.
- 252 Radda, A., Hofmann, H., Pretzmann, G. (1969): Threshold of viraemia in *Apodemus flavicollis* for infection of *Ixodes ricinus* with tick-borne encephalitis virus. *Acta Virol.* 13: 74-77.

- 253 Radda, A., Schmidke, W., Wandeler, A. (1974): Virus der Fröhsummer-Meningo-Enzephalitis. Nachweis des Virus der Fröhsummer-Meningo-Enzephalitis in *Ixodes ricinus* aus dem Kanton Zürich. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig. 229: 268-272.
- 254 Rajcani, J., Nosek, J., Kozuch, O., Waltinger, H. (1976): Reaction of the host to the tick-bite. II. Distribution of tick borne encephalitis virus in sucking ticks. Zbl.Bakt.Hyg.I.Orig.A. 236: 1-9.
- 255 Rampas, J., Gallia, F. (1949): [Isolation of encephalitis virus from *Ixodes ricinus* ticks] (en tchèque). Cas.Lék.Cesk. 88: 1179-1180.
- 256 Rawlings, J.A. (1986): Lyme disease in Texas. Zbl.Bakt.Hyg.A. 263: 483-487.
- 257 Rehacek, J. (1961): Transmission of tick-borne encephalitis virus by fleas. J.Hyg.Epidemiol.Microbiol.Immunol. 5: 282-285.
- 258 Rehacek, J. (1961): (Discussion). Proc.Symp.Biology of viruses of the tick-borne encephalitis complex, Smolenice, 1960 (Ed. H. Libikova). 418-419.
- 259 Rehacek, J. (1962): Transovarial transmission of tick-borne encephalitis virus by ticks. Acta Virol. 6 (3): 220-226.
- 260 Rehacek, J., et al (1986): Hard ticks in Slovakia as vectors of *Borrelia burgdorferi*. 9th Int.Congr.Infect.Parasit.Dis., München, 20-26 July, 1986. No 1261.
- 261 Rehacek, J., Gresikova, M., Nosek, J., Albrecht, P. (1963): Experimental infection of the buzzard (*Buteo buteo* L.) and kestrel (*Falco tinnunculus* L.) with TBE-virus. J.Hyg.Epidemiol.Microbiol. 7: 145-150.
- 262 Rehse-Küpper, B., Danielova, V., Klenk, W., Abar, B., Ackermann, R. (1978): Isolierung von Virus der Zentraleuropäischen Enzephalitis (Tick-borne encephalitis) aus *Ixodes ricinus* (L.) in Süddeutschland. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig. 242 (2): 148-155.
- 263 Reid, H.W. (1975): Experimental infection of red grouse with Louping-ill virus (Flavivirus group). I. The viraemia and antibody response. J.Path. 85: 223-229.
- 264 Reid, H.W. (1988): Louping-III. In: The Arboviruses: epidemiology and ecology, Vol. III, (Ed. T.P. Monath). Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc.
- 265 Ribeiro, J.M.C., Mather, T.N., Piesman, J., Spielman, A. (1987): Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). J.Med.Entomol. 24: 201-205.
- 266 Richling, E. (1955): Virus meningoencephalitis in Austria. I. Epidemiological features. Bull.W.H.O. 12: 521-534.

- 267 Riedl, H., Kozuch, O., Sixl, W., Schmeller, E., Nosek, J. (1971): Isolierung des Zeckenezephalitis Virus (TBE-Virus) aus der Zecke *Haemaphysalis concinna* Koch. Arch.Hyg.Bact. 154: 610-611.
- 268 Robert, D.-E. (1991): Problème du sérodiagnostic IgM de la Maladie de Lyme: mise au point d'un Test de Capture IgM. Mémoire de licence. Faculté des Sciences, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.
- 269 Rockstroh, T., Mochmann, H., Stanek, G. (1989): Lyme borreliosis by contact infection, a case report. In: Lyme Borreliosis II, Zbl.Bakt. Suppl. 18. (Ed. Stanek). Gustav Fischer. 40-41.
- 270 Rousselle, C., Floret, D., Cochat, P., Reignier, F., Wright, C. (1989): Encéphalite aiguë à *Borrelia burgdorferi* (maladie de Lyme) chez un enfant algérien. Pédiatrie. 44 (4): 265-269.
- 271 Ryder, J.W., Pinger, R.R., Glancy, T. (1992): Inability of *Ixodes cookei* and *Amblyomma americanum* nymphs (Acari: Ixodidae) to transmit *Borrelia burgdorferi*. J.Med.Entomol. 29 (3): 525-530.
- 272 Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350.
- 273 Satz, N., Ackermann, R., Gern, L., Aeschlimann, A., Ott, A., Knoblauch, M. (1988): Zur Epidemiologie der Infektion mit *Borrelia burgdorferi*. Schweiz.med.Wschr. 118: 422-426.
- 274 Saucy, F. (1988): Dynamique de population, dispersion et organisation sociale de la forme fouisseuse du campagnol terrestre (*Arvicola terrestris* Scherman (Shaw), Mammalia, Rodentia). Thèse. Faculté des Sciences, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.
- 275 Schafrank, S.N., Kurban, A.K., Martone, G. (1990): Lyme disease acquired in southeast Africa (letter). Arch.Dermatol. 126 (5): 685-686.
- 276 Schauman, K., Kovanen, J., Seppälä, I. (1989): Lyme borreliosis in Finland in 1986-1988. Biomed.Pharmacother. 43: 427-430.
- 277 Schindler, R., Krampitz, H.E. (1964): Über Unterschiede in der Empfänglichkeit verschiedener Mausstämme und -arten gegenüber dem Virus der FSME. Zschr.Tropenmed.Parasit. 15: 29-37.
- 278 Schlesinger, P.A., Duray, P.H., Burke, B.A., Steere, A.C., Stillmann, M.T. (1985): Maternal-fetal transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. Ann.Intern.Med. 103 (1): 67-68.
- 279 Schmidt, R., Kabatzki, J., Hartung, S., Ackermann, R. (1985): Erythema-migrans-Borreliose in der Bundesrepublik Deutschland. Dtsch.Med.Wschr. 110: 1803-1807.

- 280 Schmidt, R., Kabatzki, J., Hartung, S., Ackermann, R. (1986): Erythema chronicum migrans disease in the Federal Republic of Germany. *Zbl.Bakt.Hyg.A.* 263: 435-441.
- 281 Schmidtke, W. (1973): Isolierung des Virus der Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME) aus Zecken und Nachweis von Antikörpern gegen dieses Virus in Seren von Menschen und Weidetieren in der Region Schaffhausen. Dissertation. Vet. Med. Fakultät der Universität Zürich.
- 282 Schmutzhard, E., Berek, K., Pfausler, B. (1991): Clinical picture of tick-borne encephalitis (Abstract). 2nd Int.Symp. on tick-borne encephalitis, Baden, 6-7 June 1991.
- 283 Schmutzhard, E., Stanek, G., Pletschette, M., Hirschl, A.M., Pallua, A., Schmitzberger, R., Schlögl, R. (1988): Infections following tickbites. Tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis - a prospective epidemiological study from Tyrol. *Infection.* 16 (5): 269-272.
- 284 Schneider, H. (1931): Über epidemische akute "Meningitis serosa". *Wien.Klin.Wschr.* 44: 350-352.
- 285 Schönherr, U., Strle, F. (1993): Ocular manifestations. In: Aspects of Lyme Borreliosis. (Eds K.Weber, W.Burgdorfer), Springer-Verlag. 248-258.
- 286 Schwartz, B.S., Goldstein, M.D.(1990): Lyme disease in outdoor workers: risk factors, preventive measures, and tick removal methods. *Am.J.Epidemiol.* 131 (5): 877-885.
- 287 Scrimenti, R. (1970) : Erythema chronicum migrans. *Arch.Dermatol.* 102: 104-105.
- 288 Shiu, S.Y.W., Ayres, M.D., Gould, E.A. (1991): Genomic sequence of the structural proteins of Louping ill virus: comparative analysis with tick-borne encephalitis virus. *Virology* 180 (1): 411-415.
- 289 Siegenthaler, M. (1992): Evolution de l'infection par *Borrelia burgdorferi* chez les rongeurs et étude quantitative de la transmission spirochétienne au vecteur *Ixodes ricinus*. Mémoire de licence. Faculté des Sciences, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.
- 290 Sixl, W., Batikova, M., Stünzner, D., Sekeyova, M., Sixl-Voigt, B., Gresikova, M. (1973): Haemagglutination-inhibiting antibodies against arboviruses in animal sera, collected in some regions in Austria II. *Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A.* 224: 303-308.
- 291 Sixl, W., Stunzner, D., Withalm, H., Kock, M. (1989): Rare transmission mode of FSME (tick-borne encephalitis) by goat's milk. *Geogr.Med. Suppl.* 2: 11-14.
- 292 Smetana, A. (1955): On the transmission of tick-borne encephalitis virus by fleas. *Acta Virol.* 2: 375.

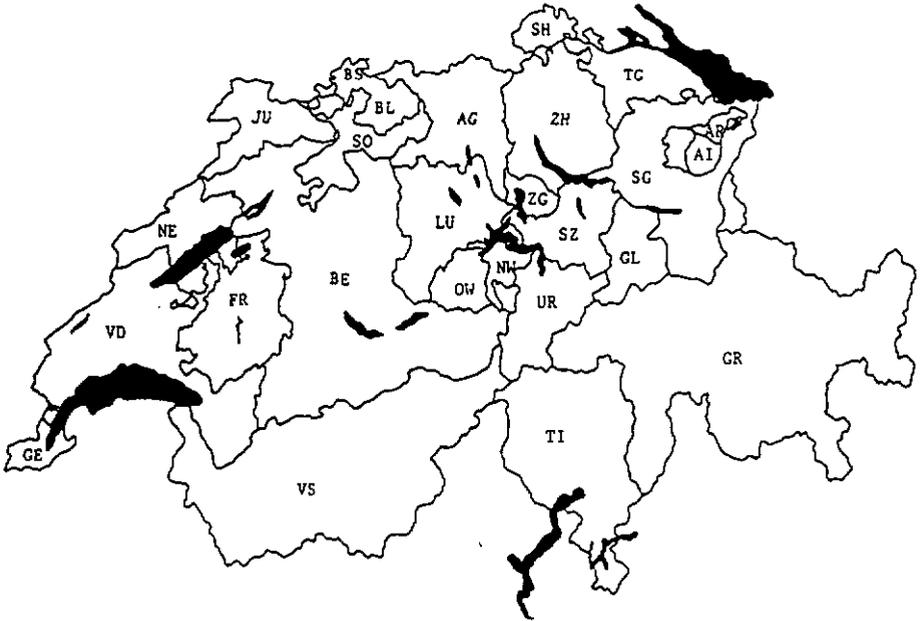
- 293 Spiess, H., Mumenthaler, M., Burkhardt, S., Keller, H. (1969): Zentraleuropäische Enzephalitis (Zeckenenzephalitis) in der Schweiz. *Schweiz.med.Wschr.* 99: 277-282.
- 294 Stanek, G., Prinz, A., Wewalka, G., Hirschl, A.M., Kebela-Ilunga. (1989): Lyme borreliosis in Central Africa. In: *Lyme Borreliosis II, Zbl.Bakt. Suppl.* 18. (Ed. Stanek). Gustav Fischer. 77-81.
- 295 Stanek, G., Satz, N., Strle, F., Wilske, B. (1993): Epidemiology of Lyme Borreliosis. In: *Aspects of Lyme Borreliosis*. (Eds K. Weber, W. Burgdorfer). Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. 358-370.
- 296 Steere, A.C., Bartenhagen, N.H., Craft, J.E., Hutchinson, G.J., Newman, J.H., Pachner, A.R., Rahn, D.W., Sigal, L.H., Taylor, E., Malawista, S.E. (1986): Clinical manifestations of Lyme disease. *Zbl.Bakt.Hyg.A.* 263: 201-205.
- 297 Steere, A.C., Broderick, T.F., Malawista, S.E.(1978): Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector. *Am.J.Epidemiol.* 108 (4): 312-321.
- 298 Steere, A.C., Grodzicki, R.L., Kornblatt, A.N., Craft, J.E., Barbour, A.G., Burgdorfer, W., Schmid, G.P., Johnson, E., Malawista, S.E. (1983): The spirochetal etiology of Lyme disease. *N.Engl.J.Med.* 308: 733-739.
- 299 Steere, A.C., Malawista, S.E., Snyderman, D.R., Shope, R.E., Andiman, W.A., Ross, M.R., Steele, F.M. (1977): Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthr.and Rheum.* 20 (1): 7-17.
- 300 Streissle, G. (1960): Untersuchungen zur Übertragung des Virus der Fröhsommer-Meningo-Enzephalitis durch die Zecke *Ixodes hexagonus* Leach. *Zbl.Bakt.Parasitenk.Orig.* 179 (3): 289-297.
- 301 Streissle, G. (1961): Versuche zur Übertragung des Virus der Fröhsommer-Meningoenzephalitis (FSME) durch Lederzecken. *Zbl.Bakt.Hyg.1.Abt.Orig.* 182: 159-167.
- 302 Strle, F., Pejovnik-Pustinek, A., Stanek, G., Pleterski, D., Rakar, R. (1989): Lyme borreliosis in Slovenia in 1986. In: *Lyme Borreliosis II, Zbl.Bakt. Suppl.* 18. (Ed. Stanek). Gustav Fischer. 50-54.
- 303 Süß, J., Sinnecker, H., Sinnecker, R., Berndt, D., Zilske, E., Dedek, G., Apitzsch, L. (1992): Epidemiology and ecology of tick-borne encephalitis in the eastern part of Germany between 1960 and 1990 and studies on the dynamics of a natural focus of tick-borne encephalitis. *Int.J.Med.Microbiol.Virol.Parasitol.Infect.Dis.* 277 (2): 224-235.
- 304 Svartz, N. (1946): Penicillin behandling vid dermatitis atrophicans Herxheimer. *Nord.Med.* 32: 2783.

- 305 Telford, S.R., Spielman, A. (1989): Competence of a rabbit-feeding *Ixodes* (Acari: Ixodidae) as a vector of the Lyme disease spirochete. *J.Med.Entomol.* **26**: 118-121.
- 306 Telford III, S.R., Urioste, S.S., Spielman, A. (1992): Clustering of host-seeking nymphal deer ticks (*Ixodes dammini*) infected by Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **47** (1): 55-60.
- 307 van Tongeren, H.A.E., Richling, E.N., Wilterdink, J.B., Wyler, R. (1955): Serologische und epidemiologische Studien zur Meningoenzephalitis des Jahres 1954 in der Steiermark. *Wien.Med.Wschr.* **50**: 1046-1047.
- 308 Traavik, T., Mehl, R., Wiger, R. (1978): The first tick-borne encephalitis virus isolates from Norway. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.(B)*. **86** (4): 253-255.
- 309 Trape, J.F., Duplantier, J.M., Bouganali, H., Godeluck, B., Legros, F., Cornet, J.P., Camicas, J.L. (1991): Tick-borne borreliosis in West Africa. *Lancet.* **337** (8739): 473-475.
- 310 Trevisan, G., Crovato, F., Marcuccio, C., Fumarola, D., Scarpa, C. (1986): Lyme disease in Italy. *Zbl.Bakt.Hyg.A.* **263**: 459-463.
- 311 Trevisan, G., Magaton Rizzi, G., Cinco, M. (1988): Lyme disease in forestry workers in the Friuli-Venezia-Giulia region. (Abstract). VI. Internat. Congr. Zoonoses, Brno, 29.8-1.9.88. 6.15.
- 312 Turrian-Vittoz, N., Humair, P.-F. (1990): Importance du rôle de réservoirs des micromammifères et des oiseaux dans la borréliose de Lyme. Mémoire de licence. Faculté des Sciences, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.
- 313 Verani, P., Ciufolini, M.G., Nicoletti, L., Leoncini, F., Stefanelli, S., Bassetti, D., Balducci, M. (1991): The present knowledge on the distribution of TBE virus in Italy (Abstract). 2nd Int.Symp. on tick-borne encephalitis, Baden, 6-7 June 1991.
- 314 W.H.O. (1967): Les arbovirus et leur rôle dans la pathologie humaine. Rapport d'un groupe scientifique de l'OMS. Sér.Rapp.techn. No 369.
- 315 W.H.O. (1986): Tick-borne encephalitis and haemorrhagic fever with renal syndrome in Europe: report on a W.H.O. meeting, Baden, 3-5 October 1983. *EURO Reports and Studies* 104. 71 p.
- 316 W.H.O. (1989): Lyme borreliosis in Europe. WHO-workshop. Baden near Vienna, Austria; June 4th, 1987. In: *Lyme Borreliosis II*, *Zbl.Bakt., Suppl.* 18. (Ed. Stanek). Gustav Fischer.
- 317 Waldvogel, A., Matile, H., Wegmann, Ch., Wyler, R., Kunz, Ch. (1981): Zeckenenzephalitis beim Pferd. *Schweiz.Arch.Tierheilk.* **123**: 227-233.
- 318 Wandeler, A., Kunz, Ch., Steck, F. (1973): Beobachtungen über die Zentraleuropäische Zeckenenzephalitis in der Schweiz. *Path.Microbiol.* **39**: 35-36.

- 319 Wandeler, A., Steck, F., Fankhauser, R., Kammermann, B., Gresikova, M., Blaskovic, D. (1972): Isolierung des Virus der Zentraleuropäischen Zeckenzephalitis in der Schweiz. *Schweiz.Path.Microbiol.* **38**: 258-270.
- 320 Ward, U.K., Marriott, A.C., Both, T.F., el-Ghorr, A.A., Nuttall, P.A. (1990): Detection of an arbovirus in an invertebrate and a vertebrate host using the polymerase chain reaction. *J.Virol.Meth.* **30** (3): 291-300.
- 321 Weber, K., Schierz, G., Wilske, B., Neubert, U., Krampitz, H.E., Barbour, A.G., Burgdorfer, W. (1986): Reinfection in erythema migrans disease. *Infection.* **14**: 32-35.
- 322 Wenzl, J., Loew, J., Zukrigl, K. (1965): Zur Frage der Frühsommer-Meningo-Encephalitis (FSME) in Österreich. *Mitteilungen der Forstlichen Bundes-Versuchsanstalt Mariabrunn.* **67**: 88 p.
- 323 Westaway, E.G., Brinton, M.A., Gaidamovich, S.Ya., Horzinek, M.C., Igarasbi, A., Kääriäinen, L., Lvov, D.K., Porterfield, J.S., Russell, P.K., Trent, D.W. (1985): Flaviviridae. *Intervirology* **24**: 183-192.
- 324 Wiersbitzky, S. (1992): Bemerkung zur Leserbrief - R. Abshagen (Ludwigslust): "Doppelinfection *Borrelia burgdorferi* und FSME-Virus". *Kinderärztl.Praxis.* **60** (3): 103-104.
- 325 Wilske, B., Preac-Mursic, V., Jauris, S., Hofmann, A., Pradel, I., Soutschek, E., Schwab, E., Will, G., Wanner, G. (1993): Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect.Immun.* **61** (5): 2182-2191.
- 326 Wilske, B., Preac-Mursic, V., Schierz, G., Kühbeck, R., Barbour, A.G., Kramer, M.D. (1988): Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **593**: 123.
- 327 Wilske, B., Schierz, G., Preac-Mursic, V., Pfister, H.-W., Weber, K., von Busch, K., Baruschke, A. (1989): IgM- and IgG-immune responses to *Borrelia burgdorferi* in Erythema migrans and neuroborreliosis. *In: Lyme Borreliosis II, Zbl.Bakt., Suppl.* **18**. (Ed. Stanek). Gustav Fischer. 290-298.
- 328 Winward, K.E., Smith, J.L. (1989): Ocular disease in Caribbean patients with serologic evidence of Lyme borreliosis. *J.Clin.Neuro-Ophthalmol.* **9** (2): 65-70.
- 329 Wyler, R., Matile, H. (1984): Die Zeckenzephalitis in der Schweiz. *Institut für Virologie der Universität Zürich.* 88 p.
- 330 Wyler, R., Schmidtke, W., Kunz, Ch., Radda, A., Henn, V., Meyer, R. (1973): Zeckenzephalitis in der Region Schaffhausen: Isolierung des Virus aus Zecken und serologische Untersuchungen. *Schweiz.med.Wschr.* **103**: 1487-1492.

- 331 Yousfi-Monod, R., Aeschlimann, A. (1986): Recherches sur les tiques (Acarina: Ixodidae), parasites de bovidés dans l'ouest algérien. 1. Inventaire systématique et dynamique saisonnière. *Ann.Parasitol.Hum.Comp.* 61: 341-358.
- 332 von Zeipel, G. (1959): Isolation of viruses of the russian spring-summer encephalitis-louping-ill-group from swedish ticks and from a human case of meningoencephalitis. *Arch.gesamtc Virusforsch.* 9: 460-469.
- 333 Zhioua, E. (1993): Enquête séro-épidémiologique de la borréliose de Lyme chez une population suisse à risque (coureurs d'orientation). Thèse. Faculté des Sciences, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.
- 334 Zhioua, E., Gern, L., Aeschlimann, A. (1989): Isolement d'un spirochète à partir d'*Ixodes ricinus* de Tunisie. *Bull.Soc.fr.Parasitol.* 7 (1): 107-110.
- 335 Zhioua, E., Hu, Ch., Gern, L., Rais, O., Bouali, N., Aeschlimann, A. (1990): Sur une spirochétose à tique (Borréliose de Lyme?) dans le nord-ouest tunisien. (Abstract). *Congr.Aso.Epidémiol., Monastir, 1990.*
- 336 Zhioua, E., Monin, R., Gern, L., Aeschlimann, A. (1988): Infection of free-living life-stages of *Ixodes ricinus* with *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. *Zbl.Bakt.* 300: 293.
- 337 Zilber, R.L., Soloviev, V.D. (1946): Far Eastern tick-borne spring-summer (spring) encephalitis. *Am.Rev.Sovict.Med.* Special suppl. 80 p.
- 338 Zindel, W., Wyler, R. (1983): Zeckenezephalitis bei einer Ziege im untern Prättigau. *Schweiz.Arch.Tierheilk.* 125: 383-386.

ANNEXE 1: Les cantons de Suisse



AG	Argovie	NW	Niedwald
AI	Appenzell-Rhodes intérieures	OW	Obwald
AR	Appenzell-Rhodes extérieures	SG	St-Gall
BE	Berne	SH	Schaffhouse
BL	Bâle-campagne	SO	Soleure
BS	Bâle-ville	SZ	Schwyz
FR	Fribourg	TI	Tessin
GE	Genève	TG	Thurgovie
GL	Glaris	UR	Uri
GR	Grisons	VD	Vaud
JU	Jura	VS	Valais
LU	Lucerne	ZH	Zürich
NE	Neuchâtel	ZG	Zoug

ANNEXE 2-1: Questionnaire à l'intention des forestiers, cantonniers et donneurs de sang (version française).

ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA BORRELIOSSE DE LYME ET DE L'ENCEPHALITE A TIQUES EN SUISSE

Toutes les informations seront traitées confidentiellement

A remplir en caractères d'imprimerie svp

NOM -----	PRENOM -----
SEXE-----	DATE DE NAISSANCE -----
PROFESSION-----	ADRESSE -----
LOCALITE-----	N° DE TELEPHONE -----

Cochez la case correspondante:

1. Etes-vous en forêt au moins 1/2-heure par semaine?
NON
OUI pour le travail
OUI pour les loisirs
(promenades, sorties de chiens, jogging, camping, etc.)
2. Si OUI, combien d'heures par semaine passez-vous en forêt?
1 heure 2-5 6-10 plus de 10
3. Depuis combien de temps allez-vous régulièrement en forêt?
1-2 ans 3-5 6-10 plus de 10
4. Nom de la forêt ou de la région où vous avez vos loisirs /
où vous travaillez:

5. Aviez-vous vos loisirs / travailliez-vous auparavant dans
une autre région?
NON OUI
Si OUI, où: -----
combien de temps:-----
jusqu'à quand:-----

voir au verso

6. Avez-vous déjà été piqué par une tique?
 OUI NON NE SAIS PAS
7. Si OUI, nombre de piqûres au total:
 1-5 6-10 11-50 plus de 50
8. Si OUI: en 1989 en 1988 en 1987 avant 1987
9. Avez-vous déjà souffert de:
- | | | |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| a) inflammation de la peau | OUI <input type="radio"/> | NON/NE SAIS PAS <input type="radio"/> |
| b) inflammation d'une articulation | OUI <input type="radio"/> | NON/NE SAIS PAS <input type="radio"/> |
| c) arthrite du genou | OUI <input type="radio"/> | NON/NE SAIS PAS <input type="radio"/> |
| d) encéphalite ou méningite | OUI <input type="radio"/> | NON/NE SAIS PAS <input type="radio"/> |
| e) névrite | OUI <input type="radio"/> | NON/NE SAIS PAS <input type="radio"/> |
| f) paralysie faciale | OUI <input type="radio"/> | NON/NE SAIS PAS <input type="radio"/> |
| g) Lupus érythémateux | OUI <input type="radio"/> | NON/NE SAIS PAS <input type="radio"/> |
| h) polyarthrite chronique | OUI <input type="radio"/> | NON/NE SAIS PAS <input type="radio"/> |

Si OUI, quand, et par qui avez-vous été traité?

10. Avez-vous été malade durant le mois écoulé
 (grippe, rhume, etc)?
 NON OUI Si OUI, quoi: -----
11. Avez-vous été vacciné contre l'encéphalite à tiques?
 OUI NON
12. Si OUI, combien d'injections?-----
 date de la dernière injection?-----

Nous vous prions de renvoyer ce questionnaire dûment rempli à l'adresse suivante et vous en remercions d'avance.

Or Lise Gern / Floriane de Marval
 Université de Neuchâtel
 Institut de Zoologie
 Chantemerle 22
 2000 NEUCHÂTEL

**ANNEXE 2-2: Questionnaire à l'intention des forestiers, cantonniers et
donneurs de sang (version allemande).**

**EPIDEMIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG UEBER DIE LYME-BORRELIOSIS
UND DIE ZECKENENZEPHALITIS IN DER SCHWEIZ**

Alle Angaben werden vertraulich behandelt

Bitte in Blockschrift ausfüllen

NAME-----	VORNAME -----
GESCHLECHT-----	GEBURTSTAG -----
BERUF-----	ADRESSE -----
WOHNORT-----	TELEFONNUMMER -----

Bitte Zutreffendes ankreuzen:

1. Halten Sie sich öfters im Wald auf (mindestens 1/2 Stunde pro Woche)?

NEIN

JA im Rahmen der Arbeit

JA im Rahmen der Freizeit

(wandern, Ausführen von Hunden, Jogging, Camping, usw.)

2. Falls JA, wieviele Stunden verbringen Sie pro Woche im Wald?

1 Stunde

2-5

6-10

mehr als 10

3. Seit wievielen Jahren gehen Sie regelmässig in den Wald?

1-2 Jahren

3-5

6-10

mehr als 10

4. Name des Waldes / des Gebietes Ihrer Arbeit / Freizeit:

5. Hielten Sie sich früher für Ihre Arbeit / Freizeit in einer anderen Gegend auf?

NEIN

JA

Falls JA, wo: -----

wie lange:-----

bis wann:-----

Bitte wenden

6. Wurden Sie je von einer Zecke gebissen?
JA NEIN WEISS NICHT

7. Falls JA, Zahl der Bisse insgesamt:
1-5 6-10 11-50 mehr als 50

8. Falls JA: im Jahre 1989 im Jahre 1988
im Jahre 1987 vor 1987

9. Hatten Sie jemals:
- a) eine Hautentzündung JA NEIN/WEISS NICHT
 - b) eine Gelenkentzündung JA NEIN/WEISS NICHT
 - c) eine Knie Arthritis JA NEIN/WEISS NICHT
 - d) eine Gehirn(haut)entzündung JA NEIN/WEISS NICHT
 - e) eine Nervenentzündung JA NEIN/WEISS NICHT
 - f) eine Gesichtslähmung JA NEIN/WEISS NICHT
 - g) Lupus erythematoses (Gesichtsrose) JA NEIN/WEISS NICHT
 - h) eine chronische Polyarthritits JA NEIN/WEISS NICHT

Falls JA, wann und von wem wurden Sie behandelt?

10. Waren Sie im letzten Monat krank (Grippe, Schnupfe usw.)?
NEIN JA Falls JA, was: -----

11. Wurden Sie gegen Zeckenzephalitis geimpft?
JA NEIN

12. Falls JA, wieviele Injektionen?-----
wann zum letzten Mal?-----

Senden Sie bitte den ausgefüllten Fragebogen an die folgende Adresse:

Dr Lise Gern / Floriane de Marval
Université de Neuchâtel
Institut de Zoologie
Chantemerle 22
2000 NEUCHÂTEL

Herzlichen Dank.

ANNEXE 3: Questionnaire à l'intention des militaires piqués par une tique.

<p>EPIDEMIOLOGISCHE STUDIE UEBER DURCH ZECKEN UEBERTRAGBAREN KRANKHEITEN</p> <p>ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DES MALADIES TRANSMISES PAR LES TIQUES</p>	<p>Fragebogen Questionnaire</p> <p>für durch Zecken gebissene Personen pour personnes ayant été mordues par des tiques</p>
<p><u>Alle Angaben werden vertraulich behandelt</u> <u>Toutes les informations seront traitées confidentiellement</u></p> <p>Bitte in Blockschrift ausfüllen / A remplir en caractères d'imprimerie svp</p>	

Matr.-Nr / no matr :	Schule / école :
Name / nom :	Vorname / prénom :
Geburstag / date de naissance :	Beruf / profession :
Adresse / adresse :	Wohnort / localité :
TT-Nr / N° de tél :	

1. Wann wurden Sie von einer Zecke gebissen?
A quelle date avez-vous été mordu par une tique?
2. Durch wieviele Zecken wurden Sie gebissen ?
Par combien de tiques avez-vous été mordu?
3. Wie gross war die Zecke?
Quelle était la taille de la tique?

• - •
• - •
• - ●
4. Name des Waldes/der Region, wo Sie von Zecken gebissen wurden (so genau wie möglich beschreiben);
Nom de la forêt/de la région où vous avez été mordu par une tique (répondre aussi précisément que possible):
.....
5. Entfernungsart der Zecke (spontan, Aether, Oel, usw):
Mode d'extraction de la tique (spontané, éther, huile, etc):
.....
6. Wurden Sie vorher schon durch Zecken gebissen ?
Avez-vous auparavant été mordu par des tiques?

JA
NEIN
WEISS NICHT

OUI
NON
NE SAIS PAS
7. Falls JA:
Si OUI:

im Jahre 1991
im Jahre 1990
im Jahre 1989
vor 1989

en 1991
en 1990
en 1989
avant 1989
8. Falls JA, Name des Waldes/der Region, wo Sie gebissen wurden:
Si OUI, nom de la région/de la forêt où vous avez été mordu:
.....
9. Halten Sie sich für Ihre Arbeit/Freizeit in einem andern Wald/einer anderen Region auf?
Avez-vous vos loisirs/travaillez-vous dans une autre forêt ou région?
.....
10. Falls JA, wo?
Si OUI, où?
.....

Bitte wenden
voir au verso svp

11. Hielten Sie sich früher für Ihre Arbeit/Freizeit in einem andern Wald/einer anderen Gegend auf?
 Avez-vous vos loisirs/travailliez-vous auparavant dans une autre forêt ou région?

JA
 OUI

NEIN
 NON

Falls JA, wo:

Si OUI, où:

wie lange:

combien de temps:

bis wann:

jusqu'à quand:

12. Hatten Sie jemals:
 Avez-vous déjà souffert de:

	JA OUI	NEIN NON	WEISS NICHT NE SAIS PAS
a) eine weite Hautrötung (mehrere cm) rougeur étendue de la peau (plusieurs cm)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b) eine Gelenkentzündung inflammation d'une articulation	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c) eine Gehirn(haut)entzündung encéphalite ou méningite	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d) eine Nervenentzündung névrite (inflammation du système nerveux)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e) eine Gesichtslähmung paralysie faciale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f) Lupus erythematosus Lupus érythémateux	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
g) eine rezidivierende Arthritis arthrites récidivantes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Falls JA, wann und von wem wurden Sie behandelt?

Si OUI, quand et par qui avez-vous été traité?

.....

13. Waren Sie letzten Monat krank (Grippe, Schnupfen, usw)?
 Avez-vous été malade durant le mois écoulé (grippe, rhume, etc)?

JA
 OUI

NEIN
 NON

Falls JA, was:
 Si OUI, quoi:

14. Wurden Sie je gegen Zeckenzephalitis geimpft?
 Avez-vous été vacciné contre l'encéphalite à tiques?

JA
 OUI

NEIN
 NON

15. Falls JA: Wieviele Injektionen?
 Si OUI: Combien d'injections?

Wann zum letzten Mal?

Date de la dernière injection:

Schularzt/médecin d'école

Datum der Blutentnahme/date du prélèvement:

ANNEXE 4: Questionnaire à l'intention des militaires piqués par une tique infectée par *B. burgdorferi* ou le virus CEE.

**ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DES MALADIES TRANSMISES
PAR LES TIQUES**

Toutes les informations seront traitées confidentiellement

I. Vous avez annoncé une piqûre de tique le 1991.

Depuis cette date, avez-vous été piqué par d'autres tiques? OUI NON

2. Si OUI: Quand? (répondre aussi précisément que possible)

.....

Où? (répondre aussi précisément que possible)

.....

3. Depuis la piqûre du 1991, avez-vous souffert de:

a. Rougeur étendue de la peau (plusieurs cm) OUI NON

b. Névrite (inflammation du système nerveux) OUI NON

c. Paralyse faciale OUI NON

d. Inflammation(s) d'une articulation
(non liée(s) à un accident ou un sport) OUI NON

e. Encéphalite, méningite OUI NON

4. Si OUI: Avez-vous consulté un médecin? OUI NON

Date de la maladie / du traitement:

Nom et adresse du médecin traitant:

.....

5. Accepteriez-vous de procéder à une nouvelle prise de sang (10 ml)?

OUI NON

6. Si OUI, nous allons reprendre contact avec votre médecin habituel, qui effectuera la prise de sang. Veuillez pour cela nous indiquer:

son nom:

son adresse:

son No de tél (si possible):

**EPIDEMIOLOGISCHE STUDIE UEBER DURCH ZECKEN
UEBERTRAGBARE KRANKHEITEN**

Alle Angaben werden vertraulich behandelt

1. Sie haben am 1991 einen Zeckenbiss gemeldet.
Wurden Sie seitdem von anderen Zecken gebissen? JA NEIN

2. Falls JA: Wann? (so genau wie möglich beschreiben)

.....

Wo? (so genau wie möglich beschreiben)

.....

.....

3. Seit dem Zeckenbiss vom 1991, hatten Sie:

- a. eine grosse Hautrötung (mehrere cm) JA NEIN
- b. eine Nervenentzündung JA NEIN
- c. eine Gesichtslähmung JA NEIN
- d. eine Gelenkentzündung (die nicht auf eine
sportliche Tätigkeit oder einen Unfall
zurückzuführen ist) JA NEIN
- e. eine Gehirn(haut)entzündung JA NEIN

4. Falls JA: Wurden Sie behandelt? JA NEIN

Datum der Krankheit/der Behandlung:

Name und Adresse des Arztes:

.....

5. Sind Sie mit einer neuen Blutentnahme (10 ml) einverstanden?

JA NEIN

6. Falls JA, werden wir mit Ihrem Arzt Kontakt aufnehmen, der die Blutentnahme ausführen wird. Dafür bitten wir Sie, uns mitzuteilen:

seinen Namen:

seine Adresse:

seine Telefonnummer (wenn möglich)

ANNEXE 5: Solutions de réaction pour PCR.

A. 5-1 Réactif de transcription réverse pour la détection du virus CEE

(pour 10 µl de suspension d'ARN additionnés de 1 µl d'amorce LIE 4 et 1 µl d'H₂O milliporée)

- 3 µl H₂O milliporée
- 2 µl 10 mM chaque nucléotide A, C, G, T (Pharmacia)
- 5 µl 5x tampon de transcription réverse (5x HRT Buffer, Gibco BRL)
- 1 µl 0,1 M dithiothreitol (0,1 M DTT, Gibco BRL)
- 1 µl enzyme transcriptase réverse (M-MLV H⁻ RT (Superscript), Gibco BRL)
- 1 µl inhibiteur de ribonucléases (RNasin, Promega).

A. 5-2 Réactif de PCR pour la détection du virus CEE

(pour 10 µl de suspension d'ADNc)

- 67,5 µl H₂O milliporée
- 10 µl 10x tampon pour Taq polymérase (livré avec l'enzyme)
- 5 µl 10 pmol LIE 3
- 5 µl 10 pmol LIE 4
- 2,5 µl 10 mM chaque nucléotide A, C, G, T (Pharmacia)
- 0,2 µl (1 U) Taq polymérase (Taq DNA polymerase, Gibco BRL, ou Taq XL (dans ce cas avec détergent W-1 à 0,05% v/v), Northumbria Biologicals Ltd)
- 100 µl d'huile de paraffine sont ajoutés pour prévenir toute évaporation.

A. 5-3 Réactif de PCR pour la détection de *B. burgdorferi* - 1ère amplification

(pour 4 x 1 µl de suspension d'ADN)

- 81,5 µl H₂O milliporée
- 10 µl 10x tampon pour Taq polymérase (livré avec l'enzyme)
- 1 µl 30 pmol OspA N1
- 1 µl 30 pmol OspA C1
- 2 µl 10 mM chaque nucléotide A, C, G, T (Pharmacia)
- 0,5 µl (2,5 U) Taq polymérase (Taq DNA polymerase, Gibco BRL)
- 100 µl d'huile de paraffine sont ajoutés pour prévenir toute évaporation.

A. 5-4 Réactif de PCR pour la détection de *B. burgdorferi* - 2ème amplification

(pour 1 µl du produit de la première amplification)

- 84,5 µl H₂O milliporée
- 10 µl 10x tampon pour Taq polymérase (livré avec l'enzyme)
- 1 µl 30 pmol OspA N2
- 1 µl 30 pmol OspA C2
- 2 µl 10 mM chaque nucléotide A, C, G, T (Pharmacia)
- 0,5 µl (2,5 U) Taq polymérase (Taq DNA polymerase, Gibco BRL)
- 100 µl d'huile de paraffine sont ajoutés pour prévenir toute évaporation.