



**HAL**  
open science

## “ Tiques et agents pathogènes transmis en Corse, milieu insulaire méditerranéen ”

Sébastien Grech-Angelini

### ► To cite this version:

Sébastien Grech-Angelini. “ Tiques et agents pathogènes transmis en Corse, milieu insulaire méditerranéen ”. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2020. Français. NNT : 2020PESC0061 . tel-03585529

**HAL Id: tel-03585529**

**<https://theses.hal.science/tel-03585529>**

Submitted on 23 Feb 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Université Paris-Est**

**Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé**

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Sébastien GRECH-ANGELINI**

Le 24 janvier 2020

## **Tiques et agents pathogènes transmis en Corse, milieu insulaire méditerranéen**

Directrice de thèse : **Sara Moutailler**

Directrice de recherche, ANSES

### Jury de thèse

**Sarah Bonnet**, Directrice de recherche, INRA

**Philippe Jacquet**, Professeur, ENVT

**Olivier Plantard**, Directeur de recherche, INRA

**Karen McCoy**, Directrice de recherche, CNRS

**Frédéric Stachurski**, Chargé de recherche, CIRAD

Présidente du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Encadrant



# THÈSE

**Sébastien GRECH-ANGELINI**

## **Tiques et agents pathogènes transmis en Corse, milieu insulaire méditerranéen**

Directrice de thèse : Sara Moutailler (Directrice de recherche, ANSES)

### Jury de thèse

**Sarah Bonnet**, Directrice de recherche, INRA

**Philippe Jacquet**, Professeur, ENVT

**Olivier Plantard**, Directeur de recherche, INRA

**Karen McCoy**, Directrice de recherche, CNRS

**Frédéric Stachurski**, Chargé de recherche, CIRAD

Présidente du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Encadrant



## Préface

Je pense que l'origine de cette thèse et les raisons pour lesquelles j'ai eu l'honneur d'en écrire la préface, méritent d'être racontées. J'ai pris ma retraite en Corse depuis 1994 de ce qui fut d'abord l'IEMVT (Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux), où j'avais été embauché comme chercheur à Madagascar en 1961. Cet institut est devenu plus tard le Département d'Elevage du CIRAD et j'en étais le directeur scientifique de la santé animale lorsque j'ai pris ma retraite. Je gardais grâce à Internet une certaine activité et des contacts étroits avec le monde de la recherche scientifique. Néanmoins, vers 2014 les journées s'écoulaient doucement à Cargèse lorsque je recevais un appel téléphonique d'un confrère, *in casu* Sébastien Grech-Angelini, l'auteur de cette thèse. Il avait déjà travaillé comme praticien, et travaillait depuis un an avec l'INRA de Corte. Il s'était renseigné sur ce qui manquait le plus comme connaissances en Corse, et s'était rendu compte que le domaine des tiques et des agents pathogènes transmis par les tiques (PTT) était très imparfaitement connu en Corse. Sébastien apprit d'un collègue du CIRAD qu'un spécialiste des tiques et des PTT (*in casu* moi) avait pris sa retraite en Corse et qui plus est habitait juste en face de chez lui, de l'autre côté du golfe de Sagone... D'où l'appel téléphonique.

Des contacts plus étroits ont été rapidement établis. Sébastien a passé plusieurs heures chez nous à apprendre quelle est la meilleure façon de regarder une tique sous un microscope stéréoscopique, quelle lumière utiliser, comment incliner une tique afin d'obtenir un éclairage rasant qui permet de bien voir les ponctuations, denticules de l'hypostome, etc. Sébastien s'est montré intéressé et persévérant. Il posait beaucoup de questions et j'ai en fait appris énormément de choses pour pouvoir y répondre ! Je donne un exemple de sa façon minutieuse de travailler : quand je suis arrivé en Corse je n'y voyais qu'une seule espèce de *Hyalomma*, *Hy. marginatum*, dont le feston central des adultes mâles est de la même couleur que les autres festons et les pattes sont distinctement rayées. D'autres chercheurs n'avaient pas non plus vu d'autres espèces. A la fin, dès que je voyais un adulte *Hyalomma* avec les pattes rayées, j'avais déjà fait le diagnostic (je n'ai ni stéréo, ni autre microscope à ma disposition, seulement une bonne loupe). Etant donné que je n'avais plus de responsabilités, cela ne lésait personne. Mais Sébastien avait accepté de moi initialement la thèse d'une seule espèce de *Hyalomma* en Corse, jusqu'au jour où il a quand-même remarqué que quelques tiques adultes avaient le feston central d'une autre couleur et des pattes sans rayures. Il n'a pas eu de difficultés à me convaincre qu'il ne pouvait pas s'agir de *Hy. marginatum* et en y regardant de plus près (aussi après la dissection du gonopore), nous sommes arrivés rapidement au diagnostic de *Hy. scupense* (dont *Hy. detritum* est devenu un synonyme). Et Sébastien a de nouveau regardé toutes les *Hyalomma* déjà

identifiées comme *Hy. marginatum* et a identifié plusieurs individus comme *Hy. scupense*. J'ai eu honte de ma courte vue... *Hyalomma scupense* est connue en Afrique du Nord comme le vecteur principal de la theilériose bovine à *T. annulata*, une maladie inconnue en Corse, absente ou passée inaperçue. La seule espèce bovine de *Theileria* en Corse trouvée appartient au groupe de *Th. buffeli/orientalis*, parasites habituellement peu ou pas pathogènes et dont le vecteur en Europe est *Ha. punctata* ; sa présence en Corse est connue.

Je ne traite ici que des travaux sur les tiques et les PTT en Corse. C'est l'essentiel de la thèse. Mais les recherches et intérêts de Sébastien sont bien plus étendues, comme en témoignent quelques publications présentées dans cette thèse sur la bilharziose en Corse, le virus Toscana chez le chien, l'échinococcose kystique et la grippe porcine.

Sébastien est quelqu'un qui s'adapte et coopère facilement avec d'autres, au profit de tous. Lorsque son emploi à l'INRA n'a pas pu se poursuivre, il s'est assuré de la coopération de spécialistes de l'ANSES et du CIRAD dans ce domaine pour pouvoir poursuivre son étude et aboutir à cette thèse. Il est actuellement vétérinaire épidémiologiste et animateur du GTV Corse. Il est toujours en contact étroit avec le chercheur du CIRAD qui l'avait aiguillé sur Cargèse, Frédéric Stachurski, un de mes anciens thésards et dont j'ai vu avec grand plaisir qu'il est membre du jury de thèse. La chaîne de la recherche a un nouveau chaînon et je m'en réjouis. Je suis heureux d'avoir pu aider Sébastien à ses débuts et lui souhaite une vie riche en découvertes.

Professeur Gerrit Uilenberg  
(ex-directeur scientifique santé animale, Dépt. Elevage du CIRAD)

## Avant-propos

Mon parcours dans la recherche remonte à mes premières années d'étude à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse où déjà je multipliais les stages sur un objet de recherche tout autre que les tiques, le dromadaire. Ma thèse vétérinaire traitait d'ailleurs des « effets de la déshydratation sur le métabolisme énergétique et sur l'état corporel du dromadaire, *Camelus dromedarius* » sous la direction de Philippe Jacquet (ENVT) qui, clin d'œil de l'histoire, est aujourd'hui dans mon jury de thèse universitaire. Ma dernière année d'étudiant vétérinaire a été consacrée à un master de biologie de la conservation à l'Université Complutense de Madrid (Espagne). La thèse universitaire programmée sur les productions des camélidés andins n'a pu se réaliser, faute de financement. Six années de pratique libérale rurale puis mixte ont suivi, dans le pays basque, en Guyane, en Corse, etc. J'ai beaucoup appris du métier de praticien et soigner est un enrichissement. En 2011, la recherche est revenue lorsque j'ai appris qu'un Mastère spécialisé en santé publique et épidémiologie des maladies infectieuses (Institut Pasteur) s'ouvrait aux vétérinaires.

Le Mastère à peine validé, j'ai eu l'opportunité d'être recruté à l'INRA de Corte en tant qu'ingénieur de recherche. Durant ces trois années, sous la direction de François Casabianca (directeur de l'INRA de Corte), j'ai réalisé l'essentiel des recherches qui constituent cette thèse. J'ai débuté en poursuivant des travaux réalisés sur l'échinococcose kystique et la trichinellose en Corse. Les premiers liens se sont ainsi créés avec l'ANSES de Nancy, puis les virus influenza, avec l'ANSES de Ploufragan, sont arrivés, et enfin la surprenante émergence de la bilharziose dans le sud de l'île m'a permis de travailler avec l'Université de Perpignan. La Corse ne manque pas d'agents pathogènes zoonotiques à étudier. Le thème des tiques a germé en 2013, lors d'une discussion avec Renaud Lancelot (CIRAD) qui m'avait déjà encadré lors de mon stage de Mastère sur la peste des petits ruminants au Sénégal. Nous nous étions rendus compte que la tique *Hyalomma marginatum*, vectrice notamment du virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo et reconnue comme absente de France continentale à l'époque, semblait bien installée en Corse. J'ai par la suite rencontré les tiquologues du CIRAD, notamment Frédéric Stachurski, qui m'a accompagné tout au long de cette étude. Frédéric avait eu comme directeur de thèse un certain vétérinaire tiquologue de renommée internationale, Gerrit Uilenberg, qui prenait justement sa retraite en Corse. Les éléments apparaissant favorables, l'étude sur les tiques et agents pathogènes transmis en Corse a débuté en 2014. Les seules tiques que j'avais observées, jusque-là, étaient celles de mes chiens ou de ceux que je soignais. J'en ai collectées plus de 3 000 sur presque toutes les espèces de mammifères qui vivent en Corse. A la fin de mon CDD de trois ans à



l'INRA, j'ai pu travailler quelques mois avec le CIRAD pour terminer des travaux entamés puis j'ai eu l'opportunité d'intégrer le Groupement Technique Vétérinaire (GTV) de Corse. Le GTV Corse se doit d'animer le réseau des vétérinaires ruraux corses, d'être le lien entre les instances sanitaires et les vétérinaires, mais aussi de participer à la mise en place de protocoles de recherches sur des aspects sanitaires locaux. J'ai pu apprendre les rouages des instances sanitaires françaises qui m'étaient relativement peu connues, rester au contact des vétérinaires et des éleveurs tout en poursuivant un travail de recherche. Deux articles sur les tiques avaient été publiés, mais deux étaient toujours en attente. Quatre articles publiés, comme premier auteur, dans des revues internationales, cela semblait être une base solide pour écrire une thèse sur travaux. Il ne manquait plus qu'un directeur de thèse, ce fut une directrice, Sara Moutailler (ANSES de Maisons-Alfort). Elle m'avait accueilli trois semaines dans son laboratoire dans le cadre de la recherche des agents pathogènes dans les tiques collectées en Corse. Et ainsi est né le projet de thèse...

## **Remerciements**

Je voudrai remercier toutes les personnes qui ont pris part dans ce travail et m'ont aidées à le mener à son terme.

Mes premiers remerciements iront à Sara Moutailler qui a accepté l'encadrement de cette thèse et qui surtout a soutenu et encouragé ce projet dès le premier appel téléphonique.

Je remercie les membres de ce jury de thèse, dont je connais l'excellence de chacun dans leur domaine de compétence, pour m'avoir fait l'honneur d'y participer. Je remercie Philippe Jacquet et Olivier Plantard d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et d'en évaluer la qualité scientifique. Je remercie Sarah Bonnet et Karen McCoy pour avoir accepté d'être les examinatrices du jury de thèse.

Je remercie les deux vétérinaires tiquologues spécialistes, Frédéric Stachurski (membre également du jury de thèse) et Gerrit Uilenberg, qui m'ont formé et accompagné tout au long de cette étude. Leur connaissance du monde des tiques qu'ils m'ont fait partager est le socle de ce travail.

Je tiens à remercier François Casabianca, Renaud Lancelot, Laurence Vial, Muriel Vayssier-Taussat, Oscar Maestrini et Sylvain Marco pour leur aide scientifique et/ou technique. Mais aussi Gérald Umhang et Gaëlle Simon, pour les travaux réalisés sur l'échinococcose kystique et les virus influenza porcins qui ont trouvé leur place dans ce manuscrit de thèse.

Un remerciement particulier à Jérôme Boissier, spécialiste des schistosomes qui a découvert les tiques et la Corse avec moi, pour son apport scientifique (biologie moléculaire) et son amitié qui furent précieux dans ce cheminement.

Je dois remercier le GTV Corse, et notamment sa Présidente Sandrine Ferrandi, qui a cru en l'intérêt pratique futur pour les vétérinaires corses de cette étude scientifique et m'a permis de finaliser cette thèse.

Je remercie mes parents, mes frères, ma famille et mes amis de toujours qui m'ont toujours soutenu, sans forcément toujours me comprendre, dans les différentes étapes de ma vie qui m'ont amené du dromadaire à la tique en passant par les bovins et les chiens...



## Publications scientifiques fondatrices de la thèse

- Grech-Angelini, S.**, Stachurski, F., Lancelot, R., Boissier, J., Allienne, J. F., Marco, S., Maestrini, O., Uilenberg, G., 2016. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting cattle and some other domestic and wild hosts on the French Mediterranean island of Corsica. *Parasites & vectors*, 9(1), 582. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1876-8>
- Grech-Angelini, S.**, Stachurski, F., Lancelot, R., Boissier, J., Allienne, J. F., Gharbi, M., Uilenberg, G., 2016. First report of the tick *Hyalomma scupense* (natural vector of bovine tropical theileriosis) on the French Mediterranean island of Corsica. *Veterinary Parasitology*, 216, 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.015>
- Grech-Angelini, S.**, Stachurski, F., Vayssier-Taussat, M., Devillers, E., Casabianca, F., Lancelot, R., Uilenberg, G., Moutailler, S., 2019. Tick-borne pathogens in ticks (Acari: Ixodidae) collected from various domestic and wild hosts in Corsica (France), a Mediterranean island environment. *Transboundary and Emerging Diseases* 22. <https://doi.org/10.1111/tbed.13393>
- Grech-Angelini, S.**, Lancelot, R., Ferraris, O., Nicolas Peyrefitte, C., Vachier, N., Aurélie Pédarrieu, A., ..., Vial, L., 2020. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Antibodies among Livestock on Corsica, France, 2014–2016. *Emerg Infect Dis.* 26(5):1041-1044. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2605.191465>
- Boissier, J., **Grech-Angelini, S.**, Webster, B. L., Allienne, J. F., Huyse, T., Mas-Coma, S., ..., Oleaga, A., 2016. Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(8), 971-979. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00175-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00175-4)
- Oleaga, A., Rey, O., Polack, B., **Grech-Angelini, S.**, Quilichini, Y., Pérez-Sánchez, R., ... & Vallée, I., 2019. Epidemiological surveillance of schistosomiasis outbreak in Corsica (France): Are animal reservoir hosts implicated in local transmission? *PLoS neglected tropical diseases*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007543>
- Grech-Angelini, S.**, Richomme, C., de Garam, C. P., Boucher, J. M., Maestrini, O., Grenouillet, F., ..., Umhang, G., 2019. Identification and molecular characterization of *Echinococcus canadensis* G6/7 in dogs from Corsica, France. *Parasitology research*, 118(4), 1313-1319. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06261-6>
- Dahmani, M., Alwassouf, S., **Grech-Angelini, S.**, Marié, J. L., Davoust, B., Charrel, R. N., 2016. Seroprevalence of Toscana virus in dogs from Corsica, France. *Parasites & vectors*. 9(1), 381. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1665-4>
- Grech-Angelini, S.**, Hervé, S., Rose, N., Barbier, N., Casabianca, F., Maestrini, O., ..., Simon, G., 2018. Serological survey of influenza A viruses in domestic and wild Suidae in Corsica (France), a Mediterranean island environment. *Preventive veterinary medicine*, 157, 94-98. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.06.004>

*A tous les rêveurs d'ici et d'ailleurs...*

*Per u Prufessore François Angelini,*

## Table des matières

Préface.....	3
Avant-propos .....	5
Remerciements .....	7
Publications scientifiques fondatrices de la thèse.....	9
<b>Introduction générale.....</b>	<b>15</b>
<b>1. Généralités sur les tiques .....</b>	<b>17</b>
1.1.Taxonomie générale des tiques .....	17
1.2.Morphologie des tiques .....	18
1.2.1. Le capitulum .....	19
1.2.2. L'idiosome .....	19
1.3.Anatomie interne et physiologie .....	20
1.3.1. Nutrition et système digestif .....	21
1.3.2. Appareil reproducteur et reproduction .....	22
1.3.3. Appareil respiratoire, système de circulation et excrétion .....	22
1.3.4. Système nerveux et organes des sens .....	23
1.4.Cycle de développement .....	23
1.4.1. Les trois stades de développement.....	23
1.4.2. Types de cycle, tropisme d'hôtes et écologie des tiques .....	24
1.5.Les espèces de tiques dures les plus fréquentes dans le bassin méditerranéen .....	25
1.6.La lutte contre les tiques .....	28
<b>2. Importance médicale et vétérinaire des tiques .....</b>	<b>31</b>
2.1.La morsure ou pique .....	31
2.2.Effets directs sur la santé animale et humaine .....	31
2.3.Effets indirects sur la santé animale et humaine .....	32
2.3.1. La transmission tiques-hôtes vertébrés (et inversement) des micro-organismes .....	32
2.3.2. La transmission des micro-organismes entre tiques .....	32
2.3.3. Compétence et capacité vectorielle des tiques .....	33
2.4.Les principaux agents pathogènes transmis par les tiques dures en zone méditerranéenne	33
2.4.1. La notion de zoonose et de réservoirs d'agents pathogènes .....	34
2.4.2. Les bactéries .....	34
2.4.2.1 Genre <i>Borrelia</i> .....	34
2.4.2.2 Genre <i>Rickettsia</i> .....	35

2.4.2.3 Genre <i>Anaplasma</i> et <i>Ehrlichia</i> .....	36
2.4.2.4 Autres bactéries transmises par les tiques .....	37
2.4.3. Les parasites .....	38
2.4.3.1.Genre <i>Babesia</i> .....	39
2.4.3.2.Genre <i>Theileria</i> .....	39
2.4.4. Les virus .....	40
2.4.4.1.Virus de l'encéphalite à tiques.....	40
2.4.4.2.Virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF) .....	40
<b>3. La Corse, les tiques et les agents pathogènes : quelle problématique ? .....</b>	<b>43</b>
3.1.Situation géographique et environnementale de la Corse .....	43
3.2.L'élevage .....	44
3.3.Les ongulés sauvages et la chasse .....	45
3.4.Le tourisme .....	45
3.5.Conclusion : un contexte favorable aux tiques et agents pathogène transmis ? .....	45
<b>Rappel des objectifs de la thèse .....</b>	<b>47</b>
<b>4. Étude des tiques (Ixodidae) présentes en Corse .....</b>	<b>49</b>
4.1.Contexte de l'étude .....	49
4.2.Matériel et méthode .....	49
4.2.1. Collecte des tiques .....	47
4.2.2. Identification des tiques et analyse des données .....	49
4.3.Résultats .....	52
4.3.1. Infestation des bovins .....	52
4.3.2. Comparaison avec les autre hôtes animaux .....	53
4.3.3. Distribution spatiale des principales espèces de tiques en Corse.....	54
4.4.Discussion .....	55
<b>Article</b> : <i>Ticks (Acari: Ixodidae) infesting cattle and some other domestic and wild hosts on the French Mediterranean island of Corsica</i> .....	56
4.5.Perspectives relatives à la présence du genre <i>Hyalomma</i> en Corse .....	77
4.5.1. <i>Hyalomma marginatum</i> .....	77
4.5.2. <i>Hyalomma scupense</i> .....	78
<b>Article</b> : <i>First report of the tick Hyalomma scupense (natural vector of bovine tropical theileriosis) on the French Mediterranean island of Corsica</i> .....	81
<b>5. Etude de la présence des agents pathogènes transmis par les tiques en Corse .....</b>	<b>93</b>
5.1.Contexte de l'étude.....	93
5.2.Matériel et méthode .....	93

5.3.Principaux résultats .....	95
5.4.Discussion.....	97
<b>Article</b> : <i>Tick-borne pathogens in ticks (Acari: Ixodidae) collected from various domestic and wild hosts in Corsica (France), a Mediterranean island environment</i> .....	98
<b>6. Etude spécifique du risque lié au virus CCHF en Corse</b> .....	<b>127</b>
7.1. La fièvre hémorragique de Crimée-Congo .....	127
7.2. Matériel et méthode .....	129
7.3. Résultats .....	130
7.4. Discussion.....	131
<b>Article</b> : <i>First evidence of antibodies against Crimean-Congo Haemorrhagic fever virus in domestic ruminants on Corsica Island (France)</i> .....	133
<b>7. Autres agents pathogènes zoonotiques étudiés chez les animaux en Corse</b> .....	<b>139</b>
7.1.La bilharziose uro-génitale .....	139
7.1.1. A la recherche de l'origine du parasite.....	139
7.1.2. A la recherche des hôtes animaux .....	141
7.2.L'échinococcose kystique.....	143
7.3.Le virus Toscana .....	144
7.4.Les virus influenza porcins .....	146
<b>8. Discussion générale et perspectives</b> .....	<b>149</b>
8.1.Principaux apports sur les données épidémiologiques concernant les tiques présentes en Corse.....	149
8.1.1. La connaissance des espèces de tiques présentes sur le territoire .....	149
8.1.2. Un profil de tiques atypique dans le bassin méditerranéen .....	150
8.2.Principaux apports concernant les agents pathogènes transmis par les tiques en Corse....	152
8.2.1. Caractérisation des agents pathogènes transmis par les tiques .....	152
8.2.2. Agents pathogènes transmis, la situation de la Corse par rapport au bassin méditerranéen .....	153
8.3.Perspectives en termes de prévention médicale et sanitaire .....	154
8.3.1. Perspectives sanitaires .....	154
8.3.2. Surveillance des réservoirs animaux d'agents pathogènes zoonotiques .....	155
8.3.3. Perspectives dans le domaine médical .....	156
<b>Conclusion générale</b> .....	<b>159</b>
Références bibliographiques .....	161
Liste des tableaux, figures et abréviations .....	169
Annexes (articles scientifiques hors tiques et agents pathogènes transmis) .....	173
Résumé en anglais ( <i>abstract</i> ) .....	255





## Introduction générale

Les tiques sont aujourd'hui reconnues comme les deuxièmes vecteurs d'agents pathogènes responsables de maladies humaines dans le monde après les moustiques (Parola et al., 2001), et elles tiennent le premier rôle dans la transmission des agents pathogènes dans le monde animal (Nicholson et al., 2009). L'étude de ces acariens et des micro-organismes qu'ils transmettent concerne les professionnels de la santé humaine comme de la santé animale. Mais plus généralement, l'ensemble des vertébrés terrestres peuvent être exposés aux piqûres des tiques. Avec « l'émergence médiatique » de la maladie de Lyme en Europe et en France, le grand public a aujourd'hui pris conscience de l'impact des tiques sur la santé humaine, mais le rôle pathogène des tiques est connu et étudié depuis bien longtemps. Les premières tiques fossiles dateraient du milieu du crétacé (100 millions d'années) et les égyptiens mentionnaient les tiques dès 1550 avant JC dans le Papyrus Ebers qui serait l'un des plus anciens traités médicaux. Au XVIIIème siècle, les tiques sont classées parmi les acariens par les grands descripteurs de la nomenclature scientifique. Elles étaient initialement connues pour les spoliations sanguines qu'elles entraînaient. Leur rôle dans la transmission d'agents pathogènes, suspecté de longue date, a été prouvé à la fin du XIXème. Cette première démonstration a été faite avec la transmission de *Babesia bigemina* (responsable de « la fièvre du Texas ») par *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* chez des bovins aux Etats-Unis (Smith et Kelborne, 1883). Environ 900 espèces différentes de tiques sont décrites aujourd'hui dans le monde dont un peu plus d'une quarantaine en France continentale. La diversité des agents pathogènes transmis (bactéries, parasites et virus) aux hommes et/ou aux animaux est difficilement quantifiable, et de nouveaux micro-organismes dont l'éventuelle pathogénicité n'est pas connue sont régulièrement identifiés dans les tiques.

La population de tiques présente en Corse et la diversité des agents pathogènes qu'elles transmettent constituaient, jusqu'en 2014, une équation à multiples inconnues, aucune étude ne s'y étant réellement intéressée. Pourtant, la diversité géographique et écologique de la Corse, reconnue comme « l'île montagne » de la mer Méditerranée, ainsi que les multiples interactions qui y ont lieu entre la faune sauvage, les animaux domestiques et l'homme, en font potentiellement un territoire favorable aux tiques et aux agents pathogènes qu'elles transmettent. La situation de la Sardaigne toute proche, ou encore de la Sicile, ont fait l'objet de nombreuses études sur ce thème, mais la diversité de biotopes qu'offre la Corse préjuge d'une situation différente à ces deux îles méditerranéennes.

Le premier objectif des études rassemblées dans ce manuscrit était de décrire les espèces de tiques présentes sur le territoire insulaire ainsi que leurs périodes d'activité et leurs préférences d'hôte. Le

deuxième objectif poursuivi est d'identifier les agents pathogènes que les tiques pourraient transmettre en Corse. Cette recherche s'est voulue la plus exhaustive possible et a concerné la majorité des bactéries (29 parmi les genres ; *Anaplasma*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Francisella* et *Neoehrlichia*) et des parasites (12 parmi les genres *Babesia* et *Theileria*) identifiés dans la zone méditerranéenne et potentiellement transmis par les tiques. Le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF) a été recherché dans les espèces de tiques reconnues comme pouvant le transmettre ou au moins le véhiculer, et une enquête sérologique concernant les anticorps dirigés contre ce virus a été menée chez les ruminants domestiques. En parallèle de ces travaux sur les tiques et les agents pathogènes transmis, des études impliquant des animaux en Corse ont également concerné d'autres zoonoses (bilharziose, échinococcose kystique, grippe porcine et infection au virus Toscana).

Les travaux présentés ayant ciblé les tiques dures (Ixodidae), le cas des tiques molles (Argasidae) n'est que brièvement abordé en début du manuscrit. Les deux premiers chapitres concernent la description générale de la biologie des tiques dures (Ixodidae) et le panel des agents pathogènes transmis, en détaillant la situation du bassin méditerranéen. Quelques éléments concernant la géographie et la sociologie de la Corse sont ensuite donnés afin que le lecteur comprenne que le territoire choisi présente un contexte favorable à l'étude des tiques et à la circulation des agents pathogènes zoonotiques. La présentation des travaux concernant les tiques et les agents pathogènes transmis débute dans le quatrième chapitre où les différentes études menées sur ce thème sont résumées en langue française alors que l'ensemble du protocole scientifique, des résultats et de la discussion est détaillé, en langue anglaise, dans les articles scientifiques qui sont ajoutés en fin de chaque partie. Sur les quatre articles présentés sur ce thème, trois ont été publiés dans des revues internationales à comité de lecture et un a été soumis (octobre 2019). Le septième chapitre est consacré à des études publiées sur d'autres agents pathogènes zoonotiques, que ceux transmis par les tiques, auxquels les animaux insulaires sont exposés. Les perspectives de l'ensemble des travaux présentés sont discutées en fin de manuscrit.

# 1. Généralités sur les tiques

## 1.1. Taxonomie générale des tiques

La position systématique retenue est celle proposée par Camicas et Morel (1977). Les tiques appartiennent à l'embranchement des arthropodes et à l'ordre des *Ixodida*. Le détail de la position systématique est présenté dans le Tableau 1.

**Tableau 1. Position systématique des tiques (d'après Camicas et Morel, 1977)**

Niveau de classification	Dénomination	Source originelle
Embranchement	<i>Arthropoda</i>	Siebold et Stanius, 1845
Sous-embranchement	<i>Chelicerata</i>	Heymons, 1901
Classe	<i>Arachnida</i>	Lamarck, 1801
Sous-classe	<i>Acarida</i>	Van der Hammen, 1961
Super-ordre	<i>Anactinotrichoida</i>	Van der Hammen, 1968
Ordre	<i>Ixodida</i>	Van der Hammen, 1968

Plusieurs classifications ont été proposées pour les tiques. Celle utilisée dans ce manuscrit divise l'ordre des *Ixodida* en trois familles (Figure 1). La famille des *Ixodidae*, également appelée « tiques dures », se compose de trois sous-familles : les *Ixodinae*, les *Rhipicephalinae* et les *Amblyommidae* (Figure 1). Près de 700 espèces de tiques dures sont dénombrées actuellement dans le monde, faisant des *Ixodidae* la plus importante famille en termes de nombre d'espèces. Les *Argasidae* ou « tiques molles » se divisent en deux familles (*Argasinae* et *Ornithodorinae*) et comprennent près de 200 espèces alors que pour les *Nuttalliellidae*, une seule espèce est recensée (McKoy et Boulanger, 2015). Historiquement, la classification systématique des tiques se basait uniquement sur la caractérisation morphologique des spécimens, sur l'étude de leurs caractéristiques biologiques et écologiques, et sur leur répartition géographique. Aujourd'hui, le développement des techniques de biologie moléculaire a permis d'affiner en partie les données de taxonomie grâce aux études de phylogénie, utilisant des marqueurs du génome mitochondrial et des ARN ribosomiques nucléaires. La classification des tiques dures (*Ixodidae*) est relativement stabilisée avec 12 genres décrits alors que celle des tiques molles reste encore controversée (Figure 1). Un des freins majeurs à la mise en place d'un consensus taxonomique sur les *Argasidae* est le manque de lignes directrices définissant les termes descriptifs et les traits morphologiques spécifiques des spécimens (McCoy et Boulanger, 2015). Environ 900 espèces de tiques sont recensées aujourd'hui dans le monde dont 41 pour la France métropolitaine. Cette apparente diversité reste relative comparée aux 3 500 espèces recensées de moustiques, mais il est fort probable que de nombreuses espèces de tiques restent encore à découvrir.

## 1.2. Morphologie des tiques

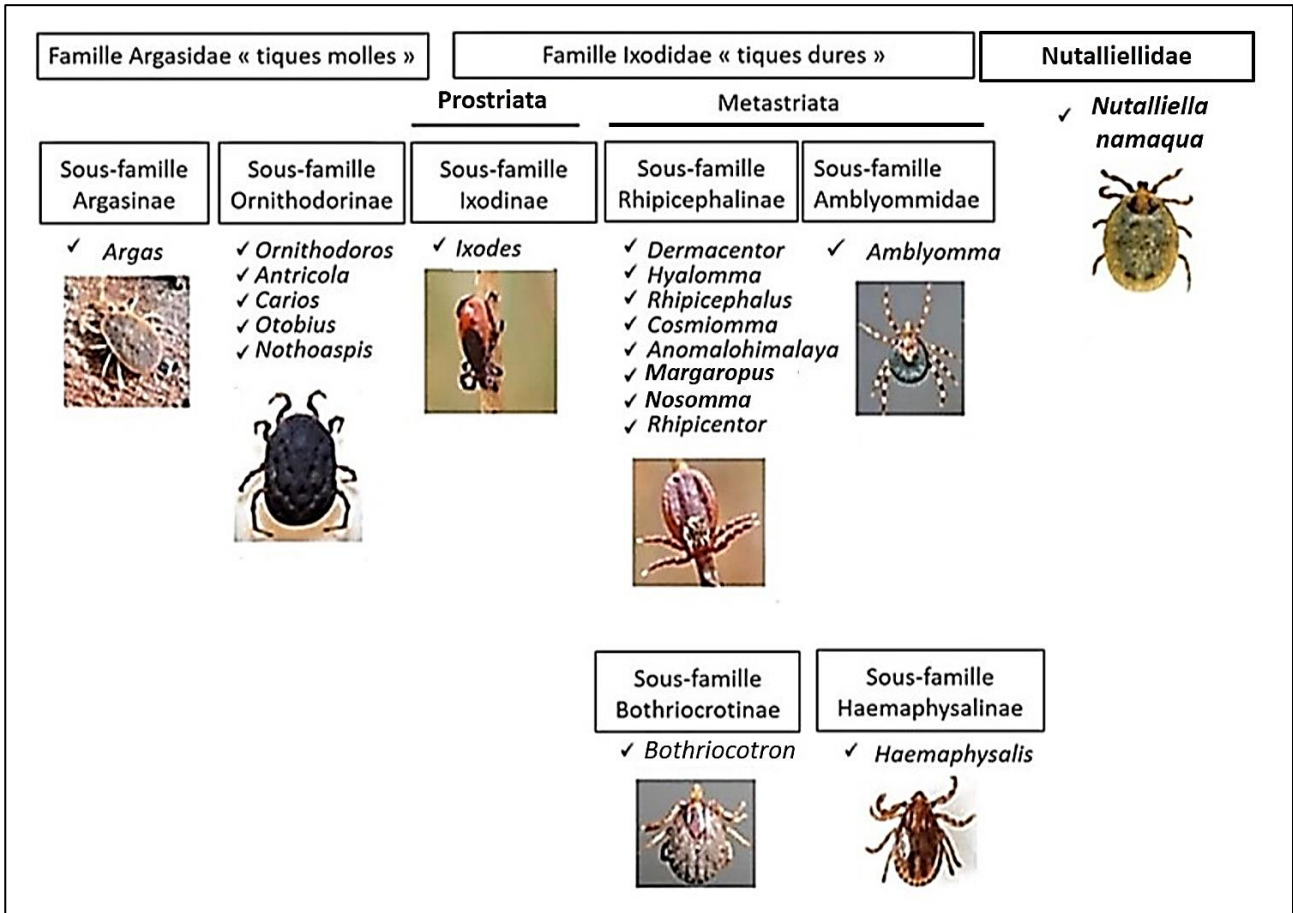


Figure 1. Classification des espèces de tiques par famille (d'après McCoy et Boulanger, 2015)

Les tiques sont des acariens ectoparasites hématophages stricts. Des différences morphologiques permettent de séparer facilement les Argasidae des Ixodidae. Les premiers ont un tégument idiosomal souple, sans partie sclérifiée, leur conférant ainsi leur nom de « tiques molles » alors que celui des Ixodidae comportent des parties sclérifiées d'où leur dénomination de « tiques dures ». Concernant les Nuttalliellidae (une seule espèce de tique décrite en Afrique), les connaissances sont plus éparées, et elles présenteraient des caractéristiques communes aux tiques molles et aux tiques dures. Les divisions en tête, thorax et abdomen employés chez la plupart des arthropodes, en particulier chez les insectes, n'existent pas chez les tiques. Leur corps se divise en deux parties, avec le capitulum ou gnathosome à l'avant pour les Ixodidae (Figure 2A) et en face ventrale pour les Argasidae, et, à l'arrière, l'idiosome non segmenté (McCoy and Boulanger, 2015). D'autre part, comme les autres arachnides, les tiques (du moins les nymphes et les adultes) possèdent quatre paires de pattes, alors que les insectes adultes n'en possèdent que trois. La morphologie des tiques traduit leur mode de vie hématophage. Le rostre, porté par le capitulum, pénètre les tissus de l'hôte vertébré alors que l'idiosome est recouvert en quasi-totalité d'une cuticule extensible qui permet sa dilatation lors du

repas sanguin pour les femelles, nymphes et larves (Fig2A ; McCoy and Boulanger, 2015) alors que les mâles ne se nourrissent que très peu.

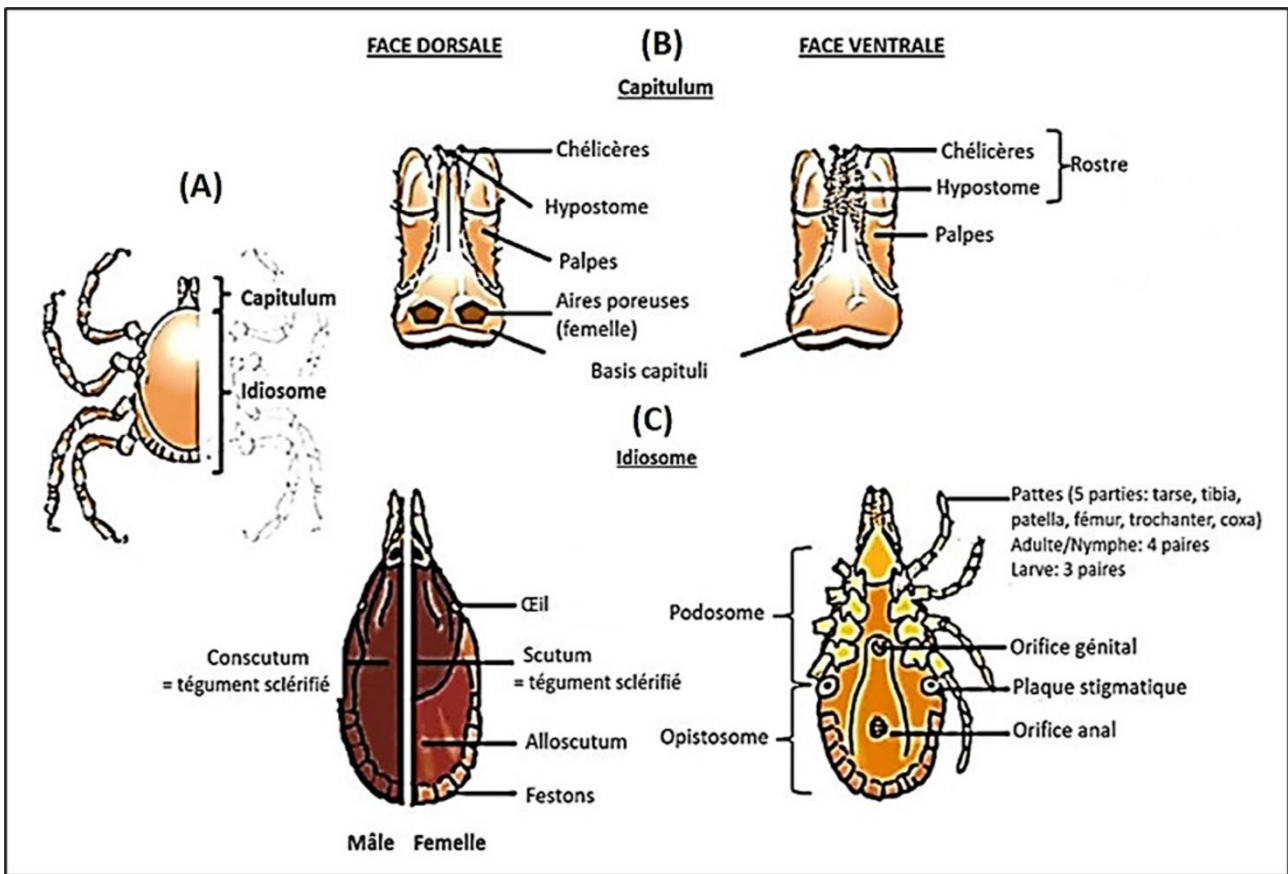


Figure 2. Anatomie externe des tiques dures (d'après Gondard, 2017)

Dans cette partie, seules les caractéristiques générales des tiques dures sont abordées. Les autres familles de tiques n'ont pas été traitées car elles n'ont fait l'objet d'aucun prélèvement au cours des études décrites dans ce manuscrit.

### 1.2.1. Le capitulum

Les Ixodidae présentent un capitulum en position apicale (Figure 2A). Le capitulum porte sur sa base, appelée *basis capituli*, les différentes pièces buccales formant le rostre ainsi que latéralement une paire de palpes au rôle sensoriel (Figure 2B). Le rostre comprend les chélicères dont le rôle est de découper la peau et l'hypostome qui est le véritable organe d'ancrage dans la peau de l'hôte. Les femelles Ixodidae possèdent des aires poreuses, sur la face dorsale de la *basis capituli*, qui interviennent au moment de la ponte (cf. 1.3.2, Pérez-Eid, 2007).

### 1.2.2. L'idiosome

La structure de l'idiosome permet aisément de différencier les mâles et les femelles chez les Ixodidae (Figure 2C). L'idiosome des femelles (mais aussi des larves et des nymphes) est séparé en deux en face dorsale. La partie antérieure sclérifiée est le scutum alors que la partie postérieure est

l'alloscutum. La face dorsale de l'idiosome des mâles, entièrement sclérifiée, prend le nom de conscutum et correspond dans sa partie antérieure au scutum des femelles.

L'idiosome porte les quatre paires de pattes (chez l'adulte et la nymphe et trois chez la larve) permettant la locomotion des tiques. Ces pattes sont composées de six articles chacune (Figure 2C). L'idiosome possède également un grand nombre d'organes sensoriels dont l'organe de Haller, situé sur le tarse de la première paire de pattes, qui permet notamment aux tiques de localiser leur hôte et d'analyser les phéromones (Sonenshine and Roe, 2014a). La présence sur l'idiosome d'autres organes sensoriels comme les yeux (ou ocelles), les soies tactiles, les pores respiratoires (appelés ponctuations) varient en fonction des familles et des genres de tiques. Sur l'idiosome sont aussi visibles, en face ventrale, les orifices génital et anal ainsi que, sur le côté, les stigmates respiratoires (entourés d'une plaque stigmatique plus développée pour les Ixodidae) (McCoy et Boulanger, 2015).

### 1.3. Anatomie interne et physiologie

#### 1.3.1. Nutrition et système digestif

Les tiques sont des arthropodes hématophages stricts, se nourrissant uniquement du sang de leur hôte. Tous les stades (larve, nymphe et adulte) des Ixodidae prennent un repas sanguin. La règle étant la prise d'un repas complet, le détachement de l'hôte n'intervient que si le volume de sang absorbé atteint un seuil (Pérez-Eid, 2007).

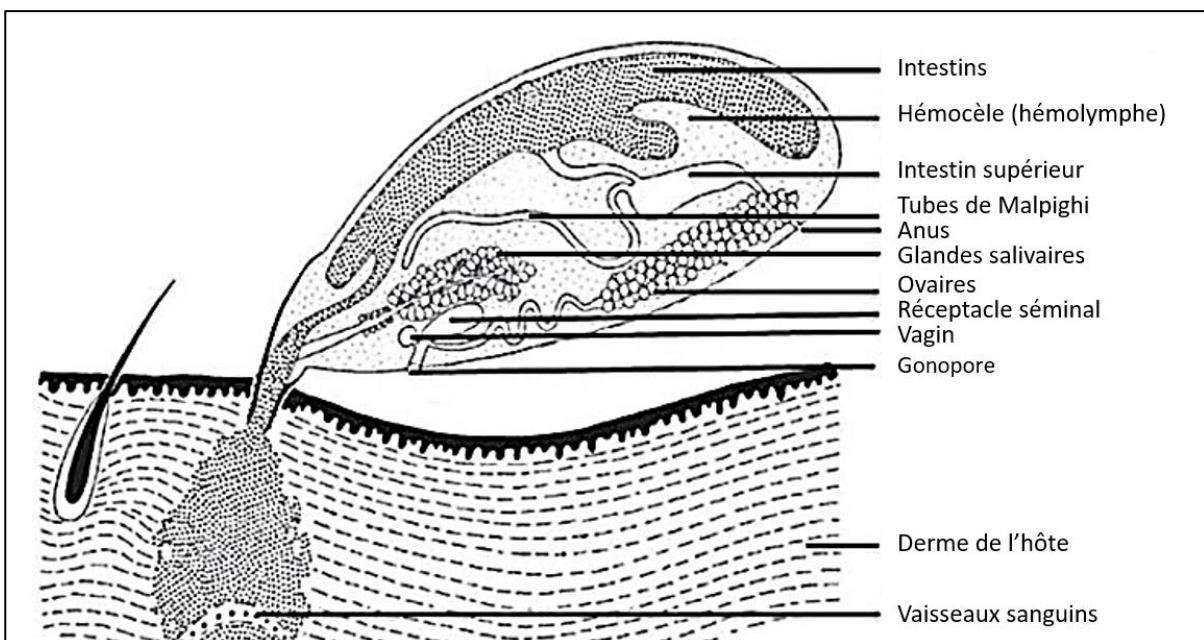
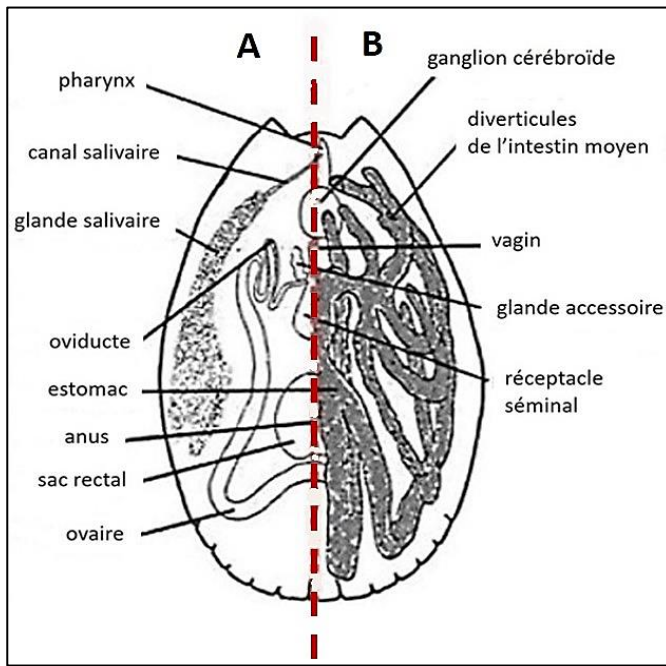


Figure 3. Anatomie interne générale d'une femelle adulte, coupe sagittale (d'après Melhorn et Armstrong, 2001)

L'appareil digestif débute par une cavité buccale, dont l'hypostome (Figure 2B) constitue le plancher, cavité qui est suivie d'un court pharynx dans lequel débouche les deux glandes salivaires (Figures 3 et 4). Le pharynx, responsable de l'alternance des phases d'absorption du sang et d'émission de salive

durant le repas, s'ouvre dans l'œsophage, puis suit l'intestin moyen qui est la partie la plus volumineuse de l'appareil digestif des tiques. Il est composé d'une portion centrale, appelée estomac central, à partir duquel se déploient plusieurs diverticules (ou caeca). C'est au niveau des cellules épithéliales de l'intestin moyen que s'effectue la digestion du repas sanguin. L'estomac central est suivi d'un sac rectal où s'accumule les fèces qui seront évacués par l'orifice anal (Figure 4).



**Figure 4. Anatomie interne d'une tique femelle en coupe frontale : appareils digestif, nerveux et reproducteur (d'après Pérez-Eid, 2007). A : Vue avec l'appareil digestif retiré ; B : Vue avec l'appareil digestif qui recouvre la majorité des organes internes**

### 1.3.2. Appareil reproducteur et reproduction

Les tiques présentent une reproduction sexuée obligatoire, mis à part quelques rares cas de pathogénèse décrits notamment pour l'espèce *Haemaphysalis longicornis* (Chen et al, 2012). L'appareil génital de la femelle est composé d'un ovaire unique, en forme de chapelet disposé en position arrière du corps. Deux oviductes partent de l'ovaire pour s'unir en un seul qui débouche dans le vagin qui se termine par une partie tubulaire aboutissant à l'orifice génital ou gonopore (Figures 3 et 4). Un réceptacle séminal accolé au vagin permet de stocker les spermatozoïdes. L'appareil reproducteur mâle est constitué de deux testicules tubulaires, prolongés par les canaux déférents qui débouchent sur le canal éjaculatoire, et d'un complexe de glandes accessoires. Lors de l'accouplement, précédé de l'introduction des pièces buccales du mâle dans les voies génitales femelle, le mâle dépose un spermatophore dans le vagin. Les spermatozoïdes qui le constituent vont continuer leur maturation dans l'organe génital femelle. L'accouplement n'a lieu qu'une fois pour les tiques dures et la ponte des femelle Ixodidae, qui se déroule après leur unique gorgement, peut varier de 2 000 à 12 000 œufs selon les espèces. Les œufs sont pondus en une masse unique et la ponte peut durer plusieurs jours. Les œufs sont récupérés par l'organe de Géné (situé au niveau de l'orifice



génital) qui se dévagine, puis sont enrobées d'une substance protectrice (afin d'éviter la déshydratation) émise par cet organe et les aires poreuses (Pérez-Eid, 2007).

### 1.3.3. Appareil respiratoire, système de circulation et excrétion

La respiration des larves s'effectue directement à travers leur tégument peu chitinisé. Les autres stades possèdent des stigmates (et plaques stigmatiques chez les Ixodidae, Figure 2C) permettant les échanges gazeux avec l'extérieur. Ils sont reliés à un système trachéolaire interne très ramifié, formant des arborescences au contact des organes (McCoy and Boulanger, 2015).

Les tiques ont un système circulatoire ouvert et sommaire. La circulation de l'hémolymphe est permise par un vaisseau dorsal bombé formant un cœur et entouré d'un sinus qui permet de propulser et de disperser l'hémolymphe à travers le réseau artériel. L'hémolymphe remplit la cavité interne, appelée hémocèle, baignant ainsi la totalité des organes internes, ainsi que le capitulum et les pattes (Figure 3). L'hémolymphe présente plusieurs fonctions dont le transport de métabolites et d'hormones, le maintien de la pression osmotique, et la régulation du système immunitaire (Sonenshine and Roe, 2014a).

L'appareil excréteur est essentiellement constitué par une paire de très longs tubes de Malpighi qui s'enroulent autour des différents organes (Figure 3). Les produits nitrogénés rejetés par les différents organes sont collectés au niveau de ces tubes puis transformés en cristaux de guanine avant d'être excrétés au niveau de l'orifice anal (Pérez-Eid, 2007).

### 1.3.4. Système nerveux et organes des sens

Le système nerveux central des tiques est concentré en une masse ganglionnaire, ou ganglion cérébroïde (nommé « *synganglion* » en anglais), située autour de l'œsophage, en arrière de l'ouverture génitale (Figure 4). Cette masse est constituée de divers ganglions correspondant aux différents organes de la tique : les chélicères, les palpes (et glandes salivaires), les yeux (pour les espèces pourvues de système optique) et les pattes. Différents nerfs (stomacal, pharyngien) et cordons nerveux partent de la masse ganglionnaire pour assurer l'innervation de l'ensemble des organes de la tique. Il n'y a pas de chaîne ganglionnaire postérieure comme chez la plupart des arthropodes (Pérez-Eid, 2007).

Les principaux organes sensoriels périphériques sont les soies (sensilles mécanoproprioceptives ou chémoréceptrices), largement distribuées sur l'ensemble du corps. Elles renseignent les tiques sur la qualité de leur environnement. Les sensilles, concentrées notamment au niveau de l'organe de Haller (repérage de l'hôte, cf. 1.2.) et des palpes auraient des fonctions proprioceptives, olfactives, chimioréceptives ou même gustatives. Les yeux présents sur l'idiosome de certaines espèces sont

composés d'un corps cristallin à cuticule transparente relié à des cellules sensorielles connectées à un nerf optique.

## 1.4. Cycle de développement des tiques dures

### 1.4.1. Les trois stades de développement

Les tiques alternent les phases parasitaires sur leurs hôtes, souvent de courte durée pour les femelles (moins d'une semaine pour les Ixodidae alors que le mâle peut parfois rester fixé plus d'un mois), et des phases libres au sol, de durée beaucoup plus longue (jusqu'à quelques mois). Chez les Ixodidae, un seul repas sanguin est réalisé par stade de développement. La femelle, une fois fécondée, se décroche de son hôte puis cherche sur le sol un endroit propice à la ponte. Les larves qui éclosent de cette ponte se caractérisent par la présence de trois paires de pattes alors que tous les autres stades en ont quatre. Elles vont, après gorgement, se métamorphoser en nymphes, lesquelles, après un nouveau gorgement, se métamorphoseront à leur tour en adultes, mâles ou femelles (Figure 5). Le repas sanguin des femelles Ixodidae doit atteindre un seuil minimum afin de remplir la demande en énergie liée à la ponte. Les mâles, à l'inverse, se nourrissent de très peu de sang, voire pas du tout (Pérez-Eid, 2007).

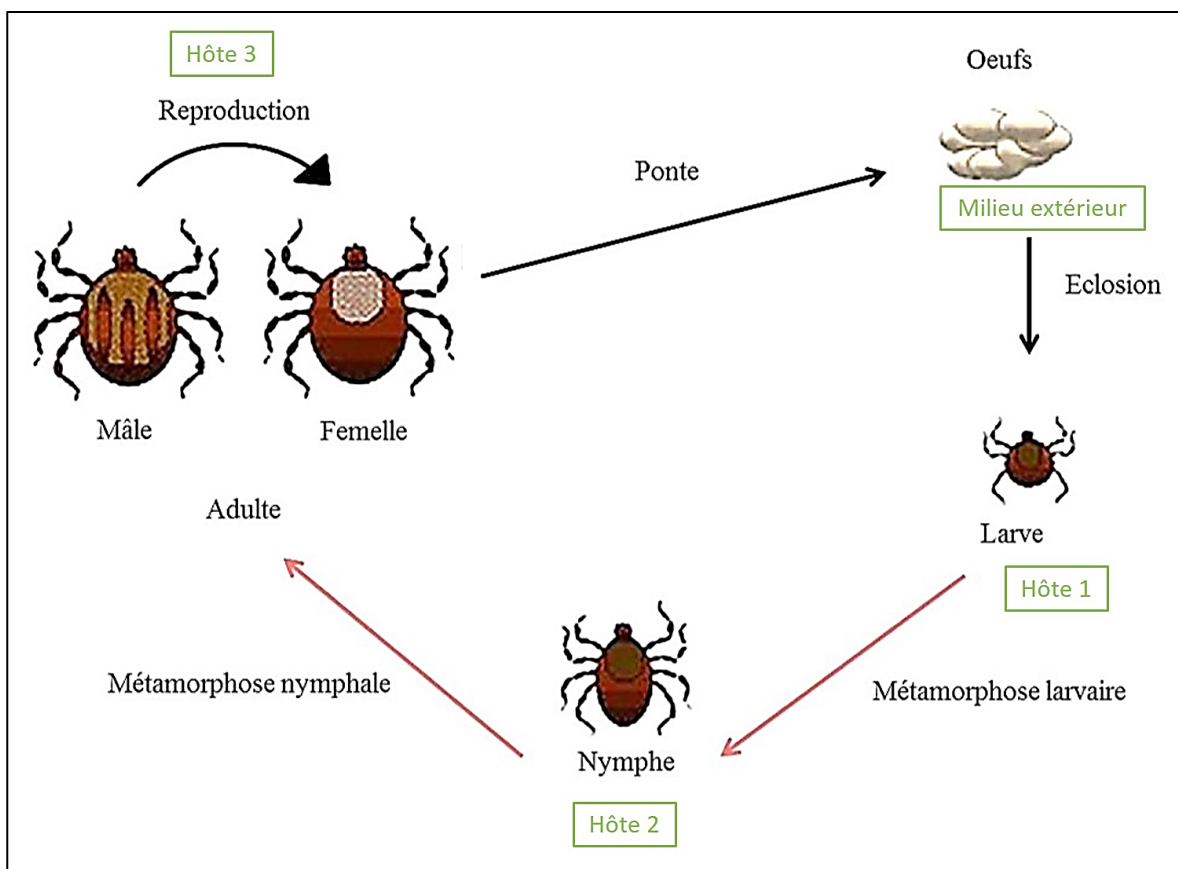


Figure 5. Cycle biologique triphasique d'une tique dure montrant un changement d'hôte pour chaque stade de développement. Chaque changement d'hôte est précédé d'une phase libre

#### 1.4.2. Types de cycle, tropisme d'hôtes et écologie des tiques

En fonction du nombre d'hôtes inclus dans le cycle et de leur nature (petit rongeur, ongulé sauvage, etc.), les cycles biologiques des différentes espèces de tiques vont se différencier. La connaissance du type de cycle est fondamentale pour comprendre l'épidémiologie des agents pathogènes transmis par les tiques. Le cycle monophasique est le plus simple puisqu'il comporte une unique phase parasitaire, la tique effectuant ses trois repas, et ses deux métamorphoses, sur le même animal sans retour au sol (Sonenshine and Roe, 2014a). Le cycle diphasique comporte deux phases parasitaires, larve et nymphe effectuant leur repas sur le même animal alors que l'adulte se nourrit sur un autre hôte, après que la nymphe a réalisé sa métamorphose au sol. Le cycle triphasique comporte trois phases parasitaires, une pour chaque stade de développement de la tique (Figure 5). Ainsi larve, nymphe et adulte se nourrissent sur trois animaux différents. Les cycles polyphasiques (plus de trois phases parasitaires) concernent uniquement les tiques molles.

Plus de 80% des espèces de tiques dures dans le monde ont un cycle triphasique. Concernant les espèces rencontrées dans le bassin méditerranéen (cf. 1.5, Tableau 2.), *Rhipicephalus (Rh.) bursa*, *Hyalomma (Hy.) marginatum*, *Hy. impeltatum* et *Hy. excavatum* ont un cycle diphasique alors que *Rh. (Boophilus) annulatus*, *Hy. anatolicum* et *Hy. scupense* ont un cycle monophasique. Les autres espèces ont un cycle triphasique.

La majorité des tiques dures sont dites exophiles, à l'inverse des tiques molles qui sont surtout endophiles, se cantonnant à l'habitation de leur hôte animal. Les tiques exophiles évoluent dans des écosystèmes dit ouverts ou semi-ouverts très variés tels que les forêts, les prairies, les savanes, mais également en zone péri-urbaine, dans les parcs et jardins publics. Les tiques exophiles sont donc plus exposées et doivent s'adapter aux variations des facteurs environnementaux tels que la température ou l'humidité. Elles présentent deux types de stratégies de recherche de leur hôte, chassant soit à l'affût, soit activement. Les tiques à l'affût se positionnent plus ou moins en hauteur dans la végétation et attendent le passage d'un hôte pour s'y fixer. A l'inverse, les tiques qui chassent activement se déplacent au sol vers leur hôte potentiel dès qu'elles l'ont localisé (McCoy et Boulanger, 2015).

Du point de vue de la nature des hôtes, les tiques sont classées en trois catégories. Le tropisme d'hôtes des tiques télotropes (ou trixènes) s'exerce envers une espèce animale hôte différente pour chacune des phases parasitaires. Les tiques ditropes (dixènes) ont un tropisme qui concerne deux groupes d'hôtes, la larve et la nymphe sont endophiles et vivent dans les abris de leurs hôtes (surtout les petits rongeurs) et au stade adulte, elles deviennent exophiles et parasitent les grands mammifères vivant dans le milieu extérieur. Le tropisme des tiques monotropes (monoxènes) ne s'exerce qu'envers un type d'hôtes. La quasi-totalité des vertébrés terrestres peuvent être parasités par les tiques mais il

existe des spécificités d'infestation de certaines espèces de tiques envers des hôtes animaux. Ces préférences trophiques sont souvent complexes à analyser car elles dépendent également d'exigences écologiques liées au biotope dans lequel la tique vit (McCoy et Boulanger, 2015).

L'activité des tiques varie en fonction de l'espèce et du milieu. Une saisonnalité assez marquée peut se noter chez certaines espèces qui ne seront actives que durant une période de l'année. Des variations quotidiennes sont même observées en fonction de l'évolution de la température et de l'hygrométrie (Pérez-Eid, 2007).

### 1.5. Les espèces de tiques dures les plus fréquentes dans le bassin méditerranéen

Un peu plus d'une trentaine d'espèces de tiques dures sont répertoriées en France métropolitaine contre une dizaine d'espèces de tiques molles (Pérez-Eid, 2007). Selon les régions les espèces de tiques dures les plus souvent retrouvées sont : *I. ricinus*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *Ha. punctata* et *Rh. bursa* (Pérez-Eid, 2007 ; Agoulon et Plantard, 2012). Pour l'Europe et l'Afrique du Nord, plus d'une cinquantaine d'espèces de tiques dures sont connues pour une quinzaine d'espèces de tiques molles (Estrada-Peña et al., 2018). Concernant la zone méditerranéenne, cinq genres de tiques dures sont décrites (*Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes*, *Rhipicephalus* et *Hyalomma*) pour une vingtaine d'espèces principales recensées sur les animaux domestiques (Estrada-Peña et al. 2004 et 2018 ; Tableau 2).

Pour obtenir les clefs d'identification et les spécificités des différentes espèces, les ouvrages de référence sont notamment celui de Pérez-Eid (2007) pour les tiques présentes en France, Estrada-Peña et al. (2004) pour les tiques du pourtour méditerranéen, et Estrada-Peña et al. (2018) pour les tiques d'Europe et d'Afrique du Nord. De multiples autres espèces sont décrites chez les vertébrés terrestres sauvages et les oiseaux, notamment. Le genre *Amblyomma* n'est pour l'instant pas installé dans le bassin méditerranéen.

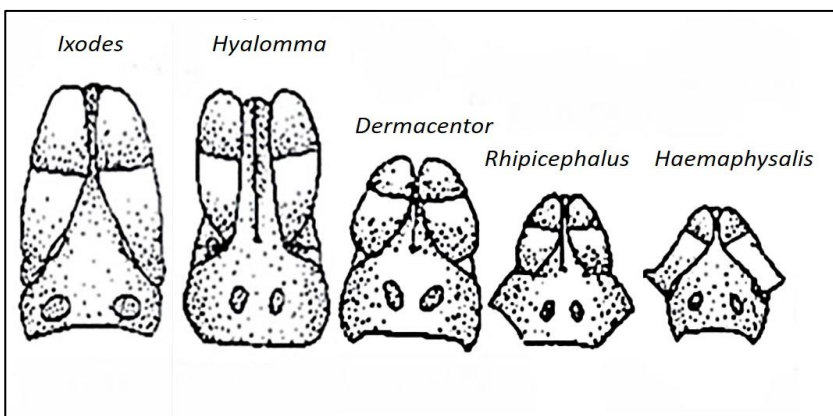


Figure 6. Capitulum des cinq genres de tiques dures présents en zone méditerranéenne (d'après Rhodain et Pérez, 1985)

**Tableau 2. Principales espèces de tiques présentes dans le bassin méditerranéen, localisation, hôtes et compétence vectorielle (d'après Estrada-Peña et al., 2018) (\*A. : *Anaplasma* ; Ba. : *Babesia* ; C. : *Coxiella* ; E. : *Ehrlichia* ; T. : *Theileria* ; R. : *Rickettsia* ; CCHF : fièvre hémorragique de Crimée-Congo ; TBE : encéphalite à tiques)**

Genre	Principales espèces	Principale localisation	Hôtes principaux	Agents pathogènes transmis*
<i>Dermacentor</i>	<i>D. marginatus</i>	Bassin méditerranéen	Bovins, ovins, caprins, chevaux, sangliers, chiens, petits mammifères (larves et nymphes)	<i>Ba. canis</i>
	<i>D. reticulatus</i>	Europe du Sud	Chien et autres carnivores, petits mammifères (larves et nymphes)	<i>Ba. canis</i> , <i>R. slovacica</i>
<i>Haemaphysalis</i>	<i>Ha. punctata</i>	Bassin méditerranéen	Bovins, ovins, caprins, chevaux	<i>Babesia</i> spp., <i>T. ovis</i> , <i>T. buffeli</i>
	<i>Ha. sulcata</i>	Bassin méditerranéen	Ongulés, surtout ovins	<i>A. ovis</i>
<i>Hyalomma</i>	<i>Hy. marginatum</i>	Bassin méditerranéen	Equins et bovins (principalement), ovins, caprins, dromadaires, petits mammifères (larves et nymphes)	Virus CCHF, <i>Ba. caballi</i> , <i>Rickettsia aeschlimannii</i>
	<i>Hy. scupense</i>	Afrique du Nord (surtout), Europe	Bovins	<i>T. annulata</i> , <i>T. equi</i> , <i>C. burnetii</i>
	<i>Hy. anatolicum</i>	Afrique du Nord, Moyen Orient	Bovins, ovins, caprins, dromadaires, équins	<i>T. annulata</i> , <i>T. equi</i> , <i>Ba. caballi</i>
	<i>Hy. excavatum</i>	Afrique du Nord, Moyen Orient	Equins, bovins, ovins, caprins, dromadaires, petits mammifères (larves, nymphes)	Rôle vectoriel méconnu
	<i>Hy. dromedarii</i>	Afrique du Nord, Moyen Orient	Dromadaires (principalement), bovins, ovins, caprins, chevaux	<i>T. annulata</i> , rôle vectoriel peu connu
	<i>Hy. impeltatum</i>	Afrique du Nord, Moyen Orient	Equins et bovins, ovins, caprins, dromadaires, petits mammifères (larves, nymphes)	Rôle vectoriel méconnu
	<i>Hy. rufipes</i>	Tunisie, Lybie, Egypte	Bovins (surtout), autres ongulés	Virus CCHF, <i>A. marginale</i> , <i>R. conorii</i> , <i>B. occultans</i>
	<i>Hy. lusitanicum</i>	Europe du Sud-Ouest (surtout), Algérie, Maroc	Bovins et autres ruminants, petits mammifères (larves, nymphes)	<i>T. annulata</i> , <i>T. equi</i> , virus CCHF, <i>C. burnetii</i>
<i>Ixodes</i>	<i>I. ricinus</i>	Europe, Afrique du nord (zones humides)	Ruminants, carnivores, petits mammifères et oiseaux (larves et nymphes)	<i>B. burgdorferi</i> s.l., <i>B. lusitaniae</i> , <i>B. garinii</i> , <i>A. phagocytophilum</i> , <i>Bar. henselae</i> , <i>Ba. bigemina</i> , <i>Ba. divergens</i> , <i>R. helvetica</i> , virus louping-ill, virus TBE.
	<i>I. gibbosus</i>	Bassin méditerranéen oriental, Italie	Bovins, ovins, caprins, chiens	Rôle vectoriel méconnu
	<i>I. hexagonus</i>	Europe	Chiens, autres carnivores, hérissons	Rôle vectoriel méconnu
<i>Rhipicephalus</i>	<i>Rh. sanguineus</i> s.l.	Bassin méditerranéen	Carnivores domestiques (chiens), ongulés	<i>E. canis</i> , <i>Ba. vogeli</i> , <i>Ba. ovis</i> , <i>A. marginale</i> , <i>A. ovis</i> , <i>R. conorii</i> , <i>R. massiliae</i>
	<i>Rh. bursa</i>	Bassin méditerranéen	Bovins, ovins, caprins, chevaux, ongulés sauvages	<i>Ba. bigemina</i> , <i>Ba. bovis</i> , <i>Ba. ovis</i> , <i>A. marginale</i> , <i>A. ovis</i> , <i>T. equi</i>
	<i>Rh. (Bo.) annulatus</i>	Europe de l'Ouest, Turquie, Afrique du Nord	Bovins (surtout), ongulés	<i>Ba. bovis</i> , <i>Ba. bigemina</i> , <i>A. marginale</i>
	<i>Rh. camicasi</i>	Nord-Est de l'Afrique	Bovins, ovins, caprins et dromadaires	Rôle vectoriel méconnu

Les différents genres peuvent se distinguer assez facilement morphologiquement à l'aide d'un stéréomicroscope (aussi nommé loupe binoculaire), notamment par la forme de leur capitulum (Figure 6). La différenciation entre les espèces du même genre peut nécessiter l'utilisation de la biologie moléculaire via des marqueurs génétiques.

Concernant plus spécifiquement îles méditerranéennes (Figure 7), différentes enquêtes menées dans quelques îles méditerranéennes à partir de collectes sur des animaux domestiques et/ou sauvages sont reprises dans le Tableau 3. Même si ces comparaisons sont à modérer, car les collectes ne sont pas forcément réalisées sur les mêmes hôtes et aux mêmes périodes, elles permettent d'avoir une idée globale du panel de tiques présentes sur ces îles. *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (qui regroupe aujourd'hui *Rh. sanguineus* s.s. et *Rh. turanicus*) apparaît être l'espèce majoritaire en Sicile (Torina et al., 2006), Sardaigne (Chisu et al., 2018), à Chypre (Tsatsaris et al., 2016) et sur les îles grecques (Psaroulaki et al., 2006), alors que *Rh. bursa* et *Hy. marginatum* ont été les deux principales espèces collectées sur des bovins dans les îles Baléares (Castellà et al., 2001).



Figure 7. Localisation de quelques îles méditerranéennes (d'après Google Earth®)

Plus au sud du bassin méditerranéen, les espèces du genre *Hyalomma* dominent largement le profil des tiques présentes en Afrique du Nord. Une étude menée sur les bovins en Tunisie (Bouattour et al., 1996) a décrit la présence de six espèces : *Hy. scupense* (84% des tiques collectées), *Hy. marginatum* (12%), *Hy. excavatum* (3%), *Hy. rufipes* (< 1%), *Rh. turanicus* (< 1%) et *Rh. sanguineus* s.l. (< 1%). Des collectes menées dans des zones plus humides du pays ont révélé la présence de cinq autres espèces : *Rh. (Bo.) annulatus*, *Rh. bursa*, *I. ricinus*, *Ha. sulcata* et *Ha. punctata* (Bouattour et al, 1999). Au Maroc, sept espèces ont été identifiées sur les bovins : *Hy. scupense* (31%), *Rh. (Bo.) annulatus* (29%) *Hy. marginatum* (26%), *Hy. anatolicum* (7%), *Hy. lusitanicum* (3%), *Rh. sanguineus* s.l. (3%) et *Rh. bursa* (< 1%) (Ouhelli et Pandey, 1982).

**Tableau 3. Espèces de tiques identifiées dans quelques îles méditerranéennes**

Île	Principales espèces identifiées	Référence
Sicile (Italie)	<i>Rh. sanguineus</i> s.l. (42%), <i>Rh. bursa</i> (32%), <i>Hy. lusitanicum</i> (12%), <i>Ha. punctata</i> (8%), <i>Hy. marginatum</i> (4%), <i>I. ricinus</i> (1%), <i>I. hexagonus</i> (<1%)	Torina et al., 2006
Sardaigne (Italie)	<i>Rh. sanguineus</i> s.l. (46%), <i>Rh. bursa</i> (26%), <i>D. marginatus</i> (18%), <i>Ha. punctata</i> (4%) <i>Hy. marginatum</i> (3%), <i>Ha. sulcata</i> (2%), <i>I. festai</i> (< 1%)	Chisu et al., 2018
Chypre	<i>Rh. sanguineus</i> s.l. (60%), <i>Rh. bursa</i> (18%), <i>Hy. excavatum</i> (9%), <i>Ha. sulcata</i> (9%), autres espèces (4%, <i>Hy. marginatum</i> , <i>Hy. rufipes</i> , <i>I. gibbosus</i> , <i>I. ventalloi</i> )	Tsatsaris et al., 2016
Iles grecques (Céphalonie, Grèce)	<i>Rh. sanguineus</i> s.l. (46%), <i>D. marginatus</i> (21%), <i>Rh. bursa</i> (18%), <i>Hy. marginatum</i> (7%), <i>Hy. excavatum</i> (4%), autres espèces (4%, <i>I. gibbosus</i> , <i>Ha. punctata</i> , <i>Ha. sulcata</i> )	Psaroulaki et al., 2006
Iles Baléares (Minorque, Espagne)	<i>Rh. bursa</i> (50%), <i>Hy. marginatum</i> (27%), <i>Hy. lusitanicum</i> (10%), <i>Rh. (Bo.) annulatus</i> (11%), <i>Rh. sanguineus</i> s.l. (2%), <i>Ha. punctata</i> (<1%)	Castellà et al., 2001

### 1.6. La lutte contre les tiques

La littérature traitant de la lutte contre les tiques est très abondante du fait de leur impact sanitaire et médical. Dans cette partie, ne seront traités que les principes de base de cette lutte qui a d'abord concerné uniquement le bétail et qui aujourd'hui s'applique également aux animaux de compagnie. Elle repose essentiellement sur l'utilisation de produits chimiques. Des dérivés arsenicaux étaient appliqués, dès la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, sous forme de bain. Au vu de leur toxicité et de l'apparition de résistances, les organochlorés se sont imposés dans cette lutte après la seconde guerre mondiale (DDT, lindane), eux aussi remplacés du fait de leur toxicité et des résistances observées. Les organophosphorés (éthion, chlorpyrifos, chlorfenvinphos, coumafos, diazinon, dichlorvos, ...) leur ont succédé, mais ils sont aujourd'hui remplacés par les pyréthriinoïdes de synthèse (deltaméthrine, perméthrine, fluméthrine, ...) qui s'appliquent sous forme de bains, aspersion, *pour-on*, ou collier pour les animaux de compagnie. L'amitraze (amitraz), les phénylpyrazoles (fipronil principalement), et les lactones macrocycliques (ivermectine, éprinomectine, etc.) qui peuvent être administrés par injection, sont également très utilisés. La lutte contre les tiques ne peut se révéler efficace que si elle prend en compte le cycle biologique, les périodes d'activité, les hôtes animaux et les sites de fixation des espèces de tiques ciblées (Pérez-Eid, 2007).

D'autres moyens que les molécules chimiques existent pour lutter contre les tiques. La lutte biologique, à base de parasitoïdes, de prédateurs ou de biopesticides (notamment les plantes répulsives utilisées sous forme d'huiles essentielles) ainsi que l'utilisation de phéromones ont fait l'objet de diverses publications mais actuellement leur utilisation est très restreinte comparée aux traitements chimiques. La lutte écologique basée sur la rotation des parcelles, ou la pratique de l'estive peut se révéler efficace en cassant le cycle biologique des tiques qui ne trouvent plus d'hôtes adaptés dans le milieu. Le « zero-grazing » (stabulation permanente) protège l'hôte animal des infestations mais elle ne peut être appliquée dans toutes les systèmes d'élevage et notamment en Corse où l'élevage est de type semi-extensif à extensif (cf. chapitre 3). La voie la plus prometteuse est celle des vaccins anti-tiques qui induirait une immunité significative contre les tiques. La protection de l'homme vis-à-vis des piqûres de tiques repose essentiellement sur la mise en place de mesures prophylactiques telles que le port de vêtements couvrants serrés au niveau du cou, des poignets et des chevilles et l'utilisation de répulsifs cutanés. Pour éviter la contamination de l'environnement privatif (jardin, habitation) les deux principales mesures sont d'empêcher la présence des ongulés domestiques et sauvages sur place et maintenir l'herbe rase. Les populations de micromammifères et d'oiseaux, sur lesquelles les larves et les nymphes se nourrissent souvent, sont bien plus complexes à contrôler. Lors d'une infestation massive de l'habitation, le plus souvent par la tique du chien, *Rh. sanguineus* s.l., l'élimination s'avère difficile, car les pontes de plusieurs milliers d'œufs vont nécessiter une multiplication des traitements acaricides directement dans l'habitation et sur les chiens (Pérez-Eid, 2007).





## 2. Importance médicale et vétérinaire des tiques

Les tiques sont des ectoparasites des animaux vertébrés terrestres sauvages et domestiques. Même si le parasitisme humain est accidentel et qu'il résulte de la présence de celui-ci dans les biotopes favorables des tiques, l'homme pâtit également des piqûres de tiques (Pérez-Eid, 2007). Les tiques ont un impact direct sur la santé de leur hôte, par la spoliation sanguine due au parasitisme hématophage, et principalement indirect par la transmission d'agents pathogènes lors du repas sanguin.

### 2.1. La piqûre

Les tiques sont attirées par l'hôte qu'elles repèrent grâce à leurs organes sensoriels sensibles à divers stimuli, principalement la chaleur, le gaz carbonique émis et les odeurs. Lors de la piqûre, l'enfoncement du rostre de la tique dans la peau (cf. 1.3.1, Figure 3) est facilité par l'action des enzymes contenues dans la salive. Le repas sanguin des tiques dures étant beaucoup plus long que celui de la plupart des autres arthropodes hématophages, la salive des tiques contient des molécules anti-inflammatoires et analgésiques annihilant la sensation de gêne chez l'hôte parasité, réduisant ainsi le risque d'arrachage. Cette salive a également des propriétés anti-coagulantes évitant l'hémostase durant la durée totale du repas sanguin, ainsi qu'une activité anti-immunitaire empêchant le rejet de la tique par l'organisme de l'hôte parasité (Bonnet et al, 2018).

Une fois celui-ci terminé, la tique se détache par arrêt de l'action mécanique de ses chélicères ce qui lui permet de tomber au sol. Les complications médicales directes d'une piqûre (formation d'abcès, myiases provoquées par la ponte de diptères dans la plaie) sont rares en zone tempérée mais relativement fréquentes en zone tropicale où la multiplication des piqûres au niveau des mamelles peut entraîner la perte des trayons. L'arrachement volontaire et incomplet d'une tique peut entraîner la formation d'un granulome inflammatoire sans gravité (Pérez-Eid, 2007).

### 2.2. Effets directs sur la santé humaine et animale

Une tique dure femelle peut ingérer jusqu'à 100 fois son poids lors du repas sanguin. Au regard de la quantité de sang prélevé, en cas d'une infestation massive, la spoliation sanguine peut entraîner une anémie qui sera suivie d'un affaiblissement des animaux, d'une diminution de l'immunité et de pertes de productions pour l'éleveur. Ces fortes infestations sont plus souvent rencontrées en zone tropicale, et notamment en Afrique où les tiques de l'espèce *Amblyomma variegatum* (Barré, 1989). Les mâles, les larves et les nymphes des Ixodidae, ne réalisant que de petits repas sanguins, ne peuvent être responsables de cette spoliation sanguine délétère.

Chez certaines espèces de tiques, la salive contient des toxines pouvant déclencher des allergies, et des paralysies qui peuvent s'avérer fatales chez l'animal comme chez l'homme. Aucun cas n'aurait été signalé en France métropolitaine, mais plusieurs ont été déclarés en Europe notamment avec des tiques du genre *Ixodes* (Mans et al., 2004).

### **2.3. Effets indirects sur la santé humaine et animale**

Les tiques étant reconnues aujourd'hui comme les seconds vecteurs d'agents pathogènes en santé humaine (en nombre de cas) dans le monde (Parola et al., 2001), et le premier en santé animale (Nicholson et al., 2009), c'est bien leur rôle dans la transmission des agents pathogènes qui va avoir un impact médical et sanitaire. La nature des agents pathogène transmis est multiple, des parasites, des bactéries et des virus sont concernés. La santé animale et la santé humaine peuvent être conjointement impliquées car la majorité de ces micro-organismes sont zoonotiques.

#### **2.3.1. La transmission tiques-hôtes vertébrés (et inversement) des micro-organismes**

Chaque repas sanguin de la tique est l'occasion d'échanger des micro-organismes avec son hôte, c'est-à-dire de s'infecter, de transmettre des agents infectieux, ou les deux à la fois. La transmission de la tique vers l'hôte se fait quasi exclusivement par l'intermédiaire de la salive. Les agents pathogènes (et autres micro-organismes) s'accumulent en effet au niveau des glandes salivaires où ils se multiplient et/ou se développent fréquemment aussi. La transmission inverse se fait par le sang infecté de l'hôte, le micro-organisme transite par l'appareil digestif de la tique avant de rejoindre les glandes salivaires. Dans ce dernier cas, plus la concentration des agents infectieux est importante, et leur présence prolongée dans le sang de l'hôte, plus la probabilité d'infecter le vecteur sera grande.

Dans de rares cas, une transmission fécale mineure a été décrite pour des espèces du genre *Rickettsia* (Reif et al., 2011) qui peuvent rester longtemps dans les fèces des tiques, les bactéries seraient ainsi inhalées par l'hôte. De même, une contamination par l'ingestion de tiques infectées a déjà été observée dans la transmission de virus et notamment pour le virus Louping-ill (Gilbert et al., 2004).

#### **2.3.2. La transmission des micro-organismes entre tiques**

Les tiques dures ne faisant qu'un repas par stade de développement, la transmission trans-stadiale (d'un stade au suivant) est obligatoire pour que la tique soit considérée comme vecteur de l'agent pathogène. La transmission trans-générationnelle ou trans-ovarienne permet à la femelle de certaines espèces de tiques de transmettre le micro-organisme à sa descendance, d'où son autre nom de transmission verticale. Dans le cas de la transmission d'un micro-organisme uniquement par transmission trans-stadiale, ce sont les nymphes et les adultes qui sont les seuls vecteurs ; la larve ne

pouvant pas dès son éclosion être porteuse du germe. Pour les agents pathogènes transmis également de façon trans-ovarienne, la jeune larve est également porteuse du micro-organisme et peut infecter l'hôte lors du premier repas sanguin. Lorsque dans un biotope, une espèce de tique est capable de transmettre trans-générationnellement un agent pathogène et que le ou les hôte(s) nécessaire(s) sont présents pour assurer un cycle continu, la tique devient un réservoir de l'agent pathogène (cf. 2.4.1) en plus d'en être un vecteur (McCoy et Boulanger et, 2015).

Certains agents infectieux peuvent également être transmis d'une tique infectée à une tique saine lors du phénomène de co-repas (*co-feeding*), lorsque les tiques se nourrissent sur un même animal dans un voisinage très proche (quelques centimètres) et sans même que la présence du micro-organisme soit nécessaire dans le sang circulant de l'hôte. Ce phénomène a essentiellement été décrit pour le virus de l'encéphalite à tiques (Nonaka et al., 2010, cf. 2.4.4.1) et pour les *Borrelia* spp. responsables de la maladie de Lyme (Voordouw, 2015).

### **2.3.3. Compétence et capacité vectorielle des tiques**

L'identification d'un agent pathogène dans une tique ne préjuge en rien de sa qualité de vecteur naturel, elle pourrait en être un simple « transporteur passif », suite à un gorgement sur un hôte infecté. Une espèce de tique est considérée comme un vecteur compétent si elle peut transmettre activement un agent infectieux (viral, bactérien ou parasitaire) à un hôte lors d'un repas sanguin.

La compétence vectorielle d'une espèce de tique ne peut être démontrée qu'expérimentalement lors de tests en laboratoires, mais celle-ci n'est pas suffisante pour prouver sa capacité vectorielle, qui se définit comme la capacité à transmettre réellement un agent pathogène dans un biotope précis. D'autres facteurs, notamment écologiques (densité suffisante du vecteur, présence de l'hôte, conditions climatiques, etc.) interviennent pour que la compétence vectorielle potentielle de la tique vis-à-vis d'un micro-organisme devienne effective et que la tique joue un rôle dans le cycle épidémiologique de l'agent pathogène (McCoy et Boulanger et, 2015).

## **2.4. Les principaux agents infectieux transmis par les tiques dures en zone méditerranéenne**

Les principaux agents pathogènes pouvant affecter l'homme et/ou l'animal sur le pourtour méditerranéen sont décrits dans cette partie. Concernant les agents pathogènes sévissant dans d'autres régions du globe, le livre de McCoy et Boulanger (2015) est une référence en langue française qui traite exhaustivement ce thème.

### 2.4.1. La notion de zoonose et de réservoir d'agents pathogènes

Les zoonoses sont communément définies comme des maladies transmissibles des animaux à l'homme ou inversement. En effet, une zoonose est une maladie provoquée par un agent pathogène (bactérie, virus, parasite, champignon ou prion) capable d'infecter au moins un animal vertébré (le plus souvent un mammifère ou un oiseau) et l'homme ; la transmission entre les deux étant assurée soit par contact direct (cohabitation, morsure) ou indirecte (aérosol, denrée alimentaire), soit par l'intermédiaire d'un vecteur, le plus souvent un arthropode piqueur (moustique, phlébotome, puce ou tique) (Dufour et Savey, 2006).

La majorité des agents pathogènes transmis par les tiques sont zoonotiques, et souvent, alors que le tableau clinique peut être sévère chez l'homme, l'animal atteint ne présente que peu ou pas de symptômes. Si l'agent pathogène est capable de survivre et se multiplier chez l'animal, ce dernier est alors considéré comme un réservoir de l'agent zoonotique. De façon plus générale, le réservoir est défini comme un système écologique (biotope et biocénose) dans lequel un agent pathogène survit indéfiniment (Ashford, 2003).

### 2.4.2. Les bactéries

#### 2.4.2.1. Genre *Borrelia*

- Le groupe *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Ces bactéries sont des spirochètes dont certaines espèces sont responsables de la maladie de Lyme. Le groupe est composé aujourd'hui d'une vingtaine d'espèces dans le monde, dont beaucoup ne provoquent pas de maladie chez l'homme. La borréliose de Lyme est la maladie transmise par les tiques avec la plus forte incidence en France. Elle était estimée en 2018 à plus de 100 cas par an pour 100 000 habitants (réseau Sentinelles, 2019). Les principales espèces du groupe *B. burgdorferi* s.l. reconnues pathogènes pour l'homme dans le bassin méditerranéen sont : *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* et *B. afzelii*. Ces bactéries sont transmises par les tiques du genre *Ixodes*, essentiellement *I. ricinus* dans la zone méditerranéenne (McCoy et Boulanger, 2015). Chez l'homme, la première manifestation clinique la plus fréquente est une inflammation cutanée localisée au niveau du point d'inoculation, appelée érythème migrant (Figure 8). Elle peut ensuite évoluer dans les semaines qui suivent en stade secondaire et tertiaire qui correspondent à une infection tissulaire focalisée unique ou multiple.

Le tableau clinique est polymorphe et dépend des tissus touchés. Les manifestations peuvent être de type neurologiques, arthritiques inflammatoires, oculaires, cardiaques et dermatologiques (Franz et al., 2003).

En première phase, les pénicillines et les doxycyclines sont le traitement de choix, et la ceftriaxone en phases secondaire et tertiaire. Un vaccin commercialisé aux Etats-Unis a été retiré du marché en 2002, et de nouveaux essais vaccinaux sont toujours en cours. Chez le chien qui semble être le seul hôte animal a développé des symptômes (arthrites et pour certaines races des atteintes rénales), des

vaccins sont commercialisés (McCoy et Boulanger, 2015). Un tableau clinique est également discuté pour les bovins et les chevaux.



Figure 8. Erythème migrant (photo laboratoire de parasitologie, Rennes)

- Le groupe des fièvres récurrentes

La plupart des borrélioses responsables de ces affections sont transmises par les tiques molles et ne sont donc pas traitées dans ce manuscrit, mis à part *B. miyamotoi* qui est transmise par les tiques du genre *Ixodes* dans le bassin méditerranéen. Les signes cliniques sont peu spécifiques et sont surtout marqués par une hyperthermie élevée, des céphalées et de l'asthénie.

#### 2.4.2.2. Genre *Rickettsia*

Le genre *Rickettsia* est composé de nombreuses espèces de petites bactéries Gram négatif qui parasitent les cellules eucaryotes. La plupart sont non pathogènes et sont décrites comme des endosymbiontes (non détaillés ici), d'autres sont responsables de rickettsioses dont une partie est due à des bactéries transmises par des tiques. Parmi les rickettsies pathogènes, on distingue le groupe des typhus (TG : *Typhus Group*) et le groupe des fièvres boutonneuses ou pourprées (SFG : *Spotted Fever Group*). Une vingtaine d'espèces du groupe SFG sont transmises par les tiques (Raoult et Parola, 2007). La fièvre pourprée la plus connue dans le bassin méditerranéen est la fièvre boutonneuse méditerranéenne qui est due à *R. conorii*, transmise par *Rh. sanguineus* sensu lato. D'autres espèces du genre *Rickettsia* sont aussi fréquemment ou plus ponctuellement signalées dans la zone méditerranéenne : *R. slovaca*, *R. aeschlimannii*, *R. massiliae*, *R. helvetica* et *R. raoultii* principalement (Oteo et Portillo, 2012).

Chez l'homme, les fièvres pourprées se manifestent par une fièvre d'installation brutale, supérieure à 39 °C, associée à des frissons, des myalgies et des céphalées ; à ce stade le diagnostic peut être orienté par l'observation d'une escarre d'inoculation au point de piqûre de la tique (tache noire). Vers le cinquième jour après l'infection, apparaît une éruption maculo-papuleuse qui se généralise à tout le corps en moins de trois jours, seule la face semble épargnée (McCoy et Boulanger, 2015). Certains signes cliniques sont typiques d'une rickettsiose spécifique. La présence d'adénopathies occipitales

douloureuses associées à une lésion nécrotique du cuir chevelu évoque une Tibola (*Tick-Borne LymphAdenopathy*) causée par *R. slovacica* et *R. raoultii* dans le bassin méditerranéen. Une rickettsiose non éruptive et sans escarre d'inoculation peut évoquer la présence de *R. helvetica* transmise par les tiques du genre *Ixodes*. La pathogénicité des *Rickettsia* spp. du groupe SFG chez l'animal n'a pas été démontrée et est toujours sujette à controverses mais le rôle de réservoir des animaux est fortement suspecté (Davoust et al., 2010). Le traitement des rickettsioses repose sur l'emploi des antibiotiques, et notamment la doxycycline pour sa bonne pénétration intracellulaire.

#### 2.4.2.3. Genres *Anaplasma* et *Ehrlichia*

Ces bactéries Gram négatifs appartiennent à la famille des *Anaplasmataceae* qui sont des organismes intracellulaires stricts.

- *Anaplasma phagocytophilum*

La maladie causée chez l'homme est l'anaplasmose granulocytaire humaine (AGH) qui est la principale anaplasmose touchant l'homme. Chez les animaux, elle prend le nom de fièvre à tiques (*tick-borne fever*) ou fièvre des pâtures pour les ruminants et d'anaplasmose équine pour les chevaux. Cette bactérie est vectorisée par de nombreuses espèces de tiques, mais l'espèce la plus fréquemment mise en cause dans le bassin méditerranéen est *I. ricinus*. Chez l'homme, la maladie a été décrite pour la première fois en 1994 (Strle, 2004) alors qu'elle est connue depuis 1932 chez les ruminants domestiques (Woldehiwet, 1993).

La maladie humaine se manifeste par une fièvre, fréquemment accompagnée de frissons, d'un état de malaise ou d'un syndrome polyalgique associé à des céphalées et myalgies. Généralement, la gravité de l'AGH est faible, sauf dans quelques formes sévères présentant des atteintes multiviscérales (Rebaudet et Brouqui, 2008). Chez les ruminants domestiques, les principaux symptômes sont une hyperthermie (40-42 °C), une diminution de l'appétit, un abattement et une chute de la production de lait. Des avortements tardifs sont également possibles. De rares cas mortels ont été observés chez l'homme (moins de 1% des formes) et l'animal (Stuen et al., 2013). La bactérie étant intracellulaire, le traitement de choix est la doxycycline chez l'homme et l'oxytétracycline chez l'animal pour toutes les espèces du genre *Anaplasma*.

- *Anaplasma marginale*

Cette bactérie qui touche essentiellement les bovins est responsable de l'anaplasmose animale la plus largement distribuée dans le monde. Plusieurs espèces de tiques sont compétentes pour la transmettre, notamment les tiques des genres *Dermacentor* et *Rhipicephalus*. Chez l'animal, la bactérie se loge dans les érythrocytes de son hôte, provoquant des signes cliniques peu spécifiques comme

l'hyperthermie, l'anémie et l'asthénie (Kokan et al., 2010). C'est une maladie à déclaration obligatoire en France même si pour l'heure, il n'y a pas eu de cas recensés sur le territoire français.

- Autres anaplasmoses et ehrlichioses

Le nombre de bactéries pouvant entraîner des anaplasmoses chez l'animal et/ou chez l'homme est relativement élevé. Les principales d'importance sanitaire en zone méditerranéenne sont : *Anaplasma bovis* (principales espèces affectées : bovins ; vecteur principal : *Rhipicephalus* spp.), *A. ovis* (ovins, caprins ; *Rhipicephalus* spp.), *A. platys* (chiens ; *Rh. sanguineus* s.l.), *Ehrlichia canis* (chiens ; *Rh. sanguineus* s.l.), *E. chaffeensis* (chiens, ruminants ; nombreux vecteurs) et *Neoehrlichia mikurensis* (l'homme ; *Ixodes* spp.). *Ehrlichia ruminantium*, qui a de lourdes conséquences sanitaires sur les troupeaux bovins et dont quelques cas humains ont été suspectés, ne devrait pour l'instant pas avoir d'impact dans la région méditerranéenne car ses vecteurs, les tiques du genre *Amblyomma*, n'y sont pas installées (Stuen et al., 2013).

#### 2.4.2.4. Autres bactéries transmises par les tiques

Il s'agit des bactéries du genre *Bartonella*, *Francisella* et *Coxiella*. La transmission par les tiques est souvent un des moyens d'infection de l'hôte mais pas le principal. Les caractéristiques de ces trois genres de bactéries sont abordées brièvement, le lecteur peut se reporter au livre de McCoy et Boulanger (2015) pour plus de détails.

- Genre *Bartonella*

Plusieurs espèces de bactéries composent ce genre, mais la plus importante en termes de santé publique est *Bar. henselae*. C'est une bactérie Gram négatif qui provoque chez l'homme « la maladie des griffes du chat ». Ce sont les fèces des puces qui permettent la transmission de la bactérie de chat à chat. La transmission habituelle à l'homme se fait par la griffure ou la morsure d'un chat, mais différentes études ont prouvé la compétence d'*I. ricinus* à transmettre la bactérie et ainsi suspecter le rôle des tiques dans la l'épidémiologie de la maladie (Cotté et al., 2008). Lors de la transmission à l'homme par une piqûre de tiques, la maladie est suspectée d'entraîner la formation d'une escarre, de l'asthénie et une adénopathie (Angelakis et al., 2010). De nombreux hôtes animaux sont également concernés, chez qui elle provoquerait de l'anorexie et de l'hyperthermie. Le traitement antibiotique se montre souvent peu efficace. Dans les cas graves, l'antibiotique utilisé dépend des symptômes, les fluoroquinolones, les macrolides, les tétracyclines sont notamment utilisés (Baddour et al., 2005).

- Genre *Francisella*

*Francisella tularensis* est un colibacille aérobic Gram négatif responsable de la tularémie. Deux sous-espèces infectent l'homme, le biovar *tularensis*, américain, est le plus virulent, et le biovar *holarctica* surtout eurasien, moins agressif. De nombreuses espèces de tiques seraient impliquées dans la



transmission de la bactérie. La voie vectorielle représenterait 15 à 20% des cas humains dans l’Ancien Monde contre 50% aux Etats-Unis (Vaissaire et Le Coustumier, 2007). La maladie se caractérise par un intense syndrome grippal, souvent associé à une hépatomégalie, qui par la suite se complique le plus souvent par un syndrome ulcéro-ganglionnaire mais d’autres formes sont également observées (oculaire et respiratoire notamment). Le traitement recommandé est à base de quinolones. Les principaux réservoirs animaux étant les petits mammifères, comme les rongeurs, le tableau clinique chez l’animal est mal renseigné (McCoy et Boulanger, 2015).

- Genre *Coxiella*

*Coxiella burnetii* est une bactérie Gram négatif intracellulaire, responsable de la fièvre Q. Elle peut affecter un grand nombre d’animaux (oiseaux, mammifères, reptiles) et l’homme. La bactérie résiste très longtemps dans le milieu extérieur et la transmission vectorielle (nombreuses espèces de tiques impliquées) est mineure, la voie principale de contamination étant l’inhalation d’aérosols ou de poussières. La maladie humaine peut se présenter sous la forme d’un syndrome grippal mais dans 60% des cas, elle est asymptomatique (Maurin et Raoult, 1999) alors qu’elle provoque des avortements chez les ruminants domestiques. Le traitement recommandé chez l’homme est la doxycycline alors que chez l’animal la mise en place de mesures sanitaires (isolement des animaux ayant avorté notamment) et la vaccination sont préconisés (De Cremoux et al., 2012).

### **2.4.3. Les parasites**

Les parasites du genre *Babesia* et *Theileria* sont à l’origine de piroplasmoses chez l’animal. Leur impact économique sur les cheptels peut être conséquent en fonction de l’agent pathogène mis en cause. Ce sont des parasites intra-érythrocytaires qui provoquent chez leur hôte de l’anorexie, de l’apathie, de la fièvre, un ictère et de l’anémie. L’hémoglobinurie est souvent présente pour la babésiose alors que la theilériose peut se caractériser par un gonflement des ganglions lymphatiques et un emphysème pulmonaire. L’imidocarbe est classiquement utilisé pour lutter contre les piroplasmoses. Deux parasites du genre *Babesia* sont reconnus comme zoonotiques même si les cas humains sont très rares : *Ba. divergens* et *Ba. microti*. Le traitement actuellement préconisé chez l’homme consiste en une combinaison d’atovaquone et d’azithromycine.

#### **2.4.3.1. Genre *Babesia***

Les principales espèces du genre *Babesia* sévissant dans le bassin méditerranéen sont présentés dans le Tableau 4. Ces parasites se caractérisent par une transmission trans-générationnelle en plus de l’habituelle transmission trans-stadiale (Uilenberg, 2006).

**Tableau 4. Principales espèces de *Babesia* identifiées dans le bassin méditerranéen (d'après McCoy et Boulanger, 2015) (I. : *Ixodes*, Rh. : *Rhipicephalus*, Ba. : *Babesia*)**

Espèce	Principale localisation	Hôtes	Pathogénicité	Vecteur
<i>Ba. bovis</i>	Zone subtropicale (Afrique du Nord, Moyen Orient)	Bovins	Très pathogène	<i>Rhipicephalus</i> spp.
<i>Ba. bigemina</i>	Zone subtropicale (Afrique du Nord, Moyen Orient)	Bovins	Piroplasmose classique	<i>Rhipicephalus</i> spp.
<i>Ba. caballi</i>	Zone tropicale, Europe	Chevaux	Piroplasmose classique	<i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Dermacentor</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp.
<i>Ba. canis</i>	Europe	Chiens	Piroplasmose classique	<i>Dermacentor</i> spp.
<i>Ba. divergens</i>	Europe	Bovins	Piroplasmose classique	<i>I. ricinus</i>
<i>Ba. gibsoni</i>	Bassin méditerranéen	Chiens	Piroplasmose classique	<i>Haemaphysalis</i> spp., <i>Rh. sanguineus</i>
<i>Ba. major</i>	Bassin méditerranéen	Bovins	Peu pathogène	<i>Haemaphysalis</i> spp
<i>Ba. microti</i> *	Europe	Chiens	Piroplasmose classique	<i>Ixodes</i> spp. (?)
<i>Ba. ovis</i>	Bassin méditerranéen	Ovins, caprins	Piroplasmose classique	<i>Rhipicephalus</i> spp.
<i>Ba. venatorum</i>	Europe	Cervidés	Piroplasmose classique	<i>Rhipicephalus</i> spp.
<i>Ba. vogeli</i>	Bassin méditerranéen	Chiens	Piroplasmose classique	<i>Rhipicephalus</i> spp.

\*Nomenclature en discussion

Dans le bassin méditerranéen, trois espèces sont connues comme zoonotiques : *Ba. divergens*, *Ba. microti* et *Ba. venatorum*

#### 2.4.3.2. Genre *Theileria*

Ces parasites se différencient des *Babesia* spp. par une phase intra-lymphocytaire qui précède la phase intra-érythrocytaire et une transmission uniquement trans-stadiale (Sonenshine, 2014b).

**Tableau 5. Principales espèces de *Theileria* identifiées dans le bassin méditerranéen (d'après McCoy et Boulanger, 2015)**

Espèce	Principale localisation	Hôtes	Pathogénicité	Vecteur
<i>T. annulata</i>	Afrique du Nord, Europe du Sud-Ouest	Bovins	Theilériose bovine tropicale, très pathogène	<i>Hyalomma</i> spp.
<i>T. buffeli</i>	Bassin méditerranéen	Bovins	Peu pathogène	<i>Haemaphysalis</i> spp.
<i>T. equi</i>	Bassin méditerranéen	Chevaux	Theilériose classique	<i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Dermacentor</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp.

#### 2.4.4. Les virus

De nombreux virus ont été identifiés dans les tiques. Ne seront abordés ici que les deux principaux présents dans la zone méditerranéenne : le virus de l'encéphalite à tiques (*Tick-borne encephalitis*, TBE) et le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF). Le virus de la peste porcine africaine n'est pas traité, malgré le fort impact sanitaire de cette pathologie chez les suidés, car la transmission vectorielle serait mineure dans la zone méditerranéenne et les principales tiques vectrices, du genre *Ornithodoros*, sont des tiques molles.

##### 2.4.4.1. Virus de l'encéphalite à tiques (TBE)

Le virus de l'encéphalite à tique appartient à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus*. L'encéphalite à tiques, décrite pour la première fois en 1931 en Autriche, est une zoonose dont le tableau clinique chez l'animal (principalement le chien) apparaît fruste alors qu'elle représente un véritable problème de santé publique. La zone de répartition s'étend de l'Europe de l'Ouest jusqu'au Japon. Le virus TBE est transmis par *I. ricinus* dans le bassin méditerranéen, alors qu'en Asie le principal vecteur est *I. persulcatus* (McCoy et Boulanger, 2015). Aujourd'hui ce sont plus de 10 000 cas humains qui sont officiellement recensés chaque année dans le monde dont une centaine en France depuis 1968. Le réservoir principal de la maladie est représenté par les petits mammifères sauvages. Les tiques se contamineraient principalement par co-repas (cf. 2.3.2). En dehors de l'infection suite à une piqûre de tique, l'homme peut également être infecté par l'ingestion de produits lactés issus d'animaux infectés (Hansmann et al., 2006).

L'infection peut être asymptomatique mais, dans sa forme classique, après avoir développé un syndrome grippal les premiers jours, l'individu atteint montre des signes méningés accompagnés dans 50% des cas d'encéphalites (troubles de la motricité, somnolence, tremblements). La mortalité pour le sous-type européen du virus présent dans le bassin méditerranéen est comprise entre 0,5 et 3%, alors que pour le sous-type asiatique elle peut dépasser les 30%. Les séquelles neurologiques sont fréquentes (10%) et augmentent avec l'âge des patients. Aucun traitement n'existe mais un vaccin inactivé est disponible (Donoso Mantke et al., 2008).

##### 2.4.4.2. Virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF)

Le virus CCHF ayant fait l'objet de recherches spécifiques (sérologie et PCR individuelle) dans cette étude, il est présenté en détails dans le sixième chapitre du manuscrit.

La fièvre hémorragique de Crimée-Congo a été décrite pour la première fois dans les années 1940 dans la péninsule de Crimée lors d'une épidémie de fièvres hémorragiques sévères (Chumakov et al., 1968). Le virus fut nommé virus CCHF suite à l'isolement en 1956 du virus Congo antigéniquement identique (Casals, 1969). Cette zoonose est due à un virus à ARN du genre *Orthonairovirus*, de la

famille des *Nairoviridae*. La CCHF est la maladie virale transmise par les tiques la plus répandue dans le monde, son aire d'extension va de l'Europe jusqu'à la Chine en passant par l'Afrique et le Moyen-Orient. La maladie, parfois asymptomatique chez l'homme, peut se présenter sous la forme d'un syndrome fébrile non spécifique ou sous une forme plus sévère entraînant de sérieux troubles vasculaires et des lésions hémorragiques multiples suivies de la mort dans 5 à 30% des cas (cf. 6.1, Figure 19 ; Bente et al, 2013). De nombreux animaux sont considérés comme des réservoirs asymptomatiques du virus CCHF. Les tiques du genre *Hyalomma*, et *Hy. marginatum* principalement dans la région méditerranéenne, sont les vecteurs naturels du virus mais il peut également être transmis par voie sanguine (Cf. 6.1, Figure 20). L'apparition récente (2016) de cas autochtones en Espagne a montré que l'Europe de l'Ouest pouvait également être touché par le virus (Negredo et al., 2017). Le traitement à base de ribavirine est efficace dans les formes sévères de l'infection. Des injections d'anticorps ont déjà été utilisés dans les zones à forte poussée épidémique et un vaccin est également disponible (Bente et al, 2013).



### **3. La Corse, les tiques et les agents pathogènes transmis : quelle problématique ?**

#### **3.1. Situation géographique et environnementale de la Corse**

La Corse est une île située dans la partie nord occidentale de la mer Méditerranée (cf. 1.5, Figure 7). Administrativement, c'est une région française constituée de deux départements, la Haute-Corse et la Corse-du-Sud, et de 360 communes. Elle se situe à 180 km au Sud-Est de la France continentale, à 80 km à l'Ouest de l'Italie continentale et à 15 km au Nord de la Sardaigne. La longueur maximale de l'île est de 183 km pour 85 km de largeur. D'une superficie de 8 722 km<sup>2</sup>, elle est la quatrième plus grande île de la Méditerranée après la Sicile, la Sardaigne et Chypre. En 1880, Guy de Maupassant ne s'était pas trompé en qualifiant la Corse de « montagne sur la mer ». Avec 120 sommets dépassant les 2 000 m d'altitude et son point culminant, le Monte Cinto, qui s'élève à 2 706 mètres, la Corse est de loin la plus montagneuse des îles méditerranéennes. La végétation de l'île est adaptée à cette topographie accidentée présentant différents étages de végétation allant de l'étage littoral jusqu'à l'étage alpin. La végétation recouvre 46% du territoire insulaire, faisant de la Corse « l'île verte » de la Méditerranée et la région de France métropolitaine la plus boisée. La Corse se différencie également des autres îles méditerranéennes par ses importantes ressources en eau (cours d'eau, étangs, lacs), l'île étant notamment traversée par 1 380 km de cours d'eau. Le climat y est considéré globalement comme tempéré chaud, mais la topographie atypique de l'île permet l'existence d'une multitude de microclimats et d'importantes variations entre les zones littorales relativement sèches et les zones montagneuses plutôt humides (Gamisans, 2010).

L'île se situe sur le passage des oiseaux migrateurs remontant d'Afrique, suggérant ainsi de possibles pénétrations et installations de vecteurs exotiques potentiellement infectés. Les caractéristiques climatiques méditerranéennes de l'île ont d'ailleurs déjà été reconnues comme favorables à la survie des vecteurs hématophages, comme les culicoïdes, vecteurs du virus de la fièvre catarrhale ovine (Biteau-Coroller, 2006).

La population, estimée à 330 000 habitants (Insee, 2016), fait de la Corse la région de France métropolitaine la moins densément peuplée (38 habitants / km<sup>2</sup>). Même si une partie importante de cette population se concentre autour des deux grandes agglomérations que sont Ajaccio et Bastia, la société corse reste largement à dominante rurale.

### 3.2. L'élevage

La Corse est incontestablement une région d'élevage. Les productions concernent le lait et sa transformation pour les ovins et les caprins, et la viande pour les porcins (charcuterie essentiellement) et les bovins (abattage des veaux de huit à douze mois principalement). L'élevage de volailles se développe mais reste encore relativement mineur. L'apiculture, qui est un secteur actif sur l'île, et la pisciculture, en pleine croissance, ne seront pas détaillées car seuls les vertébrés terrestres sont concernés par le parasitisme des tiques.

L'élevage est généralement de type semi-extensif pour les ovins, caprins et porcins. Les animaux sont lâchés libres pendant la journée sur le parcours, mais des bâtiments d'élevage (bergeries pour les petits ruminants, porcheries pour les reproducteurs en élevage porcin) permettent de les rassembler et les abriter. L'élevage bovin est essentiellement de type extensif à très extensif. Les animaux sont en permanence sur le parcours et aucune étable ne permet de les accueillir. En cas de manque de ressources alimentaires du parcours, les bovins sont nourris avec de l'aliment (foin essentiellement) déposé sur un lieu connu des animaux. Le nombre de têtes est estimé à 110 000 ovins, 70 000 bovins, 50 000 porcins et 45 000 caprins (ODARC, 2017). Ce mode d'élevage traditionnel entraîne de multiples interactions avec la faune sauvage, essentiellement les sangliers (*Sus scrofa*), et pourrait favoriser la circulation des agents pathogènes entre les compartiments domestique et sauvage. Les foyers de tuberculose bovine (causée par *Mycobacterium bovis*) sont, notamment, en très forte augmentation aussi bien chez les bovins que chez les porcins, et le rôle de réservoir joué par le sanglier en est probablement une cause importante.

L'élevage insulaire est globalement caractérisé par un faible suivi sanitaire. Les vétérinaires ruraux déclarent que moins de 10% de leur clientèle les sollicite en dehors des opérations de prophylaxie obligatoire (enquête GTV Corse, 2017). Les traitements antiparasitaires, et notamment les traitements acaricides, sont employés de façon irrégulière et non raisonnée (surtout dans l'espèce bovine) favorisant de fortes infestations par les tiques et une probable transmission d'agents pathogènes. De nombreux animaux, essentiellement des porcins, sont abattus en dehors de tout contrôle sanitaire et sans élimination des viscères, potentiellement infectées, dans un circuit sanitaire approprié. Ces pratiques à risque facilitent la circulation des agents pathogènes et notamment ceux transmis par l'alimentation comme *Echinococcus granulosus* (responsable de l'hydatidose animale et humaine, cf. 7.2.) et *Trichinella britovi* (responsable de la trichinellose chez l'homme, asymptomatique chez l'animal).

### 3.3. Les ongulés sauvages et la chasse

La Corse est la première région française de chasse (plus de 22 000 permis de chasse sont délivrés annuellement pour une population de 330 000 habitants) et le principal gibier concerné est le sanglier qui est l'ongulé sauvage le plus présent sur le territoire. Le sanglier est chassé en battue avec des meutes de chiens utilisés comme rabatteurs. La saison de chasse se déroule habituellement de la mi-août à fin janvier. Les tableaux de chasse représentent la seule source d'information pour estimer la population insulaire de suidés sauvages. Les environ 20 000 sangliers officiellement chassés chaque année en Corse représenteraient la moitié de la population vivant sur l'île. Ainsi, la densité estimée de sangliers en Corse pourrait dépasser 10 animaux/km<sup>2</sup> dans certaines microrégions (Richomme, 2009). Les croisements sont multiples avec les porcs lâchés sur le parcours, et si les éleveurs éliminent généralement les produits issus de ces croisements, ceux qui naissent dans la nature de mère sangliers sont nombreux et augmentent le métissage. Outre les interactions perpétuelles entre les sangliers et les animaux domestiques, le dépeçage des carcasses et l'élimination des déchets de chasse directement dans la nature sont autant de pratiques à risques sanitaires élevés. Même si les fosses à déchets de chasse ont actuellement tendance à se développer sous l'impulsion des fédérations de chasse, seules une vingtaine de communes en sont aujourd'hui équipées.

Deux autres ongulés sauvages sont présents en Corse, le mouflon (*Ovis gmelinii musimon* var. *corsicana*) et le cerf (*Cervus elaphus corsicanus*). Les mouflons sont présents dans la zone du Monte Cinto (Haute-Corse) et dans l'extrême sud de l'île (massif de Bavella) alors que le cerf a été réintroduit à la fin des années 1980 dans cinq microrégions (Alta Rocca, Fium'Orbu, Vénacais, Caccia et Deux Sorru). Ce sont deux espèces protégées en Corse, leur chasse est interdite.

### 3.4. Le tourisme

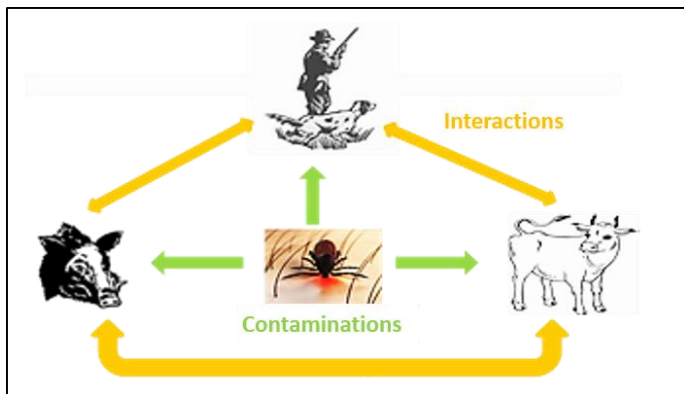
La Corse est proportionnellement la première région touristique française avec plus de trois millions de visiteurs par an pour une population d'à peine plus de 300 000 habitants. À côté du tourisme balnéaire classique de la côte, le tourisme rural est en pleine expansion. Le sentier de grande randonnée, le GR20, mondialement connu, est parcouru annuellement par plus de 30 000 marcheurs, et avec les autres itinéraires qui traversent l'île, ce sont des dizaines de milliers de personnes qui se retrouvent chaque année sur les chemins de randonnées. La Corse est également un lieu privilégié pour la pratique de l'escalade, de l'accrobranche et du canyoning.

### 3.5. Conclusion : un contexte favorable aux tiques et agents pathogènes transmis ?

La pluralité écologique, géographique et climatique de la Corse fait de l'île un lieu potentiellement privilégié pour le développement d'espèces de tiques adaptées à différents biotopes. Les ongulés



sauvages et domestiques, qui se partagent souvent le même territoire, sont également des proies particulièrement appréciées des tiques dures. Durant la pratique des activités extérieures, l'homme qu'il soit chasseur, randonneur ou éleveur, est en interaction plus ou moins directe avec ces animaux, l'exposant ainsi aux piqûres des tiques mais également aux agents pathogènes qu'elles véhiculeraient (Figure 9). Ainsi, la population, vivant ou séjournant en Corse, pourrait être spécifiquement exposée aux agents pathogènes transmis par les tiques.



**Figure 9. Schéma des interactions entre les différents compartiments en Corse : homme, faune sauvage, animaux domestiques et vecteurs**

## **Rappel des objectifs de la thèse**

Au vu du contexte écologique potentiellement favorable à l'installation d'une population diversifiée de tiques en Corse et du manque de connaissances sur ce sujet, le premier objectif de cette étude est de décrire les différentes espèces de tiques dures présentes sur l'île, leurs distributions géographiques, leurs périodes d'activité ainsi que leurs préférences d'hôte.

Le second objectif poursuivi est de rechercher de façon exhaustive dans les tiques collectées l'ADN ou l'ARN des principaux agents pathogènes connus dans le bassin méditerranéen afin de proposer une première description de l'exposition potentielle à ces micro-organismes des populations humaines et animales vivant en Corse, et notamment au virus CCHF pour lequel une partie de cette étude a spécifiquement été consacrée.

En parallèle de ces travaux sur les tiques et les agents pathogènes qu'elles transmettent, d'autres agents zoonotiques ont été étudiés chez l'animal afin de mieux comprendre si les fortes interactions qui existent entre les compartiments sauvage, domestique et humain en Corse favorisent la circulation des agents pathogènes zoonotiques.



## 4. Etude des tiques (Ixodidae) présentes en Corse

**Grech-Angelini, S.**, Stachurski, F., Lancelot, R., Boissier, J., Allienne, J. F., Marco, S., Maestrini, O., Uilenberg, G. (2016). Ticks (Acari: Ixodidae) infesting cattle and some other domestic and wild hosts on the French Mediterranean island of Corsica. *Parasites & Vectors*, 9(1), 582.

### 4.1. Contexte de l'étude

Sa situation d'île méditerranéenne, présentant une multitude de biotopes, fait de la Corse une zone à priori favorable à la présence d'une diversité importante d'espèces de tiques (cf. 3.1.). La faune locale de tiques n'avait pourtant jamais fait l'objet d'une étude exhaustive avant 2014. Seuls quelques écrits, souvent non publiés et regroupés dans le livre de Pérez-Eid (2007), fournissent des informations éparses sur les tiques présentes sur le territoire insulaire. Des espèces typiquement méditerranéennes telles que *Rh. bursa*, *Rh. sanguineus* s.l., *Ha. punctata* sont décrites sur l'île. *Hyalomma marginatum*, très rarement signalée en France continentale, y serait recensée en forte densité alors que *Ixodes ricinus* et *Rh. (Bo.) annulatus* font l'objet de quelques signalements ponctuels. Cette étude se proposait de faire un état des lieux le plus exhaustif possible des espèces de tiques présentes en Corse. Les principaux résultats sont présentés ci-dessous en langue française mais l'ensemble des données, dont les tableaux et figures, sont à consulter dans la publication scientifique qui suit (Grech-Angelini et al., 2016a).

### 4.2. Matériel et méthode

#### 4.2.1. Collecte des tiques

La collecte de tiques avec la « technique du drapeau » est classiquement utilisée dans des études comparables concernant le recensement des espèces de tiques sur un territoire. Un drapeau blanc tiré par le collecteur joue le rôle de leurre animal pour les tiques qui sont à l'affût (Figure 10). Le collecteur qui réalise des transects ramasse les tiques sur le drapeau au bout d'une distance définie, pouvant ainsi estimer les densités de présence des tiques sur le terrain. La technique du drapeau est efficace dans des zones de forêts et prairies où le collecteur peut facilement circuler alors que le maquis dense rencontré en Corse s'y prête mal. Les prélèvements de tiques sur animaux ont été retenus pour l'ensemble de cette étude car, en plus de la difficulté du terrain corse, la collecte au drapeau ne permet pas de récupérer les tiques qui chassent activement (comme les espèces du genre *Hyalomma*) alors que les prélèvements sur animaux concernent toutes les espèces de tiques. D'autre part, la connaissance des taux et niveaux d'infestation, des spécificités infestations des hôtes animaux

par les différentes espèces de tiques ainsi que les périodes d'infestation sont des données importantes en termes de santé animale et de lutte contre les tiques.



Figure 10. Collecte de tiques au drapeau (photo Anses)

Les bovins (environ 70 000 animaux) sont élevés de façon très extensive en Corse (cf. 3.2.). Lâchés sur le parcours toute l'année, ils n'ont pas d'étable ou abris et sont peu soumis aux traitements acaricides. Les bovins, présentant ainsi des bonnes caractéristiques de « pièges à tiques », ont été choisis comme « hôte étalon » de cette étude. Les collectes de tiques ont eu lieu sur une année entière, de mai 2014 à mai 2015. Les prélèvements se sont déroulés dans les trois abattoirs bovins de l'île (Figure 11). Une quinzaine d'animaux étaient inspectés mensuellement dans les abattoirs de Cuttoli (Corse-du-Sud) et Ponte-Leccia (Haute-Corse), alors que l'abattoir de Porto-Vecchio (à l'extrême sud de l'île) était visité trimestriellement. Les tiques étaient prélevées directement sur la peau de l'animal, juste après l'arrachage mécanique du cuir (Figure 12). Le lieu d'élevage des bovins a pu être retracé jusqu'au niveau de la commune grâce au système d'identification nationale des bovins (boucle auriculaire et passeport), et de courts entretiens avec les éleveurs ont permis de localiser le parcours habituel des animaux.

Les collectes sur les autres animaux domestiques et sauvages ont été réalisées de façon plus ponctuelle. Les ovins, caprins et équins ont été examinés mensuellement dans trois fermes, de mai à août 2014. Les tiques de mouflons, cerfs et sangliers (et hérissons, *Erinaceus europaeus*) ont été respectivement collectées par l'ONCFS, le PNRC et des chasseurs volontaires. Quelques tiques d'oiseaux ont également pu être collectées grâce à la participation de bagueurs dans le nord de l'île.

Les tiques des carnivores domestiques ont été prélevées par des vétérinaires praticiens (cf. Figure 2 de l'article pour la localisation des animaux prélevés, page 58).

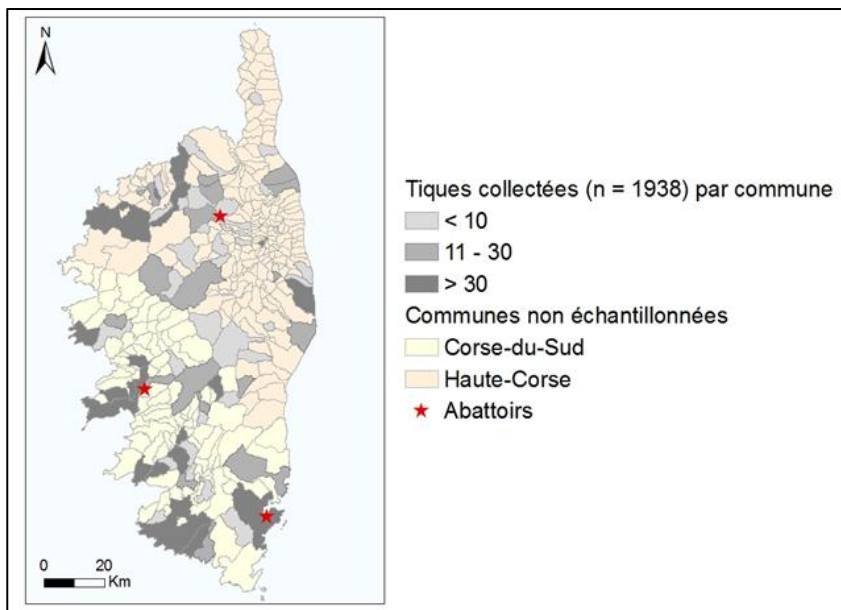


Figure 11. Zone échantillonnée et nombre de bovins prélevés par commune



Figure 12. Cuir de bovin étalé sur le sol de l'abattoir pour la collecte des tiques

Les tiques ont été conservées dans de l'éthanol à 70° à la température de -20°C jusqu'à leur identification. Les collectes des autres animaux ont été comparées à celles des bovins (hôte « étalon ») prélevés durant la même période et dans la même zone afin de mettre en évidence des préférences d'infestations d'hôtes (cf. Figure 2 de l'article, page 58).

#### 4.2.2. Identification des tiques et analyse des données

Les tiques ont été identifiées morphologiquement en utilisant les clefs usuelles (Estrada-Peña et al, 2004 ; Pérez-Eid, 2007). Pour certaines espèces, peu collectées durant cette étude ou pour lesquelles l'identification s'est avérée complexe, la biologie moléculaire a été utilisée. Les marqueurs génétiques ont été, selon l'espèce de tiques, *cox1* (*mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1*), *ITS2* (*internal transcribed spacer 2*) ou l'ADN ribosomal 16s.

Une régression logistique bêta-binomiale a été utilisée pour montrer d'éventuelles spécificités d'infestations des tiques envers les hôtes animaux et prendre en compte une possible dispersion des données. Les résultats ont été considérés statistiquement significatifs pour  $p < 0,05$ .

### 4.3. Résultats

#### 4.3.1. Infestation des bovins

Plus de 400 bovins ( $n = 418$ ) originaires de 161 exploitations ont été inspectés en abattoirs et 1938 tiques ont été prélevées. Le taux moyen d'infestation sur l'année, des animaux et des exploitations, était respectivement de 63% et 75%. Huit espèces de tiques ont parasité les bovins insulaires, *Rhipicephalus (Rh.) bursa* et *Hyalomma (Hy.) marginatum* ont été les plus fréquemment collectées, suivies par *Hy. scupense*, *Ixodes (I.) ricinus*, *Haemaphysalis (Ha.) punctata* et *Rh. sanguineus (s.l.)*. *Rh. (Boophilus) annulatus* et *Dermacentor (D.) marginatus* ont plus rarement infesté les bovins (Tableau 6).

Tableau 6. Espèces de tiques collectées sur les bovins corses de mai 2014 à avril 2015

Espèces de tiques	Individus collectés	%
<i>Rhipicephalus bursa</i>	1087	56,1
<i>Hyalomma marginatum</i>	417	21,5
<i>Hyalomma scupense</i>	168	8,7
<i>Ixodes ricinus</i>	110	5,7
<i>Haemaphysalis punctata</i>	94	4,8
<i>Rhipicephalus sanguineus (s.l.)</i>	45	2,3
<i>Rhipicephalus (Bo.) annulatus</i>	13	0,7
<i>Dermacentor marginatus</i>	4	0,2
Total	1938	100

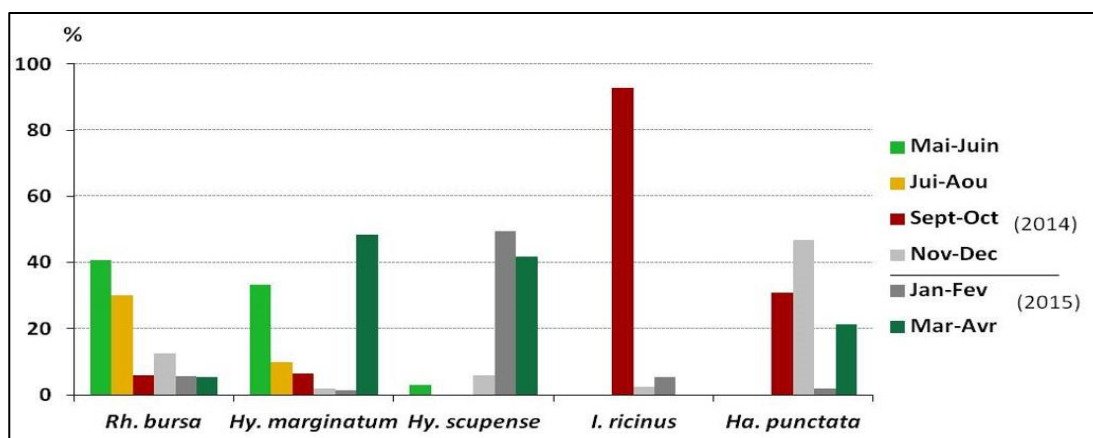


Figure 13. Activité des différentes espèces de tiques collectées en Corse

Les différentes espèces de tiques n'ont pas été actives aux mêmes périodes de l'année. *Rhipicephalus bursa* a été collectée toute l'année mais avec un pic d'activité de mai à août (Figure 13). *Hyalomma marginatum* a surtout été active de mars à juillet alors que *Hy. scupense* l'a été essentiellement de janvier à avril. *Ixodes ricinus* a principalement été active au début de l'automne (septembre-octobre). Concernant l'activité des différences espèces en fonction de l'altitude, *Rh. bursa* était l'espèce majoritaire à toutes les altitudes alors que *Hy. marginatum* a principalement été collectée dans la zone 0-200 m et *I. ricinus* à des altitudes supérieures à 600m (Grech-Angelini et al., 2016a ; Figure 4, page 62).

#### 4.3.2. Comparaison avec les autres hôtes animaux

Environ 1 000 ovins et 1 000 caprins ont été inspectés dans les six bergeries incluses dans l'étude. Le taux d'infestation des animaux était de 4% pour les ovins et 28% pour les caprins. *Rhipicephalus bursa* a représenté plus de 98% des tiques collectées (n = 393) chez les petits ruminants. Sur les 55 chevaux inspectés, 53% étaient infestés. *Hyalomma marginatum* a été la principale espèce collectée, représentant plus de 78% des tiques prélevées (n = 180) sur les chevaux, suivie par *Rh. bursa* (21%). Les carnivores domestiques étaient infestés quasi exclusivement par *Rh. sanguineus* (s.l.) qui constituait 97% des spécimens collectés (n = 162) sur ces hôtes. Les sangliers étaient principalement infestés par *D. marginatus* qui a représenté plus de 88% des tiques collectées (n = 297). Ainsi, *Rh. bursa*, *Hy. marginatum*, *Rh. sanguineus* s.l. et *D. marginatus* ont montré une préférence d'infestation significative respectivement pour les petits ruminants, les chevaux, les chiens et les sangliers par comparaison avec les collectes réalisées sur bovins. Les mouflons collectés uniquement durant la saison hivernale ont été infestés à plus de 90% par *Rh. bursa* (140 tiques prélevées) et quatre individus d'une autre espèce, *Ha. sulcata*, ont été identifiés sur cet hôte portant ainsi à neuf le nombre d'espèces de tiques décrites en Corse. Les quelques tiques prélevées (n = 14) sur cerfs étaient toutes des *I. ricinus* (Grech-Angelini et al., 2016a ; Tableau 4, page 63 pour les animaux domestiques ; Tableau 5, page 65 pour la faune sauvage). Quatre *I. ricinus* et une nymphe *Hy. marginatum* ont été collectées sur cinq oiseaux migrateurs : trois verdiers d'Europe (*Chloris chloris*), une bergeronnette printanière (*Motacilla flava*) et un merle noir (*Turdus merula*). Un hérisson était infesté par cinq *Rh. sanguineus* sensu lato.

La présence de *Hy. scupense*, identifiée pour la première fois en Corse a été confirmée en utilisant les marqueurs biomoléculaires *cox1* et ITS2 (cf. 4.5.2 et Grech-Angelini et al., 2016b). Concernant le groupe *Rh. sanguineus*, de grandes similitudes existent entre les différents membres. Les anciennes espèces comme *Rh. sanguineus* sensu stricto et *Rh. turanicus* sont pour certains auteurs impossibles à différencier morphologiquement (Navas et al., 2015). Une nouvelle phylogénie propose de diviser le groupe en quatre clades et neuf OTU (unité opérationnelle taxonomique, *Operational Taxonomic*



Units) à partir des marqueurs 16s ribosomiaux (Hekimoğlu et al., 2016). Sur les neuf spécimens corses analysés, huit se rapprochaient de OTU9 et un de OTU4. L'identification morphologique de *Haemaphysalis sulcata*, collectée en très petit nombre (n = 4) dans cette étude, a également été confirmée en utilisant l'ADN ribosomal 16s. L'ensemble de séquences génétiques identifiées a été enregistré dans GenBank (Grech-Angelini et al, 2016a).

#### 4.3.3. Distribution spatiale des principales espèces de tiques en Corse

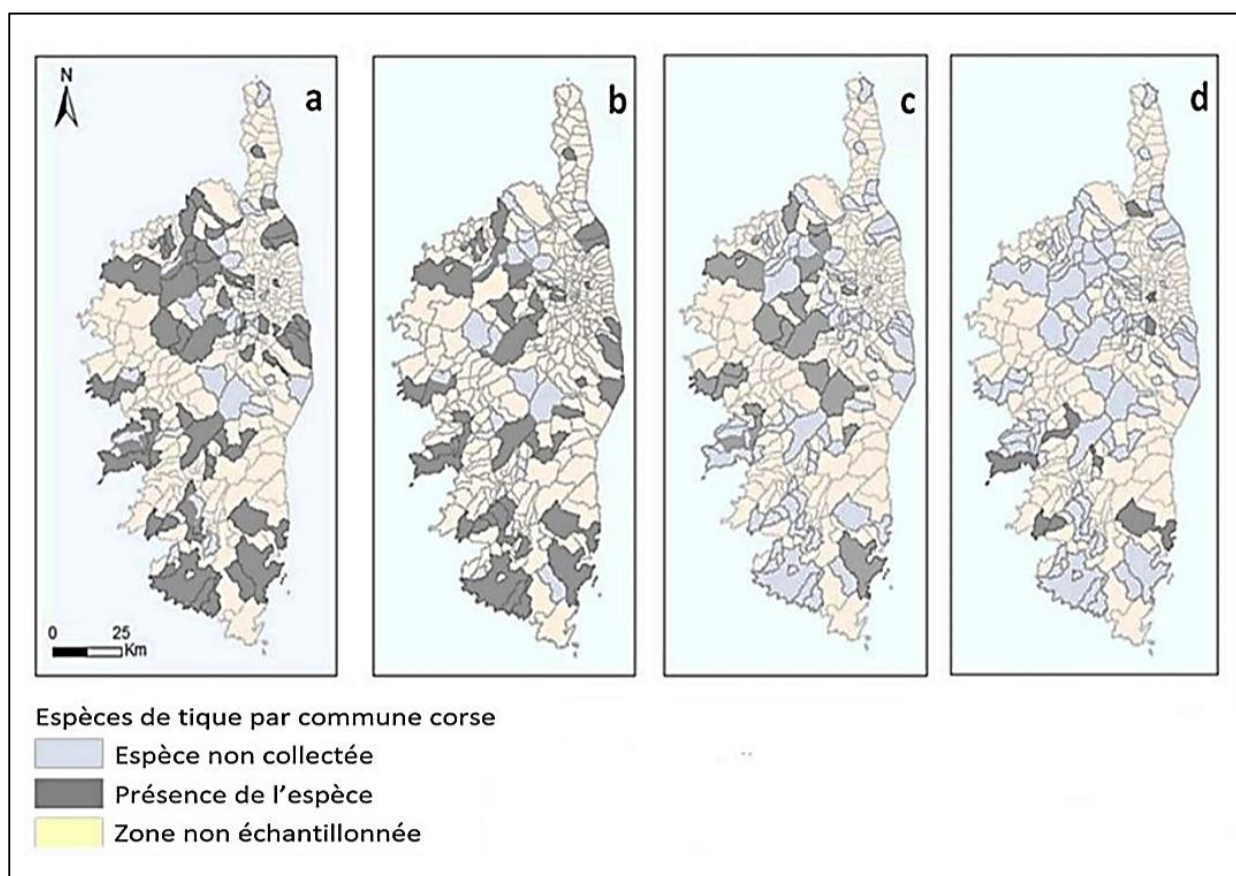


Figure 14. Distribution des quatre principales espèces de tiques collectées en Corse. a: *Rhipicephalus bursa*. b: *Hyalomma marginatum*. c: *Hyalomma scupense*. d: *Ixodes ricinus*

Un total de 3 134 tiques issues de 95 communes a été collecté sur les hôtes animaux en Corse (dont 60% sur bovins), 53% étaient des mâles, 39% des femelles et 8% des nymphes. *Rhipicephalus bursa* et *Hy. marginatum* ont été distribuées sur une grande partie de la zone échantillonnée (Figures 14a et 14b). *Hyalomma scupense* a été collectée principalement en Haute-Corse, et plus particulièrement dans le centre de l'île (Figure 14c). *Ixodes ricinus* a été identifiée dans huit communes et a parfois été l'espèce la plus collectée dans quelques zones montagneuses (Figure 14d). *Haemaphysalis punctata* était présente au nord comme au sud de l'île. Concernant *Dermacentor marginatus* et *Rh. sanguineus* s.l., dont les spécificités d'infestation étaient marquées respectivement pour le sanglier et le chien, leur distribution a été directement liée à la localisation des collectes sur ces hôtes. *Rhipicephalus* (Bo.)

*annulatus* a été collectée dans quatre communes de Haute-Corse et *Ha. sulcata* (quatre spécimens) a uniquement été trouvée sur des mouflons vivant dans la commune de Asco en Haute-Corse (Grech-Angelini et al., 2016a ; Figure 5 page 66).

#### 4.4. Discussion

Le choix des bovins comme hôte étalon pour la collecte des tiques s'est révélé relativement efficace. Cet animal élevé dans un état de « semi-liberté » en Corse s'est retrouvé infesté toute l'année avec des niveaux d'infestations bien supérieurs à ceux des autres animaux et notamment des petits ruminants. Huit des neuf espèces de tiques identifiées en Corse ont été retrouvées sur cet hôte, et la collecte à l'abattoir a permis d'obtenir une bonne couverture du territoire. La population de tiques corses est caractérisée par la dominance de deux espèces retrouvées dans l'ensemble du bassin méditerranéen, *Rh. bursa* et *Hy. marginatum*, ainsi que par l'existence d'espèces caractéristiques des zones plus sèches (*Hy. scupense*) et plus humides (*I. ricinus*). Certaines espèces apparaissent établies sur l'ensemble du territoire (*Rh. bursa*, *Hy. marginatum*) alors que d'autres, notamment *I. ricinus*, semblent cantonnées à des biotopes spécifiques. Le profil des tiques corses se caractérise également par la forte présence du genre *Hyalomma* qui a fait l'objet d'une étude spécifique détaillée dans la cinquième partie (cf. 4.5) de ce chapitre.

Les neuf espèces de tiques identifiées étant chacune vectrice d'agents pathogènes spécifiques (cf. 1.5, Tableau 2), la liste des agents pathogènes présents en Corse pourrait également présenter une grande diversité. Le sixième chapitre de cette étude s'attachera donc à faire l'inventaire exhaustif des agents pathogènes présents dans les tiques collectées afin de définir les risques d'exposition des populations humaines et animales.

## **Ticks (Acari: Ixodidae) infesting cattle and some other domestic and wild hosts on the French Mediterranean island of Corsica**

Sébastien Grech-Angelini<sup>1, 2\*</sup>, Frédéric Stachurski<sup>3, 4</sup>, Renaud Lancelot<sup>3, 4</sup>, Jérôme Boissier<sup>5</sup>, Jean-François Allienne<sup>5</sup>, Sylvain Marco<sup>6</sup>, Oscar Maestrini<sup>1</sup> and Gerrit Uilenberg<sup>7</sup>

<sup>1</sup>INRA, UR045 Laboratoire de recherches sur le développement de l'élevage, 20250 Corte, France

<sup>2</sup>Corsican Health Research (CHR), 20111 Calcatoggio, France

<sup>3</sup>CIRAD, UMR CMAEE, 34398 Montpellier, France

<sup>4</sup>INRA, UMR 1309 CMAEE, 34398 Montpellier, France

<sup>5</sup>Université de Perpignan Via Domitia, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Université de Montpellier, F-66860 Perpignan, France

<sup>6</sup>Université de Corse, 20250 Corte, France

<sup>7</sup>“A Surgente”, Route du Port, 20130 Cargèse, France

\*Correspondence: [grech.angelini@gmail.com](mailto:grech.angelini@gmail.com)

Published in *Parasites & Vectors* (2016) 9:582

## Abstract

**Background:** Corsica is a mountainous French island in the north-western Mediterranean presenting a large diversity of natural environments where many interactions between domestic animals and wild fauna occur. Despite a favourable context for ticks and tick-borne diseases (TBDs), the tick fauna of Corsica has not systematically been investigated.

**Methods:** For 1 year (May 2014-May 2015), a survey of ticks infesting cattle was performed in the three Corsican cattle slaughterhouses. Two of these were visited monthly and one quarterly; the ticks were manually collected, just after flaying. Ticks were identified on their morphology; when necessary, some specimens were also molecularly identified by sequencing mitochondrial *cox1* (cytochrome *c* oxidase subunit 1) and 16S ribosomal RNA genes and ITS2 (internal transcribed spacer 2). During the same period, ticks from other domestic animals (small ruminants, horses, domestic carnivores) and wild animals (wild boars, mouflons, deer) were occasionally collected.

**Results:** A total of 1,938 ticks was collected from 264 of 418 cattle examined, reared in 86 different localities. Eight tick species were found infesting cattle: *Rhipicephalus bursa* (56.1 %), *Hyalomma marginatum* (21.5 %), *Hy. scupense* (8.7 %), *Ixodes ricinus* (5.7 %), *Haemaphysalis punctata* (4.8 %), *Rh. sanguineus (sensu lato)* (2.3 %), *Rh. (Boophilus) annulatus* (0.7 %) and *Dermacentor marginatus* (0.2 %). The cattle infestation rate remained high all year (more than 50 %). Several tick species showed seasonal variation of their activity. From other Corsican animals 1,196 ticks were collected. Comparing ticks collected from cattle with those found on other animals, several host preferences were shown. A noteworthy record is that of a few *Ha. sulcata* on mouflons which were mainly infested by *Rh. bursa*.

**Conclusion:** The Corsican tick fauna is characterized by typical Mediterranean species (*Rh. bursa* and *Hy. marginatum*), but the mild climate and diversified environment provide satisfactory habitats both for species usually found in dry areas (*Hy. scupense*) and species usually collected in humid areas (*I. ricinus*).

**Key words:** Ticks (Ixodidae), Cattle, Domestic animals, Wild animals, Molecular identification, Corsica

## Background

The importance of ticks lies not only in their direct effects (blood loss, damage to skins, debilitation), but usually even more in their role as vectors of pathogens. They may cause great losses to the livestock industry, particularly, but not only, in tropical and subtropical countries. Their regional importance depends to a great extent on the tick species and tick-borne pathogens (TBPs) present,

but also on local climate, management and breeds of livestock [1]. It is also recognized that their role as vectors of human pathogens is second in importance after that of mosquitoes [2] and that they are worldwide the most important vectors in the veterinary field [3]. Human tick-borne diseases are usually zoonotic and wild and domestic vertebrate hosts are the reservoir of infection, usually without themselves being apparently affected [1].

Corsica is a French island in the western part of the Mediterranean area, situated 15 km north of Sardinia and 90 km west of Tuscany in Italy (Fig. 1). It is the fourth Mediterranean island in size (approximately 180 km long and 70 km wide) and also the most mountainous (with Monte Cintu peaking at 2,706 m) and the most forested one (46 % of the territory). Although its climate is considered as mild Mediterranean, there is some variability because of its specific geographical situation. Although Corsica is a sparsely populated region (about 320,000 inhabitants), about three million tourists visit the island annually. Hunting and hiking are very popular and livestock farming is an important economic activity (sheep, goats, pigs and cattle); it is of an extensive type and animals are often in contact with wildlife. Therefore, in this context, important interactions occur between livestock, wildlife and humans in a small area, which certainly favours the circulation of TBPs, including zoonotic ones. However, neither the local tick fauna nor the pathogens they transmit have been systematically investigated.

There are approximately 70,000 cattle (mainly local *Bos taurus* used for meat production) and 1,000 cattle owners on the island. Cattle are reared over all the territory; they are kept outside all year and about 12,000 animals (mainly eight month-old) are slaughtered every year. This study reports the composition of tick fauna infesting cattle in Corsica and its variation in space and time. Some comparisons are made with ticks collected from other hosts. The discovery of *Hy. scupense* was reported in a previous paper [4].

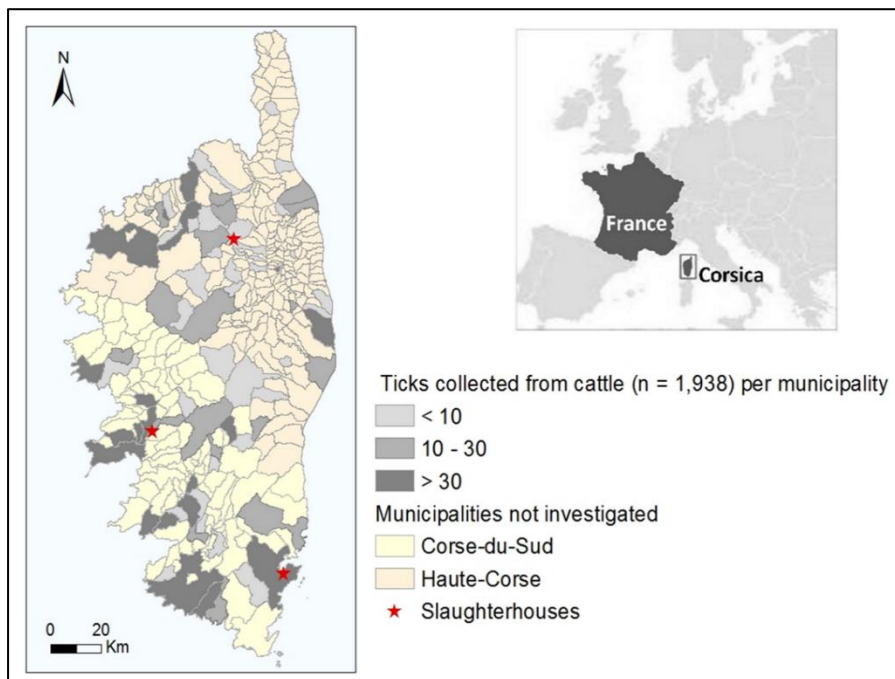
## Methods

### Collection of ticks

Cattle were chosen as live traps because of the extensive, free-ranging livestock farming system, with a low frequency of acaricide treatments. Ticks were collected from May 2014 to May 2015 in the three Corsican cattle slaughterhouses (Ponte-Leccia in Haute-Corse, Cuttoli and Porto-Vecchio in Corse-du-Sud; Fig. 1). The slaughterhouses of Ponte-Leccia and Cuttoli were visited monthly, whereas samples were collected quarterly in Porto-Vecchio (in the extreme south of the island). During each visit, the whole skins of 15 animals on the average were examined, just after flaying,

and the ticks were manually collected. When the number of ticks was low (less than 10), all were collected; otherwise between 10 and 15 were sampled for each animal.

The national cattle identification system, using ear-tags, allowed to trace the origin of animals at municipality level (the smallest administrative unit in France) and to determine the owner. By interviewing the farmers, the place where cattle were grazing could usually be determined. The altitude of their grassland was then estimated using Google Earth™.

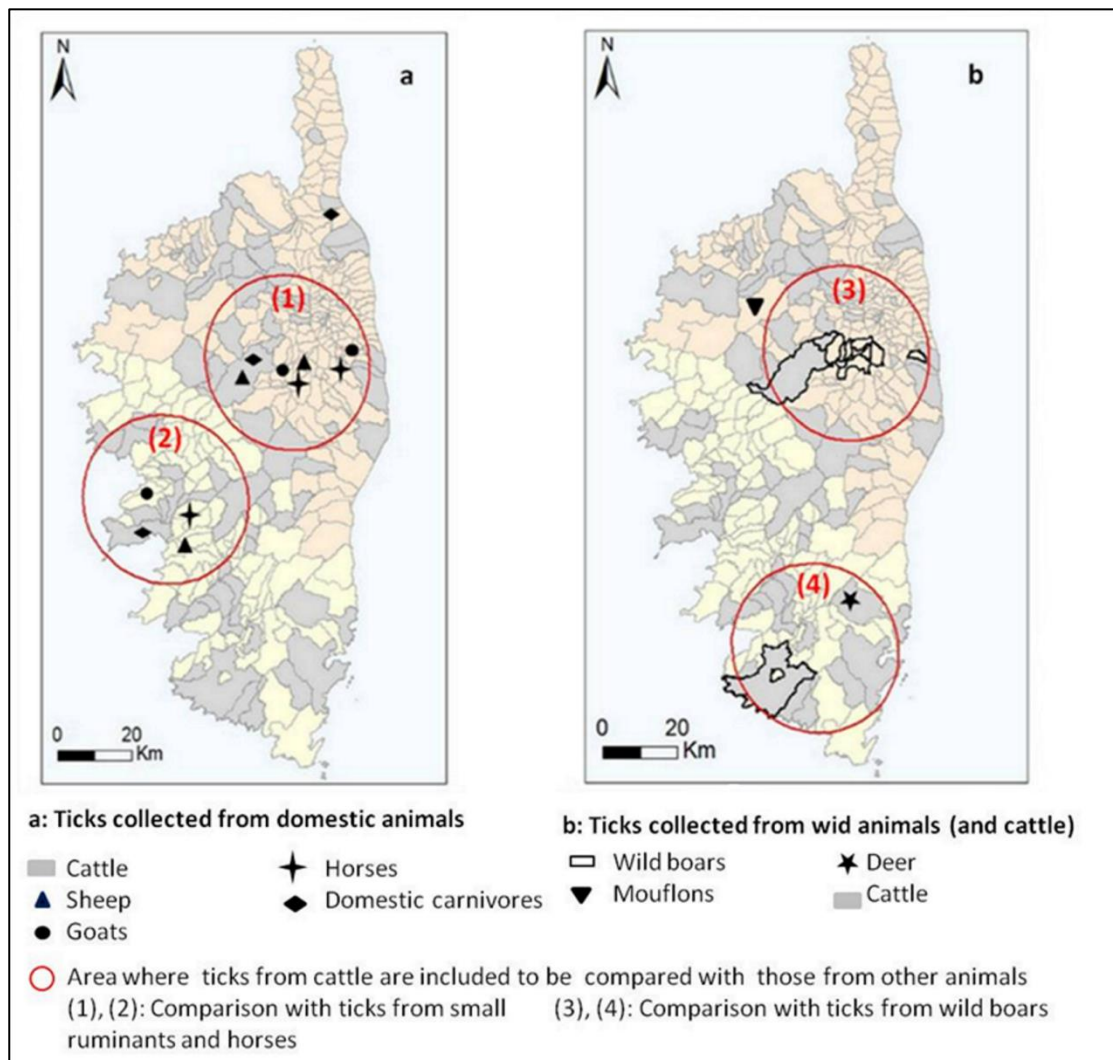


**Fig. 1** Distribution of the ticks collected from cattle in Corsica

Ticks from sheep, goats and horses were collected monthly from three farms (two in Haute-Corse and one in Corse-du-Sud) for each host species (Fig. 2a) from May to August 2014. At each visit, between 60 and 100 sheep or goats were inspected per farm while five horses were examined on the average in each riding school. Some of these animals (small ruminants and horses) were thus examined on different occasions. Practicing veterinarians provided ticks from dogs and cats during the same period.

Ticks from wild boars (*Sus scrofa*) were obtained from hunters during the hunting season (from August 2014 to February 2015) in two areas of Corsica (Fig. 2b). Staff of the National Office for Hunting and Wildlife (ONCFS) collected ticks from mouflons (*Ovis aries musimon*) from January to April 2015, and those of the Regional Natural Park of Corsica (PNRC) could obtain ticks from deer (*Cervus elaphus corsicanus*) in October 2014. To determine whether there was a host preference of tick species, ticks obtained from some domestic animals (goats, sheep and horses) and wild hosts (wild boars) were compared with ticks collected from cattle in the same area and during the same

period (Fig. 2a, b). A circle of 40 km diameter was traced around the places where ticks from the interested hosts were collected; all the ticks collected from infested cattle reared inside these areas were included in the comparisons.



**Fig. 2** Localization of the ticks collected from domestic animals (a) and wildlife (b) and areas of comparison with ticks from cattle

### Tick identification

After collection, ticks were stored in 70 % ethanol at -20 °C until they were identified under a stereomicroscope according to their morphological characteristics using appropriate keys and descriptions [5–8]. For some ticks species, never reported in Corsica or impossible to distinguish morphologically, molecular identification was attempted for a few specimens. Mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) and internal transcribed spacer 2 (ITS2) were used to identify *Hy. scupense*, as described in Grech-Angelini et al. [4]. There are great similarities between the different species of the *Rh. sanguineus* group [*Rh. sanguineus* (*s.l.*)] and for Nava et al. [9], it appears even impossible to define the species *Rh. sanguineus* (*sensu stricto*). The exact relationships between

these species are under debate and, recently, a new phylogeny of the *Rh. sanguineus* group has been proposed using a 16S ribosomal marker [10]. This latter study, including several tens of 16S sequences from ticks recovered worldwide, proposes to split the *Rh. sanguineus* complex into four clades and nine Operational Taxonomic Units (OTUs). Subsequently, in order to position the Corsican specimens among the different OTUs, the same marker was used (and the same molecular methods) to distinguish tick species of *Rh. sanguineus* (*s.l.*), using nine specimens from different hosts. To improve these genetic analyses, three specimens of *Rh. bursa*, a tick species easily distinguishable based on morphological characters from other *Rhipicephalus* spp., were also genetically identified using mitochondrial 16S rDNA. Sequences obtained were compared with all sequences referenced in the study of Hekimoğlu et al. [10]. *Haemaphysalis sulcata* was morphologically identified in this survey; as it was very rarely collected in Corsica, it was also sequenced (one specimen of the four collected) and compared with the 16S sequence database. All genetic distances have been calculated using Mega 6.0. A Kimura-2parameters model of evolution was used, modifying the percent identity (see the results section) to give weight for different mutations according to either transitions or transversions.

### **Data analysis**

To assess differences in tick species distribution between host species, a beta-binomial logistic regression model was used to account for possible overdispersion in the response with respect to the binomial distribution [11, 12]. The response was the proportion of a given tick species, aggregated by host species, farm and sampling occasion. The dependent variable was the host species. A likelihood ratio test was used to assess the statistical significance of the host-species effect. Differences in tick species proportions were considered as statistically significant if  $P < 0.05$ .

## **Results**

### **Cattle infestation**

From May 2014 to May 2015, 418 cattle (3.5 % of the cattle slaughtered annually) from 161 farms (16 % of the Corsican farms) were inspected and 1,938 ticks were collected (56 % males, 33 % females and 11 % nymphs). An average of 2.6 bovines was inspected per farm. The sampled animals were reared in 86 communes and ticks were obtained from 74 of them (Fig. 1). The infestation rates were respectively 63 % for the cattle and 75 % for the farms. The cattle infestation rate varied from 71 % in May-June 2014 to 49 % in January-February 2015 (Table 1) whereas the infestation level ranged from one to more than 100 ticks per animal. Among the 264 infested cows, 46 % were infested



by less than 10 ticks, 36 % by 10 to 30 ticks and 18 % by more than 30 ticks; almost 70 % of these high infestations were observed from March to June.

**Table 1** Ticks collected, animals inspected and cattle infestation rate per 2 months period

Periods	Ticks collected	Animals inspected	Infestation rate (%)
May-June (2014)	600	87	71
July-August	370	77	69
September-October	231	77	58
November-December	201	47	60
January-February (2015)	159	55	49
March-April	377	75	64
Total (over year)	1,938	418	63

### Species collected on cattle and molecular identification

Eight tick species were morphologically identified on cattle. The most abundant species were *Rh. bursa* (56.1 % of the ticks collected) and *Hy. marginatum* (21.5 %). *Hyalomma scupense*, *I. ricinus* and *Ha. punctata* were also frequently collected, whereas the other three species, i.e. *Rh. sanguineus* (*s.l.*), *Rh. (B.) annulatus* and *D. marginatus*, were much rarer (Table 2).

**Table 2** Tick species collected from Corsican cattle

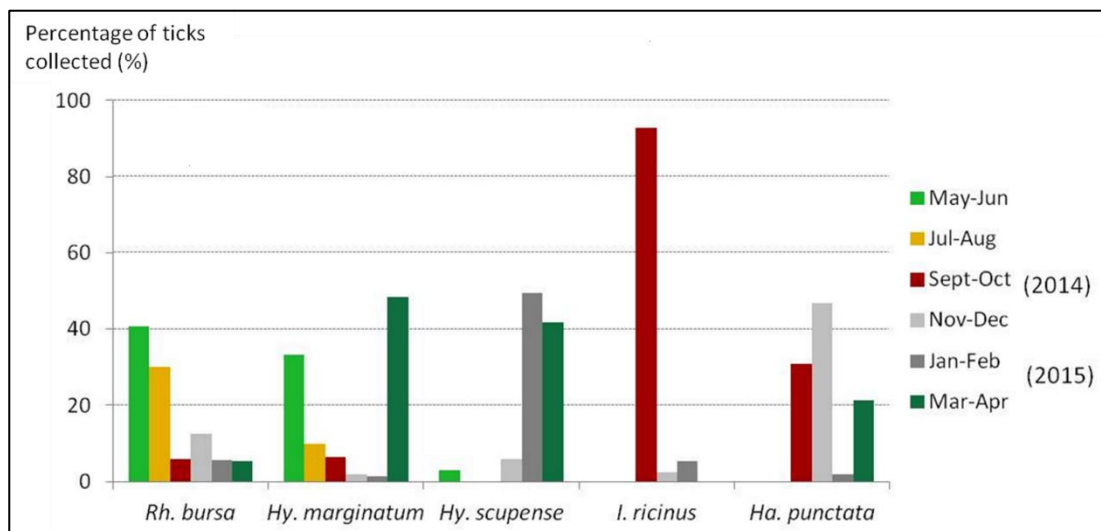
Tick species	No. of specimens	%
<i>Rhipicephalus bursa</i>	1,087	56.1
<i>Hyalomma marginatum</i>	417	21.5
<i>Hyalomma scupense</i>	168	8.7
<i>Ixodes ricinus</i>	110	5.7
<i>Haemaphysalis punctata</i>	94	4.8
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> ( <i>s.l.</i> )	45	2.3
<i>Rhipicephalus (B.) annulatus</i>	13	0.7
<i>Dermacentor marginatus</i>	4	0.2
Total	1,938	100

Concerning the molecular identification, two haplotypes (C1 and C2; see Table 3) were recorded for the mitochondrial 16S rDNA of the nine Corsican *Rh. sanguineus* (*s.l.*) analyzed. They clustered within two OTUs from nine recently identified OTUs [10]. Five ticks from cattle and three from dogs were identified as OTU9 (haplotype C1, KX553960), the genetic distance between the C1 haplotype and OTU9 being 1.4 % (54/399 bp). One tick collected from a dog was genetically close to the OTU4 (haplotype C2, KX553961); the genetic distance was 0.4 % (21/399 bp). The three specimens of *Rh. bursa* (C3, KX553962) showed a genetic distance of 0.4 % (25/399 bp) with those referenced by Hekimoğlu et al. [10]. With regards to *Hy. scupense*, which was never before identified on the island, its presence was confirmed by the molecular analyses; the genetic distance between the Corsican specimens and those deposited in GenBank was 0.7 % for both genes *cox1* (59/497 bp) and ITS2 (10/1436 bp) [4].

**Table 3** Pairwise genetic distances (in %) between mitochondrial 16S rDNA of reference sequences and Corsican specimens of the genus *Rhipicephalus* (C1, C2, and C3 sequences were compared with the whole database of Hekimoğlu et al. [10]).

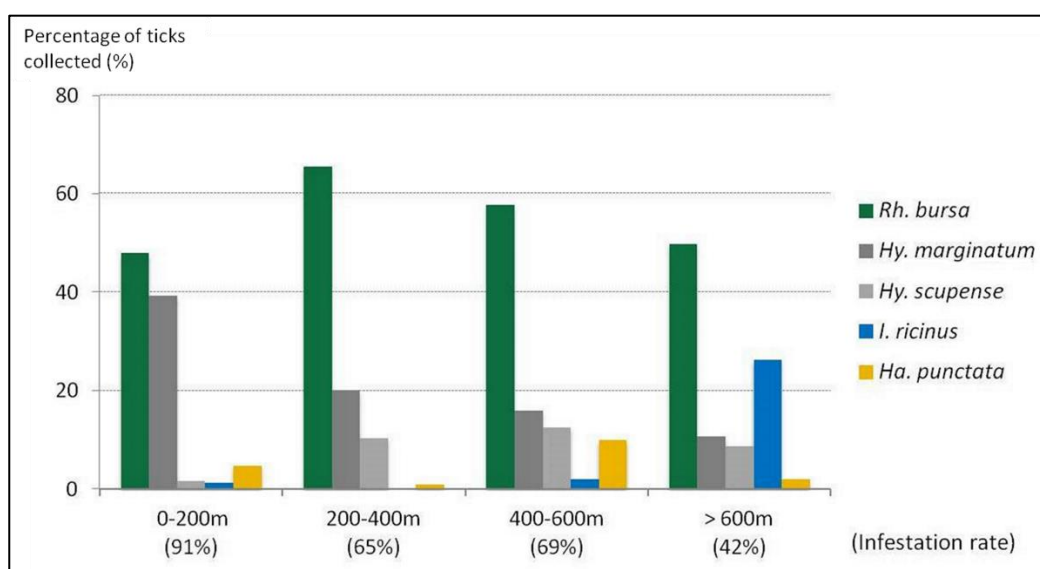
Species (morphology)	Sequences	<i>R. bursa</i>	C1	C2
<i>Rhipicephalus bursa</i>				
Corsican <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ( <i>s.l.</i> )	C1 ( <i>n</i> = 8)	14.5 ± 2.1		
	C2 ( <i>n</i> = 1)	11.3 ± 1.9	6.6 ± 1.5	
Corsican <i>Rhipicephalus bursa</i>	C3 ( <i>n</i> = 3)	0.4 ± 0.2	13.8 ± 2.0	10.6 ± 1.8
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> ( <i>s.l.</i> )	OTU8	14.4 ± 2.1	6.1 ± 1.5	6.0 ± 1.3
	OTU5	16.6 ± 2.3	7.4 ± 1.4	6.7 ± 1.3
	OTU9	16.4 ± 2.5	1.4 ± 0.3	8.6 ± 1.8
	OTU1	14.4 ± 2.6	10.7 ± 2.1	9.3 ± 2.0
	OTU6	17.3 ± 3.2	9.0 ± 2.1	8.5 ± 2.0
	OTU7	15.9 ± 2.6	8.5 ± 1.8	7.6 ± 1.7
	OTU4	12.2 ± 2.0	7.7 ± 1.6	0.4 ± 0.2

*Rhipicephalus bursa* and *Hy. marginatum* were collected throughout the year (Fig. 3). From May to August, *Rh. bursa* represented more than 70 % of the ticks collected from cattle. The activity of *Hy. marginatum* peaked from March to June when more than 80 % of the specimens were found; on the other hand, it was rarely collected from November to February. *Hyalomma scupense* was found from



**Fig. 3** Seasonality of the main tick species found on Corsican cattle per 2 months

November to May with a peak activity from January to April when 90 % of the specimens were observed on cattle. More than 90 % of the *I. ricinus* were collected in September-October, representing more than 40 % of the ticks collected from cattle in that period (Fig. 3). *Haemaphysalis punctata* was found from September to April with a peak activity in November-December. *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.) was collected from March to June and in September-October whereas *Rh. (B.) annulatus* was observed in July-August and from November to April. A few specimens of *D. marginatus* were collected from September to December.



**Fig. 4** Percentage of the main tick species infesting cattle and cattle infestation rate according to altitude

Almost 60 % of the ticks were collected on cattle reared between 200 and 600 m above sea level. With the notable exception of *I. ricinus*, the infestation rate decreased with elevation: more than 90

% of the animals were infested by at least one tick below 200 m while only 42 % were infested over 600 m (Fig. 4). *Rhipicephalus bursa* was the main species collected at all altitude levels (Fig. 4). *Hyalomma marginatum* was much more frequently collected in areas with Mediterranean climate (at less than 200 m) representing almost 40 % of the ticks collected at this level, while more than 80 % of the *I. ricinus* were collected from cattle reared above 600 m.

### Comparison with other Corsican hosts

**Table 4** Ticks collected from other domestic animals

Host species (No. of infested animals)	Tick species	No. of specimens	%
Goats (258)	<i>Rhipicephalus bursa</i>	334	99.7
	<i>Haemaphysalis punctata</i>	1	0.3
	Total	335	100
Sheep (51)	<i>Rhipicephalus bursa</i>	53	91.4
	<i>Hyalomma marginatum</i>	4	6.9
	<i>Rhipicephalus sanguineus (s.l.)</i>	1	1.7
	Total	58	100
Horses (29)	<i>Hyalomma marginatum</i>	140	77.7
	<i>Rhipicephalus bursa</i>	38	21.1
	<i>Dermacentor marginatus</i>	1	0.6
	<i>Rhipicephalus sanguineus (s.l.)</i>	1	0.6
	Total	180	100
Domestic carnivores			
Dogs (31)	<i>Rhipicephalus sanguineus (s.l.)</i>	157	97.0
	<i>Hyalomma marginatum</i>	1	0.6
Cats (4)	<i>Ixodes ricinus</i>	1	0.6
	<i>Rhipicephalus sanguineus (s.l.)</i>	3	1.8
	Total	162	100

From May to August, 1,196 sheep and 908 goats were inspected. The infestation rates of sheep and goats were 4 % and 28 %, respectively. *Rhipicephalus bursa* was by far the most abundant tick species on small ruminants, only a few specimens of other species having been collected from sheep and goats (Table 4). In the two areas where small ruminants were sampled (Fig. 2a) and during the same period (May to August), 267 ticks were collected from the 53 cattle examined, of which 71 % were *Rh. bursa* (98 % for sheep and goats). The observed proportion of *Rh. bursa* was significantly higher on small ruminants than on cattle (likelihood ratio test,  $\chi^2=27.2$ ,  $df=1$ ,  $P=2 \cdot 10^{-7}$ ). Among the 55 horses examined, 29 were infested by ticks (53 %). The most frequent tick species was *Hy. marginatum*, but *Rh. bursa* was also collected frequently (Table 4). Comparing tick species infesting horses with those collected from cattle (267 ticks collected from 53 animals) during the same period and in the same area (Fig. 2a), the observed proportion of *Hy. marginatum* was much higher on horses (78 %) than on cattle (26 %) (likelihood ratio test,  $\chi^2=30.0$ ,  $df=1$ ,  $P=4 \cdot 10^{-8}$ ). The domestic carnivores (31 infested dogs and four infested cats) were mainly infested by *Rh. sanguineus* (s.l.) (Table 4). One *I. ricinus* was collected from one cat and one *Hy. marginatum* from one dog.

From 56 infested wild boars, hunted in the south and in the centre of Corsica (Fig. 2b), 297 ticks were collected (Table 5) of which *D. marginatus* represented almost 91 %. From cattle reared in the same area (and sampled during the same period), 310 ticks were collected from 78 animals of which less than 2 % were *D. marginatus*. This species infested significantly more wild boars than cattle (likelihood ratio test,  $\chi^2=126.4$ ,  $df=1$ ,  $P=3 \cdot 10^{-29}$ ). The 24 infested mouflons examined were mainly infested by *Rh. bursa* (Table 5). Four other species were observed on this host among which the species *Ha. sulcata* ( $n=4$ ), collected only on this wild ungulate. Its identification has been genetically confirmed (KX576650), the genetic distance between the Corsican specimen of *Ha. sulcata* and those deposited in GenBank (L34308.1) being extremely low: 0.6 % (17/359 bp). Ticks from some other wild animals were occasionally collected. *Ixodes ricinus* ( $n=14$ ) was the single species found on one deer examined in a mountainous area from southern Corsica (Fig. 2b).

Migrating birds were caught in the northern part of the island and five of them were infested: three European greenfinch (*Chloris chloris*), one western yellow wagtail (*Motacilla flava*) and one common blackbird (*Turdus merula*). Four *I. ricinus* adults and one *Hy. marginatum* nymph were collected. Lastly, one hedgehog collected by hunters in central Corsica was infested by five adults of *Rh. sanguineus* (sensu lato).

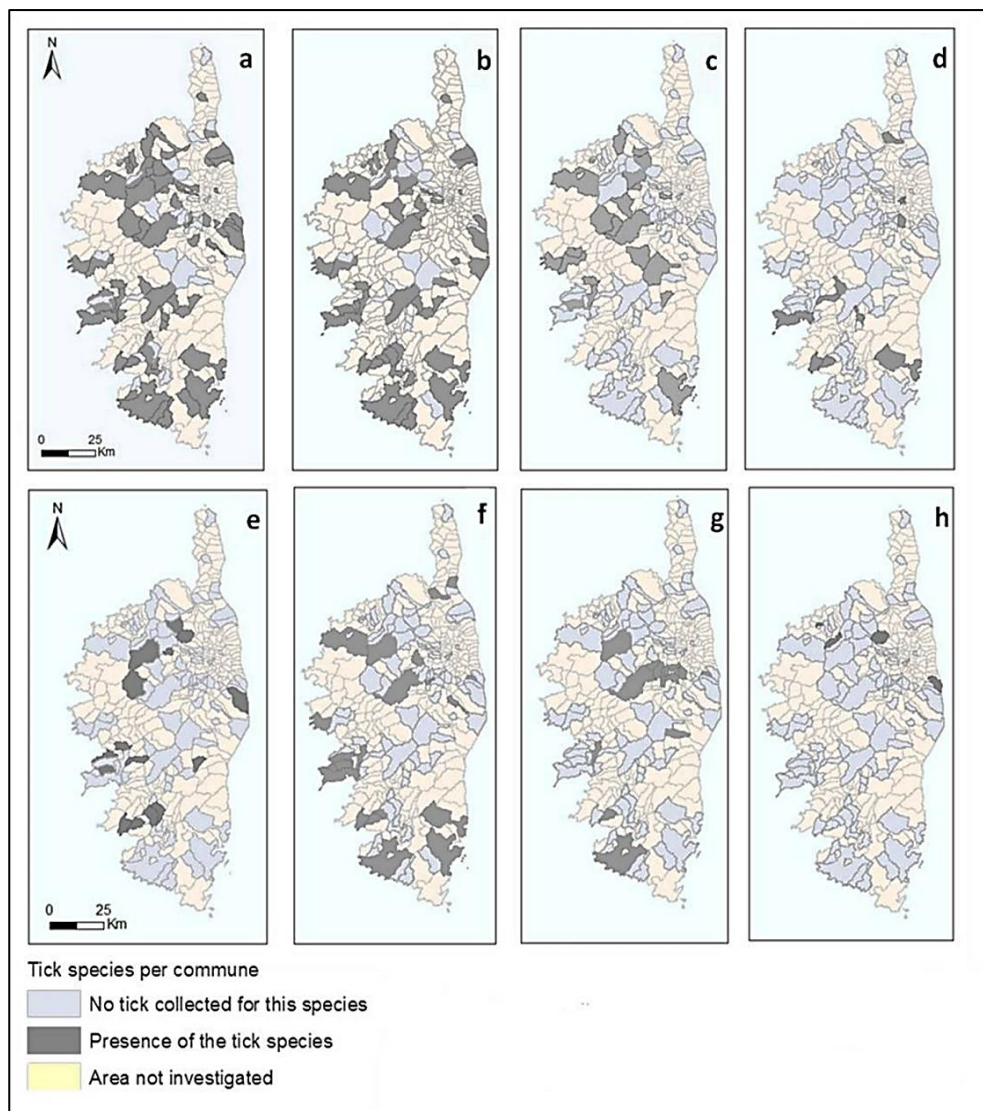
**Table 5** Ticks collected from different Corsican wild ungulates

Host (No. of infested animals)	Tick species	No. of specimens	%
Wild boars (56)	<i>Dermacentor marginatus</i>	262	88.2
	<i>Rhipicephalus sanguineus (s.l.)</i>	20	6.7
	<i>Hyalomma marginatum</i>	8	2.7
	<i>Rhipicephalus bursa</i>	6	2.0
	<i>Ixodes ricinus</i>	1	0.4
	Total	297	100
Mouflons (24)	<i>Rhipicephalus bursa</i>	127	90.7
	<i>Haemaphysalis punctata</i>	7	5.0
	<i>Haemaphysalis sulcata</i>	4	2.9
	<i>Rhipicephalus sanguineus (s.l.)</i>	1	0.7
	<i>Dermacentor marginatus</i>	1	0.7
	Total	140	100
Deer (1)	<i>Ixodes ricinus</i>	14	100

### Spatial distribution of the main Corsican tick species

Among the 3,134 ticks collected (more than 60 % from cattle), 53 % were males, 39 % females and 8 % nymphs. *Rhipicephalus bursa* and *Hy. marginatum* were spread over almost the entire investigated area (Fig. 5a, b). *Hyalomma scupense* was found mostly in Haute-Corse and especially in the centre of the island (Fig. 5c) where it could be very abundant [4]. *Ixodes ricinus* was identified in eight municipalities, and was the most collected species in some mountainous areas (Fig. 5d). *Haemaphysalis punctata* was mostly collected from cattle and it was found as well in southern as in northern parts of the island (Fig. 5e). *Rhipicephalus sanguineus (s.l.)* was dominant on dogs (Table 4), therefore the distribution area of these ticks was linked to dog sampling during the study (Fig. 2a); but they were also collected from cattle (in 13 municipalities) and wild boars (Fig. 5f). *Dermacentor marginatus* was collected almost only from wild boars and its spatial distribution is linked to the areas

where these were sampled (Figs. 2b, 5g). *Rhipicephalus (B.) annulatus* was collected from cattle reared in four communes in Haute-Corse (Fig. 5h). The species *Ha. sulcata* (four ticks) was found only on mouflons in the commune of Asco (Haute-Corse), where the sampled animals lived (Fig. 2b).



**Fig. 5** Distribution of the main Corsican tick species collected on animals. a: *Rhipicephalus bursa*. b: *Hyalomma marginatum*. c: *Hyalomma scupense*. d: *Ixodes ricinus*. e: *Haemaphysalis punctata*. f: *Rhipicephalus sanguineus (s.l.)*. g: *Dermacentor marginatus*. h: *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*

## Discussion

Cattle were chosen as a model host to investigate the Corsican tick fauna because its husbandry system is still of a very extensive type: there are no barns, animals are reared outside all year round and acaricide treatments are performed without well-established criteria and with low frequency.

Cattle may thus capture the tick species active in the environment and feeding on large mammals at all periods of the year. This choice was apparently efficient because the infestation rate of cattle was high throughout the year. From May to August 2014, ticks from small ruminants were also collected but cattle were much more infested during this period; it is probably due to the fact that sheep and goats are more handled, in particular during milking when breeders can check tick infestation every day. Moreover, eight of the nine tick species reported during the study were found on cattle; only *Ha. sulcata* was not collected from this host but from mouflons examined in a mountainous area of the island where no cattle were sampled (Figs. 1, 2b). In much of continental France, according to the region, the tick species infesting most frequently cattle are *I. ricinus*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *Ha. punctata* and *Rh. bursa* [8, 13]. This pattern is quite different from what was observed in Corsica. Regarding the geographical situation of the island, it appears more interesting to compare the Corsican tick distribution with other area of the Mediterranean basin and especially its islands.

*Rhipicephalus bursa* is a typical species in the Mediterranean area [6, 7] and was the most frequently collected species in Corsica. It was the dominant tick on cattle and small ruminants, as well as on mouflons and it was second in frequency on horses. This species is established in the whole of Corsica, both in coastal and mountainous areas. On Menorca Island, *Rh. bursa* was also the main tick species collected on cattle (more than 50 %) [14]; and it was frequently collected on small ruminants in Sardinia [15] and on cattle in Sicily [16]. *Rhipicephalus bursa* is also reported in North Africa, where it seems to be confined to the least dry areas of these arid or semi-arid regions [6, 7]. It is a proven vector of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in cattle, and *Babesia ovis* in sheep; *B. bovis* has been detected in Corsica [17]. *Rhipicephalus bursa* is also a vector of *Anaplasma marginale* of cattle (also detected in Corsica [17]) and *Anaplasma ovis* of small ruminants, as well as of *Theileria equi* in equines [7].

The presence of *Hy. marginatum* in Corsica was reported by other authors [8, 18, 19], and confirmed by this survey. It appears to be common and wide-spread on the island, and was the second species in frequency on cattle and the dominant one on horses. The species was considered as rare in continental France [5, 8], but in the past few years numerous adults were found on horses in the south-eastern part of the country (near the town of Montpellier and in the Camargue region, [20]). It is also described in other Mediterranean islands and countries neighbouring Corsica. In Sicily, it represented 3.5 % of the ticks collected from cattle [16], 23 % in Sardinia [15] and 27 % in Menorca [14]. *Hyalomma marginatum* is also widely distributed in North Africa [7]. It is one of the main vectors of Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus, an important emerging zoonotic disease in Turkey and south-eastern Europe [21]. *Hyalomma marginatum* is a vector of *Rickettsia* spp. of the



spotted fever group (SFG), including *R. aeschlimannii* in Corsica [19]. It has also been reported as a vector of equine babesiosis (caused by *Babesia caballi*) [7].

*Hyalomma scupense* (synonym *Hy. detritum*) was found for the first time on Corsica during this survey [4]. It was only collected on cattle, which is consistent with its host tropism, and appeared to be widespread and well-established (the third in frequency on Corsican cattle). This species was rarely found in the neighbouring areas. Very few specimens were recorded in Sardinia [22], on the small Italian island of Pianosa [23] and in continental Italy [24]. It was also reported, always in low numbers, in south-western continental France [25]. On the other hand, in North Africa *Hy. scupense* is often the main tick species infesting cattle [26]. This species is an efficient vector of tropical bovine theileriosis (caused by *Theileria annulata*), a major cattle disease in Northern Africa and a vector of *Theileria equi* and of *Coxiella burnetii*; it can probably also transmit CCHF virus but may not be a major vector [4].

*Ixodes ricinus* was considered as rare in Corsica [8], but in this survey represented almost 6 % of the ticks collected from cattle. It was mainly found in mountainous areas during autumn, when the conditions (temperature and humidity) were more favourable to this species. *Ixodes ricinus* was rarely collected in the dry areas and islands neighbouring Corsica. This species represented less than 1 % of the ticks collected from animals in Sicilia [16] and in Sardinia [15]; but it appears to be well-established in northern Italy where this tick is attaching frequently to humans [27]. In Africa, *I. ricinus* is restricted mainly to the coolest areas [7]; for instance, in the relative humid region of Gharb in northern Morocco, it represented 26 % of ticks collected from cattle [28]. This species is one of the main vectors of *Borrelia burgdorferi* (*s.l.*), the causative agent of Lyme disease, the most important zoonotic infection in Europe. This pathogenic agent was believed to be rare or even absent from Corsica, but a few cases of Lyme disease have been reported in recent years by the French Institute for Health Surveillance (InVS). *Ixodes ricinus* is also a vector of *Anaplasma phagocytophilum* (causative agent of tick-borne fever or pasture fever of ruminants), previously detected in bovine serum from Corsica [17]. The tick is also known as a vector of a number of other pathogens such as the zoonotic virus of tick-borne encephalitis (TBE), *Babesia divergens* (causative agent of bovine babesiosis), *Babesia venatorum* (human babesiosis), as well as *Rickettsia* spp. of the SFG [7, 8]. A related species, *Ixodes inopinatus*, has been described recently [29] from the drier regions of the western Mediterranean, and also as far north as Germany; it has been found to co-habit sometimes with *I. ricinus*. As this species was reported only from foxes and reptiles, not sampled in our survey, it has not been taken into consideration in this paper.

Almost 5 % of the ticks collected on cattle were *Ha. punctata*, found also in low numbers on mouflons and goats. This species is widespread in the entire Mediterranean basin and further to the north; it is found in a very wide variety of habitats [7]. It is a vector of *Theileria buffeli*, usually a benign blood parasite of cattle, which is known to occur on Corsica [17]. *Haemaphysalis pucntata* is also the vector in Europe of protozoa of the genus *Babesia*, *B. major* and *B. motasi*, causing (usually benign) babesiosis in cattle and small ruminants, respectively [7].

*Dermacentor marginatus* was very rarely collected on Corsican cattle and almost all specimens were found on wild boars. Cattle and wild boars commonly share the same areas of forest or maquis (sclerophyll shrubland) in Corsica. The comparisons between the ticks collected from cattle reared in the zones where wild boars were hunted (Fig. 2b), showed a pronounced host preference of *D. marginatus* for this wild ungulate. It is a common tick in the Mediterranean region [7]. In Sardinia, *D. marginatus* also infested mainly wild boars [30] and in Sicily, this species represented 1.4 % of the ticks collected from cattle [16]. In continental Spain, *D. marginatus* represented 9.3 % of the ticks collected on wild boars [31] but it was not reported on Menorca where wild boars are not present [14]. In Northern Africa, its distribution area is restricted to the coolest and most humid areas. *Dermacentor marginatus* can transmit various pathogens, including *Theileria equi* and *Babesia caballi* to horses (two causative agents of equine piroplasmosis), *Anaplasma ovis* to sheep, and also *Rickettsia slovaca* which belongs to the SFG [7, 8].

*Rhipicephalus sanguineus* (*s.l.*) ticks were found in all areas where domestic carnivores (especially dogs) were sampled. They have also been collected on cattle, mouflons, wild boars and more rarely on sheep and horses. Because of the strong association with domestic dogs, *Rh. sanguineus* (*s.l.*) ticks occur in all climatic regions of the Mediterranean basin. Among other pathogens, *Rh. sanguineus* (*s.l.*) is well known to transmit *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* (causing respectively canine ehrlichiosis and canine babesiosis), *Babesia ovis*, *Anaplasma marginale* (these two latter diseases are known to occur in Corsica [17]) and *Anaplasma ovis* [7]. It is also a vector of rickettsiae of the SFG including *R. conorii*, the classical agent of human Mediterranean spotted fever; and its role as a vector of *R. massiliae* has been shown in Corsica [32].

*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus* had already been identified in Corsica [33] but it has never been reported in continental France. This species was not frequently collected during this survey, infesting only cattle and representing less than 1 % of the ticks found on this host. In some other Mediterranean areas, *Rh. (B.) annulatus* is more common: on Menorca Island, it was the third species collected on cattle [14] and the main species collected from cattle reared in the northern part of Algeria [34]. This

species is known as a vector of several pathogens, including *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* [7].

*Haemaphysalis sulcata* (syn. *Ha. cretica*) has been reported only once in Corsica in a rather vague way in 1927 [35]. Its presence, confirmed by molecular identification, was not unexpected because it is a common tick in the Mediterranean region. It was reported in Sardinia on small ruminants [30], but also in Sicily, continental Italy, continental France, Spain and Northern Africa with lower frequency [7]. In Corsica, the species was only collected from mouflons in the northern part of the island. *Haemaphysalis sulcata* is known to transmit *Anaplasma ovis* to sheep.

## Conclusions

In this study 1,938 ticks were collected from cattle for one year. Eight tick species belonging to five genera were found. The pattern of the Corsican tick fauna infesting cattle is characterized by the dominance of typical Mediterranean species (*Rh. bursa* and *Hy. marginatum*) and by the existence of established populations of tick species usually found in drier areas (*Hy. scupense*), or in cooler areas (*I. ricinus*). Ticks collected from other domestic animals and wildlife confirmed that *Rh. bursa* and *Hy. marginatum* are the two most important tick species infesting ungulates in Corsica, and also confirmed the occurrence of another tick species, *Ha. sulcata*, found on mouflons. This first systematic survey of the tick fauna on Corsican livestock revealed important differences in composition and seasonal variation of the activity of some species with the situation of the Mediterranean regions neighbouring the island. It is now of the utmost importance for human and animal health to determine TBPs present in Corsica.

## Abbreviations

TBDs: tick-borne diseases; PNR: Regional Natural Park of Corsica; ONCF: National Office for Hunting and Wildlife; TBPs: tick-borne pathogens; *cox1*: cytochrome *c* oxidase subunit 1; ITS2: internal transcribed spacer 2; OTUs: operational taxonomic units; CCHF: Crimean-Congo haemorrhagic fever.

## Acknowledgements

We are grateful to the staff of the slaughterhouse of Ponte-Leccia, Cuttoli and Porto-Vecchio for their help in collecting ticks from cattle and to ONCFS, PNR, hunters and practicing veterinarians for collecting ticks respectively from mouflons, deer, wild boars and domestic carnivores. This study was partially funded by the French Ministry of Agriculture, General Directorate for Food (DGAI).

### **Ethics approval and consent to participate**

We obtained the agreement of all the owners to collect ticks from their domestic animals (dogs, cats, sheep, goats and horses). The cattle inspected were slaughtered for the human consumption; the wild boars collected were legally hunted during the hunting season. The collected deer and mouflons were captured by PNRG and ONCF and they were all released.

### **Consent for publication**

Not applicable.

### **Availability of data and material**

The data supporting the conclusions of this article are included within the article.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Funding**

Not applicable.

### **Authors' contributions**

FS, GU, RL and SGA designed the study. OM, SGA and SM performed the tick collection. FS, GU, SGA and SM conducted the morphological analysis. JB and J-FA conducted the molecular analysis and submitted sequences to GenBank. RL and SGA analyzed the data. GU and SGA wrote the first draft of the manuscript. FS, JB and RL revised the manuscript. All the authors approved the final version of the manuscript.

### **References**

1. Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology*. 2004;129 (Supplement):S3-S14.
2. Parola P, Raoult D. Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis*. 2001;32:897-928.

3. Nicholson WL, Sonenshine DE, Lane RS, Uilenberg G. Chapter 26. Ticks (Ixodia). In: Mullen GR and Durden LA (eds). Medical and veterinary entomology. Second edition. Place: Academic Press. 2009;493-542.
4. Grech-Angelini S, Stachurski F, Lancelot R, Boissier J, Allienne JF, Gharbi M, Uilenberg G. First report of the tick *Hyalomma scupense* (natural vector of bovine tropical theileriosis) on the French Mediterranean island of Corsica. Vet Parasitol. 2016;216:33-37.
5. Hoogstraal H. African Ixodoidea. I. Ticks of the Sudan (with special reference to Equatoria province and with preliminary reviews of the genera *Boophilus*, *Margaropus*, and *Hyalomma*). Res Rept, Dept. of the Navy, Bureau of Medicine and Surgery, Washington, D.C. 1956;1101 pp.
6. Walker AR, Bouattour A, Camicas JL, Estrada-Peña A, Horak IG, Latif AA, et al. Ticks of domestic animals in Africa. A guide to identification of species. Edinburgh, Scotland, UK: Bioscience Reports; 2003, 221 pp.
7. Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR. Ticks of domestic animals in the Mediterranean Region: a guide to identification of species. University of Zaragoza, Zaragoza, Spain, 2004;131 pp.
8. Pérez-Eid C. Les tiques. Identification, biologie, importance médicale et vétérinaire. Lavoisier, TEC&DOC, 2007;314 pp.
9. Nava S, Estrada-Peña A, Petney T, Beati L, Labruna MB, Szabó MPJ et al. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). Vet Parasitol. 2015;208:2-8.
10. Hekimoğlu O, Sağlam İk, Özer N, Estrada-Peña A. New molecular data shed light on the global phylogeny and species limits of the *Rhipicephalus sanguineus* complex. Ticks Tick-borne Dis. 2016;7:798–807
11. Hinde J, Demétrio CGB. Overdispersion: models and estimation. Comput Stat Data An. 1998;27:151-170
12. Lesnoff M, Lancelot R. aods3: analysis of overdispersed data using S3 methods. CRAN package version 0.4. 2013; <https://cran.r-project.org/web/packages/aods3/index.html>.
13. Agoulon A, Plantard O. Tiques et maladies à tiques chez les bovins en France: effet des changements globaux? Point Vet (special issue). 2012;2110-5154:118-123.
14. Castellà J, Estrada-Peña A, Almería S, Ferrer D, Gutiérrez J, Ortuño A. A survey of ticks (Acari: Ixodidae) on dairy cattle on the island of Menorca in Spain. Exp Appl Acarol. 2001;25:899-908.

15. Di Todaro N, Piazza C, Otranto D, Giangaspero A. Ticks infesting domestic animals in Italy: current acarological studies carried out in Sardinia and Basilicata regions. *Parassitologia*. 1999;41(Suppl):39-40.
16. Torina A, Khoury C, Caracappa S, Maroli M. Ticks infesting livestock on farms in Western Sicily, Italy. *Exp. Appl. Acarol*. 2006;38:75-86.
17. ICTTD. Tick-borne infections of cattle on Corsica. 2000;newsletter 14:13 (ISSN: 1385-3422).
18. Morel PC. Les *Hyalomma* (Acariens, Ixodidae) de France. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1959;34:552-555.
19. Matsumoto K, Parola P, Brouqui P, Raoult D. *Rickettsia aeschlimanni* in *Hyalomma* ticks from Corsica. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis*. 2004;23:732-734.
20. Vial L, Stachurski F, Leblond A, Huber K, Vourc'h G, René-Martellet M et al. First evidence of the tick *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 in southern continental France. *Ticks Tick-Borne Dis*. 2016;7:1162–1167.
21. Dreshaj S, Ahmeti S, Ramadani N, Dreshaj G, Humolli I, Dedushaj I. Current situation of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Southeastern Europe and neighboring countries: a public health risk for the European Union? *Travel Med Infect Dis*. 2016;14:81-89.
22. Garippa G, Biddau M, Cherchi M. Endo ed ectoparassiti di *Cervus elaphus corsicanus* della Sardegna. *J Med Ecol*. 2003;7(Suppl):189–190.
23. Tomassone L, Grego E, Auricchio D, Iori A, Gianni F, Rambozzi. Lyme borreliosis spirochetes and spotted fever group rickettsiae in ixodid ticks from Pianosa Island, Tuscany Archipelago, Italy. *Vector-Borne Zoonot*. 2013;13:84-91.
24. Montarsi F, Maioli G, Fois F, Mereu Piras P, Magliano A, Pascucci I, et al. Uncommon ticks from Italy. In: *Proceeding of the 7th International Conference Ticks and Tick-borne Pathogens (TTP7), Zaragoza*. 2011;213.
25. Macaigne F, Pérez-Eid C. *Hyalomma scupense* Schulze 1919 (Acarina, Ixodoidea) tique autochtone du sud-ouest de la France. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1993;68:199–200.
26. Gharbi M, Darghouth MA. A review of *Hyalomma scupense* (Acari, Ixodidae) in the Maghreb region: from biology to control. *Parasite*. 2014;21(2).
27. Otranto D, Dantas-Torres F, Giannelli A, Latrofa MS, Cascio A, Cazzin S, et al. Ticks infesting humans in Italy and associated pathogens. *Parasit Vectors*. 2014;7:328.
28. Laamri M, K. Kharrim E, Mrifag R, M. Boukbal M, Belghyti D. Dynamique des populations de tiques parasites des bovins de la région du Gharb au Maroc. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop*. 2012;65:57-62.

29. Estrada-Peña A, Nava S, Petney T. Description of all the stages of *Ixodes inopinatus* n. sp. (Acari: Ixodidae). Ticks Tick-Borne Dis 2014; 5:734-743.
30. Satta G, Chisu V, Cabras P, Fois F, Masala G. Pathogens and symbionts in ticks: a survey on tick species distribution and presence of tick-transmitted micro-organisms in Sardinia, Italy. J Med Microbiol. 2011;60:63-68.
31. Ruiz-Fons F, Fernandez-de-Mera IG, Acevedo P, Höfle U, Vicente J, de la Fuente J, Gortazar C. Ixodid ticks parasitizing Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: geographical and temporal distribution. Vet Parasitol. 2006;140:133-142.
32. Matsumoto K, M. Ogawa M, Brouqui P, D. Raoult D, Parola P. Transmission of *Rickettsia massiliae* in the tick, *Rhipicephalus turanicus*. Med Vet Ent. 2005;19:263-270.
33. Rageau J. Répartition géographique et rôle pathogène des tiques (acariens : *Argasidae* et *Ixodidae*) en France. Wiadomosci Parazytologiczne. 1972;18:707-719
34. Benchikh Elfegoun MC, Gharbi M, Djebir S, Kohil K. Dynamique d'activité saisonnière des tiques ixodidés parasites des bovins dans deux étages bioclimatiques du nord-est algérien. Rev Elev Méd Vét Pays Trop. 2013;66:117-122.
35. Schulze, P. Beiträge zur Kenntnis der Zecken Europas. S.B. Ges. Naturf. Fr. Berl. 1927;(1925-1927) (1-10):109-126.

#### 4.5. Perspectives relatives à la présence du genre *Hyalomma* en Corse

La densité élevée des tiques du genre *Hyalomma* fait de la Corse une exception pour ces latitudes dans le bassin méditerranéen. Mis à part le cas des îles Baléares où *Hy. marginatum* représentait 27% des tiques collectées chez les bovins (cf. 1.5, Tableau 3 et Castilla et al, 2001), ces proportions sont habituellement rencontrées en Afrique du Nord et soulèvent la question de la possible présence d'agents pathogènes exotiques sur l'île ou de leurs futures émergences.

##### 4.5.1. *Hyalomma marginatum*

*Hyalomma marginatum* est une espèce de grande taille (environ 6 mm pour l'adulte à jeun) distribuée sur l'ensemble du bassin méditerranéen (Figure 15). Elle est diphasique, ditrope et exophile. Les larves et les nymphes parasitent généralement les hôtes lagomorphes (lièvres et lapins) mais également les oiseaux, alors que les adultes se nourrissent principalement sur les grands ongulés sauvages et domestiques (Estrada-Peña et al., 2017).



Figure 15. *Hyalomma marginatum* mâle et femelle

*Hyalomma marginatum* a été la deuxième espèce de tique la plus collectée sur les bovins insulaires (21,5%) alors qu'elle a très rarement infesté les petits ruminants (Tableau 7). L'espèce était largement majoritaire chez le cheval, représentant près de 80% des tiques collectées sur cet hôte. Pour les hôtes sauvages, elle a été retrouvée chez le sanglier et une nymphe a été identifiée chez un oiseau migrateur. L'espèce a été collectée dans 55% des communes échantillonnées (n = 95 ; cf. 4.3.3, Figure 14b) et son activité apparaît maximale à basse altitude (0-200 m) d'avril à fin juillet.

Cette densité élevée de *Hy. marginatum* était suspectée par plusieurs écrits (Pérez-Eid, 2007 ; Matsumoto et al., 2004), mais cette étude a été la première à la prouver. *Hyalomma marginatum* est l'un des principaux vecteurs du virus de la fièvre hémorragique de Crimée Congo (CCHF) et elle transmet également des bactéries du genre *Rickettsia* appartenant au groupe des SFG, notamment *R. aeschlimannii* en Corse (Matsumoto et al., 2004), ainsi que *Babesia caballi* responsable d'une piroplasmose équine. Ainsi, en cas d'émergence du virus de la CCHF en Corse, les populations humaines seraient potentiellement fortement exposées. Le risque lié au virus CCHF en Corse est étudié spécifiquement dans le chapitre six.



**Tableau 7. Nombre de tiques collectées par hôte animal et pourcentage de *Hyalomma marginatum***

Espèce animale	Individus collectés	% de <i>Hyalomma marginatum</i>
Bovins	1 938	21,5
Ovins	58	6,9
Caprins	335	0,0
Chevaux	180	77,7
Chiens/chats	162	0,6
Sangliers	297	2,7
Mouflons	140	0,0
Cerfs	14	0,0
Hérissons	5	0,0
Oiseaux	5	20,0
Total	3 134	18,2

#### 4.5.2. *Hyalomma scupense*

**Grech-Angelini, S.**, Stachurski, F., Lancelot, R., Boissier, J., Allienne, J. F., Gharbi, M., Uilenberg, G. (2016). First report of the tick *Hyalomma scupense* (natural vector of bovine tropical theileriosis) on the French Mediterranean island of Corsica. *Veterinary Parasitology*, 216, 33-37.

*Hyalomma scupense* est une tique monotrope et monophasique parasitant presque exclusivement les bovins. Elle est plus petite (Figure 16) que *Hy. marginatum*, ses pattes sont généralement d'une couleur unie et non bicolore marron-blanc comme *Hy. marginatum*. La présence d'un feston central pâle sur la face dorsale des individus mâles permet également de les distinguer des *Hy. marginatum*. Son aire de distribution inclut principalement l'Afrique du Nord, le Soudan, le sud de la Russie, la Turquie, le Moyen-Orient, l'Asie centrale et la Chine (Apanaskevich et al., 2010). L'espèce est connue principalement pour son rôle dans la transmission de *Theileria annulata*, responsable de la theilériose bovine tropicale, considérée comme une pathologie majeure affectant le cheptel bovin



**Figure 16. Vue dorsale d'un mâle *Hyalomma scupense* collecté en Corse**

nord-africain (Gharbi et al., 2011). La découverte inattendue de *Hy. scupense* en Corse a fait l'objet d'une publication qui suit ce chapitre (Grech-Angelini et al., 2016b).

Parmi les 1 938 tiques de bovins collectées en abattoirs (cf. 4.2.1), 168 étaient des *Hy. scupense* (70 femelles, 74 mâles et 24 nymphes), représentant 8,7% des tiques prélevées sur cet hôte en Corse. *Hyalomma scupense* n'a été retrouvée sur aucun autre hôte animal. Des analyses moléculaires se basant sur une séquence mitochondriale (*coxI*) et une séquence ribosomale (ITS2) ont permis de confirmer l'identification morphologique de *Hy. scupense*. Quatre haplotypes ont été enregistrés dans GenBank avec les numéros d'enregistrement : KT598361, KT598360, KT598362, KT598363 (Grech-Angelini et al, 2016b).

Des spécimens de *Hy. scupense* ont été collectés sur plus de 23% des communes échantillonnées (cf. 4.3.3, Figure 14c) durant plusieurs mois (activité maximale de janvier à mars) et deux stades (nymphes et adultes) ont été identifiés. Ces éléments sont en faveur de l'existence d'une population bien établie de *Hy. scupense* en Corse, ce qui est relativement surprenant pour une île du sud-ouest de l'Europe. Mises à part quelques descriptions ponctuelles dans le sud-ouest de la France (Macaigne et Pérez-Eid, 1993) ou encore sur la petite île italienne de Pianosa (Tomassone et al, 2013), la tique est habituellement trouvée dans des zones plus chaudes et notamment en Afrique du Nord, où *Hy. scupense* est souvent la principale espèce qui infeste les bovins (Bouattour et al., 1996 et 1999). L'origine de la présence de *Hy. scupense* en Corse reste indéterminée, l'implantation par la voie des oiseaux migrateurs est à considérer, bien que la tique soit monotrope (envers les bovins) et qu'elle n'ait jamais été identifiée sur des oiseaux. Le transport d'animaux en provenance de zones où *Hy. scupense* est endémique et en direction de la Corse n'existe pas actuellement mais cela aurait pu se produire dans un passé plus ou moins lointain. Aucune étude ne s'étant, auparavant, intéressée à la population de tiques corses, il est possible que l'espèce soit présente depuis longtemps et qu'elle se soit adaptée à l'environnement local. La biologie de la tique est, en effet, apparue bien différente sur l'île de celle habituellement décrite en Afrique du Nord où *Hy. scupense* est principalement active durant les mois d'été et est connue comme une espèce endophile, alors qu'en Corse son pic d'activité a été maximal en hiver et son caractère endophile semble peu probable au regard du caractère extensif de l'élevage bovin insulaire qui ne prévoit pas d'étable pour les animaux.

La theilériose bovine tropicale entraîne de fortes diminutions de productivité, des avortements et même la mort des animaux, induisant de lourdes pertes économiques pour les éleveurs bovins nord-africains. *Theileria annulata* n'a jamais été identifié en Corse, mais au regard du caractère très extensif de l'élevage bovin insulaire et du faible suivi sanitaire des troupeaux, le parasite pourrait circuler de façon silencieuse sans même que les vétérinaires et les éleveurs, qui ne connaissent pas ce

danger sanitaire, puissent l'identifier. La présence du parasite avait d'ailleurs été suspectée en 2008 suite à un épisode de fortes mortalités sur la côte orientale de l'île. Des échantillons de tiques et de sang sur EDTA (n = 22) avaient été analysés au service de parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse et, suite à l'utilisation de la coloration au May-Grünwald Giemsa, la conclusion était que la présence d'éléments intra-érythrocytaires étaient compatibles avec une theilériose (Jacquet, 2008, résultats non publiés). Les échantillons de sang sur EDTA des 22 bovins et quelques tiques ont été analysés par RLB (Reverse Line Blot) à l'Université vétérinaire d'Utrecht (Pays-Bas). *Theileria buffeli*, une espèce reconnue comme bénigne, avait été identifiée dans 15 échantillons et la présence d'une theilériose due à *T. annulata* avait été exclue (Jongejan, 2008, résultats non publiés). Même si aujourd'hui rien ne permet de suspecter la présence de la theilériose bovine tropicale en Corse, des études sérologiques seraient à mener chez les bovins pour s'en assurer. De plus, les vétérinaires ainsi que les instances sanitaires locales devraient être fréquemment sensibilisés au fait que la présence de *Hy. scupense*, son vecteur, préjuge d'une possible émergence de la maladie.

**First report of the tick *Hyalomma scupense* (natural vector of bovine tropical theileriosis) on the French Mediterranean island of Corsica**

Sébastien Grech-Angelini<sup>a\*</sup>, Frédéric Stachurski<sup>b,c</sup>, Renaud Lancelot<sup>b,c</sup>, Jérôme Boissier<sup>d</sup>, Jean-François Allienne<sup>d</sup>, Mohamed Gharbi<sup>e</sup>, Gerrit Uilenberg<sup>f</sup>

<sup>a</sup> INRA, UR045 Laboratoire de recherches sur le développement de l'élevage, Corte, France

<sup>b</sup> CIRAD, UMR CMAEE, 34398 Montpellier, France

<sup>c</sup> INRA, UMR 1309 CMAEE, 34398 Montpellier, France

<sup>d</sup> Univ. Perpignan Via Domitia, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Univ. Montpellier, F-66860 Perpignan, France

<sup>e</sup> Laboratoire de Parasitologie, Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire, Université de la Manouba, Sidi Thabet, Tunisia

<sup>f</sup> "A Surgente", Route du Port, 20130 Cargèse, France

\*Corresponding author. Tel.: +33 4 95 45 15 16; fax: +33 4 95 46 11 81. E-mail address: [angelini@corse.inra.fr](mailto:angelini@corse.inra.fr)

Published in *Veterinary Parasitology* (2016), 216: 33-37

## Abstract

*Hyalomma scupense* (Acari, Ixodidae) is a common tick species found in several areas in North Africa, Asia and South Europe and an efficient natural vector of bovine tropical theileriosis (*Theileria annulata*), a livestock disease with an important economic impact. For one year, 1,938 ticks were collected on cattle in several Corsican slaughterhouses; 168 of them were morphologically identified as *H. scupense*. This result was confirmed by genetic identification using sequences of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) and ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) genes. The presence of 2 different stages (adults and nymphs), collected in various areas of the island, indicates that a population of *H. scupense* is established in Corsica. However, bovine tropical theileriosis has not been diagnosed on the island so far.

**Key words:** *Hyalomma scupense*, cattle, molecular identification, *Theileria annulata*, Corsica

## 1. Introduction

*Hyalomma scupense* occurs in a wide area ranging from northern Africa, Sudan, Turkey, the Middle East, southern Russia and central Asia, to China; it has also been reported from some southern European countries (Apanaskevich et al., 2010). Taxonomic uncertainty as to the identity of *Hyalomma* (*Euhyalomma*) *scupense* Schulze, 1919 and *Hyalomma detritum* Schulze, 1919 has existed for a long time, but it is now established that the two names correspond to the same species; *H. scupense* is the valid name and *H. detritum* is a synonym (Apanaskevich et al., 2010). It is the most abundant ixodid tick infesting cattle in Morocco and Tunisia (Estrada-Peña et al., 2004; Gharbi and Dhargouth, 2014). This tick species is monotropic and has become endophilic in many regions. *H. scupense* is a one- or two-host tick; domestic cattle are the most common hosts for adults and immature stages, but almost all ungulates may be infested. Single records are also known from other hosts (domestic dogs, hares (*Lepus* sp.), foxes (*Vulpes* sp.)) and humans are often attacked by the adults (Hoogstraal, 1956; Apanaskevich et al., 2010). It is one of the most important vectors of bovine tropical theileriosis (*Theileria annulata*). This protozoan is a major pathogen in the Maghreb region, causing high economic losses in cattle (milk yield decrease, weight loss, abortions, high treatment costs and deaths; Gharbi et al., 2011). *H. scupense* is also a vector of other diseases, including Q-fever (*Coxiella burnetii*) and equine piroplasmiasis (*Theileria equi*) (Hoogstraal, 1956). Although *H. scupense* can probably transmit the virus of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF), it does not appear to be a major vector. Hoogstraal (1979) quoted a study by Chumakov et al. (1973) in which CCHF virus infection was demonstrated by the fluorescent antibody test in the salivary glands of *H. scupense* in Kzyl-Orda Oblast, Kazakhstan. According to Estrada-Peña et al. (2012), *H. scupense* is

one of the main *Hyalomma* species implicated in the transmission of the virus in Eurasia, but no other evidence of this is given.

Corsica is a French Mediterranean island situated 15 km north of Sardinia and 90 km west of Tuscany in Italy (Fig. 1). The island is 183 km long and 83 km wide; it is the most mountainous island in the Mediterranean area (with Monte Cinto peaking at 2,706 m). Its climate is classified as hot summer Mediterranean. About 300,000 people live in Corsica and livestock farming is an important economic activity with approximately 150,000 sheep, 48,000 goats, 40,000 pigs and 70,000 cattle. Cattle farming is of a very extensive type, the animals (mainly local *Bos taurus* cattle) live outside all year and usually without any barn.

Neither the tick fauna of Corsica nor the transmitted pathogens have been fully investigated. However, a few ad hoc studies showed the existence of three species of the genus *Hyalomma* on the island. (i) *H. marginatum* is well-established, widespread, and found on many hosts (Morel, 1959; Pérez-Eid, 2007; personal observations). It is one of the main vectors of the zoonotic CCHF virus and an experimental vector of *T. annulata* but unlikely to play a significant role in the field (Estrada-Peña et al., 2004). It is also a vector of *Rickettsia* spp., including *R. aeschlimanni* in Corsica (Matsumoto et al., 2004), and of *Babesia caballi*, the agent of equine babesiosis (Estrada-Peña et al., 2004). According to Hoogstraal (1956) it is also a natural reservoir of the agent of Q-fever (*C. burnetii*); (ii) *H. aegyptium* is mainly found on tortoises although it occasionally infests other hosts, small mammals (hedgehogs, hares, rodents, etc), lizards and even birds (partridges). It has been identified only once in Corsica (one male) on a tortoise *Testudo hermanni* (Matsumoto et al., 2004)<sup>1</sup>; (iii) *H. rufipes*, a tropical sub-Saharan species, has been collected on migrating birds and may play a role in the dissemination of *R. aeschlimanni*, with which it has been found infected in Corsica (Matsumoto et al., 2004). This species is known to be the most important vector of CCHF virus in southern Africa and it also transmits *Anaplasma marginale* and *Babesia occultans* to cattle (Estrada-Peña et al., 2004). Nymphs of this species are commonly found on birds migrating from Africa to Europe (Hoogstraal et al., 1963) and isolated adults have even been reported in Northern Europe.

A better knowledge of the Corsican tick fauna is needed to determine present and potential dangers to human and animal health related to tick-borne pathogens. This was the aim of a systematic tick survey carried out in 2014-2015. The finding of the species *H. scupense* during this study is

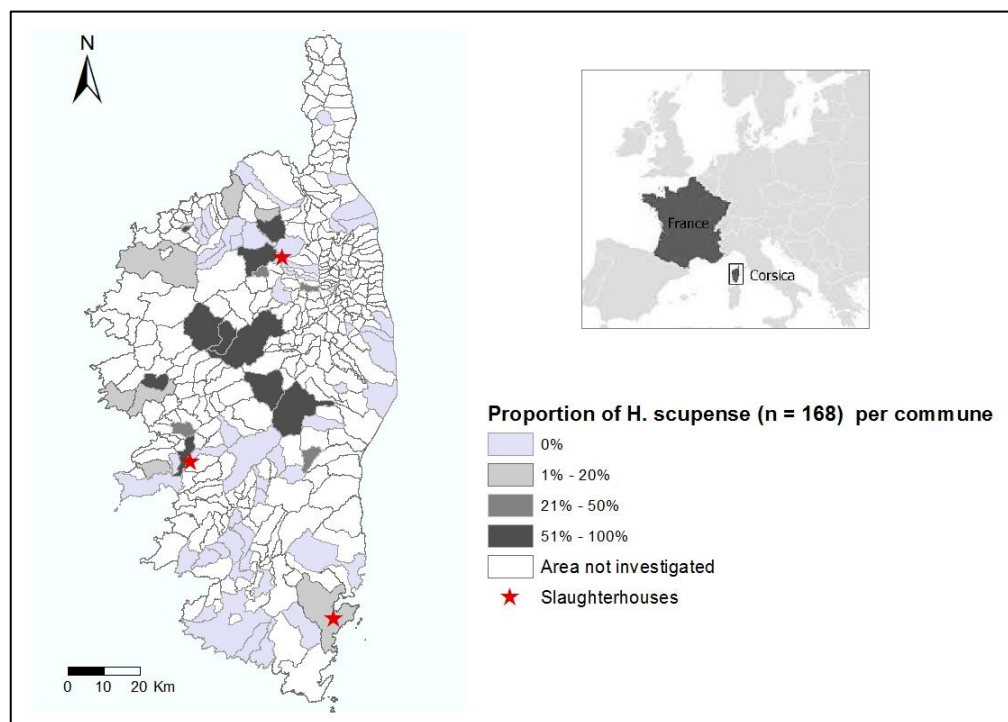
---

<sup>1</sup> The report by Foata et al. (2006) of this species on a Corsican boar was based on a wrong identification (Pérez-Eid, 2007), in part possibly due to the fact that the name has for a long time been a catchall for several *Hyalomma* spp., before these were properly separated (Hoogstraal, 1956).

presented here in advance because of its great potential importance as an efficient vector of *T. annulata* on cattle.

## 2. Materials and methods

From May 2014 to May 2015, ticks were collected in the 3 Corsican cattle slaughterhouses (Ponte-Leccia, Cuttoli and Porto-Vecchio, Fig. 1), from cattle living in different areas of the island. The national cattle identification system (eartags) allowed to trace back the origin of the cattle. The slaughterhouses of Ponte-Leccia and Cuttoli were visited monthly, whereas samples were collected only three times in Porto-Vecchio. During each visit, the whole skins of 15-25 cows were examined, just after flaying, and the ticks were manually collected. They were stored in 70% ethanol at -20°C until their identification according to their morphological characteristics using a stereomicroscope, with the keys and descriptions by Hoogstraal (1956), Walker et al. (2003), Estrada-Peña et al. (2004) and Apanaskevich et al. (2010).



**Fig. 1.** Localization of *Hyalomma scupense* and proportion of this species among the ticks collected on cattle in Corsica

To confirm the morphological identification of *H. scupense*, genomic DNA (gDNA) was extracted and purified from either one or two legs, using the QIAamp DNA microkit following manufacturer protocol (Qiagen). The use of only one or two legs allowed both morphological and molecular identification and the remainder of the specimen was kept for examining the presence of

pathogenic organisms. Target genomic regions included the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) genes, as well as the whole sequences of the ribosomal internal transcribed spacer-2 (ITS2) region. The primers used for COI amplification were LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') and HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer et al. 1994). The primers used for ITS2 were H1 (5'-TGGCTTCGTCTGTCTGAGGGTC-3') and H2 (5'-TGCTTAAATTCAGCGGGTTGTC-3'). Conventional polymerase chain reaction (PCR) was performed in a total reaction volume of 25  $\mu$ L consisting of 2  $\mu$ L of gDNA, 1x colourless GoTaq flexi buffer (Promega, Madison, WI, USA), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega, Madison, WI, USA), 0.2 mM of each dNTP (Promega, Madison, WI, USA, reference U1420), 0.4  $\mu$ M forward primer, 0.4  $\mu$ M reverse primer and 1U GoTaq G2 hotstart Polymerase (Promega, Madison, WI, USA, reference M7405). DNA amplification consisted in an activation step of 95°C for 4 min, followed by 35 cycles of 95°C for 40 s, 52°C for 40 s, and 72°C for 1 min (COI) or 1 min 40 (ITS2), and a final extension at 72°C for 5 min. PCR products were visualized on Labchip GX1 (Perkin Elmer). Positive products were sent to Genoscreen (France) for sequencing in both directions using dilutions of the original PCR primers. The sequences were then assembled and manually edited using Sequencher (GeneCodes Corp) to remove any ambiguities between strands and sequences. Genetic distance between sequences obtained and reference sequences from GenBank were calculated using Mega V6.0.



**Fig. 2.** Dorsal view of a male of Corsican *Hyalomma scupense*

### 3. Results

A total of 1,938 ticks were collected from cattle, among which 168 were identified as *H. scupense* (70 females, 74 males and 24 nymphs), representing 8.7% of the collected ticks (Fig. 2). Ticks were obtained from 72 “communes” (smallest administrative unit in France, Fig. 1) and *H. scupense* were



collected from cattle raised in 21 of them. It represented more than 50% of the collected ticks in 10 communes. Individuals from this species were collected from December to May, with a peak in January-March, during which *H. scupense* constituted 40-53% of the ticks infesting the slaughtered cattle. The 24 nymphs were collected from December to March.

Eleven specimens morphologically identified as *H. scupense* (4 males, 4 females and 3 nymphs) were submitted to molecular identification. Ten COI and 8 ITS2 sequences were obtained. Sequence divergence was found within the COI sequences (4 haplotypes; GenBank accession numbers, AN: KT598361, KT598360, KT598362, KT598363). The genetic distance within Corsican specimens was 0.002 (standard deviation of 0.001). No sequence variation was found within ITS sequences (AN: KT598364). All sequences confirm the morphological identification of *H. scupense*. Table 1 shows mean pairwise distance of all the sequences obtained for COI, for ITS2 and reference sequences. The genetic distance between the Corsican specimens and *H. scupense* was 0.7% for both genes while the minimum genetic distance between the Corsican specimens and the other species was 7.7%.

**Table 1.** Pair-wise genetic distances between COI and ITS2 of reference sequences and Corsican specimens (accession numbers are between parentheses)

COI	1	2	3	4	5	6
1. <i>H. dromedarii</i> (AJ437083)						
2. <i>H. anatolicum</i> (KF912622.2)	8.7%					
3. <i>H. asiaticum</i> (KF527440.1)	14.7%	16.9%				
4. <i>H. lusitanicum</i> (EU827743)	9.6%	9.3%	15.5%			
5. <i>H. marginatum</i> (EU827693.1)	4.0%	8.7%	14.6%	8.2%		
6. <i>H. scupense</i> (KM235712.1)	12.6%	15.2%	9.8%	13.6%	11.7%	
7. Corsican specimens (n=10)	13.3%	15.3%	10.9%	14.7%	13.3%	<b>0.7%</b>

ITS2	1	2	3	4
1. <i>H. asiaticum</i> (JX845148)				
2. <i>H. anatolicum</i> (HQ005303)	11.1%			
3. <i>H. marginatum</i> (JQ737104)	11.1%	4.6%		
4. <i>H. scupense</i> (JX845150)	8.6%	8.3%	8.3%	
5. Corsican specimens (n=8)	7.8%	7.6%	7.7%	<b>0.7%</b>

#### 4. Discussion

In spite of the large geographic distribution of *H. scupense* in the world, its presence in Corsica and its relative abundance (8.7% of the collected ticks) were not expected since the species was rarely

found in the areas neighbouring the island where significant tick studies have been carried out. Two specimens were recorded in Sardinia, on deer (Garippa et al., 2003) and on man (Montarsi et al., 2011); and 7 questing adults (designated as *H. detritum*) were collected on the vegetation on the Tuscan island of Pianosa (Tomassone et al., 2013). It is not frequent in continental Spain (Oteo et al., 2006) and has not been found on Minorca Island (Ros-García et al., 2012). In continental France, the tick was reported in the South-West where it seems to be established (Macaigne and Pérez-Eid, 1993) though the collected numbers were low. But in Northern Africa where tropical theileriosis is a major cattle disease, *H. scupense* is often the most widespread tick species on cattle, representing between 84.3 and 99.1% of the ticks population in Tunisia (in farms affected by tropical theileriosis), 30.8% in Morocco (Gharbi and Dhargouth, 2014) and 13.6% in Algeria (Benchikh Elfegoun et al., 2013). In Corsica, *H. scupense* was reported in almost 30% of the investigated areas (Fig. 1) and two different stages (adults and nymphs) were found several times on the same animals. These observations provide strong arguments for the existence of an endemic and well-established population of *H. scupense* ticks in Corsica, which is rather surprising for an area of south-western Europe.

The way *H. scupense* arrived in Corsica remains unexplained. The role played in the dispersion of ticks by migratory birds has to be considered, although this species was so far not found on migrating birds (e.g. Hoogstraal et al., 1963, Wallménus et al., 2014). Cattle are the main hosts of *H. scupense* and although there is currently no introduction of animals from countries where the tick is established to Corsica, this could have happened earlier. As the Corsican tick fauna had never been fully investigated before this study, it cannot be excluded that *H. scupense* may be a long-time established species. A phylogenetic analysis of several *H. scupense* populations, from Corsica but also from Maghreb countries, could perhaps give clues regarding the origin of Corsican ticks.

Although its seasonal dynamics have not been systematically studied as yet, it appears that the habitat and life cycle of *H. scupense* are different in Corsica and in the Maghreb countries, for two reasons. *H. scupense* is usually described, in the latter regions, as an endophilic tick (Estrada-Peña et al., 2004; Gharbi and Dhargouth, 2014) with infestations often associated with barns, stables, sheds and pens; because cattle are kept outside in Corsica, the tick cannot be endophilic. Secondly, maximum activity of the species was observed from January to March in this study, which is quite different from what Gharbi and Dhargouth (2014) described in North Africa with a peak adult activity from May to August.

*Theileria buffeli/orientalis*, the causative agent of benign theileriosis, has been reported in Corsica (Uilenberg, 2000) but bovine tropical theileriosis (*T. annulata*) has not been diagnosed so far. *T. annulata* is only transstadially transmitted, so the immature *H. scupense* stages cannot be

infected before feeding on an infested host. If indeed the Corsican population of *H. scupense* is presently not infected, migrating birds coming from enzootic areas would not constitute a risk of introducing *T. annulata*. Such birds have so far not been found infested by immature *H. scupense*, and moreover, as larvae (and therefore the resulting nymphs) are never infected, the greatest potential danger of *T. annulata* introduction would be the importation of live carrier cattle from an infected country.

The occurrence of *H. scupense* in Corsica highlights however the risk of transmission of *T. annulata* to the local cattle population. Bovine tropical theileriosis occurs in many neighbouring Mediterranean countries, but has not been reported in continental Italy and Sardinia. It is present in Sicily (Loria et al., 1999), the Spanish Island of Minorca (Ros-García et al., 2012) and continental Spain (García-Sanmartín et al., 2006). In Sicily and continental Spain the main vector of *T. annulata* is *Hyalomma lusitanicum* while the vector species is uncertain in Minorca. In the other countries of the Mediterranean area, the main vector appears to be *H. scupense*. Using partial amplification and sequencing of the 18s rRNA gene, Criado-Fornelio et al. (2003) reported the identification of *T. annulata* in the blood of a bovine animal reared in France. Also Bonnet et al. (2013) detected *T. annulata* DNA in a single *Dermacentor marginatus* collected in the field by flagging in southern France (Aveyron). This tick species is not known as a vector of *T. annulata* and finding the pathogen in the tick does not necessarily mean that the tick can transmit it. These two reports certainly need further confirmations and if tropical theileriosis occurred in southern France, it would probably have been detected. Because of the extensive livestock management and the rustic local cattle breed, the infection might however remain undetected in Corsica. Bovine tropical theileriosis is one of the most economically important diseases and for the future of eventual improvements on the animal husbandry in Corsica, it is of the utmost importance to determine whether it is present or not on the island.

### **Conflict of interest statement**

The authors declare no conflicts of interest.

### **Acknowledgements**

We are grateful to the staff of the slaughterhouse of Ponte-Leccia (especially Dr. Sidonie Lefevbre), Cuttoli (especially Magalie Montaggioni) and Porto-Vecchio for their help in collecting ticks.

## References

- Apanaskevich, D.A., Filippova, N.A., Horak, I.G., 2010. The genus *Hyalomma* Koch, 1844. X. Redescription of all parasitic stages of *H. (Euhyalomma) scupense* Schulze, 1919 (= *H. detritum* Schulze) (Acari: Ixodidae) and notes on its biology. *Folia Parasitol.* 57, 69-78.
- Benchikh Elfegoun, M-C., Gharbi, M., Djebir, S., Kohil, K., 2013. Dynamique d'activité saisonnière des tiques ixodidés parasites des bovins dans deux étages bioclimatiques du nord-est algérien. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* 66, 117-122.
- Bonnet, S., de la Fuente, J., Nicollet, P., Liu, X., Madani, N., Blanchard, B., Maingourd, C., Alongi, A., Torina, A., Fernández de Mera, G., Vicente, J., George, J.-C., Vayssier-Taussat, M., Joncour, G., 2013. Prevalence of tick-borne pathogens in adult *Dermacentor* ticks from nine collection sites in France. *Vector-Borne Zoonot.* 13, 226-236.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., Barba-Carrero, J.C., 2003. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. *Vet. Parasitol.* 113, 189-201.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R., 2004. Ticks of domestic animals in the Mediterranean Region: a guide to identification of species. University of Zaragoza, Zaragoza.
- Estrada-Peña, A., Jameson, L., Medlock, J., Vatansever, Z., Tishkova, F., 2012. Unraveling the ecological complexities of tick-associated Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus transmission: A gap analysis for the Western Palearctic. *Vector-Borne Zoonot.*, 12,743-751.
- Foata, J., Mouillot, D., Culioli, J.L., Marchand, B., 2006. Influence of seasonal hostage on wild boar parasites in Corsica using indicator species analysis. *J. Helminthol.* 80, 41-45.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3, 294-299.
- García-Sanmartín, J., Nagore, D., García-Pérez, A.L., Juste, R.A., Hurtado, A., 2006. Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. *BMC Vet. Res.* 2, 16–22.
- Garippa, G., Biddau, M., Cherchi, M., 2003. Endo ed ectoparassiti di *Cervus elaphus corsicanus* della Sardegna. *J. Mt. Ecol.* 7 (suppl.), 189-190.

- Gharbi, M., Darghouth, M.A., 2014. A review of *Hyalomma scupense* (Acari, Ixodidae) in the Maghreb region: from biology to control. *Parasite* 21, 2.
- Gharbi, M., Touay, A., Khayeche, M., Laarif, J., Jedidi, M., Sassi, L., Dhargouth, M.A., 2011. Ranking control options for tropical theileriosis in at-risk dairy cattle in Tunisia, using benefit-cost analysis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 30, 763-778.
- Hoogstraal, H., 1956. African Ixodoidea. Volume I. Ticks of the Sudan. Res. Rept. NM, Cairo, Egypt, 1101 pp.
- Hoogstraal, H., Kaiser, M.N., Traylor, M.A., Gaber, S., Guindy, E., 1963. Ticks (Ixodoidea) on birds migrating from Africa to Europe and Asia 1959-61. *Bull. W.H.O.*, 24, 197-212.
- Hoogstraal, H., 1979. The epidemiology of tick-borne Crimean- Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe and Africa. *J. Med. Entomol.* 15, 307-417.
- Loria, G.R., Riili, S., Vitale, F., Greco, A., Sparagano, O., 1999. Clinical and laboratory studies on theileriosis outbreaks in Sicily, Italy. *Parassitologia* 41 (Suppl. 1), 63-67.
- Macaigne, F., Pérez-Eid, C., 1993. *Hyalomma scupense* Schulze, 1919 (Acarina, Ixodoidea) tique autochtone du sud-ouest de la France. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 68, 199-200.
- Matsumoto, K., Parola, P., Brouqui, P., Raoult, D., 2004. *Rickettsia aeschlimanni* in *Hyalomma* ticks from Corsica. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23, 732-734.
- Montarsi, F., Maioli, G., Fois, F., Mereu Piras, P., Magliano, A., Pascucci, I., Toma, L., Mignone, W., Torina, A., Capelli, G., 2011. Uncommon ticks from Italy. *Proc. Int. Conf. Ticks and Tick-borne Pathogens, Zaragoza (TTP7)*, 213.
- Morel, P-C., 1959. Les *Hyalomma* (Acariens, Ixodidae) de France. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 34, 552-555.
- Oteo, J.-A., Portillo, A., Santibañez, S., Perez-Martinez, L., Blanco, J.-R., Jimenez, S., Ibarra, V., Pérez-Palacios, A., Sanz, M., 2006. Prevalence of spotted fever group *Rickettsia* species detected in ticks in La Rioja, Spain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1078, 320-323.
- Pérez-Eid, C., 2007. Les tiques. Identification, biologie, importance médicale et vétérinaire. Lavoisier, Ed. TEC&DOC, 314 pp.
- Ros-García, A., García-Pérez, A.L., Verdrea, J., Juste, R.A., Hurtado, A., 2012. Monitoring piroplasms infection in three cattle farms in Minorca (Balearic Islands, Spain) with previous history of clinical piroplasmosis. *Vet. Parasitol.*, 190, 318-325.

Tomassone, L., Grego, E., Auricchio, D., Iori, A., Gianni, F., Rambozzi, 2013. Lyme borreliosis spirochetes and spotted fever group rickettsiae in ixodid ticks from Pianosa Island, Tuscany Archipelago, Italy. Vector-Borne Zoonot., 13, 84-91.

Uilenberg, G., 2000. Tick-borne infections of cattle on Corsica. ICTTD newsletter n° 14, 13. (ISSN: 1385-3422).

Walker, A.R., Bouattour, A., Camicas, J.-L., Estrada-Peña, A., Horak, I.G., Latif, A.A., Pegram, R.G., Preston, P.M., 2003. Ticks of domestic animals in Africa. A guide to identification of species. Bioscience Reports, Edinburgh, Scotland, UK, 221.

Wallménius, K., Barboutis, C., Fransson, T., Jaenson, T. GT, LindgrenP.-E., Nyström, F., Olsen, B., Salaneck, E., Nilsson, K., 2014. Spotted fever *Rickettsia* species in *Hyalomma* and *Ixodes* ticks infesting migratory birds in the European Mediterranean area. Parasites & Vectors, 7, 318.



## 5. Etude de la présence des agents pathogènes transmis par les tiques en Corse

**Grech-Angelini, S.**, Stachurski, F., Vayssier-Taussat, M., Devillers, E., Casabianca, F., Lancelot, R., Uilenberg, G., Moutailler, S., 2019. Tick-borne pathogens in ticks (Acari: Ixodidae) collected from various domestic and wild hosts in Corsica (France), a Mediterranean island environment. *Transboundary and Emerging Diseases*, 20. doi: 10.1111/tbed.13393

### 5.1. Contexte de l'étude

La proximité qui existe entre les compartiments humain, domestique et sauvage en Corse pourrait être favorable à la circulation des agents pathogènes transmis par les tiques (cf. chapitre 3). Neuf espèces de tiques ont été identifiées dans cette étude, chacune est connue pour être vectrice d'agents pathogènes. Ainsi, le nombre d'agents pathogènes circulants en Corse pourrait potentiellement être élevé si les conditions y étaient favorables. L'objectif de ce chapitre est de relater la recherche d'un grand nombre de micro-organismes transmis par les tiques dans les tiques collectées (1 523 analysées sur 3 134 prélevées) sur les animaux de l'île. Les agents pathogènes recherchés sont les plus couramment identifiés dans le bassin méditerranéen. Les résultats attendus permettront de connaître les risques d'expositions des populations humaines et animales à ces micro-organismes. L'ensemble du protocole et des résultats sont décrits en détails dans l'article scientifique qui suit ce chapitre (Grech-Angelini et al., 2019a)

### 5.2. Matériel et méthode

L'outil de détection utilisé est basé sur la technologie BioMark<sup>TM</sup> dynamic arrays (Fluidigm Corporation, USA). Il permet de réaliser des PCR microfluidiques en temps réel à haut débit et de détecter de 48 à 96 cibles au sein de 48 à 96 échantillons (tique individuelle ou pool) soit 2 304 (ou 9 216) réactions de PCR dans un temps très court (Michelet et al., 2014). Lors de cette étude, cet outil a permis la détection de 41 agents pathogènes : 29 bactéries des genres *Borrelia*, *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Francisella*, *Ehrlichia*, *Neoehrlichia*, *Bartonella* et *Coxiella* et 12 parasites des genres *Theileria* et *Babesia* (Tableau 8). Lorsque les séquences génétiques de ces micro-organismes étaient identifiées, des PCR individuelles (PCR ou Nested PCR) ont été réalisées sur certains échantillons et les séquences obtenues ont été comparées à celles présentes dans GenBank. L'ensemble des séquences génétiques utilisées dans ce protocole pour l'outil de PCR microfluidiques en temps réel (Biomark<sup>TM</sup>) ainsi que pour les vérifications par PCR individuelles sont disponibles dans les études de Michelet et al. (2014) et Gondard et al. (2019).



Les parasites du genre *Theileria* ont également fait l'objet d'une recherche individuelle dans les espèces de tiques potentiellement vectrices, *Ha. punctata*, *Ha. sulcata* et *Hy. scupense*. En effet, l'existence d'une population installée de *Hy. scupense* en Corse (cf. 4.5.2 et Grech-Angelini et al., 2016b) permet de suspecter la présence de *T. annulata*, responsable de la theilériose bovine tropicale. Une autre espèce de *Theileria*, *T. buffeli*, transmise par les tiques du genre *Haemaphysalis*, avait déjà été identifiée en Corse (ICTTD, 2000) et ce parasite n'était pas spécifiquement recherché par l'outil de PCR microfluidique en temps réel à haut débit.

Au regard de la forte présence de *Hyalomma marginatum*, un des principaux vecteurs du virus CCHF, sur le territoire insulaire, ce virus a été recherché individuellement dans les *Hy. marginatum*. L'ARN viral a également été recherché dans les *Hy. scupense* soupçonnées d'être vectrices du virus CCHF (Estrada-Peña et al., 2012a ; Chumakov et al., 1968) et dans les *Rh. bursa* dans lesquelles le virus a déjà été identifié sans que pour autant le rôle vecteur ne soit démontré (Papadopoulos et al., 1978, Yesilbag et al., 2013).

**Tableau 8. Liste des agents pathogènes (et endosymbiotes) recherchés par l'outil de PCR microfluidiques en temps réel (Biomark<sup>TM</sup>) à haut débit**

Genre	Nombre de micro-organismes	Espèces
<i>Anaplasma</i>	6	<i>A. ovis</i> , <i>A. bovis</i> , <i>A. centrale</i> , <i>A. marginale</i> , <i>A. phagocytophilum</i> , <i>A. platys</i>
<i>Borrelia</i>	8	<i>B. afzelii</i> , <i>B. bissetti</i> , <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto, <i>B. garinii</i> , <i>B. lusitaniae</i> , <i>B. miyamotoi</i> , <i>B. spielmanii</i> , <i>B. valaisiana</i>
<i>Bartonella</i>	2	<i>Bar. henselae</i> , <i>Bar. quintana</i>
<i>Ehrlichia</i>	3	<i>E. canis</i> , <i>E. chaffeensis</i> , <i>E. ruminantium</i>
<i>Francisella</i>	2	<i>F. tularensis</i> , <i>Francisella-like endosymbionts</i>
<i>Neoehrlichia</i>	1	<i>Neoehrlichia mikurensis</i>
<i>Rickettsia</i>	5	<i>R. aeschlimanii</i> , <i>R. conorii</i> , <i>R. helvetica</i> , <i>R. massiliae</i> , <i>R. slovaca</i>
<i>Coxiella</i>	2	<i>Coxiella burnetii</i> , <i>Coxiella-like organisms</i>
<i>Babesia</i>	10	<i>Ba. bigemina</i> , <i>Ba. bovis</i> , <i>Ba. caballi</i> , <i>Ba. canis</i> , <i>Ba. divergens</i> , <i>Ba. major</i> , <i>Ba. microti</i> , <i>Ba. ovis</i> , <i>Ba. venatorum</i> , <i>Ba. vogeli</i>
<i>Theileria</i>	2	<i>T. annulata</i> , <i>T. equi</i>

Les tiques ont été analysées individuellement ou par pools (entre deux et cinq tiques). *Rhipicephalus bursa*, *Hy. marginatum*, *Ha. punctata*, *Rh. sanguineus* s.l. and *D. marginatus*, collectées en grand nombre sur leurs hôtes (cf. 4.3 et Grech-Angelini et al., 2016a), ont été groupées dans des pools constitués selon le sexe (ou le stade de développement) de la tique, l'hôte et le lieu de collecte. Les autres espèces collectées plus rarement, ou ayant un intérêt sanitaire spécifique, ont été analysées individuellement : *I. ricinus*, *Hy. scupense*, *Ha. sulcata* and *Rh. (Bo.) annulatus*.

### 5.3. Principaux résultats

Près de la moitié (48%) des 569 échantillons (1 523 tiques analysées) et huit des neuf espèces de tiques analysées étaient porteurs de l'ADN d'au moins un agent pathogène. Aucun micro-organisme n'a été détecté dans les deux spécimens de *Ha. sulcata* testés (Tableau 9). Les séquences génétiques de 11 agents pathogènes issus de six genres ont été identifiés. La présence en Corse de quatre agents pathogènes a été confirmée par cette étude : *Rickettsia aeschlimannii* (23% des pools), *Rickettsia slovaca* (5%), *Anaplasma marginale* (4%) et *Theileria equi* (0,4%). Mais pour la plupart des agents pathogènes, leur ADN a été détecté pour la première fois : *Anaplasma phagocytophilum* (16%), *Rickettsia helvetica* (1%), *Borrelia afzelii* (0,7%), *Borrelia miyamotoi* (1%), *Bartonella henselae* (2%), *Babesia bigemina* (2%) et *Babesia ovis* (0,5%).

**Tableau 9. Proportion (%) de pools infectés (ou tiques infectées\*)**

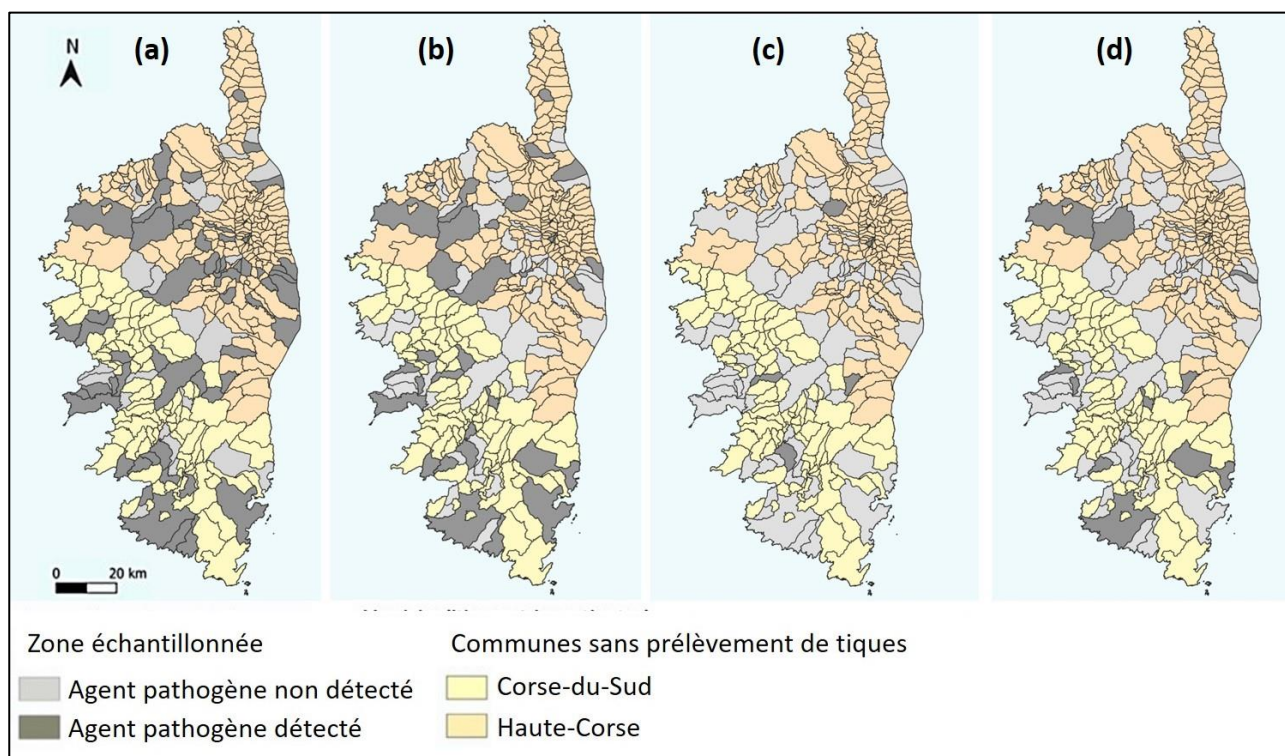
Espèces de tiques (nombre de pools ; tiques )	<i>Borrelia</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Babesia</i>	<i>Bartonella</i>	<i>Theileria</i>
<i>Rh. bursa</i> (108;518)	0	27	15	12	5	1
<i>Hy. marginatum</i> (89;362)	0	100	7	0	1	0
<i>Hy. scupense</i> (135;135)*	0	6	2	0	0	0
<i>I. ricinus</i> (115; 115)*	5	6	64	0	2	0
<i>Ha. punctata</i> (30;74)	13	0	13	0	3	0
<i>Ha. sulcata</i> (2;2)*	0	0	0	0	0	0
<i>Rh. sanguineus</i> s.l. (41;150)	0	17	12	0	2	0
<i>Rh. (Bo.) annulatus</i> (11;11)*	0	0	18	0	9	9
<i>D. marginatus</i> (38;156)	0	66	3	0	3	0

\*Tiques analysées individuellement

Les agents pathogènes les plus présents ont été les bactéries du genre *Rickettsia* (29% des pools) suivies par celles du genre *Anaplasma* (19%). L'ADN de *R. aeschlimannii* a notamment été retrouvé dans 100% des pools de *Hy. marginatum* et *A. phagocytophilum* dans 63% des *I. ricinus*. L'ARN du

virus CCHF n'a été détecté dans aucun des échantillons testés (332 pools, 1 015 tiques ; cf. chapitre 6). Les analyses individuelles pour le genre *Theileria* se sont révélées négatives dans les pools constitués des tiques du genre *Haemaphysalis* et de *Hy. scupense*. Une autre espèce de *Theileria*, *T. equi*, a été identifiée dans un pool de *Rh. bursa* et une tique de l'espèce *Rh. (Bo.) annulatus* par l'outil de PCR microfluidiques en temps réel (Biomark™) à haut débit.

Sur les 569 échantillons analysés (une à cinq tiques par échantillon), 404 étaient constitués de tiques prélevées sur les bovins, 19 sur les caprins, 12 sur les ovins, 22 sur les chiens, deux sur les chats, 41 sur les sangliers, 26 sur les mouflons, 13 sur les cerfs et deux sur les hérissons et les oiseaux migrateurs. Toutes les espèces animales prélevées étaient porteuses de tiques dans lesquelles l'ADN d'au moins un agent pathogène a été détecté. Les espèces du genre *Rickettsia* et *Anaplasma* ont été retrouvées dans les tiques prélevées sur la majorité des animaux, alors que les espèces du genre *Borrelia* ont été uniquement détectées dans des tiques collectées sur des bovins (Grech-Angelini et al, 2019 ; Tableau 4 page 107 pour les animaux domestiques et Tableau 5 page 108 pour les animaux sauvages).



Des tiques provenant de 82 communes corses ont été analysées, et l'ADN d'au moins un agent pathogène a été détecté dans 83% d'entre elles (n = 68). Les espèces du genre *Rickettsia*, *Anaplasma*

et *Babesia* ont été distribuées respectivement sur 80% (Figure 17a), 37% (Figure 17b) et 12% (Figure 17d) des communes échantillonnées alors que les espèces du genre *Borrelia* ont été détectées dans cinq communes (Figure 17c).

#### 5.4. Discussion

Parmi les 11 agents pathogènes dont l'ADN a été identifié, sept sont reconnus comme étant zoonotiques : *B. miyamotoi*, *B. afzelii*, *R. aeschlimannii*, *R. slovaca*, *R. helvetica*, *A. phagocytophilum* et *Bar. henselae*. Ces agents pathogènes sont le plus souvent asymptomatiques chez l'animal, ou leurs effets sont méconnus, alors qu'ils peuvent entraîner des maladies graves chez l'homme (cf. 2.4.). Les animaux pourraient ainsi être des réservoirs pour ces agents pathogènes. Aucun cas humain de fièvres pourprées, dues à *R. aeschlimannii*, *R. slovaca* ou *R. helvetica*, n'a été recensé en Corse. Mais les laboratoires d'analyses locaux n'étant pas informés de leur possible circulation, ces trois micro-organismes ne sont jamais recherchés chez l'homme. Seuls les anticorps dirigés contre *R. conorii* (responsable de la fièvre boutonneuse méditerranéenne) sont recherchés chez les patients présentant un tableau clinique compatible avec ces pathologies. *Anaplasma phagocytophilum* et *Bar. henselae* responsables respectivement de l'anaplasmose granulocytaire humaine et de la maladie dite des griffes du chat ne sont également jamais investiguées. Même si l'incidence de ces maladies est relativement faible en France continentale ou dans d'autres régions proches de la Corse, les fortes interactions qui ont lieu entre la faune sauvage, les animaux domestiques et les hommes pourraient augmenter l'exposition de la population insulaire à ces micro-organismes.

La détection de l'ADN des agents pathogènes dans une tique ne prouve en rien la compétence de celle-ci à transmettre le micro-organisme. En effet, la collecte sur animaux donnant accès à des tiques gorgées, il se pourrait que les séquences génétiques identifiées soient des traces d'ADN de l'agent pathogène récupéré par la tique lors de son repas sanguin sur un animal infecté. De plus, la seule détection de l'ADN ne permet pas de savoir si l'agent pathogène est vivant et s'il s'est répliqué dans la tique. Même si l'identification de séquences génétiques des agents pathogènes dans les tiques gorgées suggère la circulation de ces micro-organismes en Corse, elle ne suffit pas pour le démontrer. Ce travail doit être poursuivi par des enquêtes sérologiques chez les animaux et l'homme afin d'estimer l'exposition réelle de ces populations. De même, seul l'isolement de ces agents pathogènes chez l'homme, l'animal ou dans une tique permettra de conclure sur les risques réels encourus par l'homme et les animaux.

## Tick-borne pathogens in ticks (Acari: Ixodidae) collected from various domestic and wild hosts in Corsica (France), a Mediterranean island environment

**Running title:** Tick-borne pathogens in ticks from Corsica Island (France)

Sébastien Grech-Angelini<sup>1,\*</sup>, Frédéric Stachurski<sup>2,3</sup>, Muriel Vayssier-Taussat<sup>4</sup>, Elodie Devillers<sup>4</sup>, François Casabianca<sup>1</sup>, Renaud Lancelot<sup>2,3</sup>, Gerrit Uilenberg<sup>5</sup>, Sara Moutailler<sup>4</sup>

<sup>1</sup>INRA, UR045 Laboratoire de recherches sur le développement de l'élevage, Corte, France

<sup>2</sup>CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier, France

<sup>3</sup>ASTRE, CIRAD, INRA, Univ. Montpellier, Montpellier, France

<sup>4</sup>UMR BIPAR, Animal Health Laboratory, ANSES, INRA, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France

<sup>5</sup>“A Surgente”, Route du Port, Cargèse, France

Correspondence:

Sébastien Grech-Angelini, GTV Corse, Ghisonaccia, France ; email: [grech.angelini@gtvcorse.fr](mailto:grech.angelini@gtvcorse.fr) ; Sara Moutailler, UMR BIPAR, Maisons-Alfort, France, [sara.moutailler@anses.fr](mailto:sara.moutailler@anses.fr)

\*Present address:

- *Groupement Technique Vétérinaire de Corse, Ghisonaccia, France*

- *UMR BIPAR, Animal Health Laboratory, ANSES, INRA, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France*

Published in *Transboundary and Emerging Disease* 20, 2019

## ABSTRACT

Corsica is a mountainous French island in the north-west of the Mediterranean Sea presenting a large diversity of natural environments where many interactions between humans, domestic animals and wild fauna occur. Despite this favourable context, tick-borne pathogens (TBPs) have not systematically been investigated. In this study, a large number of TBPs were screened in ticks collected during one year from domestic and wild hosts in Corsica. More than 1,500 ticks belonging to nine species and five genera (*Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Dermacentor*, *Ixodes* and *Haemaphysalis*) were analysed individually or pooled (by species, gender, host and locality). A real-time microfluidic PCR was used for high-throughput screening of TBPs DNA. This advanced methodology permitted the simultaneous detection of 29 bacterial and 12 parasitic species (including *Borrelia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, *Bartonella*, *Candidatus* Neoehrlichia, *Coxiella*, *Francisella*, *Babesia* and *Theileria*). CCHF virus was investigated individually in tick species known to be vectors or carriers of this virus. In almost half of the tick pools (48%), DNA from at least one pathogen was detected and eleven species of TBPs from six genera were reported. TBPs were found in ticks from all collected hosts and were present in more than 80% of the investigated area. The detection of some pathogens DNA confirmed their previous identification in Corsica, such as *Rickettsia aeschlimannii* (23% of pools), *Rickettsia slovaca* (5%), *Anaplasma marginale* (4%) and *Theileria equi* (0.4%), but most TBPs DNA was not reported before in Corsican ticks. This included *Anaplasma phagocytophilum* (16%), *Rickettsia helvetica* (1%), *Borrelia afzelii* (0.7%), *Borrelia miyamotoi* (1%), *Bartonella henselae* (2%), *Babesia bigemina* (2%) and *Babesia ovis* (0.5%). The important tick infection rate and the diversity of TBPs reported in this study highlight the probable role of animal reservoir hosts for zoonotic pathogens and human exposure to TBPs on Corsica.

**Keywords:** Ticks (Ixodidae), Tickborne pathogens, Domestic animals, Wild animals, Corsica, France

## 1. INTRODUCTION

The regional sanitary importance of ticks depends on the tick species and tick-borne pathogens (TBPs) present in an area, and to a large extent on the local climate, management and breeds of livestock and human activities (Jongejan and Uilenberg, 2004). The role of ticks as vectors of human pathogens is second in importance to that of mosquitoes (Parola and Raoult, 2001) and they are worldwide the most important vectors in the veterinary field (Nicholson et al., 2009). Ticks can transmit many varieties of pathogens, including bacteria, parasites and viruses. Moreover, human tick-borne diseases are usually zoonotic and asymptomatic for non-human vertebrate hosts which most often are the reservoirs of pathogens causing human infection (Jongejan and Uilenberg, 2004). Corsica is a French island in the western part of the Mediterranean area, situated 15 km north of Sardinia and 90 km west of Tuscany in Italy (Figure 1). It is the fourth Mediterranean island in size and the most mountainous and forested one. The island consists of two departments (Corse-du-Sud and Haute-Corse) and 360 communes (the smallest administrative unit in France; Fig. 1). Tourism (three million people annually, 320,000 permanent inhabitants), extensive farming (sheep, goats, pigs and cattle), hunting and hiking are important activities in Corsica (Grech-Angelini et al., 2016b). Therefore, in this context, permanent interactions occur between livestock, wildlife and humans in a small area, which certainly favour the circulation of TBPs, including zoonotic ones. Corsica is also on the route of migratory birds which create a natural link between Africa and Europe and could spread ticks infected with TBPs (Hoffman et al., 2018).

Only scattered observations on the tick fauna of Corsica, mostly grouped together in a book on the ticks of France (Pérez-Eid, 2007), were available before 2014. From May 2014 to May 2015, a large tick survey (Grech-Angelini et al, 2016b) on domestic and a few wild animals led to the identification of nine species: *Rhipicephalus bursa*, *Hyalomma marginatum*, *Dermacentor marginatus*, *Rh. sanguineus* sensu lato, *Hy. scupense*, *Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis punctata*, *Rh. (Bo.) annulatus*, and *Ha. sulcata*. The diversity of the Corsican tick species, characterized by ticks usually collected in humid environments (*I. ricinus*) and others in drier areas (*Hyalomma* spp., *Rh. bursa*), suggested a potential high diversity of TBPs on the island.

Some of the TBPs occurring on Corsica have been reported more or less reliably in former and recent studies. Various species of the genera *Anaplasma*, *Rickettsia* and *Ehrlichia* (ICTTD, 2000; Matsumoto et al., 2004; Dahmani et al., 2017; Selmi et al., 2017; Cabezas-Cruz et al., 2019; Cicculli et al., 2019a, 2019b, 2019c), the genera *Babesia* and *Theileria* (ICTTD, 2000) have been identified, and *Borrelia burgdorferi* sensu lato was recently reported (Cicculli et al., 2019c). It remained uncertain whether all of the Corsican TBPs were known. The aim of this study was to have a large

overview regarding the TBPs carried in more than 1,500 ticks collected on different Corsican animal hosts, focusing on the main pathogens of medical and veterinary importance known in the Mediterranean area, including *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Francisella* spp., *Ehrlichia* spp., *Coxiella* spp., *Theileria* spp., *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Candidatus Neoehrlichia* and CCHF virus.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Study area and tick collection.

A large-scale tick collection has been conducted on domestic and a few wild animals in Corsica (Grech-Angelini et al., 2016a and 2016b). Cattle were chosen as host model because of the extensive, free-ranging livestock farming system, with a low frequency of acaricide treatments. Ticks were collected over a year (May 2014 to May 2015) in the three cattle Corsican slaughterhouses. Ticks on sheep, goats and horses were collected less systematically from May to August 2014 in three farms for each host. Ticks from domestic carnivores were provided by practising veterinarians. Ticks from wild boars (*Sus scrofa*) and hedgehog (*Erinaceus europaeus*) were collected by hunters, while ticks from mouflons (*Ovis aries musimon*), deer (*Cervus elaphus corsicanus*) and birds (European greenfinch, *Chloris chloris*) were obtained from staff from the National Office for Hunting and Wildlife (ONCFS), from staff from the Regional Natural Park of Corsica (PNRC) and from bird banders, respectively. Ticks were stored in 70 % ethanol at -20 °C until their identification.

Ticks were identified based on their morphology using appropriate keys and descriptions (Estrada-Peña, 2004; Pérez-Eid, 2007). For some ticks species, never reported in Corsica or impossible to distinguish morphologically, molecular identification was carried out for a few specimens by sequencing the Mitochondrial *cox1* (cytochrome *c* oxidase subunit 1) and ITS2 (internal transcribed spacer 2) for *Hy. scupense* and 16S ribosomal RNA genes for *Rh. sanguineus* s.l. and *Ha. sulcata*. All the methodology concerning the tick collection and the identification of ticks is detailed in Grech-Angelini et al. (2016a and 2016b).

### 2.2 Pools of ticks

Tick were analysed individually or by pools consisting of two to five ticks. *Rhipicephalus bursa*, *Hy. marginatum*, *Ha. punctata*, *Rh. sanguineus* s.l. and *D. marginatus*, found in large numbers on their hosts, were grouped in pools by sex, host and locality. Other species found more rarely or with a



special sanitarian interest were systematically analysed individually: *I. ricinus*, *Hy. scupense*, *Ha. sulcata* and *Rh. (Bo.) annulatus*.

### 2.3 DNA and RNA extraction

After washing once in 70% ethanol for 5 min and twice in distilled water for 5 min, pools of one to five ticks were crushed in 300 µl of DMEM with 10% foetal calf serum and six steel balls using the homogenizer Precellys® 24 Dual (Bertin, France) at 5500 rpm for 40s. DNA was then extracted using 100µl of the homogenate according to the Wizard genomic DNA purification kit (Promega, France) following the manufacturer's instruction. Total DNA per sample was eluted in 50 µl of rehydration solution and stored at -20°C until further use (Michelet et al, 2014). Using 100µl of tick homogenate for *Hyalomma* spp. and *Rh. bursa* (species known to transmit or to carry CCHF virus), the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) was used for total RNA extraction following the manufacturer's instruction (Gondard et al., 2018).

### 2.4 Detection of tick-borne pathogen DNA or RNA

#### Bacteria and parasites

Forty-one sets of primers and probes were used in this study to detect TBPs (29 bacterial and 12 parasitic species, Tab. 1) (Michelet et al, 2014; Gondard et al., 2019). The BioMark™ real-time PCR system (Fluidigm, USA) was used for high-throughput microfluidic real-time PCR amplification using 48.48 dynamic arrays (Fluidigm). These chips dispense 48 PCR mixes and 48 samples into individual wells, after which on-chip microfluidics assemble PCR reactions in individual chambers prior to thermal cycling resulting in 2,304 individual reactions (Michelet et al., 2014).

Conventional PCR using primers targeting genes or regions other than those of the BioMark™ system were used to confirm the presence of pathogenic DNA in the field samples. Amplicons were sequenced by Eurofins MWG Operon (Germany), and then assembled using BioEdit software (Ibis Biosciences, Carlsbad, USA) (Michelet et al, 2014; Gondard et al., 2019). An online BLAST (National Center for Biotechnology Information) was used to compare results with published sequences listed in GenBank sequence databases. All the target genes and primer sequences, used both for the BioMark™ real-time PCR system and individual PCR, are described in the studies of Michelet et al. (2014) and Gondard et al. (2019).

Specific detections of CCHF virus and *Theileria* spp.

CCHF virus RNA was specifically investigated in tick species known to transmit, or at least able to carry it: *Hy. marginatum*, *Hy. scupense*, and *Rh. bursa*. The presence of *Theileria* spp. DNA was also investigated by specific real-time PCR in *Hy. scupense* and *Haemaphysalis* spp. because *Hy. scupense* is an efficient vector of *T. annulata* and because *T. buffeli*, of which *Ha. punctata* is a vector, has already been reported in Corsica (ICTTD, 2000) (for primers and probes see Gondard et al., 2018 and 2019).

**Table 1. List of pathogens (and endosymbionts) detectable by the real-time PCR chip (Biomark™)**

Genus	Number of target pathogens/endosymbionts	Species
<i>Anaplasma</i>	6	<i>A. bovis</i> , <i>A. centrale</i> , <i>A. marginale</i> , <i>A. ovis</i> , <i>A. phagocytophilum</i> , <i>A. platys</i>
<i>Borrelia</i>	8	<i>B. afzelii</i> , <i>B. bissetti</i> , <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto, <i>B. garinii</i> , <i>B. lusitaniae</i> , <i>B. miyamotoi</i> , <i>B. spielmanii</i> , <i>B. valaisiana</i>
<i>Bartonella</i>	2	<i>Bar. henselae</i> , <i>Bar. quintana</i>
<i>Ehrlichia</i>	3	<i>E. canis</i> , <i>E. chaffeensis</i> , <i>E. ruminantium</i>
<i>Francisella</i>	2	<i>F. tularensis</i> , <i>Francisella</i> -like endosymbionts
<i>Neoehrlichia</i>	1	<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>
<i>Rickettsia</i>	5	<i>R. aeschlimannii</i> , <i>R. conorii</i> , <i>R. helvetica</i> , <i>R. massiliae</i> , <i>R. slovacica</i>
<i>Coxiella</i>	2	<i>Coxiella burnetii</i> , <i>Coxiella</i> -like organisms
<i>Babesia</i>	10	<i>Ba. canis</i> , <i>Ba. bigemina</i> , <i>Ba. bovis</i> , <i>Ba. Caballi</i> , <i>Ba. divergens</i> , <i>Ba. major</i> , <i>Ba. microti</i> , <i>Ba. ovis</i> , <i>Ba. venatorum</i> , <i>Ba. vogeli</i>
<i>Theileria</i>	2	<i>T. annulata</i> , <i>T. equi</i>

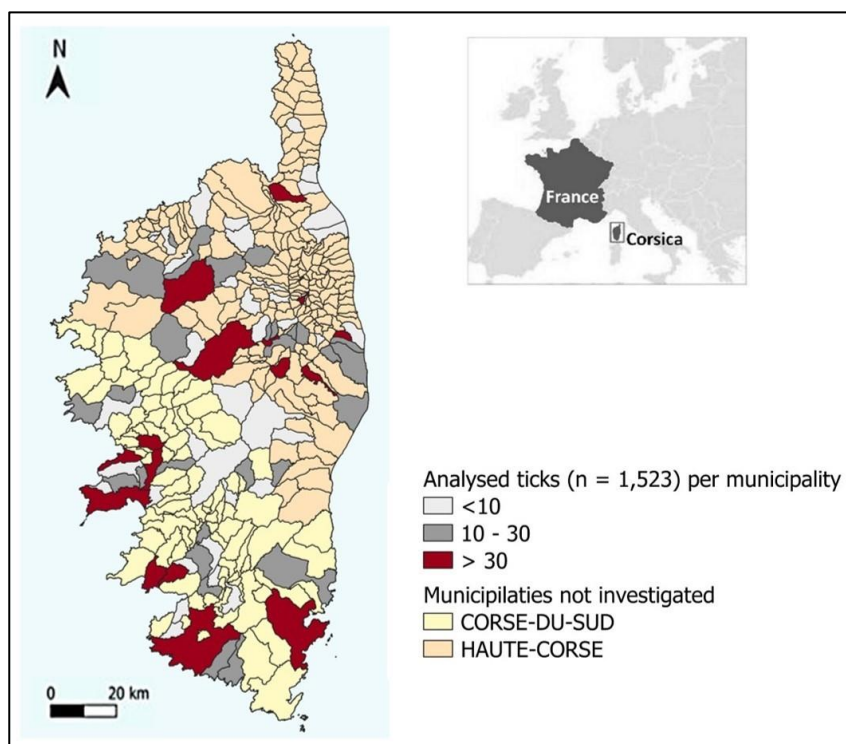
\*See Michelet et al. (2014) and Gondard et al. (2019) for target genes and primers/probe sets sequences.

## 2.5 Data analysis

The infection rate is given for all pathogens in each tick species and each host. The infection rate of individually analysed tick species is the real one detected. The infection rate of pooled tick species (cf. Methods, 2.4) means that in an infected pool there was at least one tick that gave a positive result. To assess differences in tick species infection between development stage and sex, a Kruskal-Wallis test was used. Differences were considered as statistically significant if  $p < 0.05$ . Spatial distribution (Figure 1 and Figure 2) was generated using Qgis ver. 3.4 software.

## 3. RESULTS

### 3.1 Collected ticks and pool preparation



**Figure 1. Distribution of the analysed ticks collected from animals in Corsica**

More than three thousand ticks (3,134) from nine species and five genera were collected from May 2014 to May 2015 (Grech-Angelini et al., 2016b). Almost half of them (1,523) collected from 82 municipalities (Figure 1) were analysed to detect animal and human pathogens DNA or RNA (Tab. 2). A total of 569 samples were analysed (consisting of one to five ticks): 269 adult females, 261 adult males and 39 nymphs. Nymphs of four species were found: *Rh. bursa*, *Hy. scupense*, *Rh. sanguineus* group and *Rh. (Bo.) annulatus* (Tab. 2). *Rhipicephalus bursa* ticks (4.8 ticks per pool on average), *Hy. marginatum* (4.1), *Dermacentor marginatus* (4.1), *Rh. sanguineus sensu lato* (3.7) and *Ha.*

*punctata* (2.5) were systematically pooled whereas ticks from the other four species were analysed individually (*Rh. (Bo.) annulatus*, *Ha. sulcata*, *Hy. scupense* and *Ixodes ricinus*).

**Table 2. Infection rates of individual ticks or pools of ticks collected in Corsica**

Tick species	Number of pools	Stade or sex of ticks			Total ticks analysed	Infection rate %
		Female	Male	Nymph		
<i>Rh. bursa</i>	108	42	51	15	518	43
<i>Hy. marginatum</i>	89	24	65	0	362	100
<i>Hy. scupense</i> *	135	60	56	19	135	8
<i>I. ricinus</i> *	115	79	36	0	115	70
<i>Rh. sanguineus</i> s.l.	41	22	16	3	150	24
<i>D. marginatus</i>	38	16	22	0	156	66
<i>Ha. punctata</i>	30	18	12	0	74	30
<i>Rh. (Bo.) annulatus</i> *	11	6	3	2	11	36
<i>Ha. sulcata</i> *	2	2	0	0	2	0

\* Ticks individually analysed, the infection rate is the real tick infection

### 3.2 Detection of TBPs DNA or RNA in tick species

As for each tick species, the proportion of infected pools was not significantly different between development stage and sex ( $p > 0,05$ ), the identified pathogens were presented by tick species, not separately for the stage of development and the sex of adults. Almost half of the samples (48%) were positive for at least one pathogen DNA (Tab. 2) and among them 12% were positive for two pathogens DNA or more. The most infected tick species were *Hy. marginatum* (100% of pools), *I. ricinus* (70% of the individual ticks) and *D. marginatus* (66% of pools). Pathogen DNA was found in all tick species collected in Corsica except in *Ha. sulcata*, but only two specimens were analysed (Tab. 2 and Tab. 3).

### 3.3 Pathogens identified

DNA of eleven pathogen species from six genera were identified in the ticks: *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Bartonella* spp. and *Theileria* spp.

#### ***Borrelia* spp.**

*Borrelia* spp. DNA was detected in two tick species and two different *Borrelia* were identified. DNA of *Borrelia miyamotoi* was found in *Ixodes ricinus* (2% of individual ticks) and in *Ha. punctata* (13% of the pools). A sequence was obtained from *I. ricinus* (GenBank, accession number: MK732472),

and showed 100% homology with reference sequences from *B. miyamotoi* strain isolated in Austria (AN: KP202177). DNA of *B. afzelii* was reported only in *I. ricinus* (4% of ticks). Unfortunately, the sequence could not be obtained.

**Table 3. Proportion (%) of infected pools (or ticks)**

Tick species (pools; ticks analysed)	<i>Anaplasma</i>	<i>Babesia</i>	<i>Bartonella</i>	<i>Borrelia</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Theileria</i>
<i>Rh. bursa</i> (108;518)	15	12	5	0	27	1
<i>Hy. marginatum</i> (89;362)	7	0	1	0	100	0
<i>Hy. scupense</i> (135;135)*	2	0	0	0	6	0
<i>I. ricinus</i> (115; 115)*	64	0	2	5	6	0
<i>Ha. punctata</i> (30;74)	13	0	3	13	0	0
<i>Ha. sulcata</i> (2;2)*	0	0	0	0	0	0
<i>Rh. sanguineus</i> s.l. (41;150)	12	0	2	0	17	0
<i>Rh. (B.) annulatus</i> (11;11)*	18	0	9	0	0	9
<i>D. marginatus</i> (38;156)	3	0	3	0	66	0

\*Ticks individually analysed.

### ***Rickettsia* spp.**

DNA of *Rickettsia* spp. was detected in six tick species (Tab. 3). Three species of *Rickettsia* were identified. *Rickettsia aeschlimannii* was found in *Rh. bursa* (27% of pools), *Hy. marginatum* (100% of pools), *Rh. sanguineus* s.l. (10% of pools) and *Hy. scupense* (5% of individual ticks). The four sequences obtained from *Hy. marginatum* and *Hy. scupense* presented 100% identity. One sequence was deposited in GenBank (AN: MK732478), and showed 99% homology with reference sequences from *R. aeschlimannii* strain isolated in Egypt (HQ335153). *Rickettsia slovacica* was mostly identified in *D. marginatus* (66% of pools). Three pools of *Rh. sanguineus* s.l. (7%) and one *Hy. scupense* tick (0.7%) were also positive for this bacterium. The sequence obtained from *Hy. scupense* (GenBank, AN: MK732480) showed 99% homology with reference sequences from *R. slovacica* strain isolated in United States (AN: KR559551). *Rickettsia helvetica* was detected only in *I. ricinus* (6% of ticks) but the sequence could not be obtained.

### **Anaplasma spp.**

DNA of *Anaplasma* spp. was detected in eight tick species (Tab. 3) and two species were recorded: *A. phagocytophilum* and *A. marginale*. *Anaplasma phagocytophilum* DNA was mainly found in *I. ricinus* (63% of ticks), but it was also reported in *Rh. sanguineus* s.l. (7% of pools), *Rh. bursa* (7% of pools), *Hy. marginatum* (1% of pools), *Hy. scupense* (2% of ticks), *D. marginatus* (3% of pools) and *Ha. punctata* (7%). Unfortunately, the sequence of *A. phagocytophilum* could not be obtained. *Anaplasma marginale* DNA was frequently detected in *Rh. (Bo.) annulatus* (18% of ticks) but it was also identified in *Rh. bursa* (8% of pools), *Hy. marginatum* (6% of pools), *I. ricinus* (2% of ticks), *Ha. punctata* (7% of pools) and *Rh. sanguineus* s.l. (7% of pools). The sequence obtained from *Rh. (Bo.) annulatus* (GenBank, AN: MK732471) showed 99% homology with reference sequences from *A. marginale* strain isolated in South Africa (AN: AF414873).

### **Babesia spp.**

DNA of *Babesia* spp. was detected only in *Rh. bursa* and two species were identified. *Babesia bigemina* was found in 9% of the pools of *Rh. bursa*. The two sequences obtained presented 100% identity. One sequence was deposited in GenBank (AN: MK732475) and showed 100% homology with reference sequences from *Ba. bigemina* strain from Virgin Islands (AN: EF458206). *Babesia ovis* was identified in 3% of *Rh. bursa* pools. The sequence obtained (GenBank, AN: MK732477) showed 92% homology with reference sequences from *Ba. ovis* strain isolated in Sudan (AN: AY260171). As this sequence had no more than 92% homology with *Babesia* reference sequences available in GenBank, it could be an unknown species of *Babesia*.

### **Bartonella spp.**

*Bartonella henselae* was the only species of the genus *Bartonella* detected and its DNA was identified in seven tick species (Tab. 3) but mainly in *Rh. bursa* (5% of pools), *I. ricinus* (3% of ticks), *Rh. (Bo.) annulatus* (9% of ticks) and *Ha. punctata* (3% of pools). The five sequences obtained in *Rh. bursa* and *I. ricinus* presented 100% identity. One sequence was deposited in GenBank (AN: MK732473) and showed 100% homology with reference sequences from *Bar. henselae* strain Houston-1 (AN: BX897699).

### **Theileria spp.**

*Theileria equi* DNA was reported in one pool of *Rh. bursa* (1%) and in one *Rh. (Bo.) annulatus* (9% of ticks) (Tab. 3). The sequence obtained from *Rh. bursa* (GenBank, AN: MK732476) showed 99%

homology with reference sequences from *T. equi* isolated in Brazil (AN: KJ573370). No *Theileria annulata* DNA was detected by the BioMark™ real-time PCR system in the analysed ticks. Individual PCR for *Theileria* spp. did not show the presence of any other species of *Theileria* in the tick species analysed (*Hy. scupense* and *Haemaphysalis* spp.).

### Others pathogens and micro-organisms

*Francisella tularensis* was not identified in this study but *Francisella*-like endosymbionts were detected in five tick species: *Hy. marginatum* (90% of pools), *Hy. scupense* (7% of ticks), *I. ricinus* (4% of ticks), *Rh. sanguineus* s.l. (10% of pools) and *Rh. (Bo.) annulatus* (27% of ticks). Neither DNA of *Coxiella* spp. nor DNA of *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* were identified in this study. RNA of CCHF virus was not found in *Hy. marginatum* (89 pools; 362 ticks), *Rh. bursa* (108; 518) and *Hy. scupense* (135 ticks).

For some *Rickettsiae*, the exact species could not be determined. These *Rickettsiae* were reported in seven tick species: *Rh. bursa* (8% of pools), *Hy. scupense* (2% of ticks), *I. ricinus* (9% of ticks), *Rh. sanguineus* s.l. (12% of pools), *D. marginatus* (11% of pools), *Ha. punctata* (3% of pools) and *Rh. (Bo.) annulatus* (9% of ticks). One sequence was obtained from *Rh. bursa* (GenBank, AN: MK732479) and showed 99% homology with reference sequences from *Rickettsia*-like endosymbiont strain 162 citrate synthase (gltA) gene (AN: JQ925589).

### 3.4 Presence of pathogens in ticks collected on the different hosts

Ticks were collected from different hosts: 404 samples (consisting to one to five ticks) originated from cattle, 19 from goats, 12 from sheep, 24 from horses, 22 from dogs, four from cats (Tab. 4), 41 from wild boars, 26 from mouflons, 13 from deer and two from hedgehog and birds (Tab. 5). For birds and deer, as the collected ticks were all *I. ricinus*, they were individually analysed.

*Borrelia* spp. DNA was found only in ticks from cattle; *Borrelia miyamotoi* and *Bo. afzelii* infected respectively 2% and 1% of pools from this host. *Rickettsia* spp. DNA was found in ticks from almost all collected hosts. *Rickettsia aeschlimannii* was the most important pathogen infecting ticks from domestic ruminants and horses, reported in 23% of pools from cattle, 37% from goats, 58% from sheep and 75% from horses. It was rarely found in pools from dogs (5%), wild boars (7%) and mouflons (4%). *Rickettsia slovacica* DNA was mainly found in pools from wild boars (59%) but it was also reported in pools from cattle (0.5%), horses (4%), dogs (5%) and hedgehog (one positive pool). *Rickettsia helvetica* DNA was identified only in ticks collected from cattle (2%).

*Anaplasma phagocytophilum* DNA was reported in ticks from cattle (18% of pools), goat (11% of pools), cats (25% of pools), dogs (4%), wild boars (2% of pools), deer (92% of individual ticks) and birds (two positive ticks) whereas *A. marginale* DNA was found in pools from cattle (6%) and mouflons (4%).

*Babesia bigemina* DNA was detected mainly in ticks sampled on cattle (2% of pools) but one pool of ticks from goats was also positive for this pathogen. *Babesia ovis* DNA was reported in two hosts, one pool of ticks collected on cattle and two pools from mouflons were positive.

*Bartonella henselae* DNA was reported in pools from cattle (2%), goat (11%), horses (4%) and wild boars (2%). *Theileria equi* DNA was found in one pool from cattle and one from wild boars.

**Table 4. Pathogen DNA detected in ticks collected from domestic animals**

Host	Analysed pools (ticks)	Tick species pools (or individual ticks*)	% infected pools (or ticks*)	Pathogens identified (% of infected pools or ticks*)
Cattle	404 (894)	<i>Rh. bursa</i> (54), <i>Hy. marginatum</i> (67), <i>Hy. scupense</i> (135)*, <i>I. ricinus</i> (98)*, <i>Rh. sanguineus</i> s.l. (9), <i>D. marginatus</i> (4), <i>Ha. punctata</i> (26), <i>Rh. (B.) annulatus</i> (11)*	47	<i>Anaplasma</i> spp. (22%), <i>Babesia</i> spp. (3%), <i>Bartonella</i> spp. (2%), <i>Borrelia</i> spp. (3%), <i>Rickettsia</i> spp. (25%), <i>Theileria</i> spp. (0.3%)
Goat	19 (91)	<i>Rh. bursa</i> (18), <i>Ha. punctata</i> (1)	47	<i>Anaplasma</i> spp. (11%), <i>Babesia</i> spp. (5%), <i>Bartonella</i> spp. (11%), <i>Rickettsia</i> spp. (37%),
Sheep	12 (45)	<i>Rh. bursa</i> (9) <i>Hy. marginatum</i> (2), <i>Rh. sanguineus</i> s.l. (1)	58	<i>Rickettsia</i> spp. (58%)
Dogs	22 (86)	<i>Hy. marginatum</i> (1), <i>Rh. sanguineus</i> s.l. (21)	14	<i>Anaplasma</i> spp. (4%), <i>Rickettsia</i> spp. (9%)
Horses	24 (106)	<i>Rh. bursa</i> (6), <i>Hy. marginatum</i> (16), <i>Rh. sanguineus</i> s.l. (1), <i>D. marginatus</i> (1)	83	<i>Bartonella</i> spp. (4%), <i>Rickettsia</i> spp. (79%), <i>Theileria</i> spp. (4%)
Cats	4 (6)	<i>I. ricinus</i> (1)*, <i>Rh. sanguineus</i> s.l. (3)	25	<i>Anaplasma</i> spp. (25%)



**Table 5. Pathogen DNA detected in ticks collected from wild animals**

Host	Analysed pools	Total ticks	Tick species (pools or individual ticks*)	% infected pools (or ticks*)	Pathogens (% of infected pools or ticks*)
Wild boars	41	177	<i>Rh. bursa</i> (2), <i>Hy. marginatum</i> (3), <i>I. ricinus</i> (1)*, <i>Rh. sanguineus</i> s.l. (3), <i>D. marginatus</i> (32),	66	<i>Anaplasma</i> spp. (2%), <i>Bartonella</i> spp. (2%), <i>Rickettsia</i> spp. (66%),
Mouflons	26	98	<i>Rh. bursa</i> (19), <i>Rh. sanguineus</i> s.l. (1), <i>D. marginatus</i> (1), <i>Ha. punctata</i> (3), <i>Ha. sulcata</i> (2)*	12	<i>Anaplasma</i> spp. (4%), <i>Babesia</i> spp. (8%), <i>Rickettsia</i> spp. (4%),
Deer	13	13	<i>I. ricinus</i> (13)*	92	<i>Anaplasma</i> spp. (92%*)
Hedgehogs	2	5	<i>Rh. sanguineus</i> s.l. (2)	50	<i>Rickettsia</i> spp. (50%)
Birds	2	2	<i>I. ricinus</i> (2)*	100	<i>Anaplasma</i> spp. (100%*)

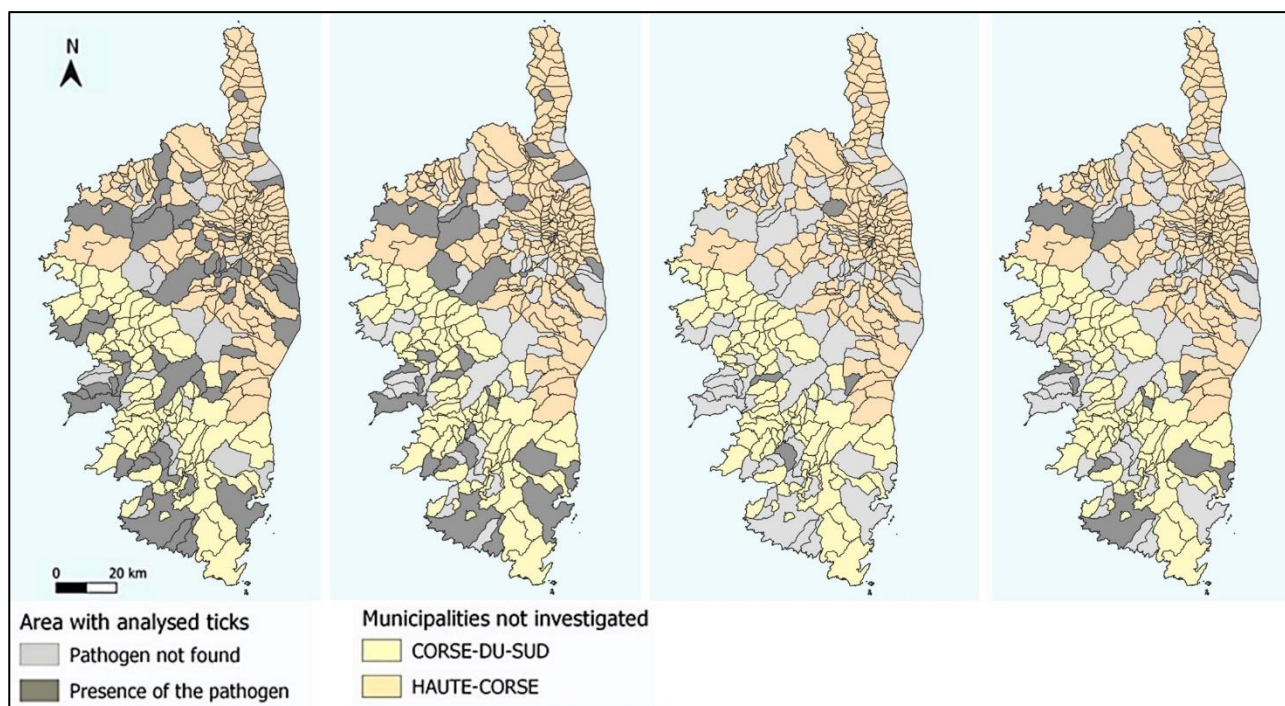
### 3.5 Geographical distribution of TBPs found in ticks

Ticks from 82 municipalities were analysed and among them, pathogen DNA was found in 68 (Fig. 2). *Rickettsia* spp. were widespread (Fig. 2a) as they were reported in more than 80% of the municipalities investigated. *Rickettsia slovacica* DNA was found in ticks collected from 13 municipalities, *R. aeschlimannii* DNA from 49, and *R. helvetica* DNA was reported from a single municipality in the centre of Corsica (Haute-Corse). *Anaplasma* spp. (Fig. 2b) were also distributed in a large part of the investigated area, found in 37% of the municipalities. *Anaplasma phagocytophilum* DNA was reported in 19 municipalities and *A. marginale* DNA in 16. *Borrelia* spp. were found in five municipalities (Fig. 2c). *Borrelia miyamotoi* DNA was identified in all these municipalities whereas *B. afzelii* DNA was reported only in one from Haute-Corse. *Babesia* spp. were identified in 10 municipalities as well in Corse-du-Sud as in Haute-Corse (Fig. 2d). *Bartonella henselae* DNA was identified in 12 municipalities whereas *T. equi* DNA was found in two municipalities near the eastern coast in Haute-Corse (results not shown).

## 4. DISCUSSION

In this study, a method using multiple primers/probe sets was implemented to perform high-throughput detection of TBPs DNA. This large-scale investigation has (i) enabled the detection of rare pathogens, (ii) generated prevalence estimations for pathogens, thus creating a comprehensive

overview of the epidemiological situation for 29 bacteria and 12 parasites present or not found in ticks from Corsica. A positive tick or a positive pool means it contains DNA (or RNA) sequences similar to those of corresponding genes of TBPs, and does not necessarily mean that the TBP is present in the tick. For the sake of commodity, the term “infection rate” is often used in this study but it means “positive rate for pathogen DNA (or RNA)”. As all collected ticks were removed from their hosts, potentially infected by pathogens, the identification of pathogen DNA in a tick suggests its presence in Corsica but the tick species is not necessarily a biological vector of this pathogen. The micro-organism or its DNA may be simply present in the ingested blood meal, the host having been infected by a real vector species of tick (Estrada-Peña et al., 2013). However, it has to be noted that in this survey, the main pathogens were most often identified in their natural vector suggesting a higher link between one pathogen and its natural vector than with other tick species. Almost 70% of the *R. aeschlimannii* were detected in *Hy. marginatum*, 86% of the *R. slovaca* in *D. marginatus*, 80% of *A. phagocytophilum* in *I. ricinus*, more than 60% of *A. marginale* in ticks from the genus *Rhipicephalus* and all the *Babesia* spp. were identified in *Rh. bursa*.



**Figure 2. Distribution of the main DNA pathogens found in Corsican ticks. a) *Rickettsia* spp., b) *Anaplasma* spp., c) *Borrelia* spp., d) *Babesia* spp.**

#### 4.1 Tick-borne pathogens reported for the first time in Corsican ticks

In almost half of the pools, DNA of at least one pathogen was reported and 11 species of pathogens from six genera were identified. Among them, seven were reported for first time in Corsican ticks: *B. afzelii*, *B. miyamotoi*, *R. helvetica*, *A. phagocytophilum*, *Ba. ovis*, *Ba. bigemina* and *Bar. henselae*.

*Borrelia afzelii* DNA, found in 4% of the Corsican *I. ricinus*, belongs to the *Borrelia burgdorferi* s.l. group, the causative agents of Lyme disease, the most important zoonotic infection in Europe. The presence of *B. burgdorferi* s.l. is linked to its natural vectors, ticks of the genus *Ixodes*, mainly *I. ricinus* in the Mediterranean area. This pathogenic agent was believed to be rare or even absent from Corsica, but a few cases of Lyme disease have been reported in recent years by the French National Centre of *Borrelia* and Santé Publique France (Vandenesch et al., 2014). *Borrelia burgdorferi* s.l. was reported in Continental France, continental Italy, Spain (Hubálek *et al.*, 1997) and also in northern Africa (Tunisia, Algeria and Morocco; Benredjem et al., 2014) but has not been found in ticks from Sardinia and Sicily, two Mediterranean islands with a drier climate than Corsica. Recently, it was reported in *I. ricinus* collected from rats in Corsica (Cicculli et al., 2019c), but without determining the exact species. The identification of *B. afzelii* DNA in ticks confirmed the exposure of Corsican population to Lyme disease.

DNA of *Borrelia miyamotoi*, first identified in 1995 in ticks from Japan (Fukunaga et al., 1995), was also detected for the first time in Corsica. It belongs to the relapsing fever group of *Borrelia* and its natural vectors are *Ixodes* ticks. *Borrelia miyamotoi* is currently considered as an emerging pathogen affecting humans. Relapsing fever borreliosis is characterized by influenza-like illness and one or more relapse episodes of bacteraemia and fever (Platonov *et al.*, 2011). *Borrelia miyamotoi* was reported in 3% of ticks from continental France (Cosson et al., 2014) and 0.7% of northern Italy (Ravagean *et al.*, 2018). Although no human case of *B. miyamotoi* was identified in Corsica and in the Mediterranean area, the bacterium has been found in humans throughout Europe (Siński et al., 2016).

*Rickettsia helvetica* DNA was only found in *I. ricinus* which is a natural vector of this bacterium. It was initially reported in 1979 in Switzerland from *I. ricinus* (Beati et al., 1993) and now the species has been identified in ticks from many countries over the world. It is especially well spread in the Mediterranean area including continental France (Parola *et al.*, 1998), Italy (Beninati *et al.*, 2002), Spain (Fernández-Soto *et al.*, 2004), Croatia (Dobec *et al.*, 2009), Algeria (Kernif *et al.*, 2012) and Tunisia (Sfar *et al.*, 2008). Human cases of rickettsiosis caused by *R. helvetica* have been reported in Italy and continental France (Portillo *et al.*, 2015). *Rickettsia helvetica* is a member of the Spotted

Fever Group (SFG) and reportedly causes a self-limiting illness associated with headache and myalgias (Parola et al., 2013).

*Anaplasma phagocytophilum* DNA was mostly found in *I. ricinus*, an important vector of this zoonotic agent responsible for human granulocytic anaplasmosis (HGA), tick-borne fever (or pasture fever) of ruminants and equine anaplasmosis. In Corsica, this pathogen was relatively unknown, and was previously only detected in a single sample of bovine blood (ICTTD, 2000). There is no HGA case reported in Corsica, but in continental France the first one was identified in 2003 and other were infrequently reported (Edouard et al., 2012). Human cases occurred also in continental Italy (Ruscio and Cinco, 2003). A recent study showed that, in the French Basque Country, 22.4% of collected ticks contained *A. phagocytophilum* DNA (Dahmani et al., 2017). It was also reported from Sardinia (Alberti et al., 2005), Sicily (Torina et al., 2010) and Northern Africa (Dahmani et al., 2015).

*Babesia* spp. are protozoan blood parasites with more than 100 described species. In this study, *Ba. bigemina* and *Ba. ovis* DNA were found for the first time in ticks collected in Corsica. *Babesia bigemina* is a causal agent for bovine babesiosis and it occurs in most areas of the world (Uilenberg, 2006). *Babesia ovis* is a causative agent of ovine babesiosis, with strains varying in pathogenicity and is also widespread throughout the world (Uilenberg, 2006).

Ticks (especially *I. ricinus*) are highly suspected to be among the vectors of *Bartonella* species. *Bartonella henselae* DNA was reported for the first time in ticks from Corsica and was found in seven tick species. It causes an infection commonly encountered in cats (cat scratch disease) and potentially dogs and humans worldwide (Álvarez-Fernández et al., 2018). In Sardinia, it was found in at least 0.2% of the collected ticks (Chisu et al., 2018).

#### 4.2 Other TBP identified in Corsica

*Rickettsia* species were the pathogens with the highest infection rate found in the Corsican pools. They are known as zoonotic agents and, if their pathogenicity and the reservoir role for animals are discussed, most species of this genus cause important human diseases (Davoust et al., 2010). The real impact of rickettsial diseases in Corsica is unknown, but some cases of Mediterranean spotted fever (MSF, caused by *R. conorii*) are reported by local medical doctors and the French National Reference Centre (CNR) for *Rickettsia* species. A former seroepidemiological study showed in 1985 that 4.8% of people were exposed to these pathogens in Corse-du-Sud (Raoult et al., 1985). *Rickettsia aeschlimannii* DNA was the most frequently detected, infecting 100% of *Hy. Marginatum* pools, one of its main natural vectors (Matsumoto et al, 2004), confirming the important presence of this bacterium in Corsica, already reported in 74% of *Hy. marginatum* collected by Matsumoto et al.

(2004). *Rickettsia aeschlimannii* was first isolated from *Hy. marginatum* in 1997 from Morocco (Beati *et al.*, 1997) and is now reported in the whole Mediterranean area (Parola *et al.*, 2013). *Rickettsia aeschlimannii* infections in humans cause spotted fever; this has previously been confirmed in northern Africa and South Africa, and in 2010 a first case occurred in Southern Europe, in a Greek patient (Germanakis *et al.*, 2013). Given the important infestation rate of this pathogen in Corsican ticks, human exposure to *R. aeschlimannii* infection is high and human cases of tick-borne spotted fever acquired in Corsica could often be due to *R. aeschlimannii*.

*Rickettsia slovaca* DNA was identified mainly in *D. marginatus* which is an important natural vector of this bacterium. This report confirmed the results of Selmi *et al.* (2017) who identified *R. slovaca* in *D. marginatus* collected on Corsican vegetation. *Rickettsia slovaca* was first isolated in 1968 in a *D. marginatus* collected in Slovakia and is largely spread in the Mediterranean area. It was found in Sardinia and continental Italy (Chisu *et al.*, 2016 and Selmi *et al.*, 2017), continental France (Michelet *et al.*, 2017), and Spain (Fernández-Soto *et al.*, 2006). The first proven human case of *R. slovaca* infection was reported in 1997 in continental France and this micro-organism is now known as a cause of disease in various European Mediterranean countries (de Sousa *et al.*, 2013). It is associated with TIBOLA (tickborne lymphadenopathy) syndrome, characterized by lymph node enlargement and scalp eschars (Parola *et al.*, 2013). So far, the TIBOLA syndrome has not been reported in Corsica.

This study did not allow to identify DNA of other *Rickettsia* spp. previously reported in Corsica as *Rickettsia felis*, a SFG *Rickettsia*, found in a flea (*Archaeopsylla erinacei*) collected from a fox (Marié *et al.*, 2012). Matsumoto *et al.* (2005) reported the species *R. massiliae* in *Rh. sanguineus* s.l. collected on dogs in Corse-du-Sud and a recent study identified *R. africae* DNA in an *Amblyomma variegatum*, tick species not established in Corsica but whose one adult was collected, certainly following introduction of a nymph by migrating bird (Cicculli *et al.*, 2019a). DNA of another species of *Rickettsia*, Candidatus *Ri. barbariae*, was recently detected in ticks collected from Corsican cattle (Cicculli *et al.*, 2019c), but its pathogenicity remains unknown.

This study also showed that *Anaplasma* species are widespread in Corsican ticks. *Anaplasma marginale* DNA was found in ticks from the genus *Rhipicephalus* which are its natural vectors but also in *Hy. marginatum*, *I. ricinus* and *Ha. punctata*. *Anaplasma marginale* DNA was formerly reported in blood from Corsican cattle (ICTTD, 2000) and two recent studies detected it in *Rh. bursa* collected on cattle confirming its presence on the island (Dahmani *et al.*, 2017 and Cicculli *et al.*, 2019c). *Anaplasma marginale* is distributed worldwide in tropical and subtropical regions. It is the causative agent of erythrocytic bovine anaplasmosis that can affect various species of domestic and

wild ruminants (Aubry and Geale, 2011). From islands near to Corsica, it was identified in Sardinia (Zobba et al, 2014) and Sicily (Torina et., 2010), but there is no report of its presence in continental France. *Anaplasma ovis* DNA, not found in this study, was recently reported in blood (52%) and ticks (*Rh. bursa*) collected from Corsican goats (Cabezas-Cruz et al., 2019). *Anaplasma bovis* and *A. omatjenne* were formerly reported in cattle blood (ICTTD, 2000) and other potential new species of *Anaplasma* were described from Corsican sheep blood (Dahmani et al., 2017).

Concerning *Babesia* species, *B. bovis*, not found in this study, was reported earlier from Corsican cattle blood (ICTTD, 2000). *Babesia bovis* occurs in most subtropical and tropical regions of the world (Uilenberg, 2006), and two of its proven vectors occur on Corsica (*Rh. bursa* and *Rh. (B.) annulatus*). Bovine babesiosis affecting cattle in Corsica is probably due either to *B. bigemina* or to *B. bovis*.

No species from the genus *Ehrlichia* were found in this study although *E. minacensis*, a species unknown so far from the Mediterranean area, has been detected recently in a *Hy. marginatum* (Cicculli et al., 2019b).

*Theileria equi* DNA was identified in two pools. It is a causative agent of equine piroplasmosis, that can be also due to *Babesia caballi* (not detected in this study). As the disease is largely spread in the island, it is well known by local veterinary practitioners and horse owners. *Theileria annulata* DNA has not been reported so far in the Corsican tick population. The high occurrence in Corsica of *Hy. scupense*, one of its main natural vectors, highlights however the risk of transmission of *T. annulata* to the local cattle population (Grech-Angelini et al., 2016a). *Theileria buffeli*, a benign cattle pathogen, already detected in Corsica (ICTTD, 2000), was not found in this study.

A total of 332 pools (1,015 ticks) of three species (*Hy. marginatum*, *Hy. scupense* and *Rh. bursa*) were tested for CCHF virus RNA and all were negative. The CCHF virus is mainly transmitted by ticks of the genus *Hyalomma* and *Hy. marginatum* is its main natural vector in Europe. Crimean-Congo haemorrhagic fever is now the most worldwide tick-borne viral infection of humans, and it can lead to haemorrhagic manifestations and considerable mortality. It is also an important emerging zoonotic disease in Turkey and south-eastern Europe (Dreshaj et al., 2016). Moreover, in 2016, the first autochthonous human cases have been reported in Spain showing that the disease can occur in western Europe (Negredo et al., 2017). Recently, CCHF RNA has been reported in a nymph of *Hy. rufipes* on a migrating bird on the small Italian island of Ventotene, identifying migrating birds as possible introduction pathway for CCHF virus into western Europe (Mancuso et al., 2019). *Hyalomma rufipes*, an important natural vector of CCHF virus in sub-Saharan Africa, was ever found on migrating birds in Corsica (Pérez-Eid, 2007). It is possible that CCHF virus was not detected in

this study due to an insufficient sample size of analysed ticks or a deterioration of the genetic material due to the storage method. As CCHF virus is an RNA virus it would certainly have been better to store ticks alive at -80°C to detect it, but in this study different people (hunters, breeders, staff of PNRC and ONCF) from different locations have collected ticks, preventing the storage of alive ticks at -80°C. However, as indicated above, CCHF RNA was detected recently in one *Hyalomma* tick collected on a migratory bird in Italy, and all the collected ticks of this study was conserved in 70° ethanol at -20°C (Mancuso *et al.*, 2019) showing there is apparently no difficulties to detect CCHF RNA with this storage method. Because of the high frequency of *Hy. marginatum* in Corsica (the second most abundant tick species collected on animal hosts, Grech-Angelini *et al.*, 2016b), it would be necessary to closely monitor the possible emergence of CCHF virus. More ticks, mainly *Hy. marginatum*, should be analysed and animal sera should be collected to test the presence of antibodies against CCHF virus in domestic ruminants which are known to be asymptomatic reservoir of CCHF virus (Bente *et al.*, 2013).

#### **4.3 Potential Corsican animal reservoirs for zoonotic pathogens and human exposure**

These data concerning the presence of TBPs DNA on Corsica Island will be useful for studying possible future emerging diseases and the role of animals as reservoirs of TBPs. This study demonstrated the presence of expected pathogens DNA, as well as unexpected pathogens. Among the eleven pathogens reported in ticks collected from animal hosts, seven are zoonotic: *B. miyamotoi*, *B. afzelii*, *R. aeschlimannii*, *R. slovaca*, *R. helvetica*, *A. phagocytophilum* and *Bar. henselae*. Most of them are asymptomatic, or their effects on animal health are unknown. *Rickettsia aeschlimannii* DNA was reported in a high proportion in ticks from domestic ruminants and horses whereas *R. slovaca* DNA was mostly identified in ticks from wild boars and *R. helvetica* DNA only in ticks from cattle. All positive pools for *Borrelia* spp. consisted of ticks collected from cattle. These domestic or wild animals could be specific reservoirs for the respective cited pathogens. *Anaplasma phagocytophilum* was mainly found in *I. ricinus* on various hosts including migrating birds that showed the potential to import pathogens on Corsica by this pathway. Even if no human cases of these pathogens have been diagnosed in Corsica to date, the important interactions that occur between domestic animals, wild fauna and humans highlight the risk for the human population. Some of these zoonotic pathogens could circulate undetected in the Corsican human population. Such studies may help avert that more efforts should be devoted to the surveillance of the animal reservoirs and the human exposure. Pathogen DNA is not enough to be able to confirm the presence and the circulation of those pathogens in Corsica. Nevertheless, this first step will allow to perform in-depth research on those interesting pathogens to better characterize their epidemiological cycle. Indeed, serological survey in domestic

and wild animals and humans need to be carry out, as well as trying to isolate those pathogens from infected ticks and/or infected animals to be able to conclude regarding the risk for human and animal health.

## 5. CONCLUSION

In this study, 569 tick pools (1,523 ticks) collected from animals on Corsica were analysed to investigate the presence of 27 bacteria and 12 parasites by a high throughput real-time microfluidic PCR system. The CCHF virus and *Theileria* spp. were specifically investigated in their respective potential vectors. DNA of eleven pathogens from six genera was identified in Corsican ticks and among them seven were reported for first time in Corsican ticks: *B. miyamotoi*, *B. afzelii*, *R. helvetica*, *A. phagocytophilum*, *Bar. henselae*, *Ba. bigemina* and *Ba. ovis*. These results also confirmed the presence of four other TBPs in Corsica: *R. aeschlimannii*, *R. slovaca*, *A. marginale*, and *T. equi*. Many of the pathogens found in this survey, as well as among those found by others, are mostly asymptomatic or benign for animals, highlighting domestic and wild Corsican animals are probably an important epidemiological reservoir increasing the human exposure to these zoonotic pathogens. These findings highlight the importance to look deeper into TBPs epidemiological situation in Corsica in the near future.

## ETHIC STATEMENT

The authors obtained the agreement of all the owners to collect ticks from their domestic animals. The cattle inspected were slaughtered for the human consumption and the wild boars collected were legally hunted during the hunting season. The collected deer, mouflons and birds were captured by PNR and ONCF and they were all released. This study was approved by the veterinary Institutes (DDCSPP of Corse-du-Sud and Haute-Corse) and the French Ministry of Agriculture, General Directorate for Food (DGAI).

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the staff of the slaughterhouse of Ponte-Leccia, Cuttoli and Porto-Vecchio for their help in collecting ticks from cattle and to ONCFS, PNR, hunters (especially Oscar Maestrini, INRA, Corte, France) and practicing veterinarians for collecting ticks respectively from mouflons, deer (and birds), wild boars and domestic carnivores.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.



## REFERENCES

- Alberti, A., Addis, M. F., Sparagano, O., Zobba, R., Chessa, B., Cubeddu, T., ... & Pittau, M. (2005). *Anaplasma phagocytophilum*, Sardinia, Italy. *Emerging infectious diseases*, 11(8), 1322. <https://dx.doi.org/10.3201%2Fcid1108.050085>
- Álvarez-Fernández, A., Breitschwerdt, E. B., & Solano-Gallego, L. (2018). *Bartonella* infections in cats and dogs including zoonotic aspects. *Parasites & vectors*, 11(1), 624. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3152-6>
- Aubry, P., & Geale, D. W. (2011). A review of bovine anaplasmosis. *Transboundary and emerging diseases*, 58(1), 1-30. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>
- Beati, L., Meskini, M., Thiers, B., & Raoult, D. (1997). *Rickettsia aeschlimannii* sp. nov., a new spotted fever group rickettsia associated with *Hyalomma marginatum* ticks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 548-554. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-548>
- 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(3), 521-526. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-3-521>
- Beninati, T., Lo, N., Noda, H., Esposito, F., Rizzoli, A., Favia, G., & Genchi, C. (2002). First detection of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* from Italy. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 983. <https://dx.doi.org/10.3201%2Fcid0809.020060>
- Benredjem, W., Leulmi, H., Bitam, I., Raoult, D., & Parola, P. (2014). *Borrelia garinii* and *Rickettsia monacensis* in *Ixodes ricinus* ticks, Algeria. *Emerging infectious diseases*, 20(10), 1776. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140265>
- Bente, D.A., Forrester, N.L., Watts, D.M., McAuley, A.J., Whitehouse, C.A., Bray M. (2013). Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Research*, 100: 159–89. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.006>
- Cabezas-Cruz, A., Gallois, M., Fontugne, M., Allain, E., Denoual, M., Moutailler, S., ... & Agoulon, A. (2019). Epidemiology and genetic diversity of *Anaplasma ovis* in goats in Corsica, France. *Parasites & Vectors*, 12(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3269-7>

Chisu, V., Foxi, C., Mannu, R., Satta, G., & Masala, G. (2018). A five-year survey of tick species and identification of tick-borne bacteria in Sardinia, Italy. *Ticks and tick-borne diseases*, 9(3), 678-681. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.02.008>

Chisu, V., Leulmi, H., Masala, G., Piredda, M., Foxi, C., & Parola, P. (2017). Detection of *Rickettsia hoogstraalii*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia aeschlimannii* in ticks from Sardinia, Italy. *Ticks and tick-borne diseases*, 8(3), 347-352. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.12.007>

Cicculli, V., de Lamballerie, X., Charrel, R., & Charrel, R. (2019a). First molecular detection of *Rickettsia africae* in a tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*, collected in Corsica, France. *Exp Appl Acarol.* <https://doi.org/10.1007/s10493-018-00336-2>

Cicculli, V., Masse, S., Capai, L., de Lamballerie, X., Charrel, R., Falchi, A. (2019b). First detection of *Ehrlichia minasensis* in *Hyalomma marginatum* ticks collected from cattle in Corsica, France. *Vet Med Sci.* <https://doi.org/10.1002/vms3.140>

Cicculli, V., Capai, L., Quilichini, Y., Masse, S., Fernández-Alvarez, A., Minodier, L., ... & Falchi, A. (2019c). Molecular investigation of tick-borne pathogens in ixodid ticks infesting domestic animals (cattle and sheep) and small rodents (black rats) of Corsica, France. *Ticks and tick-borne diseases*, 10, 606-613. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.007>

Cosson, J. F., Michelet, L., Chotte, J., Le Naour, E., Cote, M., Devillers, E., ... & Moutailler, S. (2014).. *Parasites & vectors*, 7(1), 233. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-233>

Dahmani, M., Davoust, B., Benterki, M. S., Fenollar, F., Raoult, D., & Mediannikov, O. (2015). Development of a new PCR-based assay to detect *Anaplasmataceae* and the first report of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma platys* in cattle from Algeria. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 39, 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.02.002>

Dahmani, M., Davoust, B., Rousseau, F., Raoult, D., Fenollar, F., & Mediannikov, O. (2017). Natural *Anaplasmataceae* infection in *Rhipicephalus bursa* ticks collected from sheep in the French Basque Country. *Ticks and tick-borne diseases*, 8(1), 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.009>

Dahmani, M., Davoust, B., Tahir, D., Raoult, D., Fenollar, F., & Mediannikov, O. (2017). Molecular investigation and phylogeny of *Anaplasmataceae* species infecting domestic animals and ticks in Corsica, France. *Parasites & Vectors*, 10(1), 302. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2233-2>

Davoust, B., Mediannikov, O., Marié, J. L., Socolovschi, C., Parola, P., & Raoult, D. (2010). Les animaux vertébrés sont-ils réservoirs de *Rickettsia*? *Bull. Acad. Vét. France*, Tome 163 - N°4/5. <https://doi.org/10.4267/2042/48177>

de Sousa, R., Pereira, B. I., Nazareth, C., Cabral, S., Ventura, C., Crespo, P., ... & da Cunha, S. (2013). *Emerging infectious diseases*, 19(10), 1627. <https://dx.doi.org/10.3201%2Feid1910.130376>

Dobec, M., Golubic, D., Punda-Polic, V., Kaeppli, F., & Sievers, M. (2009). *Rickettsia helvetica* in *Dermacentor reticulatus* ticks. *Emerging infectious diseases*, 15(1), 98-100. <https://dx.doi.org/10.3201%2Feid1501.080815>

Dreshaj, S., Ahmeti, S., Ramadani, N., Dreshaj, G., Humolli, I., & Dedushaj, I. (2016). Current situation of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Southeastern Europe and neighboring countries: a public health risk for the European Union? *Travel medicine and infectious disease*, 14(2), 81-91. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.03.012>

Dwuznik D., Mierzejewska EJ., Drabik P., Kloch A., Alzarraf M., Behnke JM., Bajer A. (2019). The role of juvenile *Dermacentor reticulatus* ticks as vectors of microorganisms and the problem of “meal contamination”. *Experimental and Applied Acarology*. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00380-6>.

ECDC (2013). Epidemiological situation of rickettsioses in EU/EFTA countries. Technical report. [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu).

Edouard, S., Koebel, C., Goehringer, F., Socolovschi, C., Jaulhac, B., Raoult, D., & Brouqui, P. (2012). Emergence of human granulocytic anaplasmosis in France. *Ticks and tick-borne diseases*, 3(5-6), 403-405. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.002>

Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R., 2004 Ticks of domestic animals in the Mediterranean Region: a guide to identification of species. Zaragoza: University of Zaragoza.131.

Estrada-Peña, A., Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., & Nijhoff, A. M. (2013). Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens—methodological principles and caveats. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 29. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00029>

Fernández-Soto, P., Pérez-Sánchez, R., Encinas-Grandes, A., & Sanz, R. Á. (2006). *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor* ticks found on humans in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(2), 129. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0087-1>

Fernández-Soto, P., Pérez-Sánchez, R., Encinas-Grandes, A., & Sanz, R. Á. (2004). Detection and identification of *Rickettsia helvetica* and *Rickettsia* sp. IRS3/IRS4 in *Ixodes ricinus* ticks found on humans in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 23(8), 648-649. <https://doi.org/10.1007/s10096-004-1184-7>

Fukunaga, M., Takahashi, Y., Tsuruta, Y., Matsushita, O., Ralph, D., McClelland, M., & Nakao, M. (1995). Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(4), 804-810. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-804>

Germanakis, A., Chochlakis, D., Angelakis, E., Tselentis, Y., & Psaroulaki, A. (2013). *Rickettsia aeschlimannii* infection in a man, Greece. *Emerging infectious diseases*, 19(7), 1176-7. <https://dx.doi.org/10.3201%2F1907.130232>

Gondard, M., Michelet, L., Nisavanh, A., Devillers, E., Delannoy, S., Fach, P., ... & Moutailler, S. (2018). Prevalence of tick-borne viruses in *Ixodes ricinus* assessed by high-throughput real-time PCR. *Pathogens and disease*, 76(8). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty083>

Gondard, M., Delannoy, S., Pinarello, V., Aprelon, R., Devillers, E., Galon, C., ... & Moutailler, S. (2019). Upscaling surveillance of tick-borne pathogens in the French Caribbean islands. *bioRxiv*, 532457.

Grech-Angelini, S., Stachurski, F., Lancelot, R., Boissier, J., Allienne, J. F., Gharbi, M., & Uilenberg, G. (2016a). First report of the tick *Hyalomma scupense* (natural vector of bovine tropical theileriosis) on the French Mediterranean island of Corsica. *Veterinary parasitology*, 216, 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.015>

Grech-Angelini, S., Stachurski, F., Lancelot, R., Boissier, J., Allienne, J. F., Marco, S., ... & Uilenberg, G. (2016b). Ticks (Acari: Ixodidae) infesting cattle and some other domestic and wild hosts on the French Mediterranean island of Corsica. *Parasites & Vectors*, 9(1), 582. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1876-8>

Habálek, Z., & Halouzka, J. (1997). Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *European journal of epidemiology*, 13(8), 951-957. <https://doi.org/10.1023/A:1007426304900>

Hoffman, T., Lindeborg, M., Barboutis, C., Erciyas-Yavuz, K., Evander, M., Fransson, T., ... Salaneck, E. (2018). Alkhurma Hemorrhagic Fever Virus RNA in *Hyalomma rufipes* ticks Infesting

Migratory Birds, Europe and Asia Minor. *Emerging infectious diseases*, 24(5), 879-882. <https://dx.doi.org/10.3201%2Feid2405.171369>

ICTTD (2000). Tick-borne infections of cattle on Corsica. Newsletter n° 14:13 (ISSN: 1385-3422).

Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology*. 2004; 129 (Supplement): S3–14. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>

Kernif, T., Messaoudene, D., Ouahioune, S., Parola, P., Raoult, D., & Bitam, I. (2012). Spotted fever group rickettsiae identified in *Dermacentor marginatus* and *Ixodes ricinus* ticks in Algeria. *Ticks and tick-borne diseases*, 3(5-6), 380-381. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.012>

Mancuso, E., Toma, L., Polci, A., d'Alessio, S.G., Di Luca, M., ..., Monaco, F. (2019). Crimean-Congo haemorrhagic fever virus genome in tick from migratory bird, Italy. *Emerging infectious diseases*, 25: 1418-1420. <https://doi.org/10.3201/eid2507.181345>

Marié, J. L., Davoust, B., Socolovschi, C., Mediannikov, O., Roqueplo, C., Beaucournu, J. C., ..., Parola, P. (2012). Rickettsiae in arthropods collected from red foxes (*Vulpes vulpes*) in France. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 35(1), 59-62. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.10.001>

Matsumoto, K., Parola, P., Brouqui, P., Raoult, D. (2004). *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma* ticks from Corsica. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23: 732-734. <https://doi.org/10.1007/s10096-004-1190-9>

Matsumoto, K., Ogawa, M., Brouqui, P., Raoult, D., & Parola, P. (2005). Transmission of *Rickettsia massiliae* in the tick, *Rhipicephalus turanicus*. *Medical and veterinary entomology*, 19: 263-270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2005.00569.x>

Michelet, L., Delannoy, S., Devillers, E., Umhang, G., Aspan, A., Juremalm, M., ... Klitgaard, K. (2014). High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 103. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00103>

Negredo, A., de la Calle-Prieto, F., Palencia-Herrejón, E., Mora-Rillo, M., Astray-Mochales, J., Sánchez-Seco, M. P., ... & Keough-Delgado, E. (2017). Autochthonous Crimean–Congo Hemorrhagic Fever in Spain. *New England Journal of Medicine*, 377(2). <https://doi.org/154-161.10.1056/NEJMoa1615162>

- Nicholson WL, Sonenshine DE, Lane RS, Uilenberg G. 2009. Chapter 26. Ticks (Ixodida). In: Mullen GR, Durden LA, editors. Medical and veterinary entomology. Second ed. Elsevier; Academic Press; pp. 493–542.
- Parola P, Raoult D. Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis*. 2001; 32:897–928. <https://doi.org/10.1086/319347>
- Parola, P., Beati, L., Cambon, M., & Raoult, D. (1998). First isolation of *Rickettsia helvetica* from *Ixodes ricinus* ticks in France. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17(2), 95-100. <https://doi.org/10.1007/BF01682163>
- Parola, P., Paddock, C. D., Socolovschi, C., Labruna, M. B., Mediannikov, O., Kernif, T., ... & Raoult, D. (2013). Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clinical microbiology reviews*, 26(4), 657-702. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-13>
- Parola, P., Rovey, C., Rolain, J. M., Brouqui, P., Davoust, B., & Raoult, D. (2009). *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne rickettsioses. *Emerging infectious diseases*, 15(7), 1105. <https://dx.doi.org/10.3201%2F1507.081449>
- Pérez-Eid, C. (2007). *Les tiques: identification, biologie, importance médicale et vétérinaire*. Paris: TEC&DOC, Lavoisier, coll. Monographies de microbiologie.
- Platonov, A. E., Karan, L. S., Kolyasnikova, N. M., Makhneva, N. A., Toporkova, M. G., Maleev, V. V., ... & Krause, P. J. (2011). Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerging infectious diseases*, 17(10), 1816. <https://dx.doi.org/10.3201%2F1710.101474>
- Portillo, A., Santibáñez, S., García-Álvarez, L., Palomar, A. M., & Oteo, J. A. (2015). Rickettsioses in Europe. *Microbes and infection*, 17(11-12), 834-838. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.09.009>
- Raoult, D., Fournier, P. E., Abboud, P., & Caron, F. (2002). First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection. *Emerging infectious diseases*, 8(7), 748. <https://dx.doi.org/10.3201%2F0807.010480>
- Raoult, D., Nicolas, D., De Micco, P. H., Gallais, H., & Casanova, P. (1985). Aspects épidémiologiques de la fièvre boutonneuse méditerranéenne en Corse du Sud. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et Filiales*, 78, 446-451.

Ravagnan, S., Tomassone, L., Montarsi, F., Krawczyk, A. I., Mastrorilli, E., Sprong, H., ... & Capelli, G. (2018). First detection of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes ricinus* ticks from northern Italy. *Parasites & vectors*, 11(1), 130. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2713-z>

Rebaudet S., Brouqui P., 2008 – Ehrlichioses et anaplasmoses humaines. *EMC - Maladies Infectieuses* : 1-20.

Ruscio, M., & Cinco, M. (2003). Human granulocytic ehrlichiosis in Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990(1), 350-352. [https://doi.org/10.1016/S1433-1128\(04\)80006-8](https://doi.org/10.1016/S1433-1128(04)80006-8)

Selmi, M., Ballardini, M., Salvato, L., & Ricci, E. (2017).. *Experimental and Applied Acarology*, 72(1), 79-91. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0132-z>

Sfar, N., M'ghirbi, Y., Letaief, A., Parola, P., Bouattour, A., & Raoult, D. (2008). First report of *Rickettsia monacensis* and *Rickettsia helvetica* from Tunisia. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 102(6), 561-564. <https://doi.org/10.1179/136485908X311795>

Siński, E., Welc-Falęciak, R., & Zajkowska, J. (2016). *Borrelia miyamotoi*: A human tick-borne relapsing fever spirochete in Europe and its potential impact on public health. *Advances in medical sciences*, 61(2), 255-260. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2016.03.001>

Torina, A., Galindo, R. C., Vicente, J., Di Marco, V., Russo, M., Aronica, V., ... & Kocan, K. M. (2010). Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* and *A. ovis* infection in a naturally infected sheep flock with poor health condition. *Tropical animal health and production*, 42(7), 1327-1331. <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9580-8>

Uilenberg, G. (2006). *Babesia*—a historical overview. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>

Uilenberg G., Gray J., Kahl O. (2018) Research on Piroplasmidora and other tick-borne agents: Are we going the right way? *Ticks and Tick-Borne Diseases* 9: 860-863. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.005>

Vandenesch, A., Turbelin, C., Couturier, E., Arena, C., Jaulhac, B., Ferquel, E., Choumet, V., Saugeon, C., Coffinieres, E., Blanchon, T., Vaillant, V., Hanslik, T. (2014). Incidence and hospitalisation rates of Lyme borreliosis, France, 2004 to 2012. *Euro Surveill.* 19 20883 [pii].

Zobba, R., Anfossi, A. G., Parpaglia, M. L. P., Dore, G. M., Chessa, B., Spezzigu, A., ... & Alberti, A. (2014). Molecular investigation and phylogeny of *Anaplasma* spp. in Mediterranean ruminants

reveal the presence of neutrophil-tropic strains closely related to *A. platys*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(1), 271-280. <https://doi.org/10.1128/AEM.03129-13>





## 6. Etude spécifique du risque lié au virus CCHF en Corse

Les premiers résultats obtenus dans cette étude ont montré que l'ARN du virus CCHF, recherché dans plus de 1 000 tiques ( $n = 1\ 012$ ) testées individuellement ou par pools, n'avait pas été identifié. Trois espèces de tiques ont été analysées : *Hy. marginatum* (89 pools ; 362 tiques), un des principaux vecteurs du virus CCHF, *Hy. scupense* (135 tiques) dont le rôle vecteur est supposé dans différentes études mais reste incertain (Estrada-Peña et al., 2012a ; Chumakov et al., 1968), mais également *Rh. bursa* (108 ; 518) dans laquelle le virus a été détecté dans plusieurs régions du pourtour méditerranéen sans que son rôle dans la transmission du virus ne soit prouvé (Papadopoulos et al., 1978, Yesilbag et al., 2013). La prévalence du virus étant très faible chez les tiques, même en zone endémique de CCHF, il est possible que l'effort d'échantillonnage n'ait pas été suffisant, et ces premiers résultats négatifs ne prouvent pas l'absence de circulation virale en Corse. L'ARN du virus, réputé sensible, aurait pu également être endommagé lors du stockage des tiques dans l'alcool à 70° à la température de -20°C. En effet, la méthode recommandée pour conserver au mieux un virus à ARN est la congélation des tiques vivantes à -80°C. Le dispositif de collecte mis en place dans cette étude avec l'intervention de nombreux acteurs (ONCFS, chasseurs, PNRC, vétérinaires, éleveurs) n'a pas permis un tel stockage à -80°C. Cependant la détection récente de l'ARN du virus CCHF dans une tique du genre *Hyalomma* collectée chez un oiseau migrateur sur la petite île italienne de Ventotene (Mancuso et al., 2019), alors que toutes les tiques de cette étude étaient conservées dans de l'alcool à 70° à -20°C, montre qu'il n'y a apparemment aucune difficulté à détecter l'ARN du virus CCHF en utilisant cette méthode de stockage.

Pour compléter ces résultats obtenus dans les tiques, il apparaissait nécessaire de savoir si les ruminants, reconnus comme sensibles au virus CCHF, auraient pu être exposés au virus en Corse. Une large enquête sérologique a ainsi été mise en place sur les bovins, ovins et caprins élevés sur l'île.

### 6.1. La fièvre hémorragique de Crimée-Congo

Cette zoonose est due à un virus à ARN du genre *Orthonairovirus* et de la famille des *Nairoviridae* (Figure 18). La CCHF est la maladie virale transmise par les tiques la plus répandue dans le monde (Figure 19). Elle a été décrite pour la première fois en 1944, dans la région de la Crimée de l'ancienne Union Soviétique. Son aire d'expansion s'étend aujourd'hui de la Chine à l'Europe de l'Est en passant par l'Asie du Sud-Est, le Moyen Orient et une bonne partie de l'Afrique (Bente et al., 2013). En 2016, les premiers cas humains déclarés en Espagne ont officialisé son entrée en Europe de l'Ouest (Negredo et al., 2017).

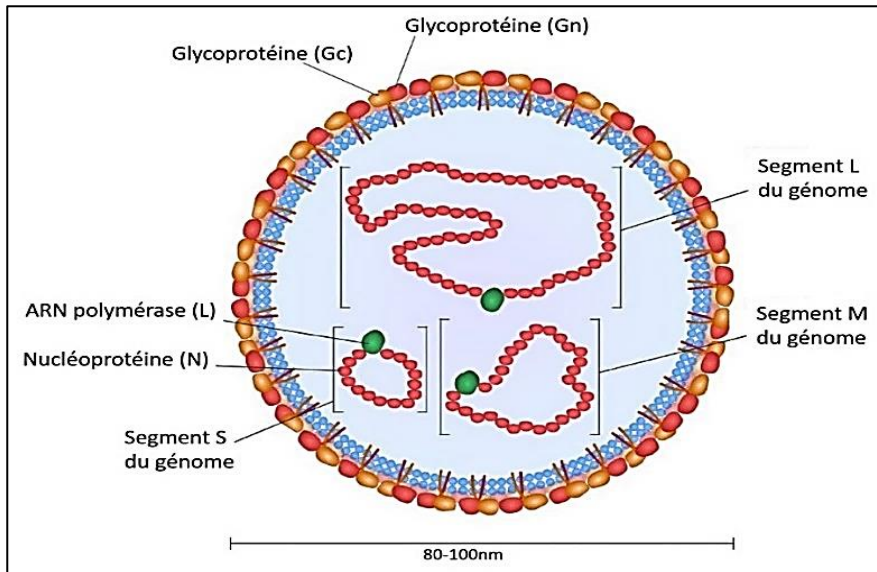


Figure 18. Représentation schématique du virus CCHF (d'après Bente et al., 2013).

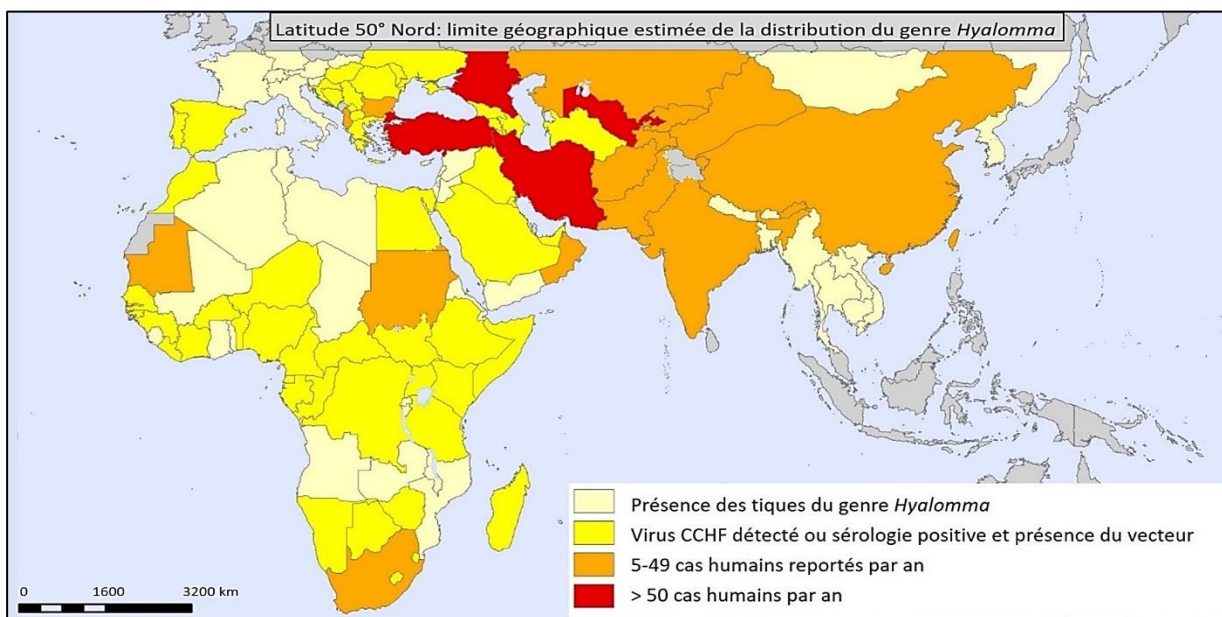


Figure 19. Situation du virus CCHF et de ses vecteurs dans le monde (d'après OMS, 2017)

Le virus CCHF est transmis aux mammifères par les tiques du genre *Hyalomma*, principalement *Hy. marginatum* dans le bassin méditerranéen. La CCHF peut toucher une grande diversité d'animaux sauvages ou domestiques, qui après avoir développé une virémie transitoire, ne présentent pas de signes cliniques. La grande majorité des espèces du genre *Hyalomma* étant ditropes et diphasiques, les deux premiers repas sanguins se déroulent sur un petit mammifère (ou oiseau) alors que les adultes privilégient les grands ongulés. Chaque repas sanguin peut être l'occasion d'une transmission du virus CCHF de l'hôte animal vers la tique, ou inversement. En effet, la transmission transovarienne du virus chez la tique fait que les œufs issus d'une femelle infectée vont donner naissance à des larves

infectées capables de transmettre le virus à leur hôte. Ces larves donneront des nymphes puis des adultes infectés par transmission trans-stadiale (Figure 20, Bente et al., 2013). La combinaison des transmissions trans-ovariennes et trans-stadiales fait de la tique vectrice un véritable réservoir du virus. L'homme ou l'animal peuvent également se contaminer via le sang, ou un autre fluide corporel contaminé. Chez l'homme, la maladie peut se présenter sous la forme d'un syndrome fébrile non spécifique ou provoquer des troubles vasculaires sévères et des hémorragies multiples pouvant entraîner la mort dans 5 à 30% des cas (Figure 21, Bente et al., 2013).

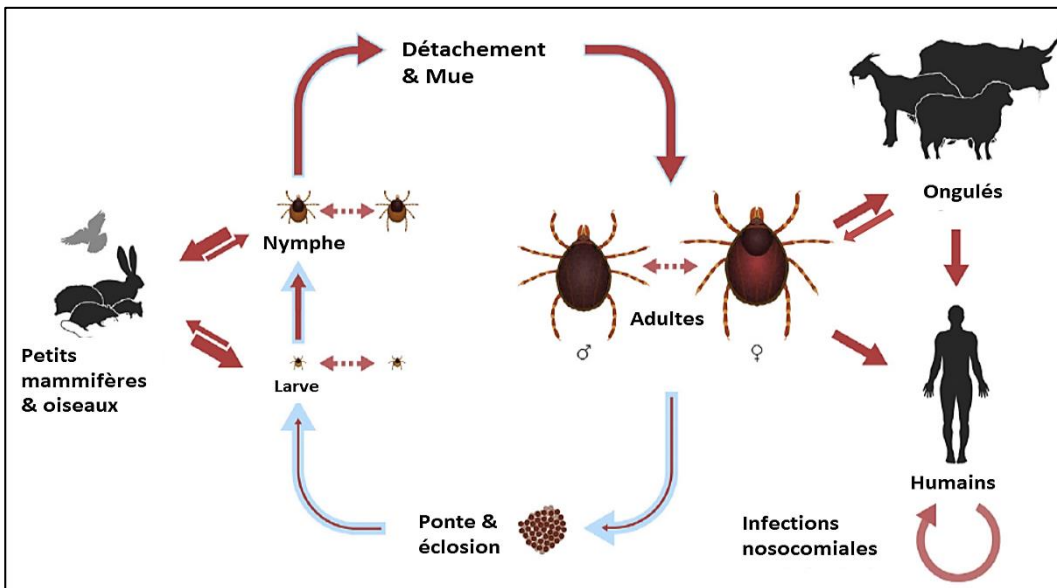


Figure 20. Cycle biologique du virus CCHF (d'après Bente et al., 2013). Les flèches bleues indiquent les étapes du cycle de vie de la tique. L'épaisseur de la flèche rouge correspond à l'efficacité de la transmission virale



Figure 21. Patient atteint de CCHF sévère présentant une lésion d'ecchymose majeure (Bente et al., 2013)

## 6.2. Matériel et méthode

**Grech-Angelini, S.,** Lancelot, R., Ferraris, O., Nicolas Peyrefitte, C., Vachery, N., Pédarrieu, A., Peyraud, A., Rodrigues, V., Bastron, B., Libeau G., Fernandez B., Holzmuller, P., Servan de Almeida, R., Michaud, V., Tordo, N., Comtet, L., Métras, R., Casabianca, F., Vial, L., 2020. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Antibodies among Livestock on Corsica, France, 2014–2016. *Emerg Infect Dis.* 26(5):1041-1044. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2605.191465>

Pour cette enquête sérologique, les animaux ont été prélevés par les vétérinaires sanitaires lors de la campagne de prophylaxie contre la brucellose en 2014-2015 pour la Corse-du-Sud et en 2015-2016 pour la Haute-Corse. Le reste de sérum non utilisé pour les sérologies brucellose était récupéré et conservé par les laboratoires départementaux d'analyses d'Ajaccio et de Bastia. L'échantillonnage a été réalisé au niveau de la commune afin d'obtenir des prélèvements de l'ensemble de l'île. Habituellement, lors de la prophylaxie annuelle, ce sont 10 animaux qui sont prélevés par cheptel bovin et 50 par cheptel ovin et caprin. Dans les élevages sélectionnés, l'ensemble des sérums bovins étaient conservés, alors qu'entre 25 et 30 sérums de petits ruminants étaient inclus et un maximum de trois élevages étaient échantillonnés par commune. Un total de 3 890 sérums a été collecté dont 1 731 bovins, 1 035 caprins et 1 124 ovins. Les animaux prélevés venaient de 269 élevages répartis sur près de 50% de la zone d'élevage de la Corse (137 communes échantillonnées sur les 298 recensées avec une activité d'élevage).

Les sérums ont été testés pour la présence des anticorps IgG dirigés contre le virus CCHF en utilisant un kit ELISA double antigène (ID Screen®, CCHF Double Antigen Multi-species, IDVet, Montpellier, France). La sensibilité du kit est comprise entre 96.8 et 99.8% et la spécificité entre 96.8 et 99.8% (Sas et al., 2018). Afin de confirmer les résultats obtenus en ELISA, 35 sérums positifs et cinq négatifs ont été envoyés au Centre National de Référence des virus CCHF (Institut Pasteur de Paris, IRBA, France). Un test de séroneutralisation par réduction des plages de lyse (PPRNT) a été utilisé en triplicata pour chaque sérum. Les virus Hazara et Dugbe, qui appartiennent respectivement au même sérogroupe (CCHF virus) ou à un sérogroupe très proche (*Nairobi sheep disease virus*), ont également été testés pour relever d'éventuelles réactions croisées. Un modèle de régression logistique bêta-binomiale a été utilisé pour traiter les données.

### 6.3. Résultats

La séroprévalence estimée pour l'ensemble des animaux a été de 9,1% ( $n = 291$ , IC95% [6,9 – 11,9]). Au niveau des espèces, 13,3% des bovins (IC95% [10,2 – 17,3]), 2,5% des ovins (IC95% [1,0 – 5,9]) et 3,1% des caprins (IC95% [1,4 – 7,0]) ont été positifs en ELISA. Dans plus d'un tiers (35,7%) des communes échantillonnées ( $n = 137$ ), au moins un animal positif a été détecté. Afin de prendre en compte les communes non échantillonnées dans la distribution géographique des séroprévalences, les polygones de Voronoi, basés sur les centroïdes des communes échantillonnées, ont été utilisés comme unité spatiale. Un cluster de prévalences élevées a été identifié dans le Nord-Ouest de l'île alors que la majorité des polygones ont eu une prévalence nulle (Figure 22A). Les probabilités de non-détection d'animaux positifs dans ces polygones négatifs a été estimée en utilisant trois niveaux de prévalence (2,8%, 5,0% et 14,3%) qui correspondent aux quantiles de 10%, 25% et 50% (Figure 22B). Ainsi, si les prévalences étaient inférieures à 5%, la probabilité de non-détection d'animaux positifs dans les

polygones positifs était élevée, alors que si la séroprévalence estimée était élevée (14,3%), la probabilité de non-détection devenait très faible. Ces résultats montrent qu'il est très peu probable que des zones de forte circulation virale n'aient pas été détectées.

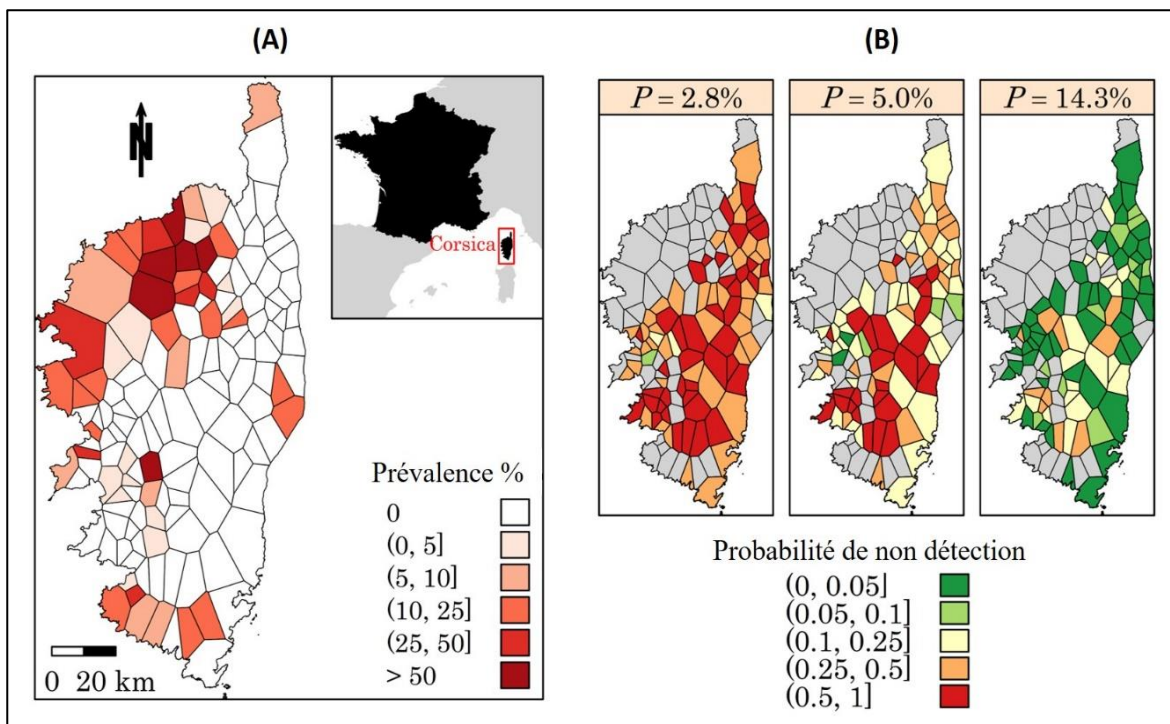


Figure 22. (A) Distribution des séroprévalences des anticorps dirigés contre le virus CCHF chez les ruminants en Corse. (B) Dans les zones où la prévalence est nulle, distribution spatiale des probabilités de non-détection en fonction de trois prévalences estimées ( $P$ ). Les unités territoriales sont des polygones de Voronoi définis par le centroïde des communes échantillonnées

Concernant la séroneutralisation, aucun des 35 sérums positifs en ELISA-CCHF n'a réagi avec les virus Hazara et Dugbe et aucun des cinq sérums négatifs en ELISA n'avait d'anticorps neutralisants contre les trois virus testés. Sur les 35 sérums positifs en ELISA, 24 avaient des anticorps neutralisants pour le virus CCHF dont 10 étaient encore positifs avec une dilution au 1/80 (dont deux étaient toujours positifs à une dilution de 1/640).

#### 6.4. Discussion

Cette étude a permis de détecter pour la première fois des anticorps dirigés contre le virus CCHF dans le cheptel corse. La prévalence estimée était supérieure chez les bovins que chez les petits ruminants, ce qui est certainement lié au fait que les bovins sont beaucoup plus infestés que les petits ruminants par *Hy. marginatum*, l'un des principaux vecteurs du virus (cf. 4.5 et Grech-Angelini et al., 2016a). Les séroprévalences retrouvées dans les zones d'endémie du virus CCHF sont souvent plus élevées que celles détectées en Corse. Ainsi, la séroprévalence moyenne basée sur l'ensemble des études publiées est de 19,3% pour les bovins, 23,8% pour les ovins et 28,1% pour les caprins (Spengler et al., 2016). Cette comparaison est toutefois à modérer car dans ces zones, le virus était souvent installé

depuis longtemps et les tests utilisés étaient différents et possiblement moins spécifiques que ceux utilisés dans cette étude. En Europe de l'Ouest, le virus CCHF, après avoir été détecté dans des tiques en Espagne en 2012 (Estrada-Peña et al., 2012b), a causé deux premiers cas humains en 2016 (Negredo et al., 2016). Récemment, l'ARN du virus a également été retrouvé dans une tique collectée sur un oiseau migrateur dans la petite île italienne de Ventotene (Mancuso et al., 2019). Cette découverte souligne le probable rôle que pourraient jouer les oiseaux migrants dans l'émergence du virus CCHF en Europe de l'Ouest. Aucun cas humain de CCHF n'a été signalé en Corse, et de façon plus générale en France et eu regard du tableau clinique parfois très sévère de la maladie il est probable que la souche qui circule en Corse soit atténuée. De nouvelles études entomologiques et épidémiologiques sont en cours pour tenter d'identifier la souche virale, ainsi que pour comprendre la dynamique du virus CCHF en Corse afin de définir le risque d'exposition pour la population humaine.

## **Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Antibodies among Livestock on Corsica, France, 2014–2016**

Sébastien Grech-Angelini<sup>1,2,3</sup>, Renaud Lancelot<sup>4,5</sup>, Olivier Ferraris<sup>6</sup>, Christophe Nicolas Peyrefitte<sup>6,7</sup>, Nathalie Vachier<sup>4,5</sup>, Aurélie Pédarrieu<sup>4,5</sup>, Armelle Peyraud<sup>4,5</sup>, Valérie Rodrigues<sup>4,5</sup>, Denise Bastron<sup>4,5</sup>, Geneviève Libeau<sup>4,5</sup>, Bernard Fernandez<sup>4,5</sup>, Philippe Holzmüller<sup>4,5</sup>, Renata Servan de Almeida<sup>4,5</sup>, Vincent Michaud<sup>4,5</sup>, Noël Tordo<sup>8,9</sup>, Loïc Comtet<sup>10</sup>, Raphaëlle Métras<sup>4,5</sup>, François Casabianca<sup>1</sup>, Laurence Vial<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>INRA, UR045 Laboratoire de recherches sur le développement de l'élevage, Corte, France

<sup>2</sup>Groupement Technique Vétérinaire de Corse, Ghisonaccia, France

<sup>3</sup>UMR BIPAR, Animal Health Laboratory, ANSES, INRA, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, France

<sup>4</sup>CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier, France

<sup>5</sup>ASTRE, CIRAD, INRA, Univ. Montpellier, Montpellier, France

<sup>6</sup>Unité de virologie, Département Microbiologie et Maladies Infectieuses, Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Lyon, France

<sup>7</sup> Institut Pasteur, Dakar, Senegal

<sup>8</sup> Institut Pasteur, Unité des Stratégies Antivirales, WHO Collaborative Centre for Viral Haemorrhagic Fevers and Arboviruses, OIE Reference Laboratory for RVFV and CCHF, Paris, France

<sup>9</sup> Institut Pasteur, Conakry, Guinea

<sup>10</sup> ID-VET, Montpellier, France

Corresponding authors:

Sébastien Grech-Angelini, [grech.angelini@gtvcorse.fr](mailto:grech.angelini@gtvcorse.fr); Laurence Vial, [laurence.vial@cirad.fr](mailto:laurence.vial@cirad.fr)



## Abstract

We conducted a serologic survey for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antibodies in livestock (cattle, sheep, and goats; N = 3,890) on Corsica (island of France) during 2014–2016. Overall, 9.1% of animals were seropositive, suggesting this virus circulates on Corsica. However, virus identification is needed to confirm these results.

## Letter

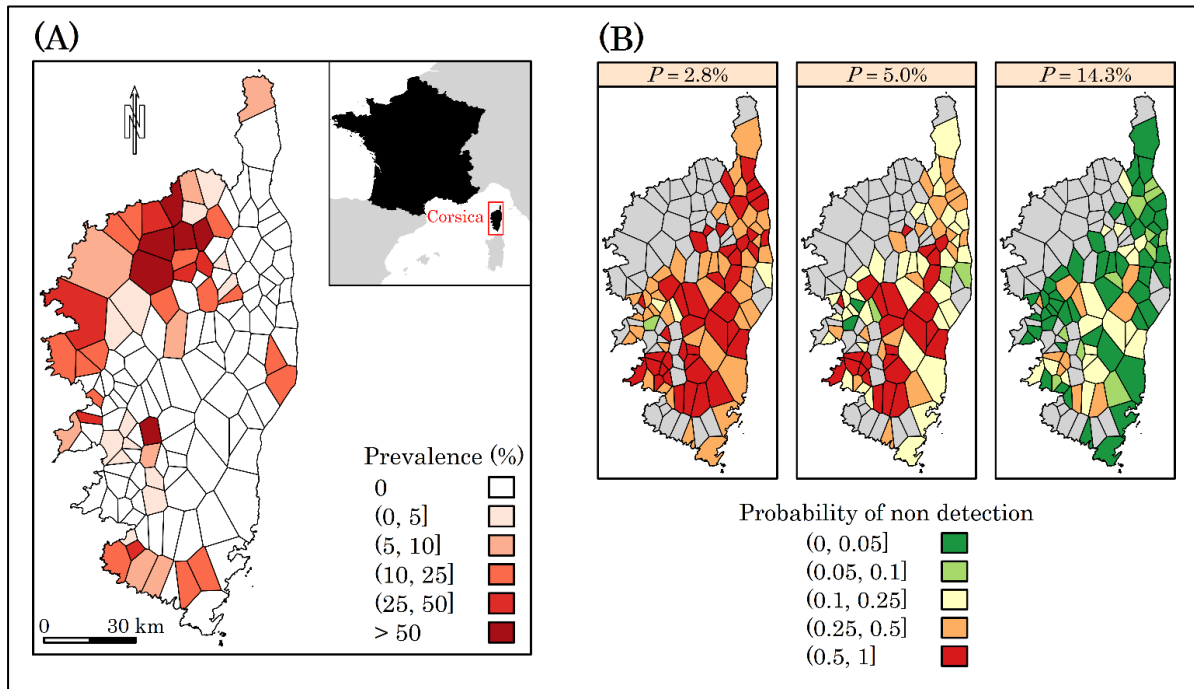
Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF), the most widespread tickborne viral infection in humans, is a zoonotic disease caused by an orthonairovirus of the *Nairoviridae* family. Symptoms in humans vary from a nonspecific mild febrile syndrome to severe hemorrhagic disease that sometimes leads to death (1,2), and a wide range of animals are asymptomatic reservoirs (1). Corsica is an island of France located in the northwestern part of the Mediterranean Sea (Figure, panel A). Entomologic surveys have revealed that one of the main vectors of CCHF virus (CCHFV), the *Hyalomma marginatum* tick, is abundant on this island (1,3,4). Therefore, we performed a serologic cross-sectional survey to assess the prevalence of antibodies against CCHFV in domestic ruminants on Corsica. This work was approved by the French Ministry of Agriculture (Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Populations of Corse-du-Sud and Haute-Corse and General Directorate for Food).

As part of national surveillance for animal diseases, veterinarians collected cattle, goat, and sheep blood samples during 2014–2016. In total, 3,890 animals (1,731 cattle, 1,035 goats, 1,124 sheep) were sampled from 269 farms, originating from 46% (137/298) of the municipalities with ruminant farming activities (3).

We tested the collected serum samples for the presence of CCHFV IgG using a double-antigen ELISA kit (ID Screen CCHF Double Antigen Multi-species, ID Vet, <https://www.id-vet.com>) according to the manufacturer's instructions (Appendix Figure, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/26/5/19-1465-App1.pdf>). For this kit, the 95% CI for sensitivity is 96.8%–99.8%, and 95% CI for specificity is 99.8%–100% (5). To confirm ELISA results, we sent 35 ELISA-positive and 5 ELISA-negative serum samples to a Biosafety Level 4 laboratory (Laboratory Jean Mérieux, Lyon, France) to be analyzed by the World Health Organization and World Organisation for Animal Health national reference center for CCHFV (Institut Pasteur and Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Paris, France). We used the pseudo-plaque reduction neutralization test (PPRNT) (6) to measure the neutralizing antibodies against IbAr10200 (same antigen used in ELISA) in triplicate. We included Hazara virus (same serogroup as CCHFV) and Dugbe virus (closely related virus, Nairobi sheep disease serogroup) to detect possible immune cross-reactions. We estimated overall and species-

specific IgG prevalence against CCHFV using a  $\beta$ -binomial logistic regression model of data grouped by farm.

The overall estimated seroprevalence was 9.1% (95% CI 6.9%–11.9%); estimated seroprevalence in cattle was 13.3% (95% CI 10.2%–17.3%), goats 3.1% (95% CI 1.4%–7.0%), and sheep 2.5% (95% CI 1.0%–5.9%). CCHFV antibodies were detected across the island; 35.8% (49/137; 95% CI 27.8%–44.4%, estimated by exact binomial test) of the investigated municipalities had  $\geq 1$  positive ELISA test result. Because serum samples were not available from all municipalities, we used Voronoi polygons to draw regional boundaries and estimate the spatial distribution of seroprevalence across the island. Seroprevalence was high in the northwest corner of Corsica; however, most regions lacked evidence of seropositivity (Figure panel A). In areas corresponding to negative polygons, the probability of nondetection of positive serum samples was estimated assuming 3 levels of estimated seroprevalence corresponding with the 10% quantile (2.8% seroprevalence), 25% quantile (5.0% seroprevalence), and 50% quantile (14.3% seroprevalence) (Figure, panel B) and by accounting for sample size. This data shows that if seroprevalence in these regions is  $\leq 5\%$ , the probability of nondetection is high (Figure, panel B), and if the seroprevalence in these regions is  $\geq 14.3\%$ , the probability of nondetection is low. Therefore, the chance that we missed hotspots of transmission is highly unlikely.



**Figure 1.** (A) Spatial variability of the antibody prevalence against CCHF virus in Corsican ruminants. (B) In areas where the estimated prevalence was null: uncertainty associated with the non-detection of antibodies against CCHF virus, according to different assumptions of the estimated prevalence ( $P$ ), corresponding to the 10% ( $P=2.8\%$ ), 25% ( $P=5.0\%$ ) and 50% ( $P=14.3\%$ ) quantiles. The boundaries of the territory are those of a Voronoi diagram defined by the centroids of municipalities where blood samples were collected.

Of 35 ELISA-positive serum samples tested, none showed neutralizing antibodies against Hazara and Dugbe viruses, and no ELISA-negative serum sample showed neutralizing antibodies against CCHFV, Hazara virus, or Dugbe virus (at lowest dilution 1:20; Appendix Table). Of 35 ELISA-positive serum samples, 23 had neutralizing antibodies against CCHFV at the 1:40 dilution, and 10 remained positive at the 1:80 dilution (including 2 positives at the 1:320 and 1:640 dilutions).

Our serologic survey results suggest CCHFV circulates in livestock on Corsica. Relative discrepancies between ELISA (35 positives) and PPRNT (23 positives) findings might result from their different target epitopes; the ELISA measures total immunoglobulin (neutralizing and nonneutralizing antibodies) and PPRNT just a subset (functional neutralizing antibodies) (7). Seroprevalence estimates were higher in cattle than smaller ruminants, probably reflecting that cattle in Corsica are more infested by *Hy. marginatum* ticks (3).

As of February 2020, CCHFV has not been detected in ticks on Corsica (8), and no clinical human case has been reported. The presence of a genetically close and less virulent strain in ticks on Corsica might help explain the lack of these findings. CCHFV was detected in ticks in Spain, where the first human cases were reported in 2016 (9), and in a tick collected on a migratory bird in Italy (10). Entomologic and epidemiologic investigations to identify the incriminated strain and characterize its spatial distribution are ongoing. This work will be essential to assess the risk for human CCHFV exposure and raise public health awareness on Corsica and in neighboring areas.

### **Acknowledgments**

The authors thank staff of the 2 district veterinary laboratories of Corsica for their help in collecting blood samples.

This study was partially funded by the French Ministry of Agriculture General Directorate for Food.

### **About the Author**

Dr. Grech-Angelini is a veterinary epidemiologist for the Groupement Technique Vétérinaire de Corse, Ghisonaccia, France, who obtained his doctorate during the completion of this study in 2020 with the Animal Health Laboratory of Unité Mixte de Recherche de Biologie Moléculaire et d'Immunologie Parasitaires (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation de l'Environnement et du Travail, Institut National de la Recherche Agronomique, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France). His primary research interests are the epidemiology of zoonoses and tickborne diseases.

### **References**

1. Bente DA, Forrester NL, Watts DM, McAuley AJ, Whitehouse CA, Bray M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity.

- Antiviral Res. 2013;100:159–89. [PubMed http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.006](http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.006)
2. Dreshaj S, Ahmeti S, Ramadani N, Dreshaj G, Humolli I, Dedushaj I. Current situation of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Southeastern Europe and neighboring countries: a public health risk for the European Union? *Travel Med Infect Dis.* 2016;14:81–91. [PubMed http://dx.doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.03.012](http://dx.doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.03.012)
  3. Grech-Angelini S, Stachurski F, Lancelot R, Boissier J, Allienne JF, Marco S, et al. Ticks (Acari: *Ixodidae*) infesting cattle and some other domestic and wild hosts on the French. *Parasit Vectors.* 2016;9:582. [PubMed http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1876-8](http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1876-8)
  4. Gargili A, Estrada-Peña A, Spengler JR, Lukashev A, Nuttall PA, Bente DA. The role of ticks in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: a review of published field and laboratory studies. *Antiviral Res.* 2017;144:93–119. [PubMed http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.05.010](http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.05.010)
  5. Sas MA, Comtet L, Donnet F, Mertens M, Vatansever Z, Tordo N, et al. A novel double-antigen sandwich ELISA for the species-independent detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-specific antibodies. *Antiviral Res.* 2018;151:24–6. [PubMed http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.01.006](http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.01.006)
  6. Canakoglu N, Berber E, Ertek M, Yoruk MD, Tonbak S, Bolat Y, et al. Pseudo-plaque reduction neutralization test (PPRNT) for the measurement of neutralizing antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Virol J.* 2013;10:6. [PubMed http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-10-6](http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-10-6)
  7. Ravault S, Friel D, Di Paolo E, Caplanusi A, Gillard P, Povey M, et al. Assessment of mumps virus-specific antibodies: comparison of plaque reduction neutralization test and enzyme-linked immunosorbent assay estimates. *J Infect Dis.* 2019;220:1462–8. [PubMed http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiz345](http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiz345)
  8. Grech-Angelini S, Stachurski F, Vayssier-Taussat M, Devillers E, Casabianca F, Lancelot R, et al. Tick-borne pathogens in ticks (Acari: *Ixodidae*) collected from various domestic and wild hosts in Corsica (France), a Mediterranean island environment. *Transbound Emerg Dis.* 2019;tbed.13393. [PubMed http://dx.doi.org/10.1111/tbed.13393](http://dx.doi.org/10.1111/tbed.13393)
  9. Negrodo A, de la Calle-Prieto F, Palencia-Herrejón E, Mora-Rillo M, Astray-Mochales J, Sánchez-Seco MP, et al.; Crimean Congo Hemorrhagic Fever@Madrid Working Group. Autochthonous Crimean-Congo hemorrhagic fever in Spain. *N Engl J Med.* 2017;377:154–61. [PubMed http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1615162](http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1615162)
  10. Mancuso E, Toma L, Polci A, d'Alessio SG, Di Luca M, Orsini M, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genome in tick from migratory bird, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2019;25:1418–20. [PubMed http://dx.doi.org/10.3201/eid2507.181345](http://dx.doi.org/10.3201/eid2507.181345)



## 7. Autres agents pathogènes zoonotiques étudiés chez les animaux en Corse

Les agents pathogènes, transmis par les tiques, détectés dans cette étude sont le plus souvent zoonotiques. Mais le rôle des animaux dans la transmission et le maintien des agents zoonotiques sur l'île ne se limitent pas à cet aspect. Ainsi d'autres agents pathogènes ont été étudiés dans la faune sauvage et chez les animaux domestiques, en parallèle de cette étude sur les tiques et agents pathogènes transmis.

### 7.1. La bilharziose uro-génitale

#### 7.1.1. A la recherche de l'origine du parasite

Boissier, J., **Grech-Angelini, S.**, Webster, B. L., Allienne, J. F., Huyse, T., Mas-Coma, S., ... & Oleaga, A. (2016). Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(8), 971-979. **Annexe 1**, page 173.

La bilharziose (ou schistosomiase) est la seconde maladie parasitaire humaine après le paludisme (206 millions de personnes atteintes selon l'OMS, 2019). Absente depuis plus de 40 ans du continent européen, la bilharziose uro-génitale a émergé dans l'extrême sud de la Corse (Figure 24a) en 2013 avec plus de 120 cas recensés ayant toujours la même origine, une baignade dans la rivière du Cavu. Cette maladie est endémique dans presque toute l'Afrique sub-saharienne, le Moyen-Orient, Madagascar et les îles de l'Océan Indien. Le parasite responsable de la bilharziose uro-génitale chez l'homme est classiquement *Schistosoma haematobium*. Pourtant, la première identification du parasite présent sur l'île avait montré l'existence d'un hybride entre *S. haematobium* et la forme bovine *S. bovis* chez un patient allemand infesté en Corse (Moné et al., 2015). Le cycle de *S. haematobium* (Figure 23) fait intervenir un hôte vertébré définitif, habituellement l'homme, et un hôte intermédiaire mollusque, le bulin (*Bulinus truncatus*). La reproduction se déroule chez l'homme et les œufs sont libérés via les urines dans le milieu extérieur (l'eau douce). Les larves miracidium qui éclosent infestent alors le bulin avant de se transformer en sporocyste qui produira par multiplication clonale l'ultime phase larvaire : la cercaire. Les cercaires sont des larves nageantes qui pénétreront dans un nouvel hôte définitif par voie transcutané. La maladie, parfois asymptomatique, se manifeste classiquement par une cystite et de l'hématurie. Une étude clinique a montré que sur 106 patients infectés en Corse seulement un tiers présentait des symptômes caractéristiques d'une infestation par le schistosome (Noël et al., 2018).

L'objectif de cette étude était (i) à l'aide d'une large enquête malacologique d'essayer d'identifier le parasite chez l'hôte intermédiaire mollusque(ii) d'infester expérimentalement des bulins puis des rongeurs (hamsters) à partir d'œufs retrouvés dans les urines d'un patient infesté en Corse afin de prouver la compatibilité entre le parasite et l'hôte intermédiaire local (à défaut de trouver des bulins naturellement infectés), (iii) de caractériser génétiquement (marqueurs ITS2 et *cox1*) la souche ayant émergé en Corse afin d'élucider l'origine géographique du parasite.

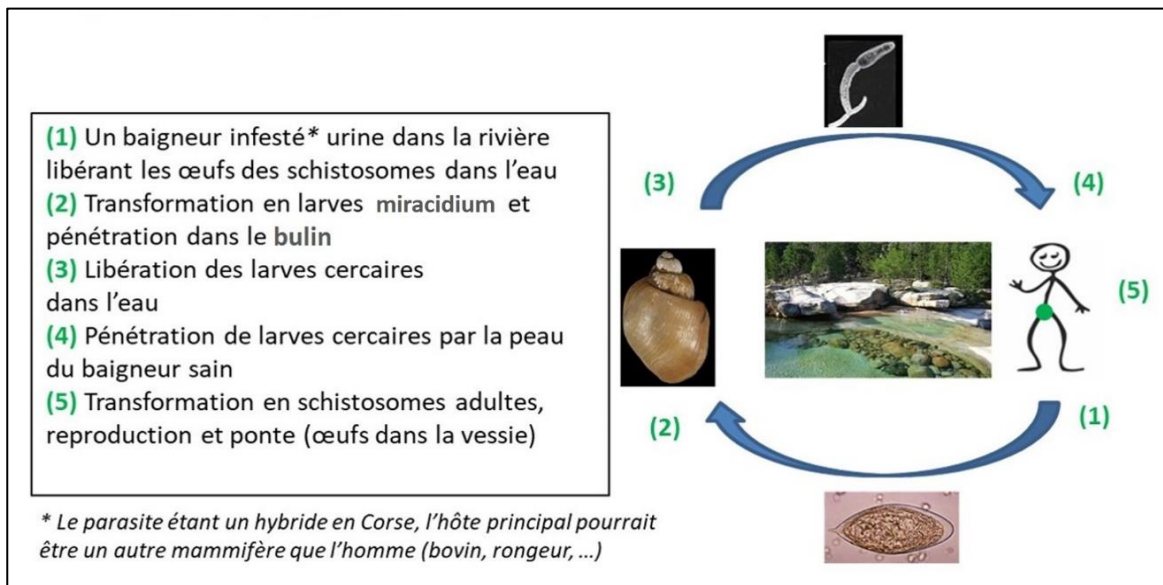


Figure 23. Le cycle de *Schistosoma* dans le sud de la Corse

Sur les 3 544 bulins collectés dans la rivière du Cavu, aucun n'était porteur du parasite. La prévalence étant habituellement très faible chez les mollusques, ce résultat ne prouve pas l'absence de réalisation locale du cycle du parasite. En effet, les infestations effectuées sur les bulins collectés dans le Cavu, à partir de miracidia éclos des œufs d'une patiente infestée, ont permis de réaliser expérimentalement l'ensemble du cycle du parasite en laboratoire. Les analyses génétiques réalisées (Sire et al., 2001) à partir de prélèvements d'urines de patients infestés ont permis de confirmer le côté hybride du parasite. Sur les 12 patients prélevés, quatre étaient infestés avec des parasites contenant des marqueurs de *S. bovis* et des marqueurs de *S. haematobium*, quatre avaient des parasites possédant uniquement des marqueurs de *S. haematobium*, trois ont produits à la fois des parasites hybrides et des *S. haematobium* purs et un sujet a produit des œufs de *S. haematobium* purs et de *S. bovis* purs. Le sang de 34 animaux (31 chèvres, trois bovins) élevés sur les bords de la rivière a également été prélevé afin de procéder à des recherches sérologiques qui se sont révélées négatives.

Cette première émergence de la bilharziose uro-génitale en Corse soulève le problème de multiples émergences à venir dans le bassin méditerranéen où le bulin, l'hôte intermédiaire indispensable à la bonne réalisation du cycle, est présent. L'hybridation du parasite questionne sur le rôle que pourrait jouer les animaux dans la circulation et le maintien du parasite en Corse, et ce d'autant plus que la forme *S. bovis* avait été identifiée sur l'île dans les années 1960 (Gretillat, 1963). L'analyse génétique de tous les haplotypes testés, et les correspondances dans GenBank, vont dans le sens d'une origine proche de l'Afrique occidentale, probablement la souche identifiée au Sénégal. L'article scientifique est inclus en intégralité dans la thèse en annexe 1 (page 173).

### 7.1.2. A la recherche des hôtes animaux

Oleaga, A., Rey, O., Polack, B., **Grech-Angelini, S.**, Quilichini, Y., Pérez-Sánchez, R., ..., Boissier, J., 2019. Epidemiological surveillance of schistosomiasis outbreak in Corsica (France): Are animal reservoir hosts implicated in local transmission? *PLoS neglected tropical diseases*, 13(6). **Annexe 2**, page 193.

Depuis 2013 et l'émergence de la bilharziose urinaire en Corse, des cas humains sont régulièrement diagnostiqués avec toujours pour même origine une baignade dans la rivière du Cavu, dans l'extrême sud de la Corse (Figure 24a). Le parasite hybride identifié en Corse pourrait être hébergé par des mammifères domestiques ou sauvages qui joueraient le rôle de réservoir et recontamineraient régulièrement la rivière exposant ainsi les hommes à de nouvelles infestations.

L'objectif de cette étude est de rechercher parmi les animaux vivant en Corse et reconnus comme sensibles au parasite, lequel (ou lesquels) pourrait être un réservoir du parasite et jouer un rôle dans son cycle épidémiologique. Une enquête sérologique a ainsi été menée dans la population de ruminants domestiques (bovins, ovins et caprins) élevés dans le sud de l'île, alors que le parasite a directement été recherché chez des rongeurs capturés au bord de la rivière.

Un total de 3 519 ruminants domestiques (1 147 bovins, 671 caprins et 1 701 ovins) originaires de 160 cheptels répartis sur 14 communes du sud de l'île, ont été prélevés au moment de la prophylaxie annuelle réalisée par les vétérinaires sanitaires (Figure 24). Parmi eux, 17 étaient positifs en test ELISA mais des analyses complémentaires (coprologie et nouveau test ELISA) sur ces animaux ont permis de les classer comme des faux positifs. Les piégeages de rongeurs sauvages ont abouti à la capture de 34 rats et quatre souris. Après euthanasie et dissection, deux rats semblaient porteurs de schistosomes. Malgré ce nombre relativement faible d'animaux, les analyses de biologie moléculaire (marqueurs *cox1* et ITS2) ont permis d'identifier un schistosome au profil hybride *S. haematobium* –



*S. bovis* chez un rat. Ce schistosome était de la même souche que celle responsable des cas humains en 2013 et 2015.

Au regard de la faible prévalence du parasite retrouvé dans la faune domestique ou sauvage, il est probable que les rongeurs et les ruminants ne jouent pas un rôle significatif dans le maintien du parasite en Corse. L'hypothèse avancée aujourd'hui serait que des personnes initialement infestées en 2013 recontamineraient de façon saisonnière la rivière du Cavu. Le rôle des animaux et notamment des ruminants ne peut cependant pas être éliminé, car les collectes de sérums ont eu lieu en 2014-2015, entre un et deux ans après l'apparition des premiers cas humains, et dans l'hypothèse d'une primo-contamination de la rivière par un homme, les ruminants domestiques auraient pu s'infester par la suite. L'article scientifique concernant ces sérologies est inclus en intégralité dans la thèse en annexe 2 (page193).

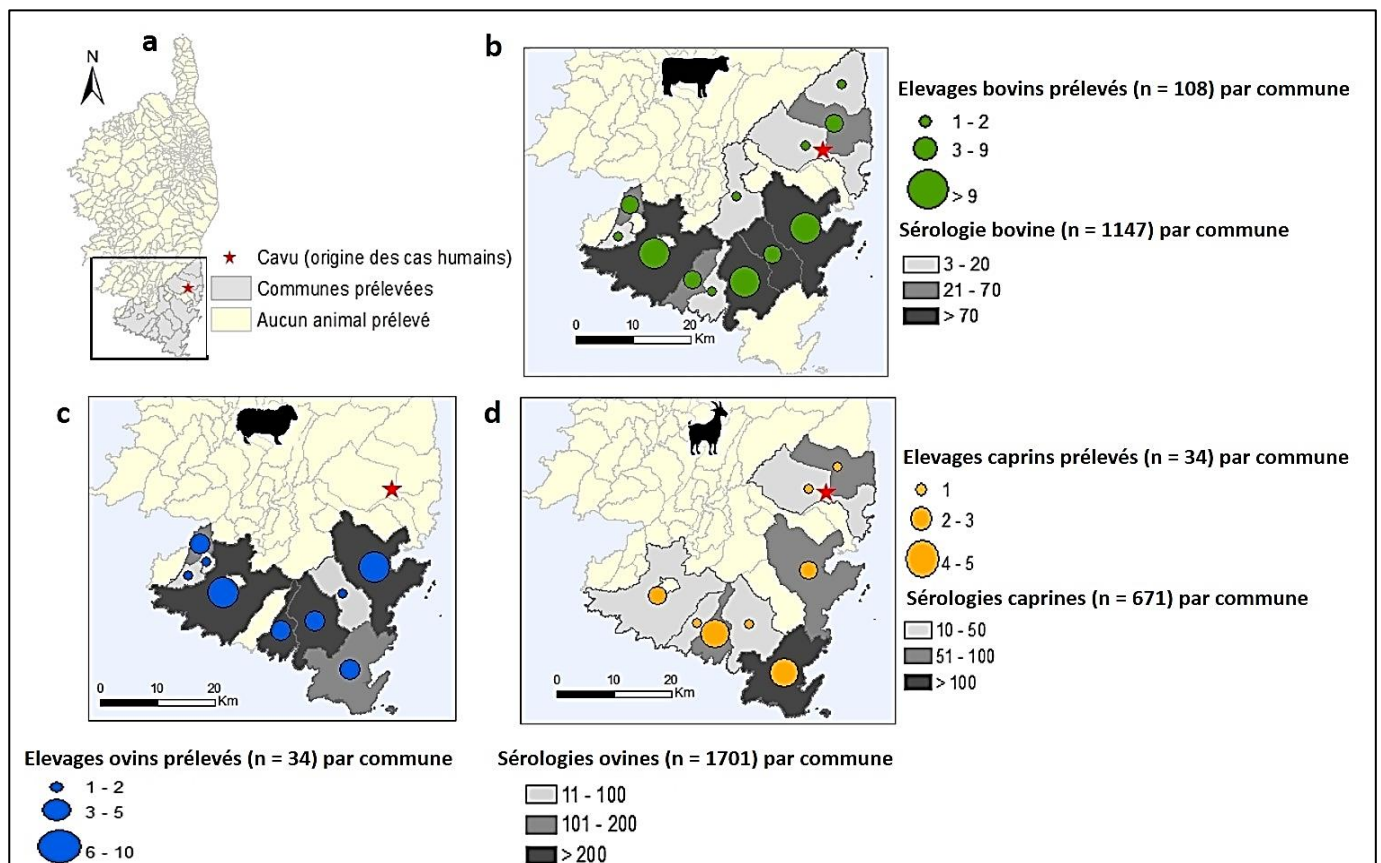
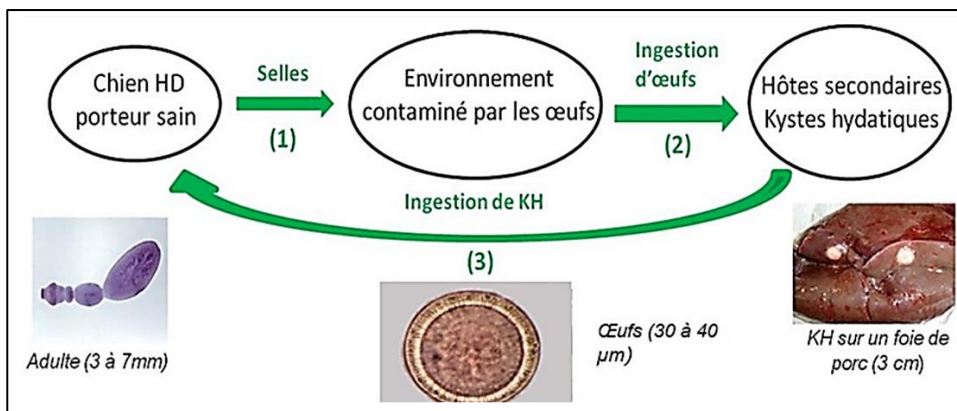


Figure 24. Localisation de la zone échantillonnée (a) pour la recherche sérologique de *Schistosoma* spp. chez les bovins (b), ovins (c) et caprins (d) prélevés dans le sud de la Corse (d'après Oleaga et al., 2019)

## 7.2. L'échinococcose kystique

**Grech-Angelini, S.**, Richomme, C., de Garam, C. P., Boucher, J. M., Maestrini, O., Grenouillet, F., ..., Umhang, G., 2019. Identification and molecular characterization of *Echinococcus canadensis* G6/7 in dogs from Corsica, France. *Parasitology research*, 118(4), 1313-1319. **Annexe 3**, page 215.

De récentes études réalisées en abattoirs ont confirmé l'existence de trois espèces différentes du parasite *Echinococcus granulosus* s.l. en France : *E. granulosus* s.s., *E. ortleppi* et *E. canadensis* G6/G7. *Echinococcus granulosus* s.s. est l'espèce la plus présente en France alors que *E. canadensis* G6/G7 n'a été retrouvé qu'en Corse, chez des porcs (Umhang et al., 2013). La taxonomie G6/G7 a été récemment adoptée, elle regroupe le génotype G6 (qui correspondait à la souche appelée « camélidés ») et le génotype G7 (souche « porcs »). La prévalence de *E. canadensis* G6/G7 est élevée chez les porcs (5,9%) et les sangliers vivant en Corse (Umhang et al., 2014). Le cycle classique d'*E. granulosus* s.l. fait intervenir le chien, l'hôte principal chez qui le parasite se reproduit, et un autre mammifère, hôte intermédiaire qui s'infeste en ingérant les œufs présents dans les selles du chien (Figure 25). Le chien se recontamine alors en ingérant des kystes hydatiques présents dans les viscères des animaux (le plus souvent foie et poumons).



**Figure 25.** Cycle d'*Echinococcus granulosus* s.l. en Corse (HD : Hôte définitif, KH : Kyste hydatique)

L'homme est un hôte paraténique : suite à son infestation, le cycle du parasite ne peut plus se poursuivre (l'homme n'étant normalement pas consommé par le chien). Le développement des kystes hydatiques (remplis de larves) chez l'hôte intermédiaire, principalement au niveau du foie (Figure 25), est une phase longue et asymptomatique mais la rupture des kystes peut causer de graves troubles chez l'homme, allant jusqu'à entraîner un choc anaphylactique et la mort.

L'objectif de cette étude était de continuer à investiguer le cycle biologique du parasite en Corse et, après avoir précédemment identifié *E. canadensis* G6/G7 chez les suidés domestiques et sauvages (Umhang et al., 2014), de tenter d'identifier l'hôte principal habituel supposé, le chien, et ainsi

prouver la réalisation complète du cycle épidémiologique du parasite sur l'île. Ainsi les selles de 259 chiens, originaires de 31 communes, ont été collectées afin de rechercher *E. granulosus* par PCR multiplex en temps réel, en utilisant des marqueurs mitochondriaux (*nad1* et *nad5*). La plupart des animaux prélevés était des chiens de chasse (78%) et 21% étaient utilisés intégralement ou partiellement pour la garde des animaux de rente. *Echinococcus canadensis* G6/G7 a été retrouvé dans trois échantillons de fèces (1.2% ; IC95% [0.2 - 3.3%]) alors que *E. granulosus* s.s., dont la présence a également été recherchée, n'a jamais été identifié.

La preuve de la réalisation du cycle complet d'*E. canadensis* G6/G7 en Corse, entre le chien (hôte définitif) et les suidés (hôtes intermédiaires), met en lumière les risques d'infestation chez l'homme. Parallèlement aux prélèvements de fèces, des entretiens, réalisés auprès des propriétaires des chiens, ont confirmé des pratiques à risque (cf. chapitre 3). Les porcs sont souvent abattus directement à la ferme, en dehors de tout contrôle sanitaire, et les sangliers sont dépecés dans la nature en fin de battue de chasse. Dans les deux cas, les chiens d'élevage et/ou de chasse ont directement accès aux viscères contaminées, permettant ainsi la réalisation complète du cycle parasitaire. Une étude récente, basée sur le nombre d'exérèses de kystes hydatiques par an dans les hôpitaux, a montré que les cas humains d'échinococcose kystique sont beaucoup plus nombreux en Corse qu'en France continentale, soulevant ainsi la question du réel potentiel zoonotique de *E. granulosus* G6/G7 (Van Caeteren et al., 2016). Seule une analyse moléculaire des kystes hydatiques des patients pourrait prouver que ces cas sont effectivement dus à *E. canadensis* G6/G7, ce qui aujourd'hui n'est pas réalisé dans les hôpitaux qui pratiquent les exérèses de kystes hydatiques. L'absence de détection d'*E. granulosus* s.s. ne signifie pas que la parasite ne circule pas en Corse. Mais ses hôtes intermédiaires, les ruminants domestiques, sont abattus jeunes pour les bovins (huit à 12 mois) ou très jeunes pour les ovins (deux à trois mois), ce qui limite considérablement les chances d'infestation des animaux. L'article scientifique sur la recherche d'*E. granulosus* chez le chien est inclus en intégralité dans la thèse en annexe 3 (page 215).

### 7.3. Le virus Toscana

Dahmani, M., Alwassouf, S., **Grech-Angelini, S.**, Marié, J. L., Davoust, B., & Charrel, R. N. (2016). Seroprevalence of Toscana virus in dogs from Corsica, France. *Parasites & vectors*. 9(1), 381. **Annexe 4**, pages 229.

Le virus Toscana est un arbovirus appartenant à la famille des *Nairoviridae* et au genre *Phlebovirus*, il est transmis par les femelles phlébotomes (genre *Phlebotomus*). Même si l'infection humaine est souvent asymptomatique, elle peut parfois entraîner des troubles graves comme des méningites ou

des encéphalites. Plusieurs cas ont été diagnostiqués en France continentale et même si aucun foyer n'a été identifié en Corse, la séroprévalence chez les donneurs de sang a été évaluée à près de 9% en 2007. Le virus a également été détecté chez un phlébotome collecté sur l'île en 2010 (Bichaud et al., 2014). Sachant que le chien est sensible au virus Toscana, et que l'infection est asymptomatique chez lui, il représente un potentiel réservoir du virus et il est également une bonne sentinelle pour surveiller la circulation virale. L'objectif de cette étude est d'estimer la séroprévalence du virus Toscana chez le chien en Corse, et ainsi mieux caractériser le risque d'exposition de la population humaine.

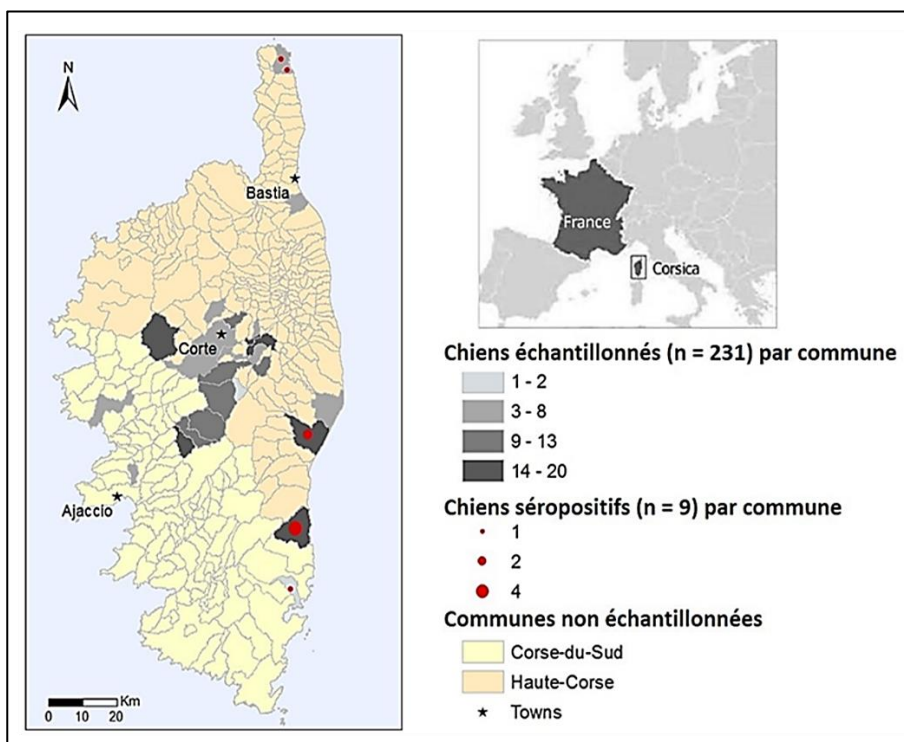


Figure 26. Localisation des communes échantillonnées et des animaux séropositifs au virus Toscana

Entre 2013 et 2014, 231 sérums de chiens originaires de 26 communes, et majoritairement élevés pour la chasse aux sangliers, ont été prélevés (Figure 26). Les sérums ont été analysés avec un test basé sur la microneutralisation du virus. Neuf sérums ont présenté des anticorps, soit 3,9% des chiens testés. Les chiens positifs étaient localisés sur la côte orientale, alors qu'en centre Corse, d'où provenaient de nombreux chiens, aucun animal séropositif n'a été identifié. Cette disparité géographique est vraisemblablement due à la forte diminution de l'activité des phlébotomes à des altitudes élevées (> 500m). De plus, la leishmaniose canine, due à *Leishmania infantum* et vectorisée également par les phlébotomes, est enzootique en Corse. Les colliers répulsifs sont couramment utilisés pour lutter contre la maladie, ce qui pourrait expliquer un niveau de séroprévalence plus bas du virus Toscana que celui relevé par d'autres études menées en zone méditerranéenne. Ces résultats confirment la circulation du virus Toscana en Corse et des tests sérologiques devraient être préconisés

notamment pour les patients originaires de la côte orientale (où les chiens séropositifs ont été détectés), et souffrant d'un syndrome fébrile avec des signes d'encéphalites ou de méningites. L'article scientifique est inclus en intégralité dans la thèse en annexe 4 (page 229).

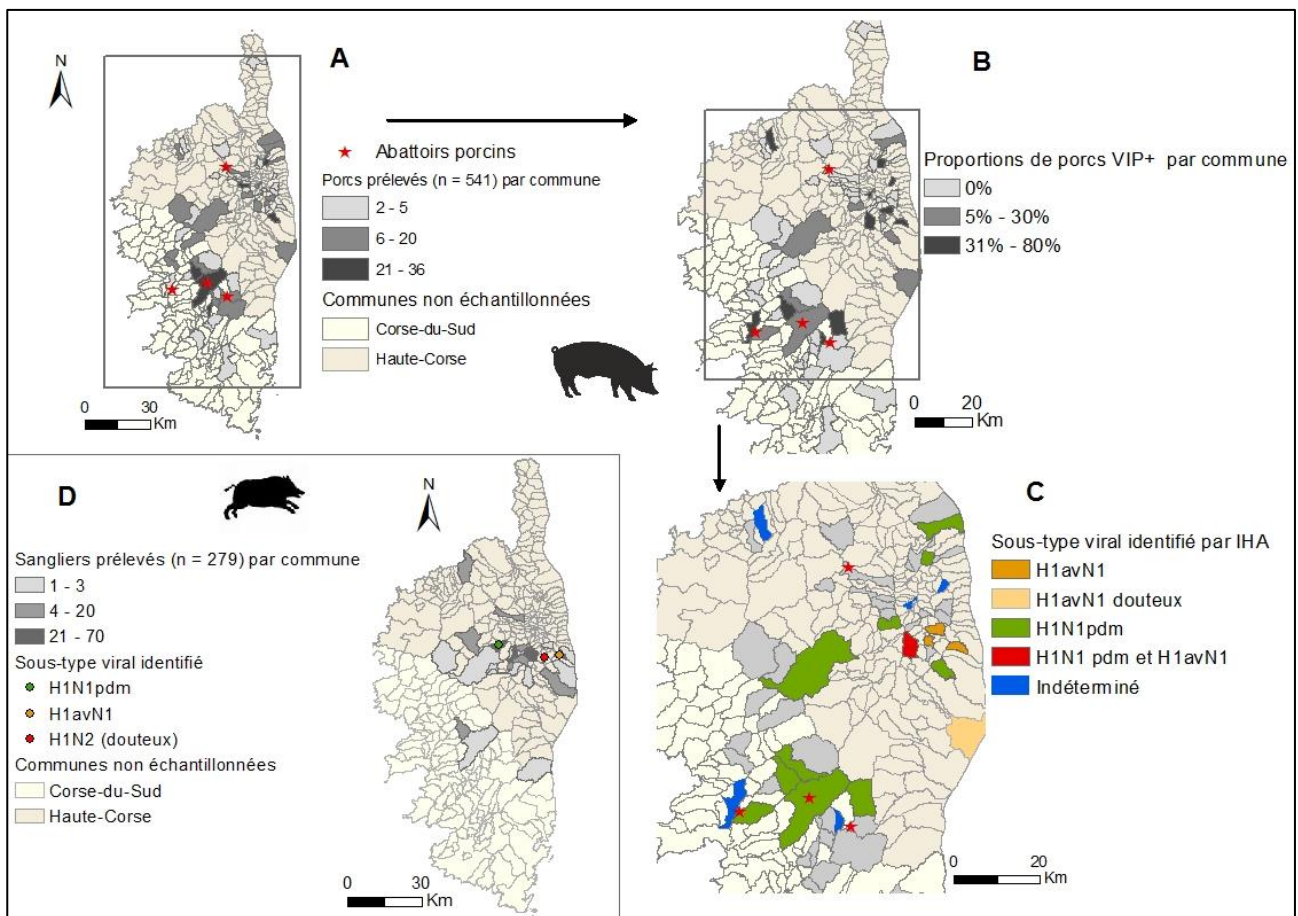
#### 7.4. Les virus influenza porcins

**Grech-Angelini, S.**, Hervé, S., Rose, N., Barbier, N., Casabianca, F., Maestrini, O., Falchi, A., Simon, G. (2018). Serological survey of influenza A viruses in domestic and wild Suidae in Corsica (France), a Mediterranean island environment. *Preventive veterinary medicine*, 157, 94-98. **Annexe 5**, page 239.

L'élevage de porcs est de type semi extensif en Corse (cf. 3.2). Les animaux, laissés libre sur le parcours la majorité du temps, sont en perpétuelles interactions avec les sangliers. Aucun cas de grippe porcine n'a été identifié en Corse mais le faible suivi sanitaire de la filière porcine insulaire pourrait, en partie, expliquer l'absence de détection de foyers. D'autant plus que la maladie, souvent bénigne, s'exprime sous la forme d'un syndrome respiratoire fébrile, peu spécifique. Les virus influenza porcins concernent doublement la santé publique car (i) ils sont reconnus comme des agents zoonotiques (Myers et al., 2007) et, (ii) comme les porcs peuvent s'infecter avec des virus influenza provenant d'hôtes divers, le réassortiment des gènes de différents virus grippaux (Olsen et al., 2000) peut créer de nouveaux virus potentiellement zoonotiques et plus pathogènes pour l'homme que les virus parentaux. Le virus H1N1pdm responsable de la pandémie en 2009 contenait des gènes provenant de VIP. Le virus H1N1pdm, jamais détecté dans l'espèce porcine avant son émergence chez l'homme, a ensuite été transmis aux porcs jusqu'à devenir enzootique dans de nombreuses populations porcines à travers le monde. Aujourd'hui quatre sous-types génétiques sont reconnus comme enzootiques chez les porcs en Europe : « *avian-like swine H1N1* » (H1avN1), « *human-like reassortant swine H3N2* » (H3N2), « *human-like swine H1N2* » (H1huN2) et « *pandemic-like swine H1N1* » (H1N1pdm). En plus du poids économique que la grippe porcine fait peser sur les élevages porcins, notamment en cas de co-infection, il est nécessaire de surveiller la circulation des virus influenza chez le porc pour prévenir les émergences dans la population humaine. L'objectif de cette étude était d'évaluer la séroprévalence des virus influenza de type A dans les populations de suidés domestiques et sauvages, et de connaître les différents sous-types et lignages génétiques du virus qui circuleraient en Corse et pourraient affecter l'homme.

Les sérums des porcs ont été collectés dans les quatre abattoirs porcins de l'île durant la saison d'abattage 2013-2014, de novembre à fin avril (Figure 27A). Les lieux d'élevage et les propriétaires des animaux ont été retrouvés grâce au système national d'identification des animaux. La taille de l'échantillonnage a été calculée en se basant sur la séroprévalence connue en France continentale,

entre 20 et 25% des porcs (Hervé et al., 2011), et sur le nombre de porcs officiellement abattus chaque année en Corse (n = 9 000). La situation de la Corse vis-à-vis des VIP étant inconnue, la taille de l'échantillon a ensuite pratiquement été doublée par précaution. Les sérums de sangliers ont été collectés par des chasseurs durant quatre saisons de chasse, entre 2009 et 2014 (Figure 27D). Les sérums ont tous été testés en ELISA (kit ID-Vet, Montpellier, France) afin de détecter les anticorps dirigés contre tous les virus influenza A. Les sérums positifs ou douteux en ELISA ont ensuite subi un test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) avec des antigènes de référence dans l'objectif d'identifier les sous-types et lignages viraux en cause.



**Figure 27. Localisation de la zone échantillonnée et des animaux VIP positifs (A : porcs prélevés par commune ; B : Porcs VIP positifs ; C : Lignées virales identifiées chez les porcs ; D : sangliers prélevés et lignées virales identifiées)**

Un total de 543 porcs issus de 91 élevages répartis sur 56 communes a été prélevé (Figure 27A). La séroprévalence au niveau des animaux était de 16,4% (IC95% 9,9 – 26,3) (Figure 27B). Parmi les 91 élevages échantillonnés, 26,4% (n = 24, IC95% 17,7 – 36,7) avaient au moins un animal séropositif. Dans les élevages classés positifs aux VIP, 35,2% (IC95% 24,7 – 45,7) des animaux étaient

séropositifs. Parmi les 80 animaux séropositifs, 66,2% l'étaient pour le lignage virale H1N1pdm, 15% pour le lignage H1avN1 et 1,3% étaient douteux pour ce dernier. Aucun animal n'a été retrouvé positif vis-à-vis de plusieurs lignages et pour 17,5% des animaux VIP positifs en ELISA et testés en IHA le lignage génétique n'a pu être défini (Figure 27C). Concernant les sangliers, 279 sérums ont été collectés dans 25 communes différentes (Figure 27D). Quatre sérums étaient positifs en test ELISA soit une séroprévalence estimée de 1,4% (IC95% 0,4 – 3,6). Deux sérums de sangliers avaient des anticorps dirigés contre le virus H1avN1, un contre le virus H1N1pdm et le dernier était douteux vis-à-vis du sous-type H1huN2.

En France continentale et en Italie, bien qu'aucune étude sérologique n'ait été menée depuis la pandémie de 2009, les animaux semblent plus exposés aux VIP qu'en Corse puisque les séroprévalences étaient respectivement de 23,2% (Hervé et al, 2011) et 63% (Van Reeth et al., 2008). Dans de nombreuses zones du monde, où les porcs étaient indemnes de VIP avant la pandémie de 2009, les études sérologiques ont démontré que ces porcs immunologiquement naïfs avaient fortement été exposés au virus H1N1pdm. Aucune donnée n'est disponible sur la situation de la Corse avant 2009, mais la présence d'anticorps dirigés contre le virus H1avN1 suggère que les cheptels avaient été exposés aux VIP avant la pandémie. Afin de confirmer la circulation de deux souches virales en Corse, H1N1pdm et H1avN1, il est nécessaire de poursuivre les recherches et d'identifier ces virus en prélevant des porcs présentant des symptômes respiratoires aigus. L'article scientifique est inclus en intégralité dans la thèse en annexe 5 (page 239).

## 8. Discussion générale et perspectives

Avant 2014 et le lancement de cette étude par l'INRA de Corte, le CIRAD (unité ASTRE) et l'ANSES de Maisons-Alfort (UMR BIPAR), la situation des tiques et des agents pathogènes qu'elles transmettent était méconnue en Corse. Ce manque était préjudiciable, en premier lieu, aux professionnels de la santé humaine et animale qui ne disposaient pas des connaissances nécessaires pour diagnostiquer les pathologies dues à ces micro-organismes.

### 8.1. Principaux apports sur les données épidémiologiques concernant les tiques en Corse

#### 8.1.1. La connaissance des espèces de tiques présentes sur le territoire

Neuf espèces de tiques ont été identifiées en Corse : *Rh. bursa*, *Rh. sanguineus* s.l., *Rh. (Bo.) annulatus*, *Hy. marginatum*, *Hy. scupense*, *Ha. punctata*, *Ha. sulcata*, *I. ricinus* et *D. marginatus* (chapitre 4 et Grech-Angelini et al., 2016a et 2016b). Les deux espèces majoritaires, *Rh. bursa* et *Hy. marginatum*, sont des tiques typiquement méditerranéennes, mais la forte densité des *Hy. marginatum* est par contre assez inédite pour une île du Sud-Ouest de l'Europe. Les collectes importantes de *I. ricinus* et de *Hy. scupense*, sur les bovins, sont plus surprenantes. Bien que ces deux espèces soient également des tiques endémiques du milieu méditerranéen, *I. ricinus* est habituellement détectée dans des zones réputées humides alors que *Hy. scupense*, à l'inverse, dans des zones plus chaudes.

Cette étude a également fourni des informations sur les préférences d'hôte, les périodes d'activité et la distribution géographique des différentes espèces de tiques. *Hyalomma marginatum* et *Rh. bursa* apparaissent implantées sur une grande partie du territoire alors que d'autres espèces semblent se cantonner à certaines zones (*I. ricinus*, *Rh. (Bo.) annulatus*) probablement en lien avec des biotopes qui leur sont favorables. Les périodes d'activités des différentes espèces ont montré des variations. *Hyalomma marginatum* a été principalement active d'avril à juillet, *Rh. bursa* de mai à août, *Hy. scupense* a eu son pic d'activité durant la période hivernale et *I. ricinus* au début de l'automne. *Haemaphysalis punctata* a été plus active de septembre à décembre. La distribution de *Rh. sanguineus* et *D. marginatus* ont été liées aux collectes de l'hôte pour lequel ces deux espèces ont montré une forte spécificité d'infestation, respectivement le chien et le sanglier.

Pour lutter efficacement contre les tiques, et plus largement contre les agents pathogènes qu'elles transmettent, la compréhension de l'écologie et de la biologie des espèces dans leur biotope est essentielle. Concernant *Hy. scupense*, *Hy. marginatum* et *I. ricinus*, dont l'importance médicale et/ou sanitaire est primordiale, des études ciblées devront être menées afin de mieux appréhender leur écobiologie et identifier les facteurs responsables de leur présence élevée, sur l'ensemble du territoire



insulaire ou sur quelques localités. Ainsi, un suivi annuel de plusieurs troupeaux dont l'infestation pour chacune de ces trois espèces s'est révélée importante durant cette étude permettrait d'obtenir des données plus exhaustives. Dans l'hypothèse d'une émergence du virus CCHF, le contrôle de l'espèce vectrice, *Hy. marginatum*, apparaît complexe dans le contexte corse. Les bovins et de nombreux chevaux, les hôtes de prédilection des adultes *Hy. marginatum*, sont souvent lâchés dans leur environnement et les traitements acaricides leur sont administrés de façon irrégulière. Ces animaux constituent autant de proies disponibles pour que les tiques réalisent leur cycle de vie et que les femelles *Hy. marginatum* pondent après leur ultime repas sanguin. La solution adoptée au début des années 2000 par les instances sanitaires pour lutter contre la propagation du virus de la FCO avait été la distribution gratuite de deltaméthrine en *pour-on* pour afin de limiter les piqures de culicoïdes.

Concernant *Hy. scupense* et *I. ricinus* moins largement distribuées sur le territoire que *Hy. marginatum*, une description précise des biotopes où les animaux infestés vivent fournirait de nouveaux éléments pour comprendre l'écobiologie de ces deux espèces. L'exemple de *Hy. scupense* est assez remarquable (4.5.2 et Grech-Angelini et al., 2016b). L'espèce est reconnue comme endophile et principalement active durant les mois chauds de l'été en Afrique du Nord. A l'inverse, en Corse, *Hy. scupense* a été principalement collectée en hiver et au regard de la spécificité de l'élevage bovin insulaire qui ne comprend pas d'étables, elle devrait être exophile. En Afrique du Nord, la lutte menée contre la theilériose bovine tropicale repose principalement sur la diminution de l'exposition des bovins à son vecteur. *Hyalomma scupense* vit durant ses phases libres dans les trous des bâtiments d'élevages. Les traitements acarides des bâtiments ainsi que la construction d'étables possédant des murs sans fissures et des sols lisses sont ainsi préconisés. L'espèce n'étant probablement pas endophile en Corse, en cas d'émergence de la theilériose bovine tropicale, les méthodes de lutte employées devront s'adapter à l'écobiologie de *Hy. scupense* qui doit être approfondie.

### 8.1.2. Un profil de tiques atypique dans le bassin méditerranéen

Les études concernant les populations de tiques collectées dans différentes régions méditerranéennes n'étant pas conduites dans les mêmes conditions (hôtes animaux, saison des collectes), les comparaisons sont à utiliser avec prudence et servent uniquement d'indicateurs. En France continentale, selon les régions, les espèces de tiques les plus souvent identifiées sur les bovins sont : *I. ricinus*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *Ha. punctata* et *Rh. bursa* (Eid-Pérez, 2007 ; Agoulon et Plantard, 2012). En Italie continentale, une étude menée dans la région du Latium (côte occidentale), distante de 200 km de la Corse, a identifié cinq espèces de tiques : *Rh. (Bo.) annulatus*, *Rh. bursa*, *Rh. sanguineus* s.l., *Hy. marginatum* et *D. marginatus* dans l'ordre d'importance des collectes (Toma

et al., 2017), alors qu'une revue bibliographique, réalisée sur les tiques des ruminants domestiques indique que *I. ricinus* et *D. marginatus* sont les principales espèces infestant ces animaux (Genchi et Manfredi, 1999).

Le profil de la population des tiques des quelques îles méditerranéennes a montré une dominance du genre *Rhipicephalus* : *Rh. sanguineus* s.l. et *Rh. bursa* pour la Sardaigne (Chisu et al., 2018), la Sicile (Torina et al., 2006), Chypre (Tsatsaris et al., 2016) et Céphalonie (Grèce, Psaroulaki et al., 2006), et *Rh. bursa* et *Rh. (Bo.) annulatus* pour les Iles Baléares (Castellà et al., 2001) qui, à l'instar de la Corse, se démarquent des autres îles par la forte présence de *Hy. marginatum* (cf. 1.5, Tableau 3).

Bien que les conditions climatiques interviennent et que des variations puissent être observées en fonction de la zone d'étude (l'altitude notamment), les espèces de tiques les plus souvent majoritaires dans les collectes réalisées en Afrique du Nord appartiennent au genre *Hyalomma* (Bouattour et al., 1996 et 1999). La forte proportion de *Hyalomma* spp. confère ainsi à la Corse des caractéristiques d'un profil nord-africain. A des latitudes comparables, *Hy. scupense* n'est que très ponctuellement signalée. Dans les années 1990, l'espèce a été signalée dans le sud-ouest de la France (Macaigne et Pérez-Eid, 1993) et plus récemment sur la petite italienne de Pianosa, distante de 40 Km de la côte orientale de la Corse (Tomassone et al., 2013). La présence de *Hy. scupense* en Corse restant inexplicée, des études phylogénétiques comparables à celles réalisées concernant le schistosome identifié dans cette étude (Cf. 7.1) permettraient de déterminer l'origine géographique de la population de *Hy. scupense* et ainsi d'établir des hypothèses sur son installation en Corse.

*Ixodes ricinus*, une espèce réputée des zones humides, a représenté 6% des tiques collectées sur les bovins corses, alors que l'espèce semble absente (ou collectée très ponctuellement) des autres îles méditerranéennes. L'humidité et la végétation verdoyante des montagnes corses explique certainement cette particularité.

La diversité des espèces de tiques identifiées en Corse semble refléter sa variété écologique alternant les aires relativement sèches du littoral avec celles plus humides en altitude. Le système d'élevage, de type semi-extensif à extensif, et la cohabitation des animaux domestiques avec la faune sauvage participent au maintien des cycles biologiques des différentes espèces, expliquant probablement aussi en partie cette diversité. La Corse apparaît comme un cas relativement atypique dans le bassin méditerranéen, et sa population de tiques pourrait être qualifiée, par une antithèse, de type « afro-humido-méditerranéen ».

## 8.2. Principaux apports concernant les agents pathogènes transmis par les tiques en Corse

### 8.2.1. Caractérisation des agents pathogènes transmis par les tiques

Les études menées sur les agents pathogènes transmis par les tiques se focalisent souvent sur quelques espèces ou genres de bactéries et parasites, voir, plus rarement, sur des virus. Parmi les derniers travaux recensés en Corse, l'un concernait *Anaplasma ovis* chez les chèvres (Cabeza-Cruz et al., 2019) et un autre le genre *Anaplasma* (Dahmani et al., 2017). Ces études permettent le signalement ou la description précise d'un, ou des, agent(s) pathogène(s) ciblé(s), alors que l'objectif poursuivi ici était de fournir une image la plus complète possible de la situation de la Corse vis-à-vis des agents pathogènes transmis par les tiques. Le protocole mis en place a permis, à partir de l'identification de la séquence génétique d'un agent pathogène dans une tique de remonter jusqu'à l'hôte animal et ainsi définir les zones d'expositions potentielles des populations humaines et animales à ces micro-organismes.

L'utilisation du système de PCR microfluidique en temps réel à haut débit (Biomark™ dynamic array, Fluidigm, USA), mis au point à l'ANSES de Maisons-Alfort, a permis la recherche simultanée de 41 agents pathogènes (29 bactéries, 12 parasites) dans chaque pool de tiques analysé. Près de la moitié des pools (48%) était porteur de l'ADN d'au moins un micro-organisme et onze agents pathogènes ont été identifiés. La présence de *Rickettsia aeschlimannii* (23% des pools), *Rickettsia slovaca* (5%), *Anaplasma marginale* (4%) et *Theileria equi* (0.4%) a ainsi été confirmée en Corse, alors que *Anaplasma phagocytophilum* (16%), *Rickettsia helvetica* (1%), *Borrelia afzelii* (0.7%), *Borrelia miyamotoi* (1%), *Bartonella henselae* (2%), *Babesia bigemina* (2%) et *Babesia ovis* (0.5%) ont été détectés pour la première fois. L'une des caractéristiques du profil des agents pathogènes transmis par les tiques en Corse est la domination des espèces des genres *Rickettsia* et *Anaplasma*, identifiées respectivement dans 29% et 19% des échantillons analysés.

La collecte sur de multiples hôtes animaux et l'identification d'agents pathogènes spécifiques chez certains a également permis de suggérer le rôle des animaux comme réservoirs d'agents zoonotiques. Parmi les 11 agents pathogènes détectés sept sont zoonotiques : *B. miyamotoi*, *B. afzelii*, *R. aeschlimannii*, *R. slovaca*, *R. helvetica*, *A. phagocytophilum* et *Bar. henselae*. Ainsi, 83% des séquences d'ADN des bactéries *R. slovaca* identifiées dans cette étude ont été retrouvées chez le sanglier qui pourrait être un réservoir de la bactérie. Les ADNs de *Rickettsia helvetica* et de toutes les *Borrelia* spp. ont été détectés uniquement dans des tiques collectées sur des bovins. La prévalence estimée de l'ADN de *R. aeschlimannii* dans les pools de tiques analysés était de 23%, dont 100% des

*Hy. marginatum*, suggérant que de nombreux animaux pourraient être réservoirs de cette bactérie et qu'il existe une potentielle importante exposition de la population humaine.

La détection de l'ADN des agents pathogènes dans une tique ne prouve pas la compétence de celle-ci à transmettre le micro-organisme. La collecte sur animaux donnant accès à des tiques gorgées les séquences génétiques identifiées pourraient être des traces d'ADN de l'agent pathogène récupéré par la tique lors de son repas sanguin sur un animal infecté. Cependant cette étude a aussi montré que l'ADN des différents micro-organismes était le plus souvent identifié dans leurs tiques vectrices respectives. Ainsi 70% des *R. aeschlimannii* ont été détectés dans les *Hy. marginatum*, 86% des *R. slovaca* dans les *D. marginatus*, 80% des *A. phagocytophilum* dans les *I. ricinus*, plus de 60% des *A. marginale* dans les tiques du genre *Rhipicephalus* et toutes les espèces de *Babesia* ont été identifiées dans les *Rh. bursa*. Ces identifications spécifiques de l'agent pathogène dans son vecteur sont une indication en faveur de la circulation réelle de ces micro-organismes entre la tique et l'animal. Mais seules des analyses sérologiques chez l'homme et l'animal et l'isolement des agents pathogènes prouveront la circulation effective de ces 11 micro-organismes en Corse.

### **8.2.2. Agents pathogènes transmis par les tiques, la situation de la Corse par rapport au bassin méditerranéen**

Le profil des agents pathogènes détectés dans cette étude a « logiquement » reflété le panel des vecteurs présents en Corse. Les 11 micro-organismes identifiés sont régulièrement détectés dans les régions du bassin méditerranéen où leurs tiques vectrices sont installées. Ainsi *R. aeschlimannii*, l'agent pathogène le plus souvent retrouvé dans les tiques corses, a été détecté pour la première fois au Maroc en 1997 (Beati et al., 1997) et est aujourd'hui recensé dans une grande partie de la zone où son principal vecteur, *Hy. marginatum*, est présent. Les espèces du genre *Borrelia*, dépendantes de leur vecteur naturel, *I. ricinus* principalement dans le bassin méditerranéen, ne sont retrouvées que dans les zones relativement humides. Ainsi en Sicile et en Sardaigne, deux îles au climat plus sec que la Corse, *I. ricinus* n'est que très rarement collectée (cf. 8.2.1) et les *Borrelia* spp. n'y ont pas été recherchées. A l'inverse, dans certaines régions réputées humides d'Afrique du Nord, des espèces de *Borrelia* ont déjà été identifiées dans des *I. ricinus* (Sarih et al., 2003 ; Benredjem et al., 2014).

Le matériel génétique de certains agents pathogènes à fort impact médical ou sanitaire n'a pas été détecté dans les tiques analysées mais la présence du vecteur combinée à celle de l'agent pathogène dans des régions voisines de la Corse suggèrent pour le moins un risque d'émergence. Ainsi, *Theileria annulata* n'a pas été identifié et aucun cas de theilériose bovine tropicale n'a jusqu'à aujourd'hui été recensé en Corse malgré une forte suspicion en 2008 qui s'est finalement révélée négative (Cf.4.1.2). Le parasite circule en Sicile (Loria et al., 1999), sur l'île de Majorque (Ros-García et al., 2012) et en

Espagne continentale (García-Sanmartín et al., 2006) pour le sud-ouest de l'Europe, et la theilériose bovine tropicale est reconnue comme la principale pathologie affectant les bovins nord-africains (Gharbi et al., 2011). La présence d'une population installée de *Hy. scupense*, vecteur de *T. annulata*, en Corse devrait appeler les vétérinaires insulaires à une grande vigilance concernant le risque d'émergence de la theilériose bovine tropicale.

L'ARN du virus CCHF n'a pas été détecté dans les tiques, mais l'enquête sérologique réalisée chez les ruminants domestiques élevés en Corse a montré que ces animaux ont bien été exposés au virus. La DGAI a rédigé une note de service (DGAI/SDSPA/2019-88) pour informer les acteurs sanitaires, et notamment les services de l'Etat, de cette circulation virale. Le virus CCHF a déjà émergé en Europe de l'Ouest avec les premiers cas humains autochtones recensés en Espagne en 2016 (Negredo et al., 2017), et sa récente identification dans une tique collectée sur un oiseau migrateur dans l'île italienne de Ventotene (Mancuso et al, 2019) renforce l'hypothèse de sa probable présence en Corse. Les recherches afin de détecter le virus CCHF dans les tiques et tenter de l'isoler se poursuivent, elles sont primordiales pour connaître la virulence de la souche circulante et estimer les risques pour la population humaine.

### **8.3. Perspectives en termes de prévention médicale et sanitaire**

Certains agents pathogènes identifiés dans cette étude sont méconnus des acteurs de la santé animale et humaine et leurs potentiels impacts restent à évaluer.

#### **8.3.1. Perspectives sanitaires**

Les bactéries du genre *Anaplasma* ont régulièrement été identifiées dans les tiques collectées. L'ADN de *A. phagocytophilum* et *A. marginale* était présent respectivement dans près de 16% et 4% des pools de tiques analysés. *Anaplasma phagocytophilum* est responsable d'une zoonose qui affecte cliniquement les ruminants domestiques, l'anaplasmose granulocytaire ou fièvre des pâtures (cf. 2.4.2), et les chevaux. Même si les cas en France continentale sont relativement sporadiques, l'anaplasmose animale dû à *A. marginale* est la plus largement distribuée dans le monde. Ces deux bactéries du genre *Anaplasma*, et/ou les anticorps dirigés contre elles, ne sont jamais recherchées chez les animaux alors que cette étude suggère leur circulation en Corse et qu'elles pourraient être responsables de cas cliniques. Concernant les espèces du *Rickettsia*, leur pouvoir pathogène est très discuté chez l'animal et reste pour l'heure à démontrer (Davoust et al., 2010). Au regard de leur forte présence dans les tiques analysées, un tableau clinique pourrait être associé à ces rickettsies, notamment lors de pathologies dont l'origine est polyfactorielle, ou chez des animaux immunodéprimés dont le parasitisme interne est mal géré. La recherche sérologique des anticorps

dirigés contre ces bactéries serait à préconiser dans ces situations, au moins dans un cadre expérimental au départ, afin d'investiguer le rôle réservoir que pourrait jouer les animaux et décrire leur pathogénicité chez l'animal.

### **8.3.2. Surveillance des réservoirs animaux d'agents pathogènes zoonotiques**

Sept agents pathogènes détectés dans les tiques collectées sur des animaux étant zoonotiques, l'existence de multiples réservoirs animaux est soulevée par cette étude. En France, les maladies animales qui font l'objet de mesures systématiques de maîtrise sont celles classées comme danger sanitaire (DS) de catégorie 1 principalement. Cette surveillance est organisée par les instances sanitaires et repose essentiellement sur les campagnes de prophylaxies réalisées par les vétérinaires sanitaires et les prélèvements en abattoirs. Les dangers sanitaires faisant l'objet de mesures de contrôles systématiques en Corse sont la brucellose (due à *Brucella* spp.) pour les bovins, ovins et caprins, la tuberculose bovine (*Mycobacterium bovis*) et la leucose bovine enzootique (rétrovirus du genre Deltarétrovirus) pour les bovins, la fièvre catarrhale ovine (FCO ; *blue tongue virus*, BTV) pour les ovins, bovins et caprins (vaccination obligatoire jusqu'au 30 septembre 2019) et la trichinellose (*Trichinella* spp.) pour les porcins. La brucellose (fièvre de Malte), la tuberculose bovine et la trichinellose sont des zoonoses. Aucun autre agent pathogène n'est surveillé et le statut des animaux vis-à-vis des agents zoonotiques n'est connu que ponctuellement lorsqu'un Institut de recherche conduit une enquête sérologique, comme cela a été le cas dans cette étude pour le virus CCHF, le virus Toscana, les virus influenza porcins et le schistosome responsable de la bilharziose uro-génitale.

En dehors du contrôle obligatoire des dangers sanitaires, des réseaux spécialisés de surveillance existent. Le réseau d'épidémiologie-surveillance en pathologie équine (Respe) permet la surveillance des maladies infectieuses, parasitaires ou d'origine toxique qui atteignent les équidés en se basant sur des vétérinaires sentinelles volontaires exerçant dans toute la France. Trois agents pathogènes transmis par les tiques sont surveillés par le Respe : *T. equi*, *B. caballi* et *A. phagocytophilum*, responsables de maladies du type piroplasmose (*Syndrome Piro-like*). La surveillance des pathologies de la faune sauvage (oiseaux et mammifères) est aussi organisée au niveau national par le réseau SAGIR, piloté par l'ONCFS et l'ANSES. Le réseau est organisé principalement autour de chasseurs volontaires qui réalisent des prélèvements dans la nature. Le réseau SAGIR permet ainsi la surveillance d'agents zoonotiques dont les animaux constituent un réservoir, notamment le virus West Nile avec les oiseaux. Ce système de surveillance existe également en santé humaine avec le réseau Sentinelles qui repose sur des médecins généralistes volontaires. Ce réseau prend en compte, au niveau national, 10 indicateurs de santé dont la maladie de la Lyme, qui est la seule maladie zoonotique transmise par les

tiques à bénéficier d'une surveillance active. Concernant la surveillance passive, parmi les zoonoses provoquées par des agents pathogènes transmis par les tiques, les fièvres hémorragiques, dont la CCHF, figurent dans la liste des maladies à déclaration obligatoire (MDO) en France.

Un réseau de surveillance des agents pathogènes zoonotiques transmis par les tiques pourrait s'articuler, à l'instar du Respe pour les chevaux, autour de vétérinaires volontaires et faire de la Corse une zone pilote dans la surveillance des agents zoonotiques transmis par les tiques. La prophylaxie obligatoire pourrait servir de cadre à ce réseau. Une première collaboration a été mise en place entre l'unité ASTRE du CIRAD et le GTV Corse pour le suivi de la circulation du virus CCHF. Durant la saison de prophylaxie 2019/2020, les vétérinaires sanitaires seront chargés de collecter des sérums de ruminants et des tiques de l'espèce *Hy. marginatum*. La création de ce réseau sentinelle de vétérinaires pourrait, à moyen terme, concerner d'autres zoonoses d'importance médicale avérée en fonction des besoins et des émergences. En créant de l'activité vétérinaire, ce réseau serait également un élément de réponse à la problématique de la désertification sanitaire des zones rurales.

Le modèle de collectes des tiques de bovins en abattoirs s'est révélé efficace (Grech-Angelini et al., 2016a). La logistique est simple et peu coûteuse, comparée à des prélèvements effectués en élevages. Les taux d'infestation des bovins se sont révélés élevés toute l'année, la majorité des espèces de tiques identifiées en Corse (huit sur neuf) ont parasité les bovins, et des tiques d'une grande partie du territoire ont pu être collectées rapidement. La systématisation des collectes en abattoirs pourrait permettre d'anticiper l'introduction, notamment par la voie des oiseaux migrateurs, et l'installation de nouvelles espèces de tiques, et par là même l'émergence de pathologies exotiques, à condition que ces tiques aient un tropisme pour l'espèce bovine. Ce modèle de surveillance existe déjà pour la FCO sur l'île, une cinquantaine de prélèvements sont réalisés mensuellement dans les abattoirs de Corse-du-Sud et de Haute-Corse afin de contrôler les sérotypes de ce virus qui circulent.

### **8.3.3. Perspectives dans le domaine médical**

L'homme n'est pas une proie habituelle des tiques, mais il est tout de même victime de leurs piqûres, et la majorité des agents pathogènes transmis sont zoonotiques. Certains d'entre eux font partie des plus émergents dans le monde aujourd'hui (*Borrelia* s.l. responsable de la maladie de Lyme et virus TBE notamment). Les interactions (décrites dans le chapitre 3) entre l'homme, les animaux domestiques et la faune sauvage sont multiples en Corse, favorisant ainsi l'exposition des populations humaines aux piqûres de tiques. Une enquête devra en premier lieu estimer la fréquence des piqûres et les espèces de tiques qui s'attaquent à l'homme dans les populations les plus à risques de l'île que sont notamment les éleveurs, les randonneurs et les chasseurs. Aucune donnée n'est actuellement disponible dans ce domaine en Corse. L'utilisation de l'application « signalement tiques », par les

populations les plus à risque, issues du projet de science participative Citique, développé par l'INRA, la DGS et le Centre National de Référence des *Borrelia*, pourrait être un outil adapté, facile d'utilisation.

Concernant la borréliose de Lyme, durant des dizaines années il a été considéré que la tique vectrice, *Ixodes ricinus*, qui préfère les zones humides, ne pouvait pas vivre dans le climat jugé relativement sec de l'île. Ainsi, peu ou pas de médecins réalisaient des sérologies concernant la maladie de Lyme chez des patients piqués par des tiques, ce qui a pu induire un défaut de diagnostic préjudiciable. Des cas cliniques autochtones ont maintenant été recensés en Corse par le CNR des *Borrelia* et Santé Publique France (Vandenesch et al., 2014). Cette étude aura prouvé que le vecteur, *I. ricinus*, préalablement signalé (Pérez-Eid, 2007), et l'ADN de *Borrelia afzelii*, une des bactéries responsables de la maladie de Lyme, sont bien présents en Corse. *Borrelia afzelii* a été détecté dans neuf communes et dans 5% des *I. ricinus* collectées suggérant une potentielle pression d'exposition sur les populations locales. Une enquête devra déterminer si dans ces zones, l'incidence de la maladie de Lyme n'est pas spécifiquement élevée et si les patients atteints ont tous été diagnostiqués. L'exemple de la borréliose de Lyme devrait appeler à une plus grande vigilance concernant les autres agents pathogènes détectés dans cette étude et qui sont pour la plupart d'entre eux encore relativement inconnus des professionnels de la santé.

Même si l'anaplasmose granulocytaire humaine (AGH), due à *A. phagocytophilum*, et les fièvres récurrentes dues à *B. miyamotoi* sont des zoonoses reconnues peu fréquentes dans les régions voisines de la Corse, des cas non diagnostiqués pourraient exister sur l'île. Un peu plus de 200 demandes de recherches sérologiques de *Rickettsia* spp. sont faites par an aux laboratoires d'analyses (Canarelli-Colonna-Fernandez) qui couvrent environ un tiers de la population corse. Les espèces recherchées sont *R. conorii*, la bactérie responsable de fièvre boutonneuse méditerranéenne et *R. typhi*. Les trois espèces de *Rickettsia* détectées dans les tiques corses (*R. aeschlimannii*, *R. slovaca* et *R. helvetica*) n'étant pas incluses dans les recherches sérologiques, la détection de leurs anticorps chez l'homme n'est pas envisageable aujourd'hui. L'Ordre des médecins de Corse et les laboratoires d'analyses locaux ont été informés des résultats de cette étude et les recherches concernant les anticorps dirigés contre les *Rickettsia* spp. devraient être prochainement élargies aux espèces de *Rickettsia* identifiées dans cette étude.

Bien qu'aucune conclusion ne puisse être apportée tant que le virus CCHF n'aura pas été isolé, la découverte d'anticorps chez les ruminants est en faveur de la circulation d'une souche atténuée. En effet, le tableau clinique de la CCHF s'apparente parfois à un syndrome fébrile peu spécifique, mais



des symptômes beaucoup plus sévères, dont de multiples lésions hémorragiques, ne passeraient pas inaperçus si un variant virulent circulait d'ores et déjà chez l'homme.

## Conclusion générale

Les tiques et les agents pathogènes qu'elles transmettent n'étaient que très peu connus en Corse. Cette étude a apporté les premiers éléments pour caractériser le risque médical et sanitaire lié aux tiques sur l'île. La collecte sur les animaux domestiques et sauvages a permis d'identifier neuf espèces de tiques issues de cinq genres : *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Ixodes* et *Haemaphysalis*. La diversité écologique de la Corse a ainsi permis l'installation aussi bien d'espèces de tiques réputées des zones humides (*I. ricinus*) que d'espèces connues des milieux plus chauds (*Hy. scupense*), conférant à la Corse un statut relativement atypique comparée à d'autres régions ou îles du bassin méditerranéen.

Les séquences génétiques de 11 agents pathogènes, issus de six genres (*Borrelia*, *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Babesia* et *Theileria*), dont huit sont zoonotiques ont été détectées dans les tiques. La recherche sérologique du virus CCHF chez les ruminants domestiques s'est révélée positive montrant ainsi que les ovins, caprins et bovins avaient été exposés au virus même s'il n'a pu être identifié dans les tiques. Ces travaux ont mis en lumière le rôle très probable de réservoir que jouent les animaux et la potentielle forte exposition de la population humaine à ces micro-organismes en Corse. D'autres agents pathogènes (notamment *T. annulata*) n'ont pas été identifiés mais la présence de la tique vectrice et leur circulation dans des régions voisines présagent de futures émergences. Ces résultats ont vocation à être diffusés aux médecins et vétérinaires insulaires afin qu'ils puissent les utiliser dans leur pratique courante. La recherche directe des agents pathogènes (isolement) détectés dans cette étude ainsi que celle des anticorps produits chez l'homme et/ou l'animal sont maintenant nécessaires pour prouver que la circulation de ces micro-organismes est effective en Corse.



## Références bibliographiques

- Agoulon, A., Plantard, O., 2012. Tiques et maladies à tiques chez les bovins en France : effet des changements globaux? *Point Vet* 2110-5154(special issue),118–23.
- Angelakis, E., Pulcini, C., Waton J., Imbert, P., Socolovschi, C., Edouards, S., Dellamonica, P., Raoult, D., 2010. Scalp eschar and neck lymphadenopathy caused by *Bartonella henselae* after Tick Bite. *Clinical Infectious Diseases*, 50: 549-551.
- Apanaskevich, D.A., Filippova, N.A., Horak, I.G., 2010. The genus *Hyalomma* Koch,1844. x. Redescription of all parasitic stages of *H. (Euhyalomma) scupense* Schulze, (= *H. detritum* Schulze) (Acari: Ixodidae) and notes on its biology. *Folia Parasitol.* 57, 69–78.
- Ashford, R.W., 2003. When is a reservoir not a reservoir? *Emerg. Infect. Dis.* 9 (11), 1495-1496
- Baddour, L. M., Wilson, W. R., Bayer, A. S., Fowler Jr, V. G., Bolger, A. F., Levison, M. E., ..., Tong, D. C, 2005. Infective endocarditis: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a statement for healthcare professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia, American Heart Association: endorsed by the Infectious Diseases Society of America. *Circulation*, 111(23), e394-e434.
- Barré, N., 1989. Biologie et écologie de la tique *Amblyomma variegatum* (Acarina : Ixodina) en Guadeloupe (Antilles Françaises). Doctoral dissertation, Paris 11.
- Beati, L., Meskini, M., Thiers, B., & Raoult, D., 1997. *Rickettsia aeschlimannii* sp. nov., a new spotted fever group rickettsia associated with *Hyalomma marginatum* ticks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 548-554.
- Benredjem, W., Leulmi, H., Bitam, I., Raoult, D., Parola, P., 2014. *Borrelia garinii* and *Rickettsia monacensis* in *Ixodes ricinus* ticks, Algeria. *Emerg. Inf. Dis. disease*, 20(10), 1776.
- Bente, D.A., Forrester, N.L., Watts DM, McAuley, A.J., Whitehouse, C.A., Bray, M., 2013. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res.* 100: 159–89.
- Bichaud, L., Izri, A., de Lamballerie, X., Moureau, G., Charrel, R.N., 2014. First detection of Toscana virus in Corsica. France *Clin Microbiol Infect.* 20(2): O101–4.
- Biteau-Coroller, F., 2006. Surveillance et évaluation du risque de transmission des maladies vectorielles émergentes : apport de la capacité vectorielle. Exemple de la fièvre catarrhale du mouton. *Doctorat Epidemiologie*: Montpellier, France. Université Montpellier II, 238 pp.
- Boissier, J., Grech-Angelini, S., Webster, B. L., Allienne, J. F., Huyse, T., Mas-Coma, S., ..., Oleaga, A. (2016). Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(8), 971-979.
- Bonnet, S., Kazimírová, M., Richardson, J., Šimo, L., 2018. Tick saliva and its role in pathogen

- transmission. In *Skin and Arthropod Vectors* (pp. 121-191). Academic Press.
- Bouattour, A., Darghouth, M. A., Miled, L. B., 1996. Cattle infestation by *Hyalomma* ticks and prevalence of *Theileria* in *H. detritum* species in Tunisia. *Veterinary Parasitology*, 65(3-4), 233-245.
- Bouattour, A., Darghouth, M. A., Daoud, A., 1999. Distribution and ecology of ticks (Acari: Ixodidae) infesting livestock in Tunisia: an overview of eighth years field collections. *Parassitologia*, 41, 5-10.
- Camicas, J. L., Morel, P. C., 1977. Position systématique et classification des tiques (Acarida : Ixodida). *Acarologia*, 18(3), 410-420.
- Casals, J., 1969. Antigenic similarity between the virus causing Crimean hemorrhagic fever and Congo virus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 131(1), 233-236.
- Castellà, J., Estrada-Peña, A., Almería, S., Ferrer, D., Gutiérrez, J., & Ortuño, A., 2001. A survey of ticks (Acari: Ixodidae) on dairy cattle on the island of Menorca in Spain. *Experimental & applied acarology*, 25(10-11), 899-908.
- Chen, Z., Yang, X., Bu, F., Yang, X., Liu, J., 2012. Morphological, biological and molecular characteristics of bisexual and parthenogenetic *Haemaphysalis longicornis*. *Veterinary parasitology*, 189(2-4), 344-352.
- Chisu, V., Foxi, C., Mannu, R., Satta, G., & Masala, G., 2018. A five-year survey of tick species and identification of tick-borne bacteria in Sardinia, Italy. *Ticks and tick-borne diseases*, 9(3), 678-681.
- Chumakov M. P., Butenko A. M., Shalunova N. V., Mart'ianova L. I., Smirnova S. E., Bashkirtsev Iu N., Zavodova T. I., Rubin S. G., Tkachenko E. A., Karmysheva V., Reingol'd V. N., Popov G. V., Savinov A. P., 1968. New data on the viral agent of Crimean hemorrhagic fever. *Voprosy Virusologii*, 13, 377.
- Cotté, V., Bonnet, S., Le Rhun, D., Le Naour, E., Chauvin, A., Boulouis, H. J., ..., Vayssier-Taussat, M., 2008. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerging infectious diseases*, 14(7), 1074.
- Dahmani, M., Alwassouf, S., Grech-Angelini, S., Marié, J. L., Davoust, B., Charrel, R. N., 2016. Seroprevalence of Toscana virus in dogs from Corsica, France. *Parasites & Vectors*. 9(1), 381.
- Davoust, B., Mediannikov, O., Marié, J. L., Socolovschi, C., Parola, P., Raoult, D., 2010. Are vertebrates reservoir hosts for *rickettsia*? *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*.
- De Cremoux, R., Rousset, E., Touratier, A., Audusseau, G., Nicollet, P., Ribaud, D., David, V., Le Pape, M., 2012. Assessment of vaccination by a phase I *Coxiella burnetii*-inactivated vaccine in goat herds in clinical Q fever situation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 64: 104-106.

- Mantke, O. D., Schädler, R., Niedrig, M., 2008. A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries. *Euro surveillance*, 13.
- Dufour, B., & Savey, M., 2006. Approche épidémiologique des zoonoses. *Bulletin Epidémiologique Anses*, 20.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J. L., & Walker, A. R., 2004. Ticks of domestic animals in the Mediterranean region. *University of Zaragoza, Spain*, 131.
- Estrada-Peña, A., Jameson, L., Medlock, J., Vatansever, Z., Tishkova, F., 2012a. Unraveling the ecological complexities of tick-associated Crimean-Congo hemorrhagic fever virus transmission: a gap analysis for the western Palearctic. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(9), 743-752.
- Estrada-Peña, A., Palomar, A. M., Santibanez, P., Sanchez, N., Habela, M. A., Portillo, A., ..., Oteo, J. A., 2012b. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerging infectious diseases*, 18(1), 179.
- Estrada-Peña, A., Mihalca, A. D., & Petney, T. N. (Eds.), 2018. Ticks of Europe and North Africa: a guide to species identification. Springer.
- Franz, J. K., Krause, A., 2003. Lyme disease (Lyme borreliosis). *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 17(2), 241-264.
- Gamisans, J., 2010. Le paysage végétal Corse, Corse, Albiana, 348 p.
- García-Sanmartín, J., Nagore, D., García-Pérez, A.L., Juste, R.A., Hurtado, A., 2006. Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. *BMC Vet. Res.* 2, 16–22.
- Genchi, C., & Manfredi, M. T., 1999. Tick species infesting ruminants in Italy: ecological and bioclimatic factors affecting the different regional distribution. *Parassitologia*, 41, 41-45.
- Gharbi, M., Touay, A., Khayeche, M., Laarif, J., Jedidi, M., Sassi, L., Dhargouth, M.A., 2011. Ranking control options for tropical theileriosis in at-risk dairy cattle in Tunisia: using benefit-cost analysis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 30, 763–778.
- Gilbert, L., Jones, L. D., Laurenson, M. K., Gould, E. A., Reid, H. W., Hudson, P. J., 2004. Ticks need not bite their red grouse hosts to infect them with louping ill virus. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(suppl\_4), S202-S205.
- Gondard, M., 2017. A la découverte des agents pathogènes et microorganismes des tiques de la zone Caraïbe par séquençage de nouvelle génération et QPCR microfluidique à haut débit (Doctoral dissertation, Paris Est).
- Grech-Angelini, S., Stachurski, F., Lancelot, R., Boissier, J., Allienne, J. F., Marco, S., ..., Uilenberg, G., 2016a. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting cattle and some other domestic and wild hosts on the French Mediterranean island of Corsica. *Parasites & Vectors*, 9(1), 582.
- Grech-Angelini, S., Stachurski, F., Lancelot, R., Boissier, J., Allienne, J. F., Gharbi, M., Uilenberg,

- G., 2016b. First report of the tick *Hyalomma scupense* (natural vector of bovine tropical theileriosis) on the French Mediterranean island of Corsica. *Veterinary parasitology*, 216, 33-37.
- Grech-Angelini, S., Hervé, S., Rose, N., Barbier, N., Casabianca, F., Maestrini, O., ..., Simon, G., 2018. Serological survey of influenza A viruses in domestic and wild Suidae in Corsica (France), a Mediterranean island environment. *Preventive veterinary medicine*, 157, 94-98.
- Grech-Angelini, S., Richomme, C., de Garam, C. P., Boucher, J. M., Maestrini, O., Grenouillet, F., ... & Umhang, G., 2019. Identification and molecular characterization of *Echinococcus canadensis* G6/7 in dogs from Corsica, France. *Parasitology research*, 118(4), 1313-1319.
- Grech-Angelini, S., Lancelot, R., Ferraris, O., Peyrefitte, N., C., Vachier, N., Pédarrieu, A., ..., Vial, L., 2019. First evidence of antibodies against Crimean-Congo Haemorrhagic fever virus in domestic ruminants on Corsica Island (France). Submitted in *Emerging Infectious Disease* (October 2019).
- Gretillat, S., 1963. Epidémiologie de certaines affections à Trématodes des animaux domestiques en Corse (Bilharziose bovine et Distomatose bovine et ovine)-(Observations effectuées au cours d'une mission réalisée en automne 1962).
- GTV Corse, 2017. Pratique rurale des vétérinaires sanitaires corses, restitution de sondage. [www.gtvcorse.fr](http://www.gtvcorse.fr)
- Hekimoğlu, O., Sağlam, İ. K., Özer, N., Estrada-Peña, A., 2016. New molecular data shed light on the global phylogeny and species limits of the Rhipicephalus sanguineus complex. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(5), 798-807.
- Hansmann, Y., Pierre Gut, J., Remy, V., Martinot, M., Allard Witz, M., & Christmann, D., 2006. Tick-borne encephalitis in eastern France. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 38(6-7), 520-526.
- Hervé, S., Gorin, S., Quéguiner, S., Barbier, N., Eveno, E., Dorenlor, V., Eono, F., Madec, F., Rose, N., Simon, G., 2011. Estimation of influenza seroprevalence in slaughter pigs in France in 2008-2009. *J. Rech. Porcine* 43, 281-282.
- ICTTD, 2000. Tick-borne infections of cattle on Corsica. *ICTTD newsletter* 14, 13 (ISSN: 1385-3422).
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*, 129 (Supplement): S3-14.
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., Ewing, S. A., 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary parasitology*, 167(2-4), 95-107.
- Loria, G.R., Riili, S., Vitale, F., Greco, A., Sparagano, O., 1999. Clinical and laboratory studies on theileriosis outbreaks in Sicily, Italy. *Parassitologia* 41 (Suppl. 1),63-67.
- Macaigne, F., & Pérez-Eid, C., 1993. *Hyalomma scupense* Schulze, 1919 (Acarina, Ixodoidea) tique autochtone du sud-ouest de la France. *Annales de parasitologie humaine et comparée*, 68(4), 199-200.

- Mancuso, E., Toma, L., Polci, A., d'Alessio, S.G., Di Luca, M., Orsini M, ..., Goffredo, M., 2019. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Genome in Tick from Migratory Bird, Italy. *Emerg. Inf. Dis.* 25:7, 1418-1420.
- Mans, B. J., Neitz, A. W., 2004. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(1), 1-17.
- Matsumoto, K., Parola, P., Brouqui, P., Raoult, D., 2004. *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma* ticks from Corsica. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 23:732-4.
- Maurin, M., Raoult, D., 1999. Q fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 518-553.
- McCoy, K. D., Boulanger, N. (2015). Tiques et maladies à tiques : biologie, écologie évolutive, épidémiologie. IRD éditions.
- Mehlhorn, H., Armstrong, P. M., 2001. Encyclopedic Reference of Parasitology: Diseases, Treatment. *Therapy*, 2, 36
- Michelet, L., Delannoy, S., Devillers, E., Umhang, G., Aspan, A., Juremalm, M., ... Klitgaard, K., 2014. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 103.
- Moné, H., Holtfreter, M. C., Allienne, J. F., Mintsá-Nguéma, R., Ibikounlé, M., Boissier, J., ..., Mouahid, G., 2015. Introgressive hybridizations of *Schistosoma haematobium* by *Schistosoma bovis* at the origin of the first case report of schistosomiasis in Corsica (France, Europe). *Parasitology research*, 114(11), 4127-4133.
- Mullen, G. R., Durden, L. A. (Eds.), 2009. Medical and veterinary entomology. Academic press. Chapter 26, 493-542.
- Myers, K.P., Olsen, C.W., Gray, G.C., 2007. Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 44, 1084-1088.
- Nava, S., Estrada-Peña, A., Petney, T., Beati, L., Labruna, M. B., Szabó, M. P., ..., Guglielmone, A. A., 2015. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Veterinary parasitology*, 208(1-2), 2-8.
- Negredo, A., de la Calle-Prieto, F., Palencia-Herrejón, E., Mora-Rillo, M., Astray-Mochales, J., Sánchez-Seco, M.P., ..., Keough-Delgado, E., 2017. Autochthonous Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Spain. *New England Journal of Medicine*. 377 :2.
- Nicholson W.L., Sonenshine D.E., Lane R.S., Uilenberg G., 2009. Chapter 26. Ticks (Ixodia). In: Mullen GR, Durden LA, editors. Medical and veterinary entomology. Second ed. Place: Academic; 2009. p. 493-542.
- Noël, H., Ruello, M., Maccary, A., Pelat, C., Sommen, C., Boissier, J., ..., Chyderiotis, G., 2018. Large outbreak of urogenital schistosomiasis acquired in Southern Corsica, France: monitoring early signs of endemicization? *Clinical Microbiology and Infection*, 24(3), 295-300



- Nonaka, E., Ebel, G. D., Wearing, H. J., 2010. Persistence of pathogens with short infectious periods in seasonal tick populations: the relative importance of three transmission routes. *PLoS One*, 5(7), e11745.
- ODARC, 2017. Les chiffres clés de l'agriculture corse.
- Oleaga, A., Rey, O., Polack, B., Grech-Angelini, S., Quilichini, Y., Pérez-Sánchez, R., ..., Vallée, I., 2019. Epidemiological surveillance of schistosomiasis outbreak in Corsica (France): Are animal reservoir hosts implicated in local transmission? *PLoS neglected tropical diseases*, 13(6).
- Olsen, C.W., Carey, S., Hinshaw, L., Karasin, A.I., 2000. Virologic and serologic surveillance for human, swine and avian influenza virus infections among pigs in the northcentral United States. *Arch. Virol* 145, 1399–1419.
- OMS, 2019. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>
- Oteo, J. A., Portillo, A., 2012. Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks and tick-borne diseases*, 3(5-6), 271-278.
- Papadopoulos, O., Koptopoulos, G., 1978. Isolation of Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus from *Rhipicephalus bursa* ticks in Greece. *Acta Microbiologica Hellenica*, 23(1), 20-28.
- Parola, P., Raoult, D., 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical infectious diseases*, 32(6), 897-928.
- Pérez-Eid, C. 2007. Les tiques : identification, biologie, importance médicale et vétérinaire. Lavoisier.
- Psaroulaki, A., Ragiadakou, D., Kouris, G., Papadopoulos, B., Chaniotis, B., & Tselentis, Y., 2006. Ticks, tick-borne Rickettsiae, and *Coxiella burnetii* in the Greek island of Cephalonia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078(1), 389-399.
- Raoult, D., Parola, P. (Eds.), 2007. *Rickettsial diseases*. CRC Press.
- Reif, K. E., Kearney, M. T., Foil, L. D., Macaluso, K. R., 2011. Acquisition of *Rickettsia felis* by cat fleas during feeding. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(7), 963-968.
- Rhodain, F., Perez, C., 1985. Les tiques Ixodidés : systématique, biologie, importance médicale. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Maloine, Paris, 341-66.
- Richomme, C. 2009. Epidémiologie de zoonoses du Sanglier (*Sus scrofa*) dans un milieu méditerranéen insulaire, la Corse. Thèse de doctorat. Université de Clermont-Ferrand, 229 pp.
- Ros-García, A., García-Pérez, A.L., Verdera, J., Juste, R.A., Hurtado, A., 2012. Monitoring piroplasm infection in three cattle farms in Minorca (Balearic Islands, Spain) with previous history of clinical piroplasmosis. *Vet. Parasitol.* 190, 318–325.
- Sarih, M. H., Jouda, F., Gern, L., Postic, D., 2003. First isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks in Morocco. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 3(3), 133-13

- Sas, M.A., Comtet, L., Donnet, F., Mertens, M., Vatansever, Z., Tordo, N., Pourquier, P., Groschup, M.H., 2018. A novel double-antigen sandwich ELISA for the species-independent detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-specific antibodies. *Antiviral Res.* 151:24-26.
- Sire, C., Langand, J., Barral, V., Theron, A., 2001. Parasite (*Schistosoma mansoni*) and host (*Biomphalaria glabrata*) genetic diversity: population structure in a fragmented landscape. *Parasitology* 122, 545-554.
- Smith, T., Kilborne, F. L., 1893. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever (No. 1). US Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry.
- Sonenshine, D.E., Roe, R.M. (Eds.), 2014a. 2nd Revised edition. Biology of Ticks, I. New York : Oxford University Press.557p.
- Sonenshine, D.E., Roe, R.M. (Eds.), 2014b. 2nd Revised edition. Biology of Ticks, II. New York: Oxford University Press.
- Spengler, J.R., Bergeron, E., Rollin, P.E., 2016. Seroepidemiological studies of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in domestic and wild animals. *PLoS neglected tropical diseases.* 10 :1.
- Strle, F. (2004). Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *International Journal of Medical Microbiology Supplements*, 293, 27-35
- Stuen, S., Granquist, E. G., Silaghi, C., 2013. Anaplasma phagocytophilum—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 31.
- Toma, L., Di Luca, M., Mancini, F., Severini, F., Mariano, C., Nicolai, G., ..., Cacciò, S. M., 2017. Molecular characterization of *Babesia* and *Theileria* species in ticks collected in the outskirt of Monte Romano, Lazio region, central Italy. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 53(1), 30-34.
- Tomassone, L., Grego, E., Auricchio, D., Iori, A., Giannini, F., Rambozzi, L., 2013. Lyme borreliosis spirochetes and spotted fever group rickettsiae in ixodid ticks from Pianosa island, Tuscan Archipelago, Italy. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, 13(2), 84-91.
- Torina, A., Khoury, C., Caracappa, S., Maroli, M., 2006. Ticks infesting livestock on farms in Western Sicily, Italy. *Experimental & applied acarology*, 38(1), 75-86.
- Tsatsaris, A., Chochlakis, D., Papadopoulos, B., Petsa, A., Georgalis, L., Angelakis, E., ..., Psaroulaki, A., 2016. Species composition, distribution, ecological preference and host association of ticks in Cyprus. *Experimental and Applied Acarology*, 70(4), 523-54.
- Uilenberg, G., 2006. *Babesia*—a historical overview. *Veterinary parasitology*, 138(1-2), 3-10.
- Umhang, G., Richomme, C., Boucher, J.M., Hormaz, V., Boué, F., 2013. Prevalence survey and first molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in France. *Parasitol Res* 112(4):1809–1812.
- Umhang, G., Richomme, C., Hormaz, V., Boucher, J.M., 2014. Pigs and wild boar in Corsica

harbor *Echinococcus canadensis* G6/7 at levels of concern for public health and local economy. *Acta Trop* 133:64–68.

Vaissaire J., Le Coustumier A., 2007. *Francisella tularensis* et tularémie. *Cahier de Formation Biologie Médicale*, 40 : 11-54.

Van Cauteren, D., Million, L., De Valk, H., Grenouillet, F., 2016. Retrospective study of human cystic echinococcosis over the past decade in France, using a nationwide hospital medical information database. *Parasitol Res* 115(11):4261–4265.

Vandenesch, A., Turbelin, C., Couturier, E., Arena, C., Jaulhac, B., Ferquel, E., Choumet, V., Saugeon, C., Coffinieres, E., Blanchon, T., Vaillant, V., Hanslik, T., 2014. Incidence and hospitalisation rates of Lyme borreliosis, France, 2004 to 2012. *Euro Surveill.* 19(34), 20883.

Van Reeth, K., Brown, I.H., Dürrwald, R., Foni, E., Labarque, G., Lenihan, P., Maldonado, J., Markowska-Daniel, I., Pensaert, M., Pospisil, Z., Koch, G., 2008. Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002–2003. *Influenza Other Respir. Viruses* 2 (3), 99–105.

Voordouw, M. J., 2015. Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology*, 142(2), 290-302.

Woldehiwet, Z., 1983. Tick-borne fever: a review. *Veterinary research communications*, 6(1), 163-175.

Yesilbag, K., Aydin, L., Dincer, E., Alpay, G., Girisgin, A. O., Tuncer, P., Ozkul, A., 2013. Tick survey and detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in tick species from a non-endemic area, South Marmara region, Turkey. *Experimental and applied acarology*, 60(2), 253-261.

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Position systématique des tiques .....	17
<b>Tableau 2.</b> Principales espèces de tiques présentes dans le bassin méditerranéen, localisation, hôtes et capacité vectorielle .....	26
<b>Tableau 3.</b> Espèces de tiques identifiées dans quelques îles méditerranéennes .....	28
<b>Tableau 4.</b> Principales espèces de <i>Babesia</i> identifiées dans le bassin méditerranéen .....	39
<b>Tableau 5.</b> Principales espèces de <i>Theileria</i> identifiées dans le bassin méditerranéen .....	39
<b>Tableau 6.</b> Espèces de tiques collectées sur les bovins corses de mai 2014 à avril 2015 .....	52
<b>Tableau 7.</b> Tiques collectées par hôte animal et pourcentage de <i>Hyalomma marginatum</i> .....	78
<b>Tableau 8.</b> Liste des agents pathogènes (et endosymbiontes) recherchés par la puce à PCR en temps réel (Biomark <sup>TM</sup> ) .....	94
<b>Tableau 9.</b> Proportion (%) de pools infectés (ou tiques infectées) .....	95

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Classification des tiques .....	18
<b>Figure 2.</b> Anatomie externe des tiques dures.....	19
<b>Figure 3.</b> Anatomie générale interne d'une tique femelle adulte (coupe sagittale) .....	20
<b>Figure 4.</b> Anatomie interne d'une tique femelle : appareils digestif, nerveux et reproducteur.....	21
<b>Figure 5.</b> Cycle biologique des tiques dures.....	23
<b>Figure 6.</b> Capitulum des cinq genres de tiques dures présents en zone méditerranéenne.....	25
<b>Figure 7.</b> Localisation de quelques îles méditerranéennes .....	27
<b>Figure 8.</b> Erythème migrant.....	35
<b>Figure 9.</b> Schéma des interactions entre les différents compartiments en Corse : homme, faune sauvage, animaux domestiques et vecteurs .....	46
<b>Figure 10.</b> Collecte de tiques au drapeau .....	50
<b>Figure 11.</b> Zone échantillonnée et nombre de bovins prélevés par commune .....	51
<b>Figure 12.</b> Cuir de bovin étalé sur le sol de l'abattoir pour la collecte des tiques.....	51
<b>Figure 13.</b> Activité des différentes espèces de tiques collectées en Corse.....	52
<b>Figure 14.</b> Distribution des quatre principales espèces de tiques collectées en Corse.....	54
<b>Figure 15.</b> <i>Hyalomma marginatum</i> mâle et femelle .....	77
<b>Figure 16.</b> Vue dorsale d'un mâle <i>Hyalomma scupense</i> collecté en Corse .....	78
<b>Figure 17.</b> Distribution géographique de l'ADN des principaux agents pathogènes détectés .....	96
<b>Figure 18.</b> Représentation schématique du virus CCHF. ....	128
<b>Figure 19.</b> Situation du virus CCHF et de ses vecteurs dans le monde .....	128
<b>Figure 20.</b> Cycle biologique du virus CCHF.....	129
<b>Figure 21.</b> Patient atteint de CCHF sévère présentant une lésion d'ecchymose majeure .....	129
<b>Figure 22.</b> (A) Distribution des séroprévalences CCHF chez les ruminants en Corse. (B) Distribution spatiale des probabilités de non détection en fonction de trois prévalences estimées ( <i>P</i> ) .....	131
<b>Figure 23.</b> Le cycle de <i>Schistosoma</i> dans le sud de la Corse.....	140
<b>Figure 24.</b> Zone échantillonnée pour la recherche sérologique de <i>Schistosoma</i> spp.....	142
<b>Figure 25.</b> Cycle d' <i>Echinococcus granulosus</i> s.l. en Corse .....	143
<b>Figure 26.</b> Communes échantillonnées et animaux séropositifs au virus Toscana.....	145
<b>Figure 27.</b> Localisation de la zone échantillonnée et des animaux VIP positifs .....	147

## Liste des abréviations (1/2)

*A.* : *Anaplasma*

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AGH** : Anaplasmose granulocytaire humaine

**ANSES** : Agence nationale de sécurité sanitaire

**ARN** : Acide ribonucléique

*B.* : *Borrelia*

*Ba.* : *Babesia*

*Bar.* : *Bartonella*

*Bo.* : *Boophilus*

**CCHF** : Fièvre hémorragique de Crimée Congo

**CIRAD** : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement

**CNR** : Centre national de référence

*Cox* : Cytochrome oxydase

*D.* : *Dermacentor*

**DDCSPP** : Direction départementale de la cohésion sociale et de la protection des populations

**DS** : Danger sanitaire

**DRAAF** : Direction régionale de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt

*E.* : *Echinococcus*

**EDTA** : Éthylènediaminetétraacétique

*Eh.* : *Ehrlichia*

*F.* : *Francisella*

**FCO** : Fièvre catarrhale ovine

**FRGDS** : Fédération régionale de groupements de défense sanitaire

**GTV** : Groupement technique vétérinaire de Corse

*Ha.* : *Haemaphysalis*

*Hy.* : *Hyalomma*

*I.* : *Ixodes*

**IC95%** : Intervalle de confiance à 95%

**INRA** : Institut national de la recherche agronomique

**ITS** : *Internal transcribed spacer*

## Liste des abréviations (2/2)

**MDO** : Maladie à déclaration obligatoire

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**OTU** : Unité opérationnelle taxonomique, *Operational Taxonomic Units*

**ONCFS** : Office national de la chasse et de la faune sauvage

**PCR** : réaction de polymérisation en chaîne

**PNRC** : Parc naturel régional de la Corse

**PPRNT** : *Pseudo-plaque reduction neutralization test*, test de séroneutralisation par réduction des plages de lyse

**qPCR** : PCR temps réel ou PCR quantitative

**R.** : *Rickettsia*

**Rh.** : *Rhipicephalus*

**RLB** : *Reverse line blot hybridization*

**SFG** : *Spot fever group*, groupe des fièvres boutonneuses (ou pourpées)

**s.l.** : sensu lato

**s.s.** : sensu stricto

**S.** : *Schistosoma*

**T.** : *Theileria*

**TBE** : *Tick-borne encephalitis*, encéphalite à tiques

**VIP** : Virus influenza porcins

# **Annexes**





## **Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study**

Jérôme Boissier\*, Sébastien Grech-Angelini, Bonnie L. Webster, Jean-François Allienne, Tine Huyse, Santiago Mas-Coma, Eve Toulza, Hélène Barré-Cardi, David Rollinson, Julien Kincaid-Smith, Ana Oleaga, Richard Galinier, Joséphine Foata, Anne Rognon, Antoine Berry, Gabriel Mouahid, Rémy Henneron, Hélène Moné, Harold Noel, Guillaume Mitta

**Short Title:** Origin of the Corsican schistosomiasis outbreak

\*Correspondance to:

Dr Jérôme Boissier, Université de Perpignan Via Domitia, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Université de Montpellier, F-66860 Perpignan, France

boissier@univ-perp

INRA, Laboratoire de recherches sur le développement de l'élevage, Corte, France (S Grech-Angelini MD)

Department of Life Sciences, Parasites and Vectors Division, Natural History Museum, Cromwell Road, London, SW75BD, UK (BL Webster PhD, D Rollinson PhD)

Department of Biology, Royal Museum for Central Africa, Leuvensesteenweg 13, 3080 Tervuren, Belgium (T Huyse PhD)

Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia, Spain (S Mas-Coma PhD)

OCIC, ECOTER, Office de l'Environnement de la Corse, Corte, France ; Unité de suivi entomologique et de politique de lutte anti vectorielle, Agence régionale de santé de Corse, Ajaccio, France (H Barré-Cardi PhD)

Parasitology Laboratory, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA, CSIC), Cordel de Merinas, 40-52, 37008 Salamanca, Spain (A Oleaga PhD)

UMR 6134 CNRS SPE Science pour l'environnement. Equipe parasites et écosystèmes méditerranéens - Université de Corse Pascal Paoli, Corte, France (J Foata PhD)

Service de Parasitologie-Mycologie, CHU Toulouse and Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, INSERM U1043, CNRS UMR5282, Université de Toulouse, Toulouse, France (A Berry MD)

Hôpital Ste marguerite, hôpitaux sud de Marseille 13009 Marseille (R Henneron MD)  
French Institute for Public Health Surveillance (Institut de Veille Sanitaire, InVS), Saint-Maurice,  
France (H Noel MD)

Published in *The Lancet Infectious Diseases* (2016), 16(8), 971-979

## SUMMARY

**Background:** Schistosomiasis is a snail-borne parasitic disease endemic in several tropical and subtropical countries. However, in the summer of 2013, an unexpected outbreak of urogenital schistosomiasis occurred in Corsica, with more than 120 local people or tourists infected. We used a multidisciplinary approach to investigate the epidemiology of urogenital schistosomiasis in Corsica, aiming to elucidate the origin of the outbreak.

**Methods:** We did parasitological and malacological surveys at nine potential sites of infection. With the snails found, we carried out snail–parasite compatibility experiments by exposing snails to schistosome larvae recovered from the urine of a locally infected Corsican patient. Genetic analysis of both mitochondrial (*cox1*) and nuclear (internal transcribed spacer) DNA data from the *Schistosoma* eggs or miracidia recovered from the infected patients was conducted to elucidate the epidemiology of this outbreak.

**Findings:** We identified two main infection foci along the Cavu River, with many *Bulinus truncatus* snails found in both locations. Of the 3544 snails recovered across all sites, none were naturally infected, but laboratory-based experimental infections confirmed their compatibility with the schistosomes isolated from patients. Molecular characterisation of 73 eggs or miracidia isolated from 12 patients showed infection with *Schistosoma haematobium*, *S. haematobium*–*Schistosoma bovis* hybrids, and *S. bovis*. Further sequence data analysis also showed that the Corsican schistosomes were closely related to those from Senegal in west Africa.

**Interpretation:** The freshwater swimming pools of the Cavu River harbour many *B. truncatus* snails, which are capable of transmitting *S. haematobium*-group schistosomes. Our molecular data suggest that the parasites were imported into Corsica by individuals infected in west Africa, specifically Senegal. Hybridisation between *S. haematobium* and the cattle schistosome *S. bovis* had a putative role in this outbreak, showing how easily and rapidly urogenital schistosomiasis can be introduced and spread into novel areas where *Bulinus* snails are endemic, and how hybridisation could increase the colonisation potential of schistosomes. Furthermore, our results show the potential risk of schistosomiasis outbreaks in other European areas, warranting close monitoring and surveillance of all potential transmission foci.

**Funding:** WHO, ANSES, RICET, and the Ministry of Health and Consumption.

## INTRODUCTION

Increases in human travel, animal migration, and environmental changes are expected to promote the emergence of tropical infectious diseases in higher latitude environments (1). However, examples of the emergence of tropical infectious diseases in temperate areas remain scarce, with most reports being about diseases transmitted by arthropod vectors, including dengue, malaria, and chikungunya, which have been reported in southern parts of Europe including Italy and France (2-4).

Aquatic freshwater snails are intermediate hosts (referred to as vectors in the case of vector-borne diseases) for several diseases caused by helminths, including the highly prevalent and debilitating neglected tropical disease schistosomiasis. This disease results from infection with parasitic worms of the *Schistosoma* genus and remains one of the world's most important neglected tropical diseases. Infection results from contact with fresh water that is contaminated with the free-swimming schistosome cercariae that are shed from infected snails. *Schistosoma haematobium* causes human urogenital schistosomiasis and is transmitted by snails of the genus *Bulinus* (5) The geographical range of *S haematobium* covers Africa, parts of the Middle East, Madagascar, and the Indian Ocean islands. More people are infected with *S haematobium* than with all the other schistosome species combined (6). Of the more than 110 million cases of schistosomiasis in sub-Saharan Africa, 70 million are associated with haematuria, 18 million with bladder wall pathology, and 10 million with hydronephrosis leading to severe kidney disease (7,8) and even bladder cancer.<sup>9</sup> An estimated 16 million women have female genital schistosomiasis, which causes complications related to fertility and transmission of HIV or other sexually transmitted infections (10). *S haematobium* eggs are voided in the urine of infected individuals and these eggs hatch when in contact with fresh water, releasing free-swimming miracidia that infect, develop, and replicate within suitable *Bulinus* snail hosts (11). *Schistosoma bovis* is a closely related sister species to *S haematobium* that causes intestinal schistosomiasis in ruminants and is a major veterinary problem across Africa, but can also be found in European Mediterranean countries (12-14). Similar to *S haematobium*, *S bovis* is also transmitted by *Bulinus* snail species and both schistosome species inhabit sympatric geographical areas. This close phylogenetic association, combined with overlapping geographical distributions, enables hybridisation between *S haematobium* and *S bovis*, as has been reported in west African countries, namely Senegal (15,16). Hybridisation can alter disease epidemiology and enhance phenotypic characteristics that affect transmission and host compatibility (17). This hybridisation is especially important in relation to snail-parasite compatibility, whereby hybridisation can enable the use of a wider range of snail species and hosts<sup>16</sup> and enhance the expansion potential of the disease.

At the beginning of 2014 a cluster of urogenital schistosomiasis cases were diagnosed in patients in France (March, 2014) and Germany (January, 2014) (18-20). The patients had never visited a schistosomiasis-endemic country, but all had spent their holidays in southern Corsica in August, 2013. Corsica, a French Mediterranean island, is very popular with tourists because of its natural beauty and Mediterranean climate. The freshwater intermediate host for schistosomes, *Bulinus truncatus*, is endemic in Corsica (13), widely distributed throughout the perimeter of the island.<sup>21</sup> The infected individuals had all been swimming in the Cavu River in the north of Porto Vecchio. After these first cases were reported, the French Institute for Public Health Surveillance (Institut National de Veille Sanitaire [INVS]) and the European Centre for Disease Prevention and Control published a rapid risk assessment, which was followed by a large campaign between April, 2014, and April, 2015, to increase awareness of the risk of urogenital schistosomiasis infection in Corsica and the possible misdiagnosis of haematuria by European health practitioners. Subsequently, 124 more cases were reported in French nationals who visited Corsica and swam in the Cavu River in 2013. A case of acute schistosomiasis acquired in Corsica during the summer of 2015 has also been reported, suggesting that transmission is still persisting<sup>22</sup> and poses a risk for further infections. Preliminary molecular analysis of schistosome eggs obtained from a German national who had the first reported case of urogenital schistosomiasis acquired in Corsica showed the involvement of *S haematobium* and *S bovis-S haematobium* hybrids (23) in the infection. In this study we used a multidisciplinary approach to investigate the epidemiology of urogenital schistosomiasis in Corsica, aiming to elucidate the origin of the outbreak.

## **METHODS**

### **Water contact site, livestock, and malacological surveys**

Nine potential sources of infection (water contact sites) were identified from family holiday; photographs and testimonials from local Corsican patients (figure 1). Cows and goats local to the Cavu River were tested by ELISA for schistosome infections, using methods described previously.<sup>24</sup> After the first cases of urogenital schistosomiasis acquired in Corsica were identified, snail surveys were done along the Cavu River, from May to September, 2014, aiming to find the sites of transmission. Surveys were done in a consistent manner at nine bathing sites that had been visited by at least one patient. Snails were collected with a sieve from all areas of the freshwater pools and aquatic plants at each site until no more could be readily found. The same approach was used at each site, and we compared random snail repartition between the different sites with the  $\chi^2$  test. All

morphologically identified *Bulinus truncatus* snails were tested for schistosome patent infection by cercarial shedding immediately and for several weeks after collection.

### **Larval schistosome sampling**

After the publication of the rapid risk assessment and the campaign to increase awareness of the risk of urogenital schistosomiasis infection in Corsica, patients who were serologically diagnosed with urogenital schistosomiasis by physicians in Corsica and on the European continent were asked to provide urine samples to confirm diagnosis by parasitological analyses. The samples were examined microscopically for the presence of characteristic terminal spined schistosome eggs, and positive samples were stored at 4°C or in ethanol, then sent to the UMR5244 laboratory in Perpignan (France) for parasitological sampling. The samples were recorded as having come from either infected Corsican locals or tourists, but patients' details remained anonymous. No patients had ever been to a schistosomiasis-endemic area and all had been swimming in the Cavu River in the summer of 2013. This study was approved by the French Commission for Data Protection (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés) as part of the public health response. Data were processed anonymously and all schistosomiasis-positive patients were treated with praziquantel.

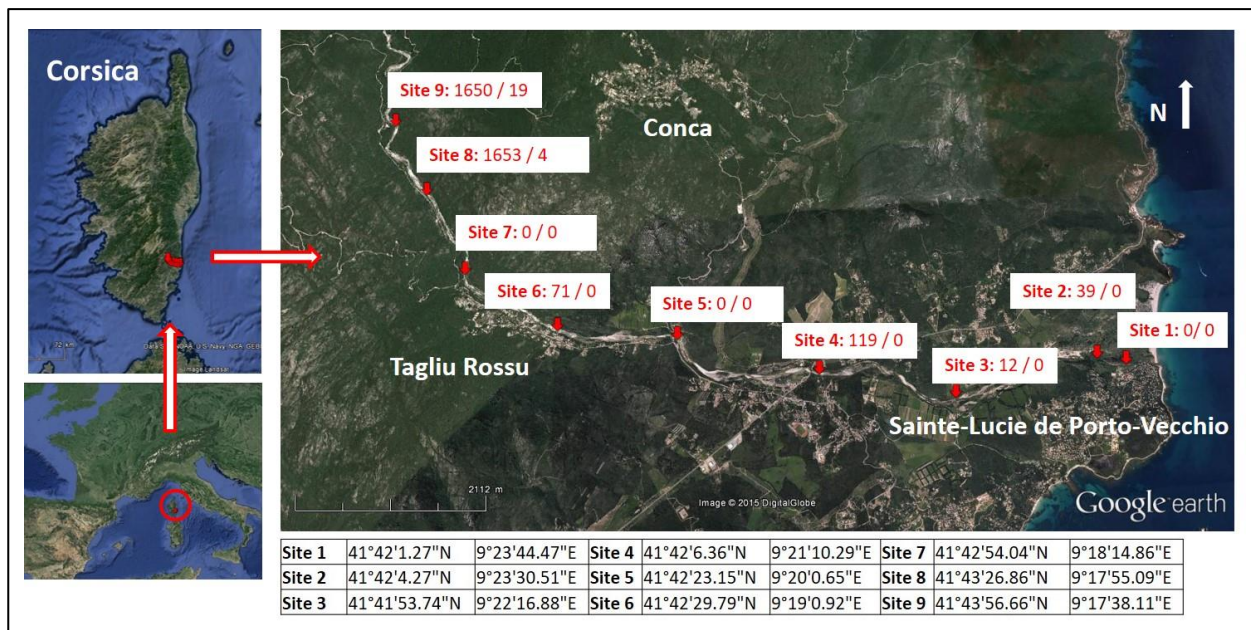
Eggs were microscopically removed individually with an elongated Pasteur pipette from each urine sample, and when viable (ie, for eggs not stored in ethanol), attempts were made to hatch the eggs by placing them in fresh water. Any non-hatched eggs or free-swimming miracidia were individually captured using a pipette and prepared for DNA extraction.

### **Molecular characterization of the schistosome miracidia or eggs**

DNA was extracted from individual miracidia or eggs (25) and the complete nuclear rDNA ITS region and a partial fragment of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*cox1*) gene were amplified and sequenced for species characterisation (Supplementary Table 1 for details). The sequences were assembled and manually edited using Sequencher (GeneCodes Corp). Sequence polymorphisms were checked and confirmed by visualization of the raw sequence chromatograms. The nuclear and mitochondrial profiles were assigned to each individual egg or miracidium analyzed as described in (15, 16) (Supplementary Table 1).

The *S. bovis* or *S. haematobium cox1* sequences obtained from the samples were grouped separately and then collapsed to group identical sequences of each species to create unique haplotypes (Supplementary Table 2). Haplotype polymorphism and the numbers of individual samples that represent each haplotype were recorded (Table 1 & 2). *S. haematobium* and *S. bovis* and hybrid *cox1*

data available from the NCBI database together with unpublished data from *S. bovis* from Spain and Africa (personal communication) were included in our phylogenetic analysis. The genealogical



**Figure 1:** Map showing the Cavu River in the south of Corsica. Malacological sampling was conducted at Sites 1-9 along the Cavu River. At each site the number of *B. truncatus* snails collected is shown together with the number of infected patients that had unique water contact at each site.

relationships between haplotypes were inferred using PopART and minimum spanning networks were created to visualize the genealogical relationships between the haplotypes. Evolutionary relationships between the haplotypes were inferred using Mega V5.2.2 using the Neighbour-Joining, Maximum Parsimony and Minimum Evolution, Maximum Likelihood methods using the best fit evolution model (HKY+G) ( $G=0,1$ ), determined using the Akaike information criterion (AIC) implemented in jModelTest (26). Analyses were subjected to 1000 bootstraps to infer the reliability of the branches and topologies were rooted to a single sister species haplotype (*S. bovis* for *S. haematobium* and *S. haematobium* for *S. bovis*).

### Host–parasite compatibility testing

107 *B. truncatus* snails (3-5 mm in size) collected in the Cavu River were individually exposed to 1, 2 or 3 miracidia successfully hatched from urine samples from a locally infected patient n°12 (Table 1). The number of exposed snails that became infected was recorded and 8 laboratory rodents were each exposed to pools of 400 cercariae. Animals were sacrificed 12 weeks after parasite exposition following standard procedures (27). A total of 20 female and 21 male worms recovered were molecularly identified using the same molecular methods as described above. All experiments on animals were carried out under the permit n°A66040, at the FR-69 WHO collaborating center



laboratory, received from both the French Ministry of Agriculture and Fishing, and the French Ministry of national Education, Research and Technology (Décret #87-848 du 19 Octobre 1987; authorisation number 007083). Maintenance and care of the experimental animals were performed according to the ethical requirements of French government.

**Table 1:** Genetic profiles of the individual eggs or miracidia\*.

Patient	No. egg <sup>e</sup> / miracidia <sup>m</sup>	Sequence Identification		mtDNA <i>cox1</i>	Genetic profile†
		rDNA ITS	rDNA	mtDNA <i>cox1</i> haplotype code*	
Patient 1	3 <sup>e</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. bovis</i>	Sb2	Hybrid
	1 <sup>e</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. haematobium</i>	ShB	<i>S. h</i>
Patient 2	1 <sup>e</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. haematobium</i>	ShD	<i>S. h</i>
	1 <sup>e</sup>	<i>S. bovis</i>	<i>S. bovis</i>	Sb2	<i>S. b</i>
Patient 3	2 <sup>e</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. bovis</i>	Sb2	Hybrid
Patient 4	7 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. haematobium</i>	ShB	<i>S. h</i>
	1 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. haematobium</i>	ShC	
Patient 5§	8 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. haematobium</i>	ShA	<i>S. h</i>
Patient 6§	8 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. haematobium</i>	ShA	<i>S. h</i>
Patient 7	1 <sup>e</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. bovis</i>	Sb1	Hybrid
	2 <sup>e</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. bovis</i>	Sb2	
	1 <sup>e</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. bovis</i>	Sb3	
Patient 8	6 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. haematobium</i>	ShD	<i>S. h</i>
	1 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. haematobium</i>	ShE	
	1 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. haematobium</i>	ShF	
Patient 9	1 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. bovis</i>	Sb4	Hybrid
	1 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. bovis</i>	Sb5	
	1 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. bovis</i>	Sb6	
	7 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. haematobium</i>	ShD	
Patient 10§	5 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. bovis</i>	Sb2	Hybrid
	1 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. bovis</i>	Sb7	
Patient 11§	1 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. haematobium</i>	ShD	<i>S. h</i>
	6 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. bovis</i>	Sb2	Hybrid
	1 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. bovis</i>	Sb8	
Patient 12	5 <sup>m</sup>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. bovis</i>	Sb2	Hybrid

**\*Table 1:** Numbers of eggs or miracidia are the number successfully profiled, rather than the number extracted. Of the 12 patients, patients 1–6 were tourists and 7–12 were Corsican locals. rDNA=ribosomal DNA. mtDNA=mitochondrial DNA. ITS=internal spacer region. *S haematobium*=*Schistosoma haematobium*. *S bovis*=*Schistosoma bovis*. *S h*=pure *S haematobium*. *S b*=pure *S bovis*. Hybrid=*S haematobium*–*S bovis* hybrids. \*The mtDNA *cox1* haplotype codes for each genetic type. †Genetic profile identifies the type of infection. ‡Patients from the same family. §Patients from the same family.

### **Role of the funding source**

The financial sponsor of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

### **RESULTS**

A total of 3,544 *B truncatus* snails were collected from the nine sites on the Cavu River, but none produced schistosome cercariae. The first *B truncatus* were found 800 m from the river mouth at site 2 (figure 1). The distribution of the snails was not random ( $\chi^2=8812$ ,  $p<0.0001$ ), with most snails collected at sites 8 (1653 snails) and 9 (1650 snails).

Two families with one infected member each, one family with two infected members and one family with three infected members, all of which had been on holiday in Corsica in 2013 and we were able to be contacted, provided holiday photographs of their visits to the Cavu River. These together with testimonials from all 26 local Corsican patients enabled identification of the potential freshwater sources of infection. Of the nine snail sampling sites, five had been visited by the infected patients (sites 5-9, appendix p 3). All of the personal photographs from the four tourist families were of site 9 (figure 1; appendix p 3), which was the most frequented site with 12 of the 26 local Corsican patients having only frequented this site. Similarly, four local patients only had water contact at site 8. The ten remaining patients had visited several sites, mostly including sites 8 or 9. These results suggest that sites 8 and 9 were the main sources of infection. Additionally, these suspected sites of infection presented the highest abundance of snails (figure 1). Three cows and 31 goats local to the Cavu River were serologically tested, but none were positive for schistosome infection.

A total of 137 eggs or miracidia were obtained from urine samples from 12 infected patients (six locals and six tourists). Complete sequence data were successfully obtained from 73 eggs or miracidia. The *cox1* sequences were identified as being either *S haematobium* or *S bovis* (table 1). All

ITS sequences except one, which was *S bovis*, were *S haematobium* and no double peaks were seen in the chromatograms at the four polymorphic positions between *S haematobium* and *S bovis* (15,16). Four patients produced only *S haematobium*–*S bovis* hybrids, four produced pure *S haematobium*, three produced both hybrid and pure *S haematobium* parasites, and one produced both an *S haematobium* egg and a pure *S bovis* egg (table 1).

**Table 2:** *cox1* polymorphic site mutations within the different *Schistosoma haematobium* haplotype sequences

		No. of eggs or miracidia	<i>cox1</i> sequence position mutations									
			184	201	213	241	252	463	574	597	773	839
ShD	15		C	G	A	G	G	G	G	T	G	G
ShB	8		T						A			
ShA	16	A	A									
ShC	1	T	A	A								
ShE	1		A		A	A						
ShF	1				C							

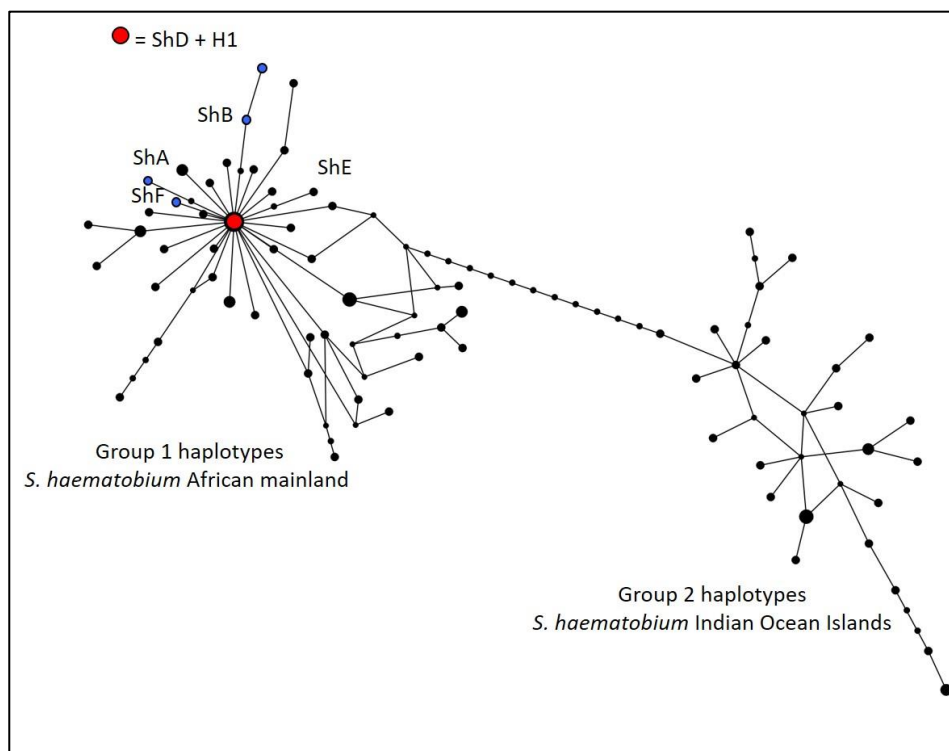
*S haematobium* sequences are compared with haplotype ShD, which is also the most common and dominant *S haematobium* haplotype throughout Africa

**Table 3:** *cox1* polymorphic site mutations within the different *Schistosoma bovis* haplotype sequences

		No. of eggs or miracidia	<i>cox1</i> sequence position mutations										
			147	199	207	358	474	623	626	633	758	773	787
Sb2	24	G	T	G	G	G	G	G	C	G	G	G	G
Sb1	1												A
Sb3	1											A	
Sb4	1		C	A			A						
Sb5	1							A					
Sb6	1								T				
Sb7	1									A	A		
Sb8	1	A			A	A							

*S bovis* sequences are compared with the most common *S bovis* haplotype (Sb2).

We identified six unique *S haematobium cox1* haplotypes (table 2) and eight unique *S bovis cox1* haplotypes (table 3). 15 of the 73 samples had the *S haematobium* haplotype that we termed ShD, which was identical to the haplotype that is the most dominant and common haplotype in Africa (28) The minimum spanning haplotype network (figure 2) shows the dominance of haplotype ShD as a central point from which the other five *S haematobium* haplotypes branch off by one or two mutational steps. These mutations do not form a network and are non-synonymous, suggesting that they are random mutations that do not persist in the population. The five other haplotypes (ShA, ShB, ShC, ShE, ShF) cluster closely with the *S haematobium* haplotypes from the African mainland (figure 2; appendix p 4).



**Figure 2 : *Schistosoma haematobium* mitochondrial DNA *cox1* haplotype network**  
Corsican *S haematobium* haplotypes are ShA, ShB, ShC, ShD, ShE, and ShF. H1 is a monophyletic group defined previously.<sup>28</sup> Our data were compared with available *S haematobium cox1* haplotype. *cox1*=mitochondrial cytochrome oxidase subunit I.

For *S bovis*, 23 of the samples formed a unique haplotype, Sb2, and the minimum spanning haplotype network analysis shows the dominance of this haplotype as a central point from which all of the other haplotypes branch off by one or two steps. Like the *S haematobium* haplotypes, the *S bovis* haplotypes do not form a network and the mutations are non-synonymous, suggesting that they are random mutations that do not persist in the population (figure 3). The most dominant *S bovis* haplotype, which we called Sb2, is identical to the *S bovis* haplotype obtained from two humans

infected with *S haematobium*-*S bovis* hybrids in Senegal (15). The network analysis and phylogenetic analysis show the human *S bovis coxI* haplotypes (Corsica and Senegal) clustering together and away from the animal *S bovis* haplotypes (figures 3, 4), providing strong evidence for a close genetic relationship between the schistosomes identified in Corsica and those from west Africa, specifically Senegal.

17 of the *B truncatus* snails from Corsica became infected after exposure to the schistosomes from Corsica (table 4). Cercariae resulting from these infections were able to successfully infect seven laboratory hamsters. We recovered 20 female and 21 male worms from the infected animals, which were molecularly characterised. All worms presented a hybrid genetic profile consisting of *S bovis* mitochondrial (mt)DNA *coxI* (haplotype Sb2) and the *S haematobium* nuclear rDNA ITS region

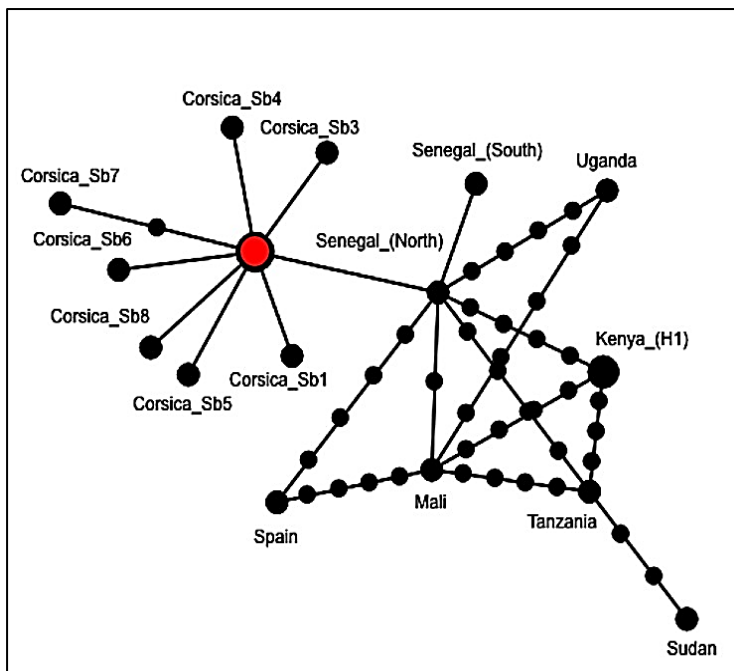


Figure 3: *Schistosoma bovis* mitochondrial DNA *coxI* haplotype network

## DISCUSSION

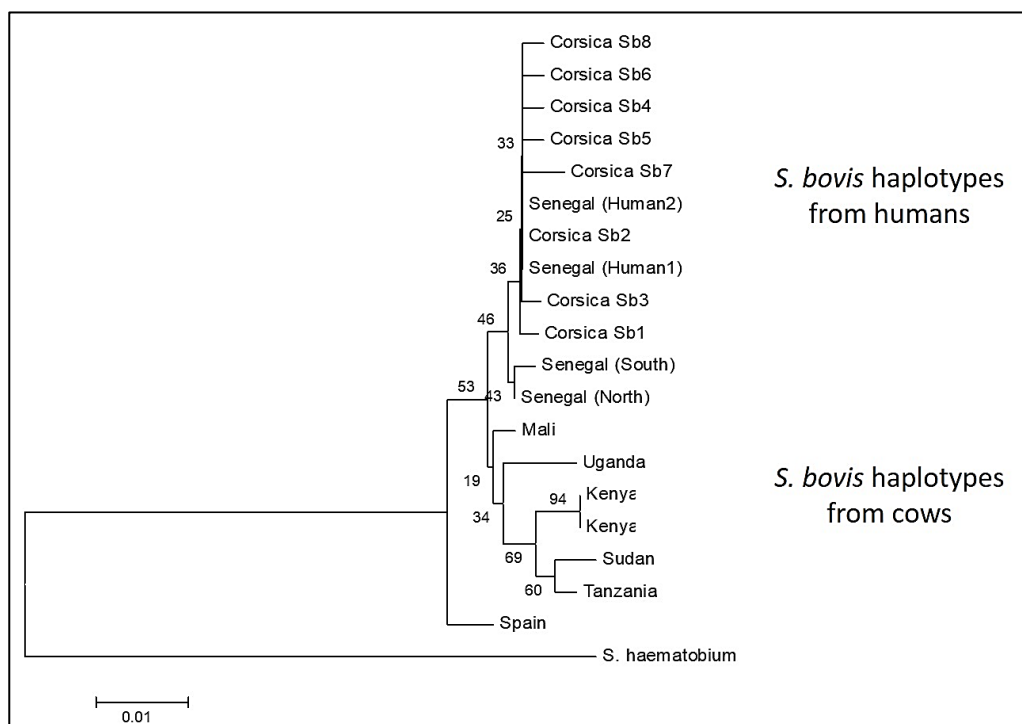
Our study identified two main infection foci along the Cavu River and showed that locally collected snails were compatible with the schistosomes from the infected patients. Molecular analyses allowed us to identify the hybrid status of the parasite and to infer the origin of the outbreak. Our results show the ease with which the schistosomes were able to invade and persist in a nonendemic area and the potential risk of dissemination of urogenital schistosomiasis to other southern European areas where

suitable intermediate snail hosts are endemic, greatly facilitated by humans travelling from endemic areas to non-endemic areas.

During the 20th century, urogenital schistosomiasis became endemic in the southern Portuguese province of Algarve (29). The first cases were recorded in 1921 and transmission is estimated to have ceased in the early 1970s. The origin of this outbreak is unknown, but it was postulated that the schistosomes were introduced by people travelling from either Morocco or a former Portuguese colony in Africa (eg, Angola, Mozambique, or Guinea Bissau). One important difference between transmission in Corsica and in Portugal is the intermediate snail host. Whereas *B truncatus* is assumed to be the intermediate snail host in Corsica, in Portugal, *Planorbarius metidjensis* snails (not present in Corsica) were found to be naturally infected with schistosomes at the time of the outbreak and were therefore proposed as the intermediate host responsible for the schistosomiasis transmission (30). This finding was unexpected because *P metidjensis* is not a typical host for *S haematobium* and schistosomes are known to be highly specific for their intermediate snail hosts. One explanation for the involvement of *P metidjensis* in the urogenital schistosomiasis outbreak in Portugal could have been the transmission of *S haematobium*-*S bovis* hybrids instead of pure *S haematobium*. Molecular tools for precise species identification were not available at that time so the infection was assumed to be due to infection with *S haematobium*, although this could not be verified. This hypothesis is supported by the fact that *S bovis* has been identified as using *P metidjensis* as a natural intermediate snail host in the Iberian Peninsula (31) and hybridisation between *S haematobium* and *S bovis* could make the resultant hybrid compatible with *P metidjensis*. Schistosome hybridisation has been shown to widen the range of invertebrate hosts, with hybrid progeny inheriting the ability to develop in the specific intermediate snail hosts of both parental species (32). Further experimental crosses between *S haematobium* and *S bovis* are needed to assess the compatibility of the resulting progeny with *B truncatus*, *P metidjensis*, or both. Such experiments would allow the range of snail hosts of these hybrid schistosomes to be established and further clarify the risk of spread and introduction of these parasites into other European countries.

Unfortunately, we found no patent-infected snails in the Cavu River, which is not surprising because the prevalence of naturally infected snails is normally very low (33). However, we only screened for active patent infections, and additional methods to detect pre-patent infections, such as PCR,<sup>34</sup> should be considered in future studies. We did compatibility experiments to investigate the role of the endemic *B truncatus* in the Corsican outbreak. Our findings showed that there is high

compatibility between the endemic snails and the schistosomes isolated from the infected patients, confirming their ability to be an intermediate snail host and supporting their role in transmission.



**Figure 4: Phylogenetic tree of *Schistosoma bovis* mitochondrial DNA *cox1* haplotypes**  
 Our data were compared with available *S bovis cox1* haplotype data (appendix p 2).  
*cox1*=mitochondrial cytochrome oxidase subunit I.

**Table 4: Experimental infections of *Bulinus truncatus* snails\***

No. of miracidia	Number of exposed snails	Number of surviving snails	Number of infected snails	Prevalence of infection
1	24	18	3	17%
2	48	48	6	13%
3	35	34	8	24%

\*Infections performed on snails collected in the Cavu River with schistosomes recovered from a single patient identified as patient 12. Infection was confirmed by natural cercarial emission at 48 days post exposure

The molecular analysis of the Corsican schistosomes shows a close genetic relationship with schistosomes previously isolated from northern Senegal, suggesting a west African origin for the schistosomes in Corsica. *S haematobium* is endemic in 53 countries (35), and urogenital schistosomiasis is highly endemic across Senegal, with prevalence estimated around 25% of the total

population, but ranging between 0% and 100% according to the region (36). Senegal was a French colony until 1958, but important ties remain between France and Senegal. Nationals travel freely between both countries and Senegal is a popular tourist destination for French nationals. French tourists can become infected in Senegal and infections are often reported in European travellers (37,38). Individuals might not know that they are infected and could introduce the parasite into places such as Corsica. Emigration from Senegal to Europe is frequent, with France remaining the most common destination (39). Senegalese nationals travelling legally to Corsica for summer work is common, creating an opportunity for the accidental importation of African schistosomes. The Cavu River, an ideal habitat for *B truncatus*, is particularly attractive for recreational bathing or swimming, enabling the spread of urogenital schistosomiasis by infected people urinating in the freshwater pools. Corsica is visited by 3 million tourists every year, including 2.7 million in the high season between May and October (40). During the peak of the tourist season (from mid-July to mid-August) 3000-5000 people visit the Cavu River every day. These high visitor numbers, combined with the high abundance of suitable intermediate snail hosts and people travelling between Corsica and urogenital schistosomiasis-endemic areas, makes the Cavu River a high-risk area for the introduction and transmission of urogenital schistosomiasis.

In a previous report, we showed that a 12-year-old German boy who visited Corsica in 2013/19 was exclusively excreting *S haematobium*-*S bovis* hybrid schistosomes (23). Our present study includes data from 12 additional patients and depicts a more complex situation. These patients excreted both pure *S haematobium* and *S haematobium*-*S bovis* hybrids, which is common in Senegal (15,16). Additionally, to our knowledge, we have detected the first pure *S bovis* genotype from a human patient, suggesting that this patient was infected with pure *S bovis* schistosomes. Since *S bovis* is deemed to be a parasite of domestic livestock, this finding presents the first potential evidence for the zoonotic transmission of *S bovis*. However, existing genotyping tools are limited in that we have used only two genes for hybrid identification and the nuclear genetic profiles can be affected by hybrid backcrossed generations, which would silence the genetic signal from one of the parental species (15). More genetic data are needed to fully elucidate whether this was a true case of zoonotic infection. Additionally, *S bovis* is an intestinal schistosome, which runs counter to the notion that this is a pure zoonotic infection because these schistosomes were excreted in urine. Unlike the previous studies from Senegal, we did not see double chromatogram peaks in the nuclear ITS sequences at the polymorphic sites separating *S bovis* and *S haematobium*. This suggests that the Corsican hybrids are not first generation hybrids resulting from *S haematobium* and *S bovis* schistosomes being dually transmitted in Corsica and mating within the infected patients (15) but are instead a result of the direct



introduction of *S haematobium-S bovis* hybrids into Corsica alongside pure *S haematobium*. This idea is further supported by the fact that we found no infected livestock in the area.

*B truncatus* has a much wider distribution than its compatible schistosome species. These snails are endemic in southern Europe, including Spain, Italy, France, and Greece. Mean water temperatures are expected to increase in the south of Europe (41), which will enhance the survival and fitness of both the parasite and snail populations. Given the recent increase in migration from endemic areas across some of these regions, together with parasite genetic variants, the spread of parasite species becomes a real risk. This risk warrants further investigation, but also needs to be brought to the attention of European governments. Furthermore, the findings from this study and all the other reports about urogenital schistosomiasis infection in Corsica, show how easily this form of schistosomiasis can spread even where good hygiene and sanitation practices are in place. Additionally, the findings raise concerns as to how the transmission of urogenital schistosomiasis can be controlled, even in developed settings, which will hamper goals set to achieve elimination in endemic areas within the near future (42).

### **Contributors**

JB, BLW, and TH wrote the manuscript. ET, GMo, HM, DR, SM-C, and GMi revised the manuscript. JB, SG-A, JF, JK-S, AR, RG, and HB-C did the malacological survey. SG-A collected animal blood samples. J-FA did the molecular analyses. AO did ELISA tests. JB, GMi, and RH questioned patients along the Cavu River. AB and HN supplied parasite samples. JB and AR did the experimental infections. BLW did the phylogenetic and phylogeographic analyses.

### **Declaration of interests**

We declare that we have no conflicts of interest.

### **Acknowledgements**

The work was financially supported by WHO (World Health Organization), ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) and UPVD (University of Perpignan Via Domitia). Spanish collaboration funded by Red RICET (No. RD12/0018/0013 of the VI PN de I+D+I 2008-2011, ISCIII-Sub dirección General de RETICS), Ministry of Health and Consumption, Madrid. Authors would thank Pr Pierre Marty from CHU de

Nice, and all members the Bilharziasis expert group of ANSES. Authors thank Dr Françoise Alluin and all the members of the 2A2B laboratory (Porto-Vecchio, France).

## **References**

1. Bouzid M, Colon-Gonzalez FJ, Lung T, Lake IR, Hunter PR. Climate change and the emergence of vector-borne diseases in Europe: case study of dengue fever. *BMC public health*. 2014; 14:781.
2. Schaffner F, Fontenille D, Mathis A. Autochthonous dengue emphasises the threat of arbovirosis in Europe. *The Lancet Infect Dis*. 2014; 14:1044.
3. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*. 2007; 370:1840-6.
4. Gould EA, Gallian P, De Lamballerie X, Charrel RN. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16:1702-4.
5. Rollinson D, Stothard JR, Southgate VR. Interactions between intermediate snail hosts of the genus *Bulinus* and schistosomes of the *Schistosoma haematobium* group. *Parasitology* 2001; 123:245-60.
6. Rollinson D. A wake up call for urinary schistosomiasis: reconciling research effort and public health importance *Parasitology*. 2009; 136:1593-610.
7. King CH, Dickman K, Tisch DJ. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet*. 2005; 365:1561-9.
8. van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema JDF, et al. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop*. 2003; 86:125-39.
9. Shiff C, Veltri R, Naples J, Quartey J, Otchere J, Anyan W, et al. Ultrasound verification of bladder damage is associated with known biomarkers of bladder cancer in adults chronically infected with *Schistosoma haematobium* in Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006; 100:847-54.
10. Kjetland EF, Norseth HM, Taylor M, Lillebo K, Kleppa E, Holmen SD, et al. Classification of the lesions observed in female genital schistosomiasis. *Int J Gynaecol Obstet*. 2014; 127:227-8.

11. De Bont J, Vercruysse J. The epidemiology and control of cattle schistosomiasis. *Parasitology today* 1997; 13:255-62.
13. Brumpt E. Cycle évolutif du *Schistosoma bovis* (*Bilharzia crassa*); infection spontanée de *Bulinus contortus* en Corse. *C R Acad Sci Ser III Sci Vie.* 1929; CLXXXI:879.
14. Grétilat S. Epidémiologie de certaines affections à trématodes des animaux domestiques en Corse (Bilharziose bovine et distomatose bovine et ovine). *Ann Parasitol Hum Comp.* 1963; 38:471-81.
15. Webster BL, Diaw OT, Seye MM, Webster JP, Rollinson D. Introgressive hybridization of *Schistosoma haematobium* group species in Senegal: species barrier break down between ruminant and human schistosomes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7:e2110.
16. Huyse T, Webster BL, Geldof S, Stothard JR, Diaw OT, Polman K, et al. Bidirectional introgressive hybridization between a cattle and human schistosome species. *PLoS Pathog.* 2009; 5:e1000571.
17. Tchuem Tchuente LA, Southgate VR, Jourdane J, Webster BL, Vercruysse J. *Schistosoma intercalatum*: an endangered species in Cameroon? *Trends Parasitol.* 2003; 19:389-93.
18. Berry A, Moné H, Iriart X, Mouahid G, Aboo O, Boissier J, et al. Schistosomiasis Haematobium, Corsica, France. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20:1595-7.
19. Holtfreter MC, Mone H, Muller-Stover I, Mouahid G, Richter J. *Schistosoma haematobium* infections acquired in Corsica, France, August 2013. *Euro Surveill.* 2014; 19:22.
20. Boissier J, Mone H, Mitta G, Bargues MD, Molyneux D, Mas-Coma S. Schistosomiasis reaches Europe. *The Lancet Infect Dis.* 2015; 15:757-8.
21. Doby JM, Rault B, Deblock S, Chabaud A. Snails and bilharziasis in Corsica. Distribution, frequency and biology of *Bulinus truncatus*. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1966; 41 :337-49.
22. Berry A, Fillaux J, Martin-Blondel G, Boissier J, Iriart X, Marchou B, Magnaval JF, Delobel P. Evidence for a permanent presence of schistosomiasis in Corsica, France, 2015. *Eurosurveillance;* 21: 3
23. Mone H, Holtfreter MC, Allienne JF, Mintsá-Nguema R, Ibikounle M, Boissier J, et al. Introgressive hybridizations of *Schistosoma haematobium* by *Schistosoma bovis* at the origin of the first case report of schistosomiasis in Corsica (France, Europe). *Parasitol Res.* 2015; 114:4127-33.

24. de la Torre-Escudero E, Manzano-Roman R, Perez-Sanchez R, Barrera I, Siles-Lucas M, Oleaga A. Molecular cloning, characterization and diagnostic performance of the *Schistosoma bovis* 22.6 antigen. *Vet Parasitol.* 2012; 190:530-40.
25. Beltran S, Galinier R, Allienne JF, Boissier J. Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages. *Mem Instituto Oswaldo Cruz.* 2008; 103:501-3.
26. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 2008; 25:1253-6.
27. Boissier J, Chlichlia K, Digon Y, Ruppel A, Moné H. Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res.* 2003; 91:144-50.
28. Webster BL, Emery AM, Webster JP, Gouvras A, Garba A, Diaw O, et al. Genetic diversity within *Schistosoma haematobium*: DNA barcoding reveals two distinct groups. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6:e1882.
29. De Azevedo JF, Da Silva JB, Matos Coito A, Coelho MF, Colaco A. O foco Portugues de Schistosomiase. *Annals do Instituto Med Trop.* 1948; 5:175-221.
30. Bettencourt A, Borges I. Le *Planorbis metidjensis*, hôte intermédiaire du *Schistosoma haematobium* au Portugal. Confirmation expérimentale. *Archives de l'Institut de Bactériologie "Camara Pestana" Lisboa.* 1922; 5:1039.
31. Mone H, Mouahid G, Morand S. The distribution of *Schistosoma bovis* Sonsino, 1876 in relation to intermediate host mollusc-parasite relationships. *Adv Parasitol.* 1999; 44:99-138.
32. Webster BL, Southgate VR. Compatibility of *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and their hybrids with *Bulinus truncatus* and *B. forskalii*. *Parasitology.* 2003; 127:231-42.
33. Basch PF. Schistosomes. Development, reproduction, and host relations. New-York: Oxford University Press; 1991.
34. Hamburger J, Hoffman O, Kariuki HC, Muchiri EM, Ouma JH, Koech DK, et al. Large-scale, polymerase chain reaction-based surveillance of *Schistosoma haematobium* DNA in snails from transmission sites in coastal Kenya: a new tool for studying the dynamics of snail infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2004; 71:765-73.
35. Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.* 2000; 77:41-51.

36. Schur N, Hurlimann E, Garba A, Traore MS, Ndir O, Ratard RC, et al. Geostatistical model-based estimates of Schistosomiasis prevalence among individuals aged  $\leq 20$  years in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5:e1194.
37. Blach O, Rai B, Oates K, Franklin G, Bramwell S. An outbreak of schistosomiasis in travellers returning from endemic areas: the importance of rigorous tracing in peer groups exposed to risk of infection. *J Public Health (Oxford, England)*. 2012; 34:32-6.
38. Steiner F, Ignatius R, Friedrich-Jaenicke B, Dieckmann S, Harms G, Poppert S, et al. Acute schistosomiasis in European students returning from fieldwork at Lake Tanganyika, Tanzania. *J Travel Med*. 2013; 20:380-3.
39. Agence du Tourisme de la Corse. Observation et stratégie touristiques 2013. <http://www.bastia.aeroport.fr/Administration/accueil/pdf/pdfdosp20121227141029.pdf>
40. van Vliet MTH, Vodele S, Rubbelke D. Water constraints on European power supply under climate change: impacts on electricity prices. *Environ Res Letters*. 2013; 8:1-10.
41. Rollinson D, Knopp S, Levitz S, Stothard JR, Tchuem Tchuente LA, Garba A, et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Trop*. 2013; 128:423-40.

## **Epidemiological surveillance of schistosomiasis outbreak in Corsica (France): are animal reservoir hosts implicated in local transmission?**

Oleaga A.<sup>1</sup>, Rey O.<sup>2</sup>, Polack B.<sup>3</sup>, Grech-Angelini S.<sup>4</sup>, Quilichini Y.<sup>5</sup>, Pérez-Sánchez. R.<sup>1</sup>, Boireau P.<sup>6</sup>, Mulero S.<sup>2</sup>, Brunet A.<sup>5</sup>, Rogon A.<sup>2</sup>, Vallée I.<sup>6</sup>, Kincaid Smith J.<sup>2</sup>, Allienne J.F.<sup>2</sup>, Boissier J.<sup>2</sup>

1. Parasitology Laboratory, Institute of Natural Resources and Agrobiology (IRNASA, CSIC). Cordel de Merinas, 40-52, 37008 Salamanca, Spain.
2. IHPE, Univ. Montpellier, CNRS, Ifremer, Univ. Perpignan Via Domitia, Perpignan France
3. UMR BIPAR, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES, INRA, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, F-94700, France
4. Groupement Technique Vétérinaire de Corse, 20240 Ghisonaccia, France
5. UMR SPE 6134, CNRS-Université de Corse Campus Grimaldi Bât 018, Université de Corse, 20250 Corte, France
6. UMR BIPAR, Anses, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, INRA, University Paris-Est, Animal Health Laboratory, Maisons-Alfort, F-94700, France

### **Corresponding author :**

Pr Jérôme Boissier : boissier@univ-perp.fr

Published in *PLoS neglected tropical diseases* (2019), 13(6), e0007543.

## **Abstract**

Environmental and anthropogenic changes are expected to promote emergence and spread of pathogens worldwide. Since 2013, human urogenital schistosomiasis is established in Corsica island (France). Schistosomiasis is a parasitic disease affecting both humans and animals. The parasite involved in the Corsican outbreak is a hybrid form between *Schistosoma haematobium*, a human parasite, and *Schistosoma bovis*, a livestock parasite. *S. bovis* has been detected in Corsican livestock few decades ago raising the questions whether hybridization occurred in Corsica and if animals could behave as a reservoir for the recently established parasite lineage. The latter hypothesis has huge epidemiological outcomes since the emergence of a zoonotic lineage of schistosomes would be considerably harder to control and eradicate the disease locally and definitively needs to be verified. In this study we combined a sero-epidemiological survey on ruminants and a rodent trapping campaign to check whether schistosomes could shift on vertebrate hosts other than humans. A total of 3,519 domesticated animals (1,147 cattle; 671 goats and 1,701 sheep) from 160 farms established in 14 municipalities were sampled. From these 3,519 screened animals, 17 were found to be serologically positive but were ultimately considered as false positive after complementary analyses. Additionally, our 7-day extensive rodent trapping (i.e. 1,949 traps placed) resulted in the capture of a total of 34 rats (*Rattus rattus*) and 4 mice (*Mus musculus*). Despite the low number of rodents captured, molecular diagnostic tests showed that two of them have been found to be infected by schistosomes. Given the low abundance of rodents and the low parasitic prevalence and intensity among rodents, it is unlikely that neither rats nor ruminants play a significant role in the maintenance of schistosomiasis outbreak in Corsica. Finally, the most likely hypothesis is that local people initially infected in 2013 re-contaminated the river during subsequent summers, however we cannot definitively rule out the possibility of an animal species acting as reservoir host

## **Keyword**

*Schistosoma*, rat, ruminant, emergence, bilharziasis, Corsica, epidemiology

## **Short Title**

European schistosomiasis reservoir host

## **Author Summary**

There is an increasing interest on the effect of global changes on the transmission of infectious diseases. Both environmental and anthropogenic changes are expected to promote outbreaks and spread of pathogens. In particular, tropical infectious diseases are expected to move towards more temperate latitudes. Until 2013, urogenital schistosomiasis was restricted to tropical and sub-tropical areas. In summer 2013, a schistosomiasis outbreak has emerged in Corsica (France) with more than 100 cases. Corsica is a French Mediterranean island, which is very popular for tourists from throughout Europe due to the natural beauty of the environment. Surprisingly, in summer 2015 and 2016, the contamination has resumed, and schistosomiasis has been classified in the list of French notifiable infectious disease. In this context it has been hypothesised that reservoir vertebrate hosts, either human and/or animal are at the origin of the maintenance of the local transmission. This paper shows that ruminants (cow, sheep and goats) should not play a role of reservoir host but we found that rodents living in the vicinity of the transmission sites have been infected by the parasite. Considering the low abundance of rodents and the low parasitic prevalence/intensity among rodents, it is unlikely that rats play a significant role in the maintenance of schistosomiasis outbreak in Corsica and that other animals or human could maintain the parasite locally.

## **INTRODUCTION**

The increasing movements of humans and animals and the ongoing climate changes at the global scale are expected to promote the emergence or the spread of tropical infectious diseases in temperate areas [1]. In this context, in summer 2013 more than 100 cases of human urogenital schistosomiasis were contracted in a very confined locality in the south of Europe (Corsica, France) [2, 3]. In summer 2014 the incriminated river (i.e. the Cavu) was closed to recreational activities, but during the two next summers, 2015 and 2016, new local contamination events occurred [4, 5]. Molecular analyses performed on parasites from patients infected in 2013 and 2016 revealed that the parasite was the same unique strain [4]. In this scenario, it has been hypothesised that vertebrate hosts, either human, animal or both, would had been the original source and ongoing reservoirs for this parasite strain, maintaining the parasite transmission in this area [4].

Schistosomes are trematode parasites affecting either humans, animals or both, according to the species concerned in tropical and sub-tropical countries [6]. *Schistosoma haematobium* is responsible for human urogenital schistosomiasis, it is widely distributed through sub-Saharan Africa, Egypt, Sudan and the Arabian Peninsula and it is estimated to affect more than 110 million people



[7]. *Schistosoma bovis* is a schistosome species infecting livestock (cattle, sheep, goats, pigs, equines, and dromedaries), wild ruminants, and rodents [8]. This parasite species is widely distributed throughout Africa, the Middle East and to a lower extent in the Mediterranean islands and Spain [9]. It is estimated that at least 165 million cattle are infected with schistosomes worldwide causing serious socio-economic damages [10]. Considering the One Health approach, it has recently been proposed to better quantify these economic losses and eventually to treat the schistosomes infected livestock [11].

Surprisingly, the parasite that emerged in Corsica was not a pure *S. haematobium* parasite but a hybrid between *S. haematobium* and *S. bovis* [12]. It has previously been showed that this hybrid was imported from Senegal [2]. *S. haematobium* x *S. bovis* hybrids have also been reported in Niger, Mali and Benin [13]. Previous studies have found these hybrid parasites in human and rodent hosts [8]. Only two studies have investigated the presence of such hybrid parasites in domestic cattle but did not find any [14, 15]. However, as the own authors recognised, they only searched the blood vessels of the intestinal tract (infection site of pure *S. bovis*) and not the vessels of the urinary tract (infection site of pure *S. haematobium*), where the hybrids may have passed unnoticed [14, 15]. The fact that *S. bovis* was historically known to be present in the Corsican island [16, 17] makes the epidemiological situation much more complex and suggests the likely presence of local reservoir hosts and the potential of local hybridization events. The last study on the presence of *S. bovis* dates from 1962 [18] and since that time, *S. bovis* has not been investigated. Identifying infected animals in slaughterhouses relies on the detection of worms of approximately 1.5 cm in the cattle mesenteric system. Moreover, clinical manifestations in the *S. bovis* infected animals are poorly documented and the disease is mainly sub-clinical and chronic. As a consequence, the presence of *S. bovis* in the island is enigmatic and need to be investigated [19].

Another concern is the potential presence of rodent reservoir hosts. It is well known that schistosome parasites have affinity for rodent hosts, as evidenced by the fact that most species of schistosomes can be maintained under laboratory conditions using several rodent species as vertebrate hosts (e.g. mouse, hamster, rat, gerbil or guinea pig). There is experimental evidence that *S. bovis* can infect the Nile rat (*Arvicanthis niloticus* [20]) and a wide range of wild rodents has been found to be naturally infected by this parasite [21]: *Arvicanthis niloticus* [8, 20], *Mastomys natalensis* [22], *Praomys albipes*, *Rattus rattus*, *Mastomys coucha* and *Lophuromys flavopunctatus* [23]. However, rodents are poorly compatible for *S. haematobium* and only *Mastomys coucha* and *Arvicanthis niloticus* were successfully experimentally infected so far [23]. To our knowledge there is no evidence

of natural *S. haematobium* rodent infection. Interestingly however, one *S. haematobium* x *S. bovis* hybrid parasite were recently detected in *Mastomys huberti* in Senegal [8]. The close genetic similarities between parasites established in Corsica and those present in Senegal hence raise the question whether rodents present in Corsica could constitute potential reservoir hosts locally.

Our aim was to identify if animals (livestock and/or wild rodents) can be reservoir host of zoonotic schistosomes in Corsica. This study included both a large-scale sero-epidemiological survey on ruminants and a rodent trapping campaign in the vicinity of the Cavu where the schistosomiasis transmission is still persisting. We have also experimentally tested the ability of schistosome hybrids from Corsica to infect *Rattus norvegicus* laboratory hosts.

## **METHODS**

### **Sero-epidemiological survey of ruminants**

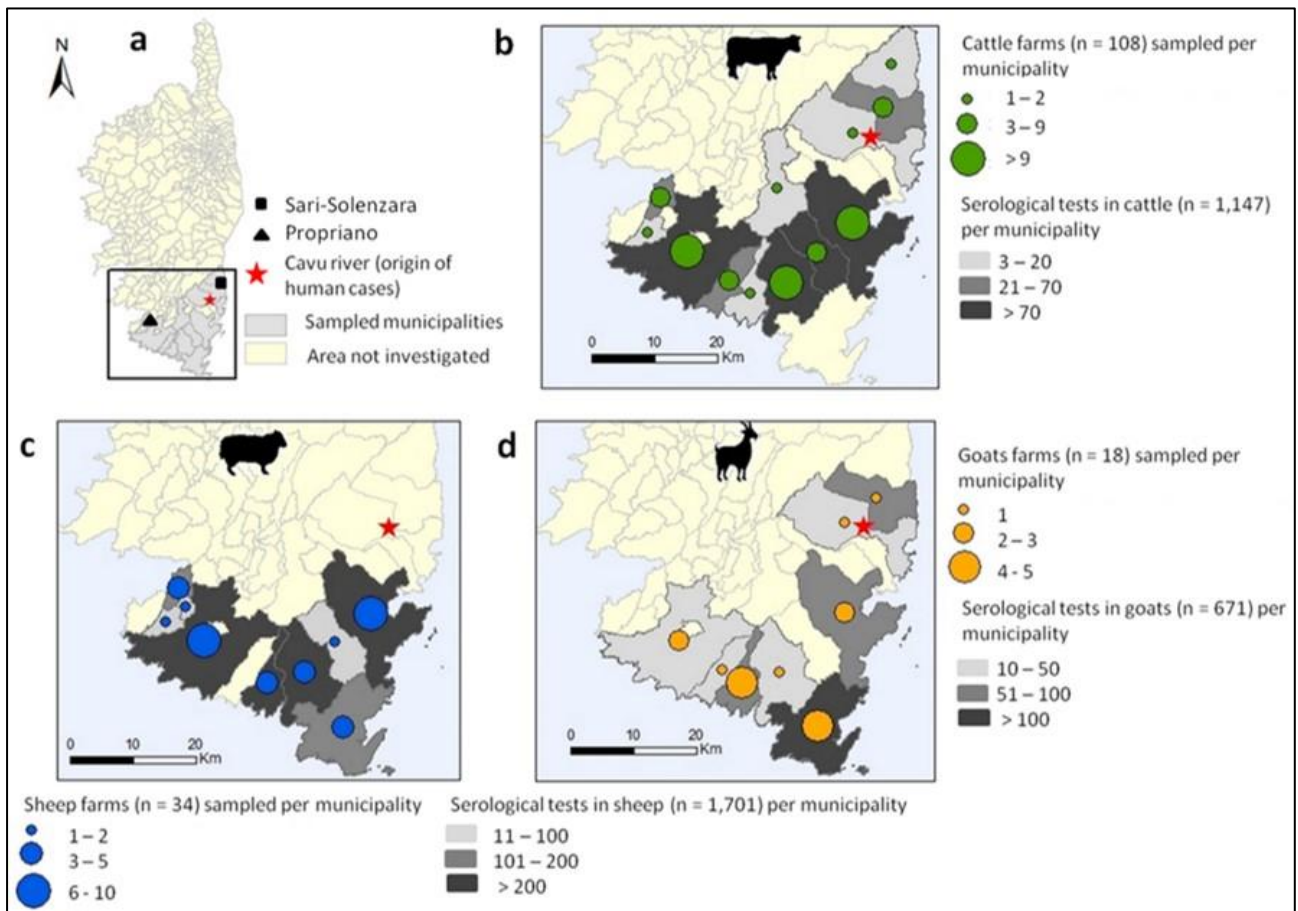
#### **Sampling area and serum collection**

Corsica is a French island situated in the north-western Mediterranean Sea at 15 km north from Sardinia and 90 km west from Tuscany in Italy. A large part of the island is preserved as a nature reserve (3500 km<sup>2</sup>), with a mountainous landscape. About 320,000 people live in Corsica. Besides tourism, the local leading economic activity, livestock farming also represents an important resource with approximately 113,000 sheep, 46,000 goats, 55,000 pigs and 65,000 cattle recorded at the island scale [24]. Animals were sampled in an area southwards of a virtual line joining Propriano to Solenzara municipalities that includes (i) the historical *S. bovis* foci near the municipalities of Propriano and Sartène [18] and Monacia-d'Aullène [16] and (ii) the Cavu where human contaminations first occurred in 2013 and 2015 (Fig 1). Blood samples were collected by practicing veterinarians in 2014 and 2015, during the annual serological testing of herds for brucellosis surveillance. In this area, about 16,200 adults' ruminants (7,500 cattle, 7,300 sheep and 1,400 goats) are reared in 255 farms (165 for cattle, 59 for sheep and 31 for goats) localized in 24 municipalities [24].

#### **ELISA assay**

ELISA tests were performed to detect potential anti-schistosome antibodies in the sera of animals using a tegumental extract (TG) of *S. bovis* adult worms as coating antigen. This *S. bovis* TG extract was obtained as previously described [25].

*Annexe 2 : Epidemiological surveillance of schistosomiasis outbreak in Corsica (France): Are animal reservoir hosts implicated in local transmission?*



**Figure 1.** Mapping of the sampling area in south Corsica (a) and distribution of the sampled cows (b), sheep (c) and goats (d). This map was made using QGIS 3.4.1 using open shapefile map of the Corsica island.

Multi-well polystyrene plates (Corning, Ref 3369) were coated overnight at 4 °C with 0.5 µg/well of TG extract in 100 µl of carbonate buffer, pH 9.6. The following day, the plates were first washed three times with 0.05% Tween-20 in PBS (TPBS) and then blocked with 200 µl/well of 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 h at 37°C. After a series of three additional washes, the sera were placed into duplicated wells (100 µl/well of a 1/100 dilution in TPBS) and incubated for 1 hour at 37 °C. After a last washing step, 100 µl/well of a 1/16,000 dilution of peroxidase-labelled anti-bovine IgG (Sigma, A5295) or a 1/6,000 dilution of peroxidase-labelled anti-Sheep/Goat IgG (AbD Serotec, STAR88P) was added and the plates were incubated for 1 hour at 37 °C. Finally, the plates were incubated for 10 minutes at room temperature with 100 µl/well of substrate solution (0.6 mg/ml of orto-phenylenediamine and 0.4 µl/ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in citrate buffer pH 5.0). The reaction was stopped with 100 µl/well of 3N sulfuric acid, and the optical densities (OD) at 492 nm were read with the Multiskan GO spectrophotometer (Thermo Scientific).

In each plate, 3 positive and 3 negative control sera were included. The negative and positive control sera used for the analysis of sheep and goats were obtained from naive sheep and from sheep experimentally infected with *S. bovis*. For the analysis of the bovine sera, positive and negative control sera were collected from cattle during an epidemiological study performed in the province of Salamanca (Spain) [26]. Any positive and/or doubtful sera potentially detected were reanalyzed independently following the same protocol. Additionally, bearing in mind that the trematode *Fasciola hepatica* is also present in Corsica [27], the potential reactivity of the TG extract with antibodies against *F. hepatica* infection was checked. To do so, serum samples from six lambs experimentally infected with 100 *F. hepatica* metacercariae obtained in a previous work [28] were analyzed by ELISA against the excreted/secreted antigen of *F. hepatica* (E/S Fh) and the TG extract of *S. bovis*. The E/S Fh antigen was prepared as previously described [29].

### **Statistics of ELISA data**

To analyze the results of the serology and to compare serological patterns between samples, each optical density (OD) was transformed into an Elisa Index (EI) by applying the following formula: OD of each serum / mean OD of the negative control sera included in each plate. Receiver–Operator Characteristic (ROC) curve were built for the TG extract and used to establish the cut-off value of EI used to discriminate between positive and negative animals. A ROC curve is obtained by calculating the sensitivity and specificity of a test or an antigen at every possible cut-off point, and plotting sensitivity against specificity [30]. The current ROC analysis was performed using 50 well-defined sera from sheep infected experimentally with *S. bovis* and 164 sera from naive sheep (without schistosomes). After that, the cut-off selected was the EI value that gave the highest diagnostic performance for the TG extract, which was calculated as the sum of the sensitivity and specificity divided by two. Then, this value was used to establish the positive/negative state of all the animal sera analysed. This ROC analysis was performed using the SPSS v17 software package.

### **Coprolological methods**

For ELISA positive animals, coprolological examination was assessed by recovering faecal sample directly from the rectum. A faecal sample of approximately 100 grams was diluted in saline solution and passed through a series of stainless steel sieves (420 µm, 250 µm, and 45 µm). The eggs should be retained in the last sieve.

### **Rodent trapping**

The trapping campaign was done along the Cavu between the 29<sup>th</sup> of May and the 9<sup>th</sup> of June 2018. The distance between the river and the traps was generally less than 50 meters and never greater than

150 meters. We have focused our survey in the vicinity of the human transmission sites identified in 2013 and 2015 [2, 4]. The traps (27x9x9 cm; Caussade, France) were deposited along the forest in steep locations and also near human activities. Our protocol considered the nocturnal activity of the targeted species. Thus the traps were baited every late afternoon, and inspected in subsequent early morning. A total of 1,949 traps were placed during 10 trapping sessions. Nontarget species such as shrews (*Crocidura suaveolens*), hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) or weasels (*Mustela nivalis*) were immediately released at the point of capture.

Trapped small rodents (mouse and rats) were returned alive to the laboratory for necropsy. Animal were euthanized with lethal injection of 1 mg per kg body weight of a sodium pentobarbital solution (Dolethal, Vetoquinol, Lure, France) and then perfused using an hepatic perfusion technique [31]. The resulting collected blood was filtered to recover potential adult worms. Animal internal organs (i.e. liver, mesenteric vessels, peri-vesical area) were examined to identify possible traces of schistosome infection. Some suspicious zones such as liver cysts and abnormal (hemozoin-like) pigments were biopsied and the fragments of tissues were stored in ethanol 95% for subsequent genetic diagnostics.

DNA extraction from worms and biopsies were performed using E.Z.N.A. tissue DNA extraction kit (Omega Bio-tek, USA) following the manufacturer's instruction. Extracted DNA from worms and biopsies were then amplified by PCR using Sh73/DraI assay [32]. This PCR diagnostic tool is very sensitive and specific to the *S. haematobium* parasite group and the resulting genetic profiles allow distinguishing between *S. bovis* and *S. haematobium* [32]. The PCR target a 121 bp repeated sequence of the schistosome genome. According to the PCR efficiency some extra bands can be observed representing multiples of 121 bp (e.g. 242). For worms only, the complete internal transcribed spacer (ITS) and a partial region of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (cox1) gene were amplified by PCR and sequenced by a subcontractor (Genoscreen, Lille, France). Sequences were first visualised and manually corrected before being compared to a set of reference sequences from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database including the sequences corresponding to the parasites from the 2013 and 2015 outbreaks [2, 4]. Detailed PCR protocols are available in supplementary Text 1.

## **Testing experimental infection of hybrid schistosomes from Corsica on *Rattus norvegicus***

The parasite that emerged in Corsica is routinely maintained in the lab using hamsters as vertebrate hosts and a sympatric lineage of *Bulinus truncatus* as intermediate host [33]. Three Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were exposed to three different doses of cercariae: 400, 600 and 800 following standard procedure [31, 34]. Rats were returned to their facilities and reared under standard experimental conditions for 105 day to give time for the potential infecting parasites to develop in their hosts. After this developing period, the rats were euthanized with lethal injection of 0.3 ml of a sodium pentobarbital solution (Dolethal, Vetoquinol, Lure, France) and perfused using hepatic perfusion technique [31]. The blood from each rat was filtered and visually inspected for the presence of adult worms. Similarly to wild animals, organs were also thoroughly examined to identify possible traces of schistosome infection.

### **Ethics statement**

All experiments were carried out according to national ethical standards (NOR: AGRG1238753A). The French Ministry of Agriculture (Ministère chargé de l'Agriculture), and the French Ministry for Higher Education, Research and Technology (Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie) approved the experiments carried out for this study and provided permit A66040 for animal experimentation. The investigator possesses the official certificate for animal experimentation (Decret n° 87-848 du 19 Octobre 1987).

## **RESULTS**

### **Sero-epidemiological survey on ruminants**

The sera of a total of 3,519 animals from 160 farms localized in 14 municipalities were sampled. This sampling effort represents 15% (n=1,147), 48% (n=671) and 22% (n=1,701) of the total cattle, goats and sheep reared in this area respectively (Fig 1). The resulting sera were stored at -20°C and sent to the laboratory of parasitology at IRNASA (CSIC) in Salamanca (Spain) for ELISA tests.

ROC analysis allowed us to set up a positivity/negativity cut-off between EI 2.5 and 2.8, with a diagnostic performance of 96.7% (97% sensitivity and 99.4% specificity). Since farmed animals are expected to be in contact with a greater number of pathogens and parasites compared to the experimental animals infected under laboratory conditions, we conservatively established a cut-off slightly higher (namely, EI 3). Accordingly, EI values comprised between 2.5 and 3 were considered

unclear results and the associated sera were re-analysed. More generally, we applied the following criterion: animals with serum samples displaying  $EI < 2.5$  were considered as negative, those with sera that displayed  $EI$  values between 2.5 and 3 were considered as doubtful, and finally animals with a detected  $EI$  value  $> 3$  were considered as infected by Schistosomes.

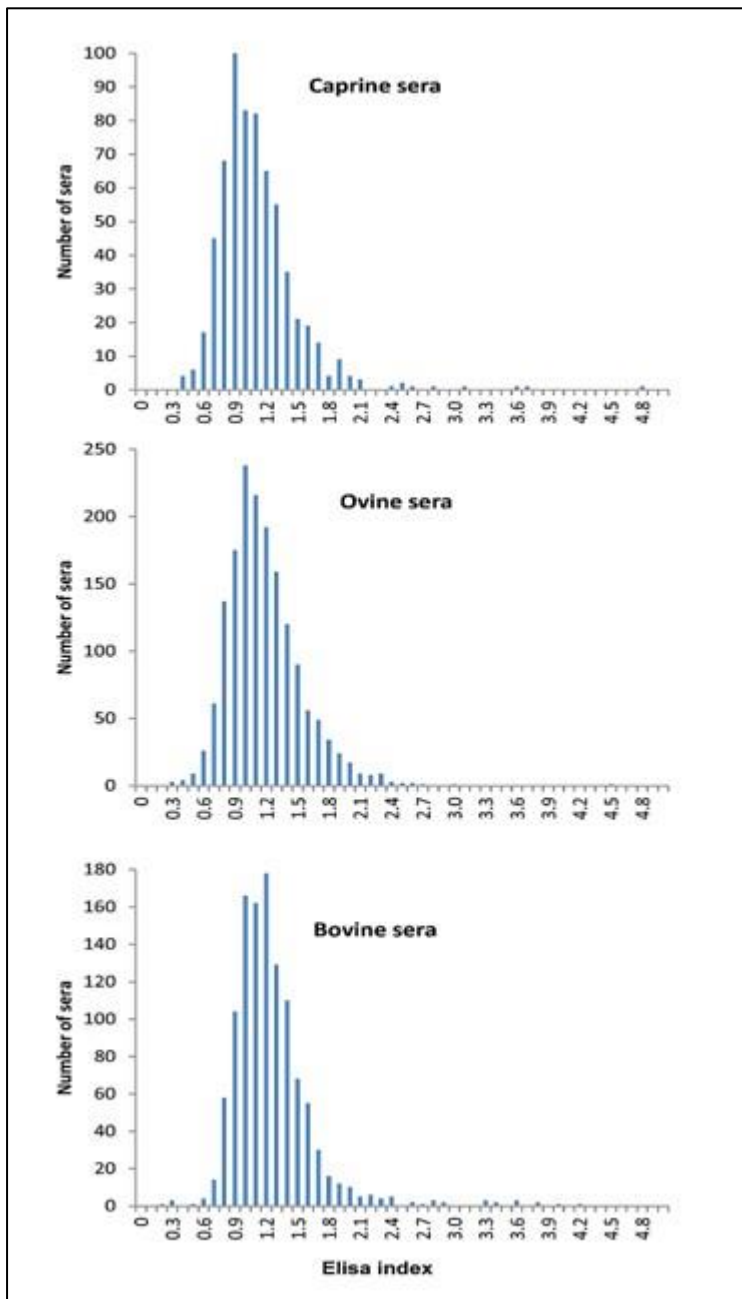
Table 1 shows the overall results of the ELISA analyses of 3,519 sera and Fig 2 represents the frequency of  $EI$  values obtained for each host species (i.e. goat, cattle, sheep). These results indicate that 99% of the sera analysed were negative, 0.52% remained doubtful after a double-analysis and 0.48% were found to be positive with  $EI$  values higher than 3. In order to explain these positive reactions, we first analyzed the cross-reaction to *F. hepatica*, which is an autochthonous trematode in Corsica [27]. The sera from sheep infected with *F. hepatica* showed increasingly detectable levels of antibodies to *F. hepatica* from the second week of infection onwards. However, none of these sera reacted at all with the TG antigen, clearly indicating that a possible concurrent infection by *F. hepatica* would not interfere in the *S. bovis*-ELISA diagnostic test. To confirm the diagnosed positive cases, additional blood samples from some animals found to be seropositive were collected and analyzed independently. From the 17 animals (12 cows – 1 sheep – 4 goats) detected positives during the first serological screening some animals was declared dead by the breeders (1 sheep – 1 goat – 1 cow) and for 8 animals (3 goats and 5 cows), the breeders refused a second serological sampling. Only 6 cows were serologically tested a second time. These cows were also diagnosed based on coprological examinations. This additional series of diagnostic tests revealed that these six cows were in fact negative based on both serological and coprological (i.e. absence of schistosome eggs) examinations.

**Table 1.** Results of the Elisa diagnostic based on the Elisa index ( $EI$ ) values obtained on individual sera from goats, sheep and cows.

	Negative $EI < 2.5$	Unclear $EI = 2.5-3$	Positive $EI > 3$	Total
Goat	663	4	4	671
Sheep	1694	6	1	1701
Cow	1127	8	12	1147

### Rodent trapping

The Table 2 represents the GPS coordinates of the different sites and the number of traps by site. Out of the 1,949 traps placed in the field, a total of 34 rats (*Rattus rattus*), 4 mice (*Mus musculus*), 2 shrews (*Crocidura suaveolens*), 3 hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) and 2 weasels (*Mustela nivalis*) were trapped.



**Figure 2.** Occurrence of the ELISA index (EI) values given by the analyzed sera samples in goats, cows and sheep



**Table 2.** Name, GPS coordinates and number of traps for each site. \*: evidence of local human contamination during summer 2013 and 2015.

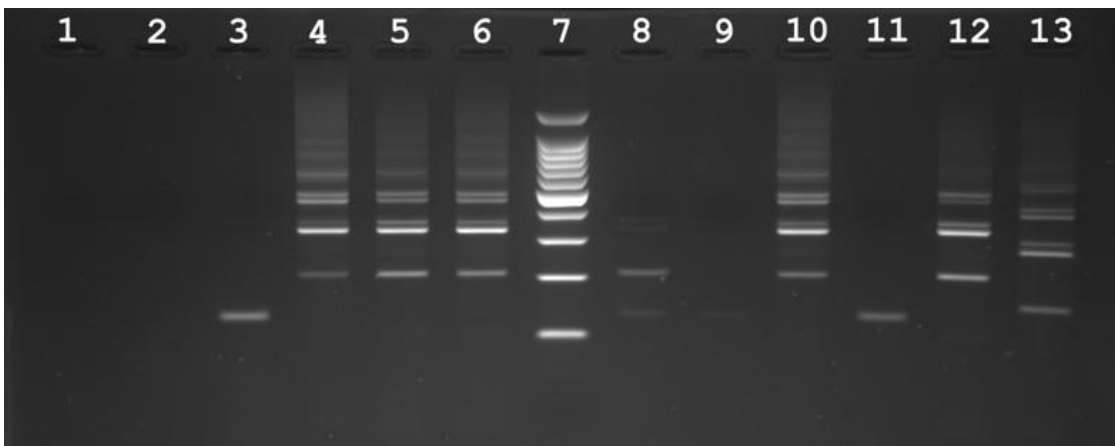
Site name	Coordinates	Number of traps	Number of trapped animals ( <i>Rattus rattus</i> )
Les trois piscines*	41°43'56.66"N 9°17'38.11"E	786	6 (5)
Le parc accrobranche*	41°43'26.86"N 9°17'55.09"E	731	24 (15)
Le pont de Conca*	41°42'23.15"N 9°20'0.65"E	298	8 (7)
L'école de Tagliu Rossu	41°42'28.81"N 9°19'3.78"E	80	5 (5)
La prise d'eau	41°42'52.99"N 9°18'14.68"E	54	2 (2)

\*: evidence of local human contamination during summer 2013 and 2015.

No trace of schistosome was found in the mice (*Mus musculus*). Among the 34 rats, one individual (called R1) was infected by a unique male schistosome. This rat also displayed granuloma on the liver (that could indicate the past or present occurrence of schistosome eggs in the liver) and black pigments on the mesenteric system. These pigments were similar to the hemozoin pigment specifically found in mature female schistosomes. Both granuloma and a piece of the mesenteric vein harbouring the black pigment were biopsied. A second rat (R2) did not display adult worms after the perfusion but some black pigmentation on the mesenteric system and on the hepatic portal system similar to those found in the rat R1. Biopsies were performed on these two zones. Additionally, samples from the liver, the mesenteric vessels and the bladder from a third rat (R3) where no trace was observed were also biopsied as negative controls.

Fig 3 shows PCR profiles after the Sh73/DraI PCR diagnostic test performed on the biopsies from the two suspicious rats (R1, R2) and the negative non-infected rat R3. No band amplification was observed on the biopsies from the non-infected rat R3 (well 1, 2, 3). Conversely, a PCR amplification was obtained for the adult worm and all biopsies collected on the rat R1 (well 4: worm; well 5: biopsy of mesenters; well 6: biopsy of the granuloma) and all amplifications displayed a migration pattern specific to pure *S. haematobium* (well 12). In respect with the rat R2, we find less intense but positive PCR signal (i.e. presence of the 121 bp diagnostic band) on the mesenteric biopsy (well 8). No amplification was obtained on the biopsy performed on the hepatic portal system of the same rat (well 9).

The ITS sequence (Genbank accession number: MK797748) from the single worm from the rat R1 was assigned to *S. haematobium* and the cox1 sequence was assigned to *S. bovis*, a pattern commonly found in hybrids from the lineage established in Corsica. The cox1 sequence (Genbank accession number: MK797748) obtained from this worm is strictly identical to the Sb2 haplotype found during the 2013 and 2015 outbreaks [2, 4].



**Figure 3.** Molecular diagnostic of samples (either worms or biopsies) recovered from non-infected (negative control) and infected rats (*Rattus rattus*) in Corsica, France. The Sh73/DraI PCR specifically targets parasites from the *S. haematobium* group. The first three wells correspond to PCR results obtained for biopsies from the liver (well 1), mesenteric vessels (well 2) and bladder (well 3) of a non-infected rat (R3). The following three wells correspond to PCR results obtained from an adult worm (well 4), a mesenteric biopsy (well 5) and a biopsy on a liver granulum (well 6) from the infected rat R1. Well 7 is a size standard (ladder). Well 8-9 are PCR amplifications obtained from a biopsies of the mesenteric vessels (well 8) and of the hepatic portal system (well 9) collected on the infected rat R2. Well 11: negative control. Well 10, 12 and 13 are positive controls (well 10: worm of the corsican schistosome strain, well 12: DNA from pure *S. haematobium* worm and well 13: DNA from pure *S. bovis* worm). Note that all of the amplification patterns obtained on the infected rats display a classical *S. haematobium* pattern.

### **Experimental rodent infection**

Among the three Wistar rats experimentally exposed to the schistosome strain that emerged in Corsica only two were slightly infected. No worms were recovered from the rat exposed to 800 cercariae and no trace of schistosomes was observed in the organs. The rat exposed to 600 cercariae displayed one schistosome pair, two single males and a few granulomas on the liver. Finally, the rat exposed to 400 cercariae displayed a single male worm and no granuloma in the liver. No pigment trace was observed on the three animals.

### **DISCUSSION**

In 2013, the emergence of schistosomiasis in Corsica was clearly unexpected for both the scientific community and public health authorities [35]. Even more surprising was the persistence of the

outbreak with evidences of new local infections during summer 2015 and 2016 [4, 36]. Because free larval stages cannot resist in the environment, the persistence of the parasite has to be attributed to the maintenance inside intermediate and/or definitive hosts. Considering the longevity of infected snail intermediate hosts in the lab (170 days at best [37]) and if we suppose that these snails can resist over one winter season this cannot explain the 2015 and 2016 cases. The existence of local vertebrate reservoir hosts either human and/or animal is the more likely explanation.

The diagnostic of schistosomiasis in humans or animals is far from being trivial. For humans, several diagnostic commercial kits exist based on the ELISA, Indirect Haemagglutination (IHA) or Western Blot methods [38]. During the outbreak in Corsica, the French authorities for human health recommended the concurrent use of these two methods (IHA and ELISA), followed by a Western Blot analysis when the two former tests were discordant. For animals, no such commercial kits exist to detect bovine schistosomiasis. Infections of ruminants by *S. bovis* can be assessed either directly, i.e. through the detection of parasite eggs in faeces or adult worms in the mesenteric veins in sacrificed animals, or indirectly by detecting antibodies specific to *S. bovis* in animals' blood serum. Coprological diagnosis, which is the most frequently used by veterinarians, has high specificity but is very laborious and offers low sensitivity [39]. The detection of specific antibodies to *S. bovis* antigens in the animal host is more sensitive than coprology and furthermore, the serodiagnostic methods (as ELISA) can be applied to large-scale epidemiological studies [40].

In this study, we performed a wide serological survey in domestic ruminants originating from the geographic area where human infections by schistosomes were first reported in south Corsica. We used the *S. bovis* TG extract as antigen, which has proved to be very efficient and reliable for the detection of antibodies of *S. bovis* in sheep [41]. This method allowed us to detect a total of 17 positive animals. However, for several reasons we believe these positively diagnosed animals were in fact false positives. First, cows found to be serologically positive after the first set of analyses were found to be negative after a second batch ELISA analyses and a sub-sample of these animals were found to be negative using coprological test. Second, *S. bovis* usually exhibits a focalized distribution and infected animals are expected to cluster into few particular farms [42]. Contrary to this expectation, the 17 positively diagnosed animals originated from 10 different farms sometimes geographically distant from one another. Third, despite our first technical validation, glycan antigens can be responsible for many cross-reactions between parasite infections [26, 43]. We thus believe that the positive diagnostic of these 17 sera result from unspecific reactions to the glycoproteins that contain the TG extract [41]. In this regard, the potential influence of the hybrid status of schistosomes on the efficiency of serological diagnostic is not known. The sensitivity of serological commercial tests

using *S. mansoni* antigens is lower for *S. haematobium* infection than for *S. mansoni* infection [44]. *S. bovis* and *S. haematobium* are closely related species and *S. bovis* antigen has proved to be useful for the detection of human infections by *S. mansoni*, *S. intercalatum* and also *S. haematobium* [45-47]. However, the sensitivity of serological tests needs to be evaluated in the case of hybrid parasite infections in human.

Concerning rodents, both our experimental (i.e. on *R. norvegicus*) and field (on *R. rattus*) approaches indicate that rats are partially permissive to the hybrid schistosome strain that emerged in Corsica. Unfortunately, we did not experimentally test the compatibility of the schistosome strain naturally present in Corsica to black rats (*R. rattus*) since no laboratory strain of *R. rattus* was available. Importantly, both the black rats [48-50] and the brown rats [50] are known to be natural alternative reservoir hosts of the parasite *S. japonicum*. In the case of *S. mansoni* the situation is more complex. The two rodent host species are partially permissive to experimental infections. In particular, adult worms develop in the brown rat but the eggs produced are non fertile eggs and these eggs are not excreted, thus this species is not considered as a suitable vertebrate host for parasite transmission [51]. Conversely, the black rat is known to be a suitable host for *S. mansoni* transmission [52]. We lack information concerning the suitability of rats for either *S. haematobium* or *S. bovis*. Experimental infections showed that both rat species can be infected but are not very permissive to *S. haematobium* parasite [53]. To our knowledge only one study showed that *R. rattus* is permissive to *S. bovis* [23]. The ability of hybrid schistosomes to increase its host range and thus for *S. haematobium* hybrids to become a zoonotic parasite is a real concern. To date, no livestock animals was found to be infected by *S. haematobium* x *S. bovis* hybrid parasites [14] and only few rodents were found to be infected in Senegal [8]. In the case of Corsica, very few animals were caught (2.3% of trapping success) hence indicating a small abundance of rats in the vicinity of the identified transmission sites. Considering both the low parasite infectivity in experimental infection and the field observation showing low parasite prevalence and intensity in rodents (only two rats infected with very few worms and no trace of reproduction), we suppose that even if rats are permissive to infection their role in the maintenance and transmission of schistosomiasis locally is expected to be negligible.

In summary, our survey strongly suggests that bovine schistosomiasis is absent from the south of Corsica, and livestock or wild rodents may not play a role as reservoir host for human schistosomiasis. The host spectrums of schistosomes are at least partially known in their original distribution area in Africa, Asia and south America, but the invasion of a new ecosystem by a hybrid parasite strain may offer new host possibilities. As an example, the mouflon (*Ovis gmelini musimon*)

is endemic from Corsica, and nothing is currently known about the ability of *S. bovis* to infect such Ovidae. The fact that *S. bovis* is known to infect sheep and the presence of a mouflon population in the Cavu valley could support this last hypothesis. Moreover, the hybrid status of the parasite makes the situation much more complex because the host spectrum of hybrid schistosomes remains enigmatic. Some positive patients emitting schistosome eggs could serve as reservoir for schistosome infection in Corsica. This hypothesis is likely because up to 66% of the patients that have been found to be infected so far were asymptomatic [54], the diagnosis is difficult to establish and false negative are possible [54-56], and the median time for first symptom apparition is 30 weeks [54]. To conclude, even if the most likely hypothesis is that local people initially infected in 2013 re-contaminated the river during subsequent summers, we cannot definitively rule out the possibility of an animal species acting as reservoir host.

## **Supporting Information Legends**

S1 Text. Primer sequences and PCR protocol

### **Author Contributions**

**Conceptualization:** Ana Oleaga, Olivier Rey, Bruno Polack, Pascal Boireau, Isabelle Vallée, Jérôme Boissier.

**Data curation:** Ana Oleaga, Olivier Rey, Bruno Polack, Isabelle Vallée, Jérôme Boissier.

**Formal analysis:** Ana Oleaga, Olivier Rey, Bruno Polack, Yann Quilichini, Jérôme Boissier.

**Funding acquisition:** Bruno Polack, Jérôme Boissier.

**Investigation:** Ana Oleaga, Olivier Rey, Bruno Polack, Sébastien Grech-Angelini, Yann Quilichini, Stephen Mulero, Aimé Brunet, Anne Rognon, Isabelle Vallée, Julien Kincaid-Smith, Jean-François Allienne, Jérôme Boissier.

**Methodology:** Ana Oleaga, Olivier Rey, Sébastien Grech-Angelini, Yann Quilichini, Jérôme Boissier.

**Project administration:** Jérôme Boissier.

**Supervision:** Jérôme Boissier.

**Validation:** Jérôme Boissier.

**Visualization:** Jérôme Boissier.

**Writing – original draft:** Ana Oleaga, Yann Quilichini, Jérôme Boissier.

**Writing – review & editing:** Ana Oleaga, Olivier Rey, Bruno Polack, Sébastien Grech-Angelini, Ricardo Pérez-Sanchez, Pascal Boireau, Isabelle Vallée, Julien Kincaid-Smith, Jérôme Boissier.

## REFERENCES

1. Kim KH, Kabir E, Ara Jahan S. A review of the consequences of global climate change on human health. *Journal of environmental science and health*. 2014;32(3):299-318. PubMed PMID: 25226222.
2. Boissier J, Grech-Angelini S, Webster BL, Allienne JF, Huyse T, Mas-Coma S, et al. Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *Lancet Infectious Disease*. 2016;16:971-9.
3. Noel H, Ruello M, Maccary A, Pelat C, Sommen C, Boissier J, et al. Large outbreak of urogenital schistosomiasis acquired in Southern Corsica, France: monitoring early signs of endemicization? *Clin Microbiol Infect*. 2017;24:295-300. doi: 10.1016/j.cmi.2017.06.026. PubMed PMID: 28669843.
4. Ramalli L, Mulero S, Noel H, Chiappini JD, Vincent J, Barre-Cardi H, et al. Persistence of schistosomal transmission linked to the Cavu river in southern Corsica since 2013. *Euro Surveill*. 2018;23(4):18-00017. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.4.18-00017. PubMed PMID: 29382413; PubMed Central PMCID: PMC5801336.
5. Berry A, Paris L, Boissier J, Caumes E. Schistosomiasis Screening of Travelers to Corsica, France. *Emerging Infectious Diseases*. 2016;22(1):159.
6. ODARC, DRAAF. Chambre d’agriculture de la Corse. Chiffres clés de l’agriculture corse. [http://draafcorseagriculturegouvfr/IMG/pdf/Chiffres-cles\\_2018\\_cle8eadefpdf](http://draafcorseagriculturegouvfr/IMG/pdf/Chiffres-cles_2018_cle8eadefpdf). 2018.
7. Rollinson D, Simpson AJG. *The biology of Schistosomes. From genes to latrines*. London: Academic Press; 1987. 446 p.
8. Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop*. 2002;82(2):139-46. PubMed PMID: 12020886.
9. Catalano S, Sene M, Diouf ND, Fall CB, Borlase A, Leger E, et al. Rodents as Natural Hosts of Zoonotic *Schistosoma* Species and Hybrids: An Epidemiological and Evolutionary Perspective From West Africa. *J Infect Dis*. 2018;218(3):429-33. Epub 2018/01/25. doi: 10.1093/infdis/jiy029. PubMed PMID: 29365139.
10. Mone H, Mouahid G, Morand S. The distribution of *Schistosoma bovis* Sonsino, 1876 in relation to intermediate host mollusc-parasite relationships. *Advances in parasitology*. 1999;44:99-138. PubMed PMID: 10563396.
11. De Bont J, Vercruysse J. The epidemiology and control of cattle schistosomiasis. *Parasitology today (Personal ed)*. 1997;13(7):255-62. PubMed PMID: 15275062.
12. Gower CM, Vince L, Webster JP. Should we be treating animal schistosomiasis in Africa? The need for a One Health economic evaluation of schistosomiasis control in people and their livestock. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017;111(6):244-7.

Epub 2017/10/19. doi: 10.1093/trstmh/trx047. PubMed PMID: 29044372; PubMed Central PMCID: PMC5914355.

13. Mone H, Holtfreter MC, Allienne JF, Mintsu-Nguema R, Ibikounle M, Boissier J, et al. Introgressive hybridizations of *Schistosoma haematobium* by *Schistosoma bovis* at the origin of the first case report of schistosomiasis in Corsica (France, Europe). *Parasitol Res.* 2015;114(11):4127-33. doi: 10.1007/s00436-015-4643-4. PubMed PMID: 26268566.
14. Leger E, Webster JP. Hybridizations within the Genus *Schistosoma*: implications for evolution, epidemiology and control. *Parasitology.* 2017;144:65-80. doi: 10.1017/S0031182016001190. PubMed PMID: 27572906.
15. Webster BL, Diaw OT, Seye MM, Webster JP, Rollinson D. Introgressive hybridization of *Schistosoma haematobium* group species in Senegal: species barrier break down between ruminant and human schistosomes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(4):e2110. PubMed PMID: 23593513.
16. Djuikwo-Teukeng F, Kouam Simo A, Alliene JF, Rey O, Njyou Ngapagna A, Tchuem Tchunte LA, et al. Population genetic structure of *Schistosoma bovis* in Cameroon *Parasites & vectors.* 2019;12:56-67.
17. Brumpt E. Cycle évolutif complet de *Schistosoma bovis*. Infection naturelle en Corse et infection expérimentale de *Bulinus contortus*. *Annales de parasitologie humaine et comparee.* 1930;VIII:17-50.
18. Brumpt E. Cycle évolutif du *Schistosoma bovis* (*Bilharzia crassa*); infection spontanée de *Bulinus contortus* en Corse. *C R Acad Sci Ser III Sci Vie.* 1929;CLXXXI:879.
19. Grétilat S. Epidémiologie de certaines affections à trématodes des animaux domestiques en Corse (Bilharziose bovine et distomatose bovine et ovine). *Annales de parasitologie humaine et comparee.* 1963;38:471-81.
20. Calavas D, Martin PM. Schistosomiasis in cattle in Corsica, France. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(12):2163-4. doi: 10.3201/eid2012.141474. PubMed PMID: 25417654; PubMed Central PMCID: PMC4257831.
21. Ghandour AM, Babiker A. The in vivo development of *Schistosoma bovis* in the Nile rat. *Ann Trop Med Parasitol.* 1978;72(3):227-30. PubMed PMID: 666394.
22. Standley CJ, Dobson AP, Stothard JR. Out of Animals and Back Again: Schistosomiasis as a Zoonosis in Africa. 2012.
23. Hanelt B, Mwangi IN, Kinuthia JM, Maina GM, Agola LE, Mutuku MW, et al. Schistosomes of small mammals from the Lake Victoria Basin, Kenya: new species, familiar species, and implications for schistosomiasis control. *Parasitology.* 2010;137(7):1109-18. PubMed PMID: 20380765.
24. Lo CT, Lemma A. Studies on *Schistosoma bovis* in Ethiopia. *Ann Trop Med Parasitol.* 1975;69(3):375-82. PubMed PMID: 808181.
25. Pérez-Sánchez R, Ramajo-Hernandez A, Ramajo-Martin V, Oleaga A. Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. *Proteomics.* 2006;6 Suppl 1:S226-36. doi: 10.1002/pmic.200500420. PubMed PMID: 16511809.
26. Oleaga A, Ramajo V. Efficiency of the oral, intramuscular and subcutaneous routes for the experimental infection of hamster and sheep with *Schistosoma bovis*. *Veterinary parasitology.* 2004;124(1-2):43-53. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.06.022. PubMed PMID: 15350660.

27. Valero MA, Panova M, Comes AM, Fons R, Mas-Coma S. Patterns in size and shedding of *Fasciola hepatica* eggs by naturally and experimentally infected murid rodents. *J Parasitol.* 2002;88(2):308-13. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0308:PISASO]2.0.CO;2. PubMed PMID: 12054003.
28. Martinez-Fernandez AR, Nogal-Ruiz JJ, Lopez-Aban J, Ramajo V, Oleaga A, Manga-Gonzalez Y, et al. Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Veterinary parasitology.* 2004;126(3):287-98. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.07.023. PubMed PMID: 15567592.
29. Casanueva R, Hillyer GV, Ramajo V, Oleaga A, Espinoza EY, Muro A. Immunoprophylaxis against *Fasciola hepatica* in rabbits using a recombinant Fh15 fatty acid-binding protein. *J Parasitol.* 2001;87(3):697-700. doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[0697:IAFHIR]2.0.CO;2. PubMed PMID: 11426738.
30. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J Intern Med.* 2013;4(2):627-35. Epub 2013/09/07. PubMed PMID: 24009950; PubMed Central PMCID: PMC3755824.
31. Dumont M, Moné H, Mouahid G, Idris MA, Shaban M, Boissier J. Influence of pattern of exposure, parasite genetic diversity and sex on the degree of protection against reinfection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res.* 2007;101:247-52. doi: doi : 10.1007/s00436-007-0476-0PubMedID: 17310396.
32. Abbasi I, Hamburger J, Kariuki C, Mungai PL, Muchiri EM, King CH. Differentiating *Schistosoma haematobium* from related animal schistosomes by PCR amplifying inter-repeat sequences flanking newly selected repeated sequences. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2012;87(6):1059-64. PubMed PMID: 23109375.
33. Kincaid-Smith J, Boissier J, Allienne JF, Oleaga A, Djuikwo-Teukeng F, Toulza E. A Genome Wide Comparison to Identify Markers to Differentiate the Sex of Larval Stages of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis* and their Respective Hybrids. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(11):e0005138. doi: 10.1371/journal.pntd.0005138. PubMed PMID: 27861520; PubMed Central PMCID: PMC5115654.
34. Boissier J, Chlichlia K, Digon Y, Ruppel A, Moné H. Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res.* 2003;91(2):144-50. doi: 10.1007/s00436-003-0943-1.
35. Kincaid-Smith J, Rey O, Toulza E, Berry A, Boissier J. Emerging Schistosomiasis in Europe: A Need to Quantify the Risks. *Trends in parasitology.* 2017;33(8):600-9. doi: 10.1016/j.pt.2017.04.009. PubMed PMID: 28539255.
36. Berry A, Fillaux J, Martin-Blondel G, Boissier J, Iriart X, Marchou B, et al. Evidence for a permanent presence of schistosomiasis in Corsica, France, 2015. *Euro Surveill.* 2016;21(1). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.1.30100. PubMed PMID: 26767427.
37. Chu KY, Sabbaghian H, Massoud J. Host-parasite relationship of *Bulinus truncatus* and *Schistosoma haematobium* in Iran. 2. Effect of exposure dosage of miracidia on the biology of the snail host and the development of the parasites. *Bull World Health Organ.* 1966;34(1):121-30.



38. Hinz R, Schwarz NG, Hahn A, Frickmann H. Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis - A review. *Mol Cell Probes*. 2016;31:2-21. doi: 10.1016/j.mcp.2016.12.003. PubMed PMID: 27986555.
39. Gomes LI, Enk MJ, Rabello A. Diagnosing schistosomiasis: where are we? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(1):3-11. Epub 2014/02/21. doi: 10.1590/0037-8682-0231-2013. PubMed PMID: 24553804.
40. de la Torre-Escudero E, Manzano-Roman R, Perez-Sanchez R, Barrera I, Siles-Lucas M, Oleaga A. Molecular cloning, characterization and diagnostic performance of the *Schistosoma bovis* 22.6 antigen. *Veterinary parasitology*. 2012;190(3-4):530-40. PubMed PMID: 22785127.
41. Ramajo-Hernandez A, Oleaga A, Ramajo-Martin V, Perez-Sanchez R. Carbohydrate profiling and protein identification of tegumental and excreted/secreted glycoproteins of adult *Schistosoma bovis* worms. *Veterinary parasitology*. 2007;144(1-2):45-60. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.09.034. PubMed PMID: 17055171.
42. Oleaga A, Ramajo-Hernández A, Pérez-Sánchez R, Ramajo-Martín V. Prevalence and distribution of the bullfighting cattle farms infected with *Schistosoma bovis* in the province of Salamanca (Spain). In: Mas-Coma, S, Bargues, MD, Esteban, JG, Valero, MA (Eds), *Multidisciplinarity for Parasites, Vectors and Parasitic Diseases* Artes gráficas Aguilar SL, Valencia, pp 283–284. 2004.
43. Alarcon de Noya B, Colmenares C, Lanz H, Caracciolo MA, Losada S, Noya O. *Schistosoma mansoni*: immunodiagnosis is improved by sodium metaperiodate which reduces cross-reactivity due to glycosylated epitopes of soluble egg antigen. *Exp Parasitol*. 2000;95(2):106-12. doi: 10.1006/expr.2000.4515. PubMed PMID: 10910711.
44. Kinkel HF, Dittrich S, Baumer B, Weitzel T. Evaluation of eight serological tests for diagnosis of imported schistosomiasis. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19(6):948-53. doi: 10.1128/CVI.05680-11. PubMed PMID: 22441394; PubMed Central PMCID: PMC3370443.
45. Belo S, Rompao S, Costa de Sousa B, Goncalves L, Ramajo V, Oleaga A, et al. Diagnostic potential of IgG4/ELISA in schistosomiasis intercalatum infection. *Trop Med Int Health*. 2009;14:193.
46. Roffi J, Lemasson JM. Use of a heterologous antigen (*Schistosoma bovis*) for the immunoenzymatic serodiagnosis of urinary bilharziasis. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. 1981;74(5):532-45. PubMed PMID: 6976218.
47. Pardo J, Arellano JL, Lopez-Velez R, Carranza C, Cordero M, Muro A. Application of an ELISA test using *Schistosoma bovis* adult worm antigens in travellers and immigrants from a schistosomiasis endemic area and its correlation with clinical findings. *Scand J Infect Dis*. 2007;39(5):435-40. doi: 10.1080/00365540601105806. PubMed PMID: 17464867.
48. Fedorko JM. *Schistosoma japonicum* in the black rat, *Rattus rattus mindanensis*, from Leyte, Philippines in relation to *Oncomelania* snail colonies with reference to other endoparasites. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1999;30(2):343-9. PubMed PMID: 10774707.
49. Kamiya H, Tada Y, Matsuda H, Tanaka H, Blas BL, Nosenas JS, et al. Annual fluctuation of *Schistosoma japonicum* infection in field rats, *Rattus rattus mindanensis*, in Dagami, Leyte, Philippines. *Jpn J Exp Med*. 1980;50(5):375-82. PubMed PMID: 7206265.

50. Guo Y, Jiang M, Gu L, Qiao Y, Li W. Prevalence of *Schistosoma japonicum* in wild rodents in five islands of the West Dongting Lake, China. *J Parasitol.* 2013;99(4):706-7. doi: 10.1645/12-35.1. PubMed PMID: 23259921.
51. Imbert-Establet D. Experimental approach of the role of *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus* in the focus of *Schistosoma mansoni* of Guadeloupe. Comparative development of *S. mansoni* in 2 natural hosts (*R. rattus* and *R. norvegicus*) and 2 laboratory hosts (the white mouse and the white rat). *Annales de parasitologie humaine et comparee.* 1982;57(3):271-84. PubMed PMID: 7137802.
52. Theron A, Sire C, Rognon A, Prugnolle F, Durand P. Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts. *Parasitology.* 2004;129(Pt 5):571-85. PubMed PMID: 15552402.
53. Martins AV. Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni*. *Bull World Health Organ.* 1958;18(5-6):931-44. PubMed PMID: 13573118; PubMed Central PMCID: PMC2537966.
54. Noel H, Ruello M, Maccary A, Pelat C, Sommen C, Boissier J, et al. Large outbreak of urogenital schistosomiasis acquired in Southern Corsica, France: monitoring early signs of endemicization? *Clin Microbiol Infect.* 2017. doi: 10.1016/j.cmi.2017.06.026. PubMed PMID: 28669843.
55. Mone H, Holtfreter MC, Mouahid G, Richter J. Difficulties in Schistosomiasis Assessment, Corsica, France. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(4):762-5. doi: 10.3201/eid2204.160110. PubMed PMID: 26982685.
56. Berry A, Paris L, Boissier J, Caumes E. Schistosomiasis Screening of Travelers to Corsica, France. *Emerging Infectious Diseases.* 2015.



## **Identification and molecular characterization of *Echinococcus canadensis* G6/7 in dogs from Corsica, France**

Sébastien GRECH-ANGELINI<sup>1,§</sup>, Céline RICHOMME<sup>2</sup>, Carine PEYTAVIN DE GARAM<sup>2</sup>, Jean-Marc BOUCHER<sup>2</sup>, Oscar MAESTRINI<sup>1</sup>, Frédéric GRENOUILLET<sup>3,4</sup>, François CASABIANCA<sup>1</sup>, Franck BOUE<sup>2</sup>, Gérald UMHANG<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> INRA, UR045, Laboratoire de Recherches sur le Développement de l'Élevage (Research Laboratory for the Development of Livestock), Corte, France

<sup>2</sup> ANSES LRFSN, Wildlife surveillance and eco-epidemiology unit, National Reference Laboratory for *Echinococcus spp.*, Malzéville, France

<sup>3</sup> Chrono-environnement Laboratory, UMR UFC/CNRS 6249 aff. INRA, University of Bourgogne-Franche-Comté, Besançon, France

<sup>4</sup> Parasite and Fungal Serologies Unit, French National Reference Center for Alveolar Echinococcosis and WHO Collaborating Center for Prevention and Treatment of Human Echinococcosis, University Hospital, Besançon, France

§ Present address: Groupement Technique Vétérinaire de Corse, Ghisonaccia, France

\* Corresponding author: G. Umhang, ANSES, National Reference Laboratory for *Echinococcus spp.*, Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife, Wildlife surveillance and eco-epidemiology unit, Technopôle Agricole et Vétérinaire, B.P. 40009, 54220 Malzéville, France – Email: gerald.umhang@anses.fr    Tel.: +33(0)3 83 29 89 50

Published in *Parasitology research* (2019), 118(4), 1313-1319

**Abstract:** Recent surveys at slaughterhouses confirmed the presence of three different species of *Echinococcus granulosus* sensu lato in France: *E. granulosus* sensu stricto, *E. ortleppi*, and *E. canadensis* G6/7. The latter species was only identified on the French Mediterranean island of Corsica, with a high prevalence in pigs and wild boar. In order to investigate the life cycle of *E. canadensis* in this region, dog feces were collected in 31 municipalities, mainly from individual kennels. The analysis of fecal samples from 259 dogs by multiplex real-time PCR shows no infection by *E. granulosus* sensu stricto but three dogs were infected by *E. canadensis* G6/7. Genetic analyses of mitochondrial genes (*cox1*, *nad1*, *nad3*, *atp6*) revealed in two dogs a haplotype previously identified in pigs. The third dog was infected by a new haplotype differing only from the two others from dogs by two mutations in the *atp6* gene. This latter haplotype is genetically closer to those identified in pigs rather than those from wild boars. Analysis of questionnaires completed by the owners revealed that the sampled dog population was almost exclusively composed of hunting dogs that had been infrequently dewormed. Most of the owners (78%) leave carcasses of hunter-harvested wild boar in close proximity to their dogs. Nevertheless, genetic results seem to indicate that the three dogs were infected due to their consumption of a pig's infected viscera following home slaughtering. This study confirms the role of dogs as definitive hosts of *E. canadensis* G6/7 in Corsica. Further molecular studies, notably in human cases, are needed to assess the zoonotic impact of *E. canadensis* G6/7 in this region.

**Keywords:** *Echinococcus canadensis* G6/7, cystic echinococcosis, dog, deworming, Corsica.

## **Introduction:**

Cystic echinococcosis (CE) is a zoonotic disease found worldwide and transmitted by cestodes of the *Echinococcus granulosus* sensu lato (s.l.) complex. Humans are infected by the larval stage of the parasite, mostly located in a single organ—typically the liver, although the lungs may also be infected ([Brunetti et al. 2010](#)). The growth of a hydatid cyst gradually compresses neighboring structures over the course of a long asymptomatic incubation period. The estimated minimum global human burden of CE averages 285,407 disability-adjusted life years (DALYs) or an annual loss of USD 194,000,000 ([Budke et al. 2006](#)).

The lifecycle of *E. granulosus* s.l. requires a carnivorous definitive host harboring adult worms in its intestines and an ungulate intermediate host that is infected by the larval stage and consequently forms hydatid cysts in the liver and/or the lungs. Once a definitive host has consumed the infected viscera of an intermediate host, and after a prepatent period of between 34 and 58 days, intestinal worms result in the parasite's microscopic eggs being excreted into the environment via the feces. Intermediate hosts are subsequently infected through oral ingestion of these eggs. Dogs (*Canis familiaris*) are usually the main definitive host, but other wild carnivorous species can more or less significantly contribute to the parasite's life cycle ([Carmena and Cardona 2014](#)). Different species of intermediate hosts are affected depending on the specific parasitic species within the *E. granulosus* s.l. complex: *E. granulosus* sensu stricto (s.s.), *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. canadensis*, or *E. felidis* ([McManus 2013](#); [Nakao et al. 2007](#); [Thompson 2008](#)). The taxonomy of *E. canadensis* that regroups the genotypes G6 (previously corresponding to the camel strain), G7 (previously the pig strain), G8 (previously the 'American' cervid strain), and G10 (previously the 'Fennoscandian' cervid strain) is still controversial ([Nakao et al. 2013](#)). Recent phylogenetic studies confirm G6/7 to be a coherent genotypic entity ([Addy et al. 2017](#)) and suggest considering G6/7 and G8/10 as two different species ([Laurimae et al. 2018](#)). Nevertheless this is not in accordance with results obtained by [Yanagida et al. \(2017\)](#) preventing the designation of G6/G7, G8, and G10 as three different species, as had previously been proposed ([Lymbery et al. 2015](#)).

All the *E. granulosus* s.l. species have been described in Europe except *E. felidis* which has been reported only in Africa ([Hüttner et al. 2008](#)). A combination of slaughterhouse surveys and molecular analysis revealed the presence of three different species in France. *E. granulosus* s.s. was described with very low prevalence levels in sheep and cattle in the south of France ([Umhang et al. 2013](#)). The presence of *E. ortleppi* in cattle was identified in two foci grouping seven cases in central and southwestern France, though two human cases from other areas were also diagnosed ([Grenouillet](#)

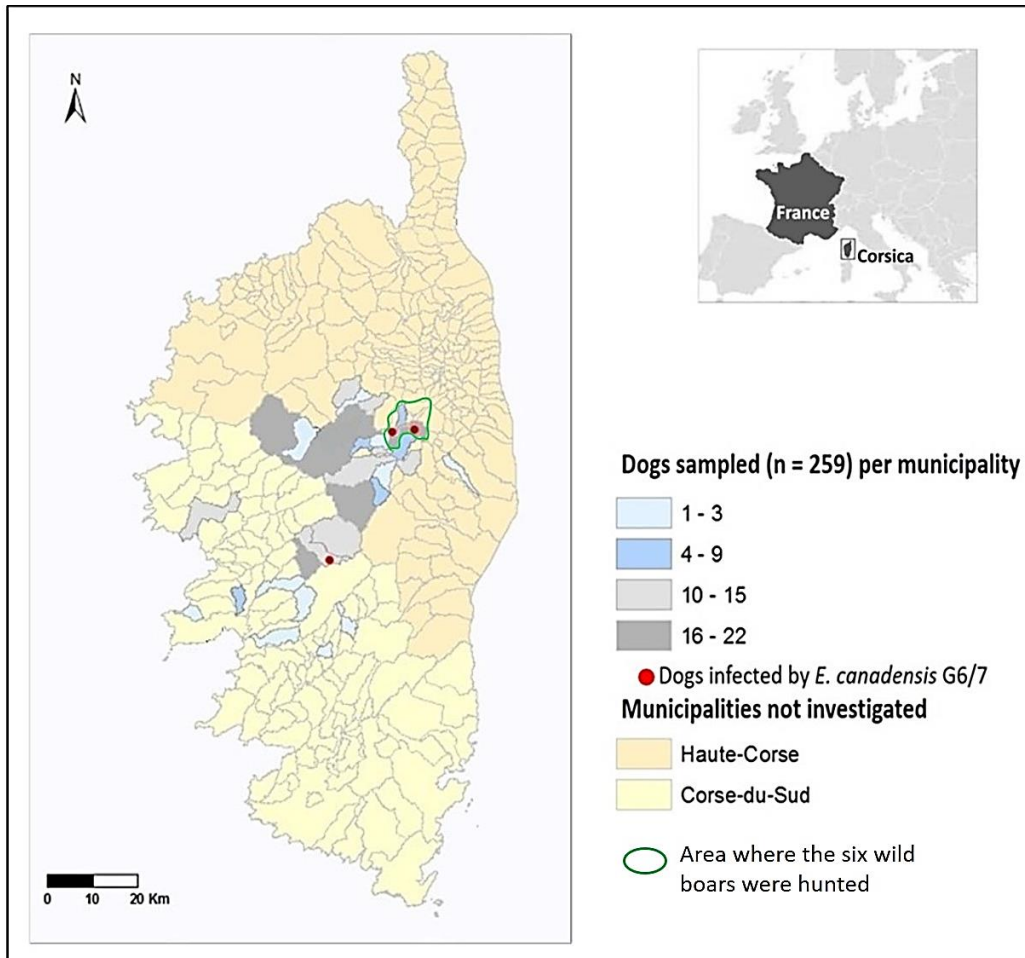
et al. 2014). Finally, *E. canadensis* G6/7 was described in pigs and wild boars exclusively in Corsica (Umhang et al. 2014), which is the fourth largest Mediterranean island. It is also the most mountainous and most forested of these islands. While tourism is its leading economic activity, livestock farming (sheep, goats, pigs, and cattle) is also important. Hunting is very popular, especially wild boar hunting which is traditionally carried out using several dogs from different owners. The island is today considered the most endemic area for CE in France. A similar prevalence of *E. canadensis* G6/7 is observed in pigs (5.9%) and in wild boar (4.0%) living on the island (Umhang et al. 2014). In the neighboring island of Sardinia, CE is one of the most widespread parasitic diseases with a very high prevalence of *E. granulosus* s.s. in sheep (75.3%) and cattle (41.5%) compared to *E. canadensis* G6/7 in pigs (0.7%) (Varcasia et al. 2006). The higher prevalence observed in Corsica compared to the south of France was thought to be due to local practices (free-range pig breeding, home slaughtering, and disposal of hunter-harvested wild boar offal) (Umhang et al. 2014). The endemic nature of CE in this area creates economic concerns for the production of traditional pork liver sausage (*figatelli*) due to the impact of having infected liver seized, but also for public health as Corsica is the region with the highest number of human CE incidences in France (1.76 cases/100,000) (Van Cauteren et al. 2016).

While dogs are thought to be the main and almost exclusive definitive host of *E. granulosus* s.l. in France, no recent data about *E. granulosus* s.l. infection in Corsica were available. This study was therefore designed to investigate the infection of dogs by *E. granulosus* s.l. in Corsica, at the same time questioning owners on their deworming routines and the dogs' feeding habits to gain a better understanding of how the CE life cycle is sustained on the island.

### **Material and methods**

Fecal samples from dogs bred in Corsica were collected from September 2013 to March 2014 in the island's two *départements* (a French administrative unit) (Figure 1). The feces were mainly collected in the individual kennels of hunting dogs but also in two veterinary clinics: one in the Haute-Corse *département*, and one in Corse-du-Sud.

A questionnaire was given to the owner of each dog with questions on its age and sex, role (sheepdog, hunting dog, pet), the deworming routines to which it is subject (twice a year or more, once a year, less than once a year), its food (leftovers, industrial pet food, carcass remains), contact with other dogs and with humans, and management of offal after home slaughtering of pigs or sheep and wild boar hunting. Owners received the results of their dog's *Echinococcus* copro-diagnosis by mail.



**Figure 1:** Dogs sampled per municipality and location of dogs infected by *E. canadensis* G6/7.

After collection, the feces were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  then kept for one week at  $-80^{\circ}\text{C}$  to inactivate *Echinococcus* sp. eggs. DNA was extracted from 500 mg of each fecal sample using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). A multiplex Taqman qPCR system was used to detect *E. granulosus* s.s. and *E. canadensis* G6/7. Mitochondrial genes *nad1* and *nad5* were targeted for *E. granulosus* s.s. and *E. canadensis* G6/7 respectively (Table 1). An internal amplification control was included to test the absence of inhibitors. This control involved adding 100 copies of plasmid DNA obtained through artificial construction (Auvray et al. 2009), which was amplified with the same primers as *E. granulosus* s.s. but detected with a different probe to specifically identify each source of DNA. The reaction was performed in duplicate with Maxima Probe qPCR Master Mix (ThermoScientific) in a final volume of 25  $\mu\text{l}$ , including 2  $\mu\text{l}$  of DNA from the fecal sample, and run on a Rotor-Gene thermocycler (Qiagen). The final concentrations of 0.3  $\mu\text{M}$  and 0.2  $\mu\text{M}$  were used for the two primer pairs and the three probes respectively. The multiplex qPCR program used was 10 min at  $95^{\circ}\text{C}$  then 45 cycles of 15 s at  $95^{\circ}\text{C}$  and 60 s at  $60^{\circ}\text{C}$ .



In order to undertake phylogenetic analyses enabling comparisons with previous identifications of *E. canadensis* G6/7 in Corsica, four mitochondrial genes (*cox1*, *nad1*, *nad3*, *atp6*) were fully or partially sequenced as previously described (Umhang et al. 2014). Additionally, the presence of *Taenia* species was detected using PCR primers Cest4-Cest5 targeting the *12S* mitochondrial gene as described by Trachsel et al. (2007).

**Table 1.** Description of the different primers and probes used in multiplex qPCR to detect *E. granulosus* s.s. and *E. canadensis* G6/7 using an internal control

qPCR assay	Gene targeted	Position	Oligonucleotide sequences (5'-3')	Labelling dye	
				5'	3'
<i>E. granulosus sensu stricto</i>	<i>nad1</i>	303-318	AGGCCTCTCCGTGTTG	-	-
		326-344	TGGCTGCCGCCAGAACATC	FAM	BHQ1
		371-348	CAACCAGTACACAACAAAGAATAC	-	-
Internal control	plasmid DNA	-	CAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCG	Cy5	BHQ3
<i>E. canadensis</i> G6/7	<i>nad5</i>	1239-1261	TCTTTCTGATAGACGAGGTTAGG	-	-
		1294-1269	CACCAAACCTCACACTACAAACCACCG	HEX	BHQ1
		1319-1298	TCCATAAAGCCAAAAATTGTAC	-	-

A private company (Beckmann Coulter Genomics, UK) sequenced the amplicons obtained through conventional PCR, while the Vector NTI software program (Invitrogen, France) was used to align nucleotide sequences. A haplotype network was constructed for *E. canadensis* G6/7 samples using TCS 1.2 software (Clement et al. 2000) and modified using tcsBU software (Múrias dos Santos et al. 2016). The network inferred from the concatenated sequences of the four mitochondrial genes was analyzed. The nucleotide sequences of *E. canadensis* G6/7 from 19 pigs and two wild boars sampled in Corsica in a previous study (Umhang et al. 2014) were also incorporated in the haplotype network alongside those of the dogs. Additionally, the nucleotide sequences from four other infected wild boars found in the same area as those from the abovementioned study, and sampled during the period when the dog feces were being collected, were also added to the network.

## **Results and discussion**

Feces were sampled from a total of 259 dogs from 59 owners in 31 municipalities (the smallest administrative unit in France) (Figure 1). Each owner had 4.3 dogs on average. Twenty-four (7.3%) fecal samples were obtained from veterinary clinics. Among these dogs, 86% were adults (more than one year old), 60% were male, and 77% (n=200) were kept purely for hunting. Almost 19% (n=49)

were hunting dogs that lived on a pig farm and were also used as sheepdogs for pig breeding, whereas six were exclusively sheepdogs and four were pets living in rural areas.

Of all the dogs sampled, 41% were dewormed twice a year or more, 45% once a year, and 14% less than once a year or never. Due to a certain proximity between kennels and hunts, each dog was in contact with 10.3 other dogs on average. Two to three people (average 2.6) were in regular contact with each dog. Almost half of the dogs sampled (49%) were fed with a mix of leftovers and/or industrial pet food, and 18% were only fed with industrial pet food. One-third (33%) of the dogs were given pig carcass remains (including viscera) after home slaughtering and/or the carcass remains of hunter-harvested wild boar.

Of the hunting dogs included in this study (n=249), 78% were owned by hunters who reported having left wild boar carcasses in the countryside, the others depositing them in public trash bins or communal graves.

Molecular diagnostics revealed the presence of *E. canadensis* G6/7 DNA in three fecal samples (TK7806, TK7823, TK7855), but *E. granulosus* s.s. was not detected. The prevalence of *E. canadensis* G6-7 was thus estimated at 1.2% (CI<sub>95%</sub>: 0.2-3.3%). The three infected dogs were adults from three different municipalities; two in Haute-Corse and one in Corse-du-Sud (Figure 1). All three were hunting dogs and one of them lived on a pig farm. Two were dewormed twice a year and the other once a year. With respect to *Taenia* sp., two infections by *Taenia ovis* and one by *Taenia hydatigena* were detected in three other dogs belonging to three different owners.

The sequencing of the three *E. canadensis* G6/7 fecal samples for the four mitochondrial targets revealed that samples TK7806 and TK7855 indicated the same concatenated haplotype, G6/7 C, previously described in pigs (Table 2 and Figure 2). From fecal sample TK7823, nucleotide sequences identical to haplotypes G6/7 C were obtained for *cox1*, *nad1* and *atp6*, but another haplotype for the *nad3* locus was identified with two mutations (116C/T, 337T/G) compared to haplotype G6/7 C. Taking into account the four loci investigated, fecal sample TK7823 corresponds to a newly-identified haplotype in Corsica named G6/7 E. The six wild boars appeared to be represented by a further three different concatenated haplotypes named G6/7 F (sample TK3916), G6/7 G (sample TK3918), and G6/7 H (samples TK8564, TK8566, TK8573, TK8574), even if wild boars mostly share similar haplotypes to pigs in terms of individual genes. The nucleotide sequences corresponding to haplotypes of the four targeted genes were registered in GenBank with accession numbers MG808393 to MG808404 for the three dogs and MH823705 to MH823728 for the six wild boars.

The parsimony-based haplotype network indicates that the infected fecal samples from dogs TK7806 and TK7855 correspond to the most commonly represented haplotype in pigs, whereas the other one (TK7823) differed by two to four mutations from other haplotypes found in pigs. For the samples collected, the three haplotypes identified in wild boars differ slightly from those identified in pigs and dogs.

This study is the first to provide molecular data about the infection of dogs by *E. granulosus* s.l. in Corsica, and more widely in France. Only a few studies on canine infection by *E. granulosus* s.l., and particularly by *E. canadensis* G6/7, are available elsewhere. The presence in Europe of this latter species in dogs has only been described in eastern European countries, with a single report of canine infection in Lithuania ([Bruzinskaite et al. 2009](#)). The prevalence of *E. canadensis* G6/7 in dogs observed here (1.2%; CI<sub>95%</sub>: 0.2-3.3%) is slightly below that observed in Lithuania (3.8%; CI<sub>95%</sub>: 1.7-7.0%), which is coherent with the fact that the prevalence in pigs (5.9%; CI<sub>95%</sub>: 5.0-6.8%) in Corsica ([Umhang et al. 2014](#)) is also below that described in Lithuania (13.2%; CI<sub>95%</sub>: 10.7–16.2%).

The genetic analyses we carried out using mitochondrial genes revealed the same haplotypes in pigs as in two of the three infected dogs in Corsica. A low genetic diversity of *E. canadensis* was previously observed in 19 pigs when only four concatenated haplotypes (1748 bp) were described using the four mitochondrial genes ([Umhang et al. 2014](#)). Sequencing the full *cox1* and *nad1* genes has also exposed very low polymorphism levels in the Corsican pig subpopulation compared to others in Europe, sub-Saharan Africa, and the Middle East ([Addy et al. 2017](#)). This can be explained by the geographic segregation of the island's parasite population in addition to a low level of polymorphism in the founder population. Interestingly, sequencing complete mitochondrial genomes from worldwide samples of *E. canadensis* G6/7 has resulted in the identification of two sub-clusters for genotype G7 of *E. canadensis*. One sub-cluster is composed of samples obtained around the world, including from Corsican pigs, while the other is exclusively composed of samples from Corsica and the neighboring island of Sardinia ([Laurimäe et al. 2018](#)). A shared evolution involving exchanges between the parasite populations of these two islands, 11 km apart, may be suspected and needs to be further investigated.

With regard to the production of traditional pork sausage “charcuterie”, the importation of live pigs is very limited and they are not usually mixed with local populations. Furthermore, the importation of pig carcasses is not thought to contribute to the parasite's life cycle. Even so, one of the infected dogs harbored a genetic variant due to mutations in the *nad3* gene which had not previously been detected. It should be noted here that only the following swine were tested for the

additional genes *nad3* and *atp6*: 19 pigs of the 180 found to be infected in a previous study (Umhang et al. 2014) and six wild boars in the present study. We can imagine that the new haplotype described here in a dog was also present in pigs and/or wild boar.

**Table 2.** Description of the different haplotypes obtained for each locus of the mitochondrial genes sequenced concerning the three dogs infected by *E. canadensis* G6/7\*.

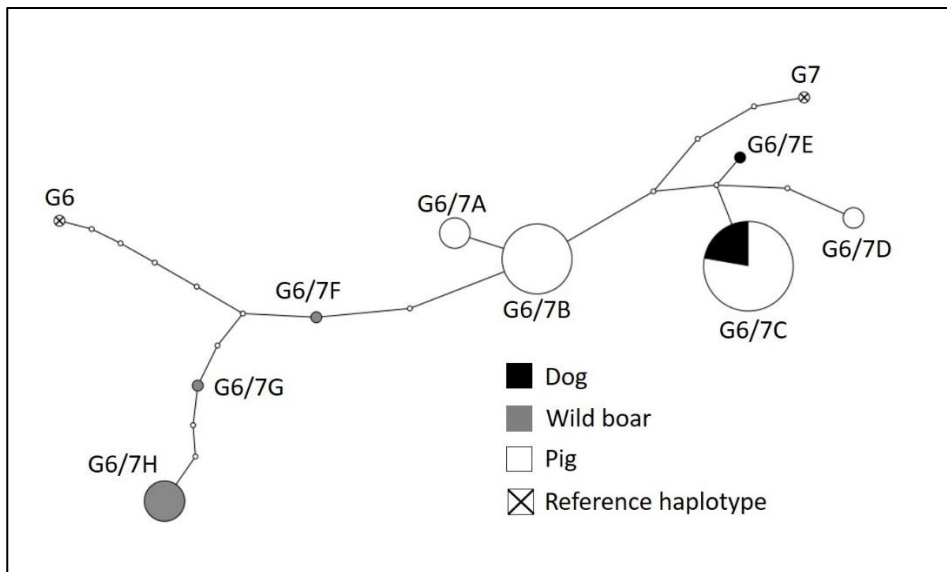
	host species	<i>nad1</i>	<i>cox1</i>	<i>nad3</i>	<i>atp6</i>	final haplotype
TK7806	dog	A/B/C/D	C/D	C	C	C
TK7823	dog	A/B/C/D	C/D	E	C	E
TK7855	dog	A/B/C/D	C/D	C	C	C
TK3916	wild boar	A/B/C/D	A/B	A/B	B	F
TK3918	wild boar	A/B/C/D	C/D	D	C	G
TK8564, TK8566, TK8573, TK8574	wild boar	A/B/C/D	C/D	D	H	H

*Haplotypes A to D referred to those previously described in pigs in Corsica by concatenated sequences of the four genes (Umhang et al., 2014). Concatenated haplotypes E to G from wild boars are newly described in this paper. The same nucleotide sequences were obtained when more than one haplotype is mentioned. The mention to other haplotype than A to D was used only when a specific sequence was identified in a new haplotype.*

The detection of the same haplotype among the four mitochondrial targets in both pigs and dogs indicates the presence of a complete *E. canadensis* G6/7 life cycle in Corsica. In light of the samples obtained during our research, the three dogs appear to have been infected following their consumption of infected viscera from a pig rather than from a wild boar, even though all three dogs were considered hunting dogs and two of the dogs were sampled in the area where wild boar were hunted.

The answers to the dog owner questionnaire clearly highlight risky practices that play a role in sustaining the life cycle of *E. canadensis* G6/7. The common hunting practice in which wild boar carcasses are left in the countryside, as well as the home slaughtering of pigs that is still practiced on the island, provide opportunities for dogs to become infected. Furthermore, the dogs we sampled were dewormed twice a year at most, which is too infrequent to prevent infection and the subsequent excretion of infectious eggs. As the infection of pigs by *E. canadensis* G6/7 in Corsica is relatively homogeneous throughout the island (Umhang et al. 2014), we can hypothesize that the canine prevalence observed in the present study would be similar in other pig-breeding areas in Corsica where practices of pig or wild boar slaughter waste deposits are similar. In addition to the present study, a previous survey on a small sample (n=38) of foxes (*Vulpes vulpes*) collected in various areas of Corsica did not indicate the presence of *E. granulosus* sp. in this other carnivorous species

(Richomme 2009). Even when found to be infected, foxes are considered to play a minimal role in contaminating the environment with *E. granulosus* s.l. eggs (Mackenstedt et al. 2015). As previously hypothesized, dogs thus appear to be the main and maybe the sole definitive host of *E. canadensis* G6/7 in Corsica (Umhang et al. 2014). In order to reduce the spread of this parasite on the island and its economic impact on pig breeding, a more appropriate deworming frequency and a strict restriction on dogs' access to pig and wild boar viscera are still necessary.



**Figure 2.** Parsimony-based haplotype network of mitochondrial DNA (*cox1*, *nad1*, *atp6*, and *nad3* corresponding to 1748 bp) obtained from CE cyst samples from 19 pigs (Umhang et al. 2014), six wild boars and the three fecal samples from dogs in this study. The size of the circles roughly indicates the number of individuals (only one for the two reference sequences of *E. canadensis* G6 and G7) and each mutation event is represented by a white circle on the lines.

The absence of infection by *E. granulosus* s.s. observed in the present study in dogs is consistent with results from a previous survey in various slaughterhouses that targeted not only pigs but also sheep, cattle, and goats (Umhang et al. 2014). Nevertheless, most of the sheep and cattle—the main intermediate hosts of *E. granulosus* s.s.—investigated during this earlier survey were young animals. Further investigations focusing on *E. granulosus* s.s. in sheepdogs would be relevant even if it affects a smaller population than hunting dogs. The lack of physical evidence for this *Echinococcus* species in Corsica is intriguing. There is still a low prevalence in the south of France (Umhang et al. 2013).. In a previous French national survey of *E. granulosus* at the slaughterhouse, data from Corsica were reported generally as “CE infection in cattle” (Soulé et al. 1989). As no appropriate tools were available in the nineties, no molecular data are available but it seems highly probable that these data concerned infection by *E. granulosus* s.s. rather than *E. canadensis* G6/7. An

older survey in 1959 described *E. granulosus* prevalence at 22% in cattle, 24% in sheep, and 46% in pigs after morphological inspection at the slaughterhouse (Deschiens 1960), which strengthens the hypothesis of the coexistence at that period of both *E. granulosus* s.s. and *E. canadensis* G6/7 in Corsica. The identification of two dogs infected by *T. ovis* indicates that dogs are also accessing and consuming viscera from sheep, revealing their capacity to sustain another parasite with similar life-cycle traits.

The high human incidence of CE in Corsica compared to mainland French regions (Van Cauteren et al. 2016) raises questions about the zoonotic potential of *E. canadensis* G6/7. This matter cannot yet be investigated because no molecular diagnosis of CE human cases originating from Corsica has so far been possible because human cases are not registered in France. Furthermore, surgery or percutaneous treatment for a CE cyst on patients originating from Corsica are often performed in different hospitals across the continent, which prevents the acquisition of any genotyping data.

Finally, despite the data obtained from definitive and intermediate hosts, the absence of *E. granulosus* s.s. or its presence in livestock, still at a low prevalence in Corsica, will not be conclusively proven without implementing further molecular studies in definitive and intermediate hosts as well as in patients affected by CE.

### **Compliance with ethical standards**

**Conflict of interest statement:** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

### **References**

Addy F, et al. (2017) Genetic differentiation of the G6/7 cluster of *Echinococcus canadensis* based on mitochondrial marker genes. *Int J Parasitol* 47(14):923-931 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.06.003>

Auvray F, Lecureuil C, Dilasser F, Tache J, Derzelle S (2009) Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for the screening of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Lett Appl Microbiol* 48(5):554-9 doi:<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02561.x>

- Brunetti E, Kern P, Vuitton DA (2010) Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop* 114(1):1-16 doi:<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.001>
- Bruzinskaite R, Sarkunas M, Torgerson PR, Mathis A, Deplazes P (2009) Echinococcosis in pigs and intestinal infection with *Echinococcus* spp. in dogs in southwestern Lithuania. *Vet Parasitol* 160(3-4):237-41 doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.11.011>
- Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR (2006) Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis* 12(2):296-303 doi:<https://doi.org/10.3201/eid1202.050499>
- Carmena D, Cardona GA (2014) Echinococcosis in wild carnivorous species: epidemiology, genotypic diversity, and implications for veterinary public health. *Vet Parasitol* 202(3-4):69-94 doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.009>
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9(10):1657-9 doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>
- Deschiens R (1960) Considérations épidémiologiques et sanitaires sur l'hydatidose humaine dans le bassin méditerranéen et en Corse. *Bull Soc Pathol Exot* 53:971-990
- Grenouillet F, et al. (2014) *Echinococcus ortleppi* infections in humans and cattle, France. *Emerg Infect Dis* 20(12):2100-2102 doi:<https://dx.doi.org/10.3201/eid2012.140641>
- Hüttner M, et al. (2008) Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol* 38(7):861-8 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.10.013>
- Laurimäe T, et al. (2018) Molecular phylogeny based on six nuclear genes suggests that *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes G6/G7 and G8/G10 can be regarded as two distinct species. *Parasitology* in press doi:<https://doi.org/10.1017/S0031182018000719>
- Lymbery AJ, Jenkins EJ, Schurer JM, Thompson RCA (2015) *Echinococcus canadensis*, *E. borealis*, and *E. intermedius*. What's in a name? *Trends Parasitol* 31(1):23-29 doi:<https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.11.003>
- Mackenstedt U, Jenkins D, Romig T (2015) The role of wildlife in the transmission of parasitic zoonoses in peri-urban and urban areas *Int J Parasitol Parasites Wildl* 4(1):71-79 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.01.006>

- McManus DP (2013) Current status of the genetics and molecular taxonomy of Echinococcus species. Parasitology 140(13):1617 - 1623 doi:<https://doi.org/10.1017/S0031182013000802>
- Múrias dos Santos A, Cabezas MP, Tavares AI, Xavier R, Branco M (2016) tcsBU: a tool to extend TCS network layout and visualization. Bioinformatics 32(4):627-628 doi:<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv636>
- Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A (2007) A molecular phylogeny of the genus Echinococcus inferred from complete mitochondrial genomes. Parasitology 134(Pt 5):713-22 doi:<https://doi.org/10.1017/S0031182006001934>
- Nakao M, et al. (2013) Mitochondrial phylogeny of the genus Echinococcus (Cestoda: Taeniidae) with emphasis on relationships among Echinococcus canadensis genotypes. Parasitology 140(3):1625-1636 doi:<https://doi.org/10.1017/S0031182013000565>
- Richomme C (2009) Epidémiologie de zoonoses du sanglier (Sus scrofa) dans un milieu méditerranéen insulaire, la Corse Doctorat d'Université - Spécialité Ecologie, Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand
- Soulé C, Fabien JF, Maillot E (1989) Enquête échinococcose-hydatidose. DGAL - Brigade Nationale d'Enquêtes Vétérinaires - CNEVA - Unité Parasitologie, Maisons-Alfort, 173 p.
- Thompson RCA (2008) The taxonomy, phylogeny and transmission of Echinococcus. Exp Parasitol 119(4):439-46 doi:<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.016>
- Trachsel D, Deplazes P, Mathis A (2007) Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA. Parasitology 134(6):911-920 doi:<https://doi.org/10.1017/S0031182007002235>
- Umhang G, Richomme C, Boucher JM, Hormaz V, Boué F (2013) Prevalence survey and first molecular characterization of Echinococcus granulosus in France. Parasitol Res 112(4):1809-1812 doi:<https://doi.org/10.1007/s00436-012-3245-7>
- Umhang G, Richomme C, Hormaz V, Boucher JM (2014) Pigs and wild boar in Corsica harbor Echinococcus canadensis G6/7 at levels of concern for public health and local economy. Acta Trop 133:64-68 doi:<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.02.005>



Van Cauteren D, Millon L, De Valk H, Grenouillet F (2016) Retrospective study of human cystic echinococcosis over the past decade in France, using a nationwide hospital medical information database. *Parasitol Res* 115(11):4261-4265 doi:<https://doi.org/10.1007/s00436-016-5204-1>

Varcasia A, Canu S, Lightowlers MW, Scala A, Garippa G (2006) Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* strains in Sardinia. *Parasitol Res* 98(3):273-7 doi:<https://doi.org/10.1007/s00436-005-0059-x>

Yanagida T, et al. (2017) Specific status of *Echinococcus canadensis* (Cestoda: Taeniidae) inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Int J Parasitol* 47(14):971-979 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.07.001>

**Parasites and Vectors (IF: 3,43)**

**SHORT REPORT**

**Seroprevalence of Toscana virus in dogs from Corsica (France)**

**Mustapha Dahmani<sup>1,3</sup>, Sulaf Alwassouf<sup>2,3</sup>, Jean-Lou Marié<sup>4</sup>, Sébastien Grech-Angelini<sup>5</sup>, Bernard Davoust<sup>1,3,4</sup> and Rémi N. Charrel<sup>2,3\*</sup>**

**\*Correspondence:** [remi.charrel@univ-amu.fr](mailto:remi.charrel@univ-amu.fr)

**Author details**

<sup>1</sup>Research Unit of Emerging Infectious and Tropical Diseases (URMITE) UMR CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1015 Aix-Marseille University, Marseille, France

<sup>2</sup>UMR "Emergence des Pathologies Virales" (EPV: Aix-Marseille University - IRD 190 - Inserm 1207 - EHESP), Marseille, France

<sup>3</sup>Fondation Méditerranée Infection, APHM Public Hospitals of Marseille, France

<sup>4</sup>Working Group of Animal Epidemiology of French Army Health Service, DRSSA Toulon, France; French Military Health Service Academy – École du Val-de-Grâce, Paris, France

<sup>5</sup> French National Institute for Agricultural Research (INRA), UR 045, LRDE, Corte, France

**The running title:** Toscana virus in dogs of Corsica

Published in *Parasites & Vectors* (2016) 9:381

## **Abstract**

**Background:** Toscana virus (TOSV) is an arbovirus belonging to *Bunyaviridae*, a family of negative-stranded, enveloped RNA viruses. The virus can be transmitted to humans by the bite of an infected sandfly of the genus *Phlebotomus*. The infection is usually asymptomatic but it can cause aseptic meningitis and meningoencephalitis, in Mediterranean countries. The dog is a good sentinel of the viral circulation and more easily accessible than the wildlife.

**Findings:** In 2013 and 2014, we have collected sera of 231 adult dogs living in 26 communes from the two departments of Corsica, a French island in the Mediterranean. The virus microneutralization-based seroprevalence study assay showed seropositive dogs (3.9%) on the eastern coast of Corsica.

**Conclusions:** Our study confirms the circulation of TOSV in Corsica. Accordingly, geographic areas where dogs possess TOSV neutralizing antibodies are good candidates to implement TOSV direct and indirect diagnosis in patients presenting with febrile illness and central nervous system infections as meningitis and encephalitis.

**Keywords:** Toscana virus, Dog, Corsica, France, Sand fly, *Phlebotomus*, Meningitis

## **Background**

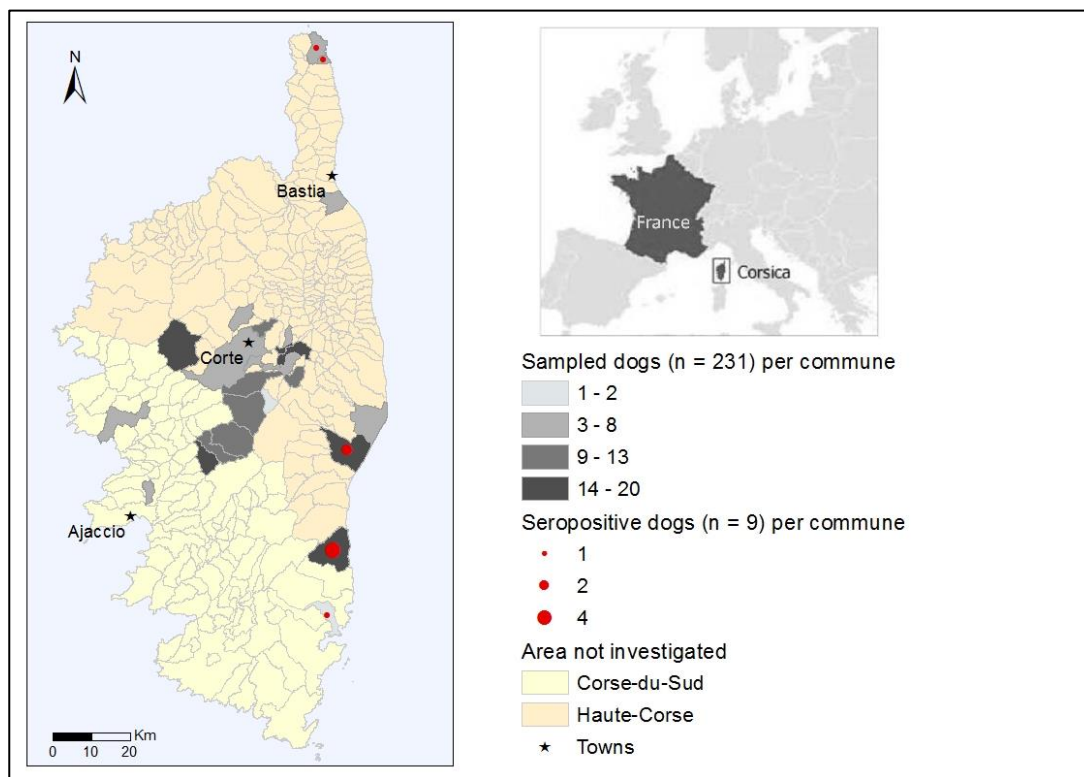
Toscana virus (TOSV) is an arbovirus belonging to *Bunyaviridae*, a family of negative-stranded, enveloped RNA viruses. The virus can be transmitted to humans by the bite of an infected sandfly of the genus *Phlebotomus*. The infection has previously been reported in countries located on the northern shores of the Mediterranean (Italy, Croatia, France, Greece, Portugal and Spain), as well as in the in the East (Cyprus and Turkey) [1], and recently from the North of Africa (Morocco, Tunisia and Algeria) [2, 3]. Although it is believed that asymptomatic infections are frequent, TOSV is an important cause of aseptic meningitis and meningoencephalitis, during the warm season (April to October) when sand flies are active [1]. In France, the first case of Toscana virus infection was reported in a German tourist south-eastern France [4]. have been described causing either meningitis [5, 6] or encephalitis [7]. Furthermore, myositis was reported as an additional clinical complication of TOSV virus [8]. Since then several cases of meningitis were attributed to TOSV infection [5,6], or encephalitis was reported [7]. Furthermore, myositis was reported as an additional clinical complication of TOSV virus [8].

In Corsica, the seroprevalence among human blood donors was 8.7 % in 2007 [9]. The presence of TOSV in *P. perniciosus* sand flies was revealed using PCR targeting the L-RNA segment [10]. Genetic analysis showed that Corsican TOSV belongs to lineage A [10]. Dogs and humans live in close contact and are both bitten by sand flies [11], the main transmission vectors of dog and human leishmaniasis. In Corsica, dogs are exposed to the bites of sand flies as evidenced by the rate of incidence of canine leishmaniasis [12]. Consequently, the aim of our study was to evaluate the TOSV seroprevalence in dogs in Corsica, a French island in the Mediterranean.

## **Methods**

In 2013 and 2014, we collected sera from the radial veins of 231 adult dogs. The dogs were living in 26 communes in the two departments of Corsica (Fig. 1): in Haute-Corse [Aleria (n = 8), Biguglia (n = 4), Castirla (N=7), Corte (n = 8), Erbajolo (n = 7), Favalello (n = 17), Ghisonaccia (n = 16), Mauracciole (n = 2), Riventosa (n = 4), Rogliano (n = 3), San'Andréa di-Bozio (n = 15), Sermano (n = 4), Tavera (n = 12), Tomino (n = 4), Tralonca (n = 9), Ucciani (n = 15), Venaco (n = 11), Ventiseri (n = 20), Vico (n = 6) and Vivario (n=9)] and in Corse-du-Sud [Afa (n =7), Albertacce (n = 17), Altiani (n = 13), Brognano (n = 9), Casanova (n = 3) and Lecci (n = 1)]. Among the 231 dogs sampled, 147 were male (63.6 %), and 84 were female (36.4 %). The average age of dogs was four-year-old (3–12-year-old) and most were wearing collars to reduce the likelihood of arthropod infestation. The dogs came from a range of sources including hunters' dogs, shepherds' dogs, military working dogs

and some pet dogs. They all appeared to be in good health at the time of sampling and were examined with the assistance of their owners. Blood samples were centrifuged within 24 h of collection and the sera were subsequently frozen at -20 °C until being processed in the laboratory.



**Figure 1.** Map of Corsica showing the areas where dogs were sampled and where positive dogs were found

The seroprevalence study based on virus microneutralization (MN) was adapted from the previously described protocol [3]. The MN assay was performed in 96-well microtitre plates using Vero cells. In short, two-fold serial dilutions of 50 µl-serum aliquots were mixed with an equal volume of 1,000 TCID<sub>50</sub> (Tissue Culture Infective Dose producing pathological change in 50 % of the cell culture inoculated) of TOSV (strain MRS2010-4319501) into 96-well plates, providing two-fold final dilutions between 1:20 and 1:160. Controls consisted of each serum (1:10) with Vero cells but without virus. After five days, the microplates were analysed under an inverted microscope, and the presence (neutralization titre at 10, 20, 40, 80 and 160) or absence (no neutralization) of cytopathic effect was noted. Cut-off titre for positivity was 20 [3, 13].

## Results & Discussion

The virus microneutralization-based assay is the most discriminative serological test adapted to differentiate the affinity of antibodies against different closely related viruses [14]. Of the 231 dogs, nine (eight males and one female) were seropositive (3.9 %) for TOSV antibodies. The seropositive dogs were all from five communes in the Haute-Corse [Tomino 1 positive/4 tested, Rogliano 1/3,

Ghisonaccia 2/16, Ventiseri 4/20] and one from the Corse-du-Sud [Lecci 1/1] (Table 1). Seropositive dogs were all from the eastern coast of Corsica. This region has an average altitude of 37 m, while all the dogs from the central region were negative, corresponding to a region with a medium altitude of 576 m. The positive dogs were aged between three and 12-year-old (Table 1). The serological titres were low: 1/20 (n = 5) and 1/40 (n = 4), which was expected when a virus challenge dose of 1000TCID<sub>50</sub> was used, thus rendering the assay more stringent compared with the commonly used 100TCID<sub>50</sub>; previous studies have shown a good correlation between both protocols [3]. The results from two TOSV neutralization-based seroprevalence studies reported in Tunisia were comparable with the results of the present study. In Kairouan, 5.6 % (11/147) of the seropositive dogs were living in an area with a high density of sand flies and where leishmaniasis is endemic [2]. In Bizerte, where leishmaniasis cases are uncommon, none of the 118 tested dogs was TOSV seropositive [2]. In Algeria (Kabylia), one serological survey showed 4.3 % positive sera among 93 dogs [15]. In contrast, the results reported from Turkey were much higher. The TOSV MN seroprevalence reported in southern Anatolia was 40.4 % (21/52); of these dogs, 15.5 % (24/155) were TOSV viraemic. In addition, two dogs were co-infected with *Leishmania infantum* [16].

**Table 1.** Location, age and serological titres (microneutralization) of Toscana virus seropositive dogs

Department	Commune	Localisation	Age of dog	Titre
Haute-Corse	Tomino	42°56'44"N, 9°26'28"E	12	40
	Rogliano	42°57'25"N, 9°25'08"E	6	20
	Ghisonaccia	42°00'59"N, 9°24'18"E	4	20
	Ventiseri	41°55'36"N, 9°24'19"E	9	40
			3	20
			9	20
			9	40
			9	20
Corse-du-Sud	Lecci	41°40'48"N, 9°19'05"E	10	40

In Granada (Spain), 48.3 % (138/286) of the dogs tested were positive for TOSV using indirect immunofluorescence (IFAT) [17]. However, this result should be considered with caution due to the possibility of cross reactivity with other phleboviruses such as Granada virus, Massilia virus, Naples virus or Tehran virus [3]. This is the reason why we decided to use neutralization assay which is the most discriminative serological technique [18] and which is not hampered by crossreactions due to antibodies elicited by sand fly-borne phleboviruses either from other antigenic groups (Sandfly fever Sicilian and Salehabad viruses) or from related viruses belonging to the Sandfly fever Naples species distinct from TOSV.

The seroprevalence of TOSV found in dogs in this study was fairly low. Historical records describe *P. mascitii*, *P. perniciosus* and *Sergentomyia minuta* on the whole island at altitudes lower than 800 m, with the latter two sand fly species being largely dominant. *Phlebotomus mascitii* has been described only in the northeastern region. *Phlebotomus papatasi*, *P. ariasi* and *P. perfiliewi* were never reported [19]. Thus, the absence of seropositive dogs from the centre of Corsica is probably best explained by the fact that sand flies are rare in this mountainous region that seems to be colder than the flat coastal region. Furthermore, the use of insecticide collars for the prevention of leishmaniasis has probably reduced the number of infected dogs by decreasing the sand fly bites [20]. Our results suggest that the question of whether dogs serve as a reservoir for the Toscana virus remains unanswered and merits further environmental and experimental studies. Despite the lack of TOSV serological studies using neutralization tests in Corsican human populations, the results presented here, together with the direct evidence of TOSV in sand flies and high ELISA-based seroprevalence in blood donors [21], suggest that dogs are good sentinels for serosurvey studies of the type discussed. Our study contributes to the identification of Corsican areas where the virus currently circulates, and shows that the east coast is subject to substantial viral circulation. Accordingly, geographic areas where dogs possess TOSV neutralizing antibodies are good candidates for implementing direct and indirect TOSV diagnosis in patients presenting with febrile illnesses and central nervous system infections such as meningitis and encephalitis.

## **Conclusions**

Our study indicates that dogs are promising sentinels for exposure to TOSV transmission by sand flies in the Mediterranean region. However, the potential of dogs as reservoirs of Toscana virus is yet unknown. Our data extend the knowledge of the distribution of this virus in Corsica, indicating higher prevalence of Toscana virus along the eastern coasts of Corsica. In geographic areas where dogs possess TOSV neutralizing antibodies, direct and indirect TOSV diagnosis should be implemented in patients presenting with febrile illnesses and central nervous system infections such as meningitis and encephalitis.

## **Abbreviations**

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; MN, microneutralization; TCID<sub>50</sub>, tissue culture infective dose producing pathological change in 50 % of the cell culture inoculated; TOSV, Toscana virus.

## **Acknowledgements**

This work was supported in part by the European Virus Archive goes Global (EVAg) project that has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 653316, the EDENext FP7 – No. 261504 EU project and this paper is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext445 (<http://www.edenext.eu>). The work of RNC was done under the frame of the EurNegVec COST Action TD1303. This study was also supported by the AMIDEX project (No. ANR-11-IDEX-0001-02) funded by the “Investissements d’Avenir” French Government programme, managed by the French National Research Agency (ANR) and Foundation “Méditerranée Infection” ([www.mediterranee-infection.com](http://www.mediterranee-infection.com)). The funders had no role in the study design, data collection and analyses, decision to publish, or preparation of the manuscript. We thank Thierry Segalen, Bernard Fabrizy and Sandrine Ferrandi for their help.

## **Authors' contributions**

RNC, BD designed the study. SA participated in serological testing. MD, BD, JLM, SGA collected samples and clinical data. MD, BD and RNC contributed to the writing process of the manuscript. All authors accepted the final version of this manuscript to be submitted for publication.

## **Competing interest**

The authors declare that they have no competing interest.

## **Consent for publication**

Not applicable.

## **Ethics approval and consent to participate**

All dog-owners are consent for the sampling of their dogs, sampling was carried out by a veterinary doctor (Dr B. Davoust) with a broad experience in the epidemiology of infectious diseases in pet animals.

## **References**

1. Charrel RN, Bichaud L, de Lamballerie X. Emergence of Toscana virus in the mediterranean area. *World J Virol.* 2012;1(5):135-41.
2. Sakhria S, Alwassouf S, Fares W, Bichaud L, Dachraoui K, Alkan C et al. Presence of sandfly-borne phleboviruses of two antigenic complexes (Sandfly fever Naples virus and Sandfly fever



- Sicilian virus) in two different bio-geographical regions of Tunisia demonstrated by a microneutralisation-based seroprevalence study in dogs. *Parasit Vectors* 2014;7:476.
3. Alkan C, Allal-Ikhlef A, Alwassouf S, Baklouti A, Piorkowski G, de Lamballerie X et al. Virus isolation, genetic characterization, and seroprevalence of Toscana virus in Algeria. *Clin Microbiol Infect.* 2015; doi: 10.1016/j.cmi.2015.07.012.
  4. Dobler G, Treibl J, Haass A, Frosner G, Woesner R, Schimrigk K. Toscana virus infection in German travellers returning from the Mediterranean. *Infection.* 1997;25:325.
  5. Hemmersbach-Miller M, Parola P, Charrel RN, Durand J-P, Brouqui P. Sandfly fever due to Toscana virus: an emerging infection in southern France. *Eur J Intern Med.* 2004;15:316–7
  6. Peyrefitte CN, Devetakov I, Pastorino B, Villeneuve L, Bessaud M, Stolidi P et al. Toscana virus and acute meningitis, France. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(5):778-80.
  7. Doudier B, Ninove L, Million M, de Lamballerie X, Charrel RN, Brouqui P. Unusual Toscana virus encephalitis in southern France. *Med Mal Infect.* 2011;41(1):50-1.
  8. Charrel RN, Izri A, Temmam S, Delaunay P, Toga I, Dumon H, et al. Cocirculation of 2 genotypes of Toscana virus, southeastern France. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(3):465-8.
  9. Kile JC, Panella NA, Komar N, Chow CC, MacNeil A, Robbins B, et al. Serologic survey of cats and dogs during an epidemic of West Nile virus infection in humans. *J Am Vet Med Assoc.* 2005;226:1349–53.
  10. Aoun O, Mary C, Roqueplo C, Marié JL, Terrier O, Levieuge A et al. Canine leishmaniasis in south-east of France: screening of *Leishmania infantum* antibodies (western blotting, ELISA) and parasitaemia levels by PCR quantification. *Vet Parasitol.* 2009;166(1-2):27-31.
  11. Cotteaux-Lautard C, Leparç-Goffart I, Berenger JM, Plumet S, Pages F. Phenology and host preferences *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: *Phlebotominae*) in a focus of Toscana virus (TOSV) in South of France. *Acta Trop.* 2016;153:64-9.
  12. Alkan C, Alwassouf S, Piorkowski G, Bichaud L, Tezcan S, Dincer E et al. Isolation, genetic characterization and seroprevalence of Adana virus a novel phlebovirus belonging to the Salehabad virus complex in Turkey. *J Virol.* 2015;89(8):4080-91.
  13. Cusi MG, Savellini GG. Diagnostic tools for Toscana virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(7):799-805.
  14. Sakhria S, Alwassouf S, Fares W, Bichaud L, Dachraoui K, Alkan C et al. Presence of sandfly-borne phleboviruses of two antigenic complexes (Sandfly fever Naples virus and Sandfly fever Sicilian virus) in two different bio-geographical regions of Tunisia demonstrated by a microneutralisation-based seroprevalence study in dogs. *Parasit Vectors* 2014; 7:476.

15. Dincer E, Gargari S, Ozkul A, Ergunay K. Potential animal reservoirs of Toscana virus and coinfections with *Leishmania infantum* in Turkey. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(4):690-7.
16. Navarro-Marí JM, Palop-Borrás B, Pérez-Ruiz M, Sanbonmatsu-Gámez S. Serosurvey study of Toscana virus in domestic animals, Granada, Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11(5):583-7.
17. Tahir D, Alwassouf S, Loudahi A, Davoust B, Charrel RN. Seroprevalence of Toscana virus in dogs from Kabylia (Algeria). *Clin Microbiol Infect.* 2015;10. pii: S1198-743X(15)00954-4.
18. de Lamballerie X, Tolou H, Durand JP, Charrel RN. Prevalence of *Toscana virus* antibodies in volunteer blood donors and patients with central nervous system infections in southeastern France. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007;7(2):275-7.
19. Bichaud L, Izri A, de Lamballerie X, Moureau G, Charrel RN. First detection of Toscana virus in Corsica, France. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(2):O101-4.
20. Bosco-Lauth AM, Panella NA, Root JJ, Gidlewski T, Lash RR, Harmon JR et al. Serological investigation of heartland virus (*Bunyaviridae*: Phlebovirus) exposure in wild and domestic animals adjacent to human case sites in Missouri 2012-2013. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(6):1163-7.



## **Serological survey of influenza A viruses in domestic and wild *Suidae* in Corsica (France), a Mediterranean island environment**

Sébastien Grech-Angelini<sup>a,§\*</sup>, Séverine Hervé<sup>b,d</sup>, Nicolas Rose<sup>c,d</sup>, Nicolas Barbier<sup>b,d</sup>, François Casabianca<sup>a</sup>, Oscar Maestrini<sup>a</sup>, Alessandra Falchi<sup>e</sup>, Gaëlle Simon<sup>b,d</sup>

<sup>a</sup> INRA, UR045, Laboratoire de recherches sur le développement de l'élevage, Corte, France

<sup>b</sup> ANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Virologie Immunologie Porcines, Ploufragan, France

<sup>c</sup> ANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Epidémiologie et Bien-Etre du Porc, Ploufragan, France

<sup>d</sup> Université Bretagne Loire, France

<sup>e</sup> EA 3710, Laboratoire de virologie, Université de Corse/Inserm, Corte, France

<sup>§</sup>Present address: Groupement Technique Vétérinaire de Corse, Ghisonaccia, France

\* Corresponding author: [grech.angelini@gtvcorse.fr](mailto:grech.angelini@gtvcorse.fr)

Published in *Preventive Veterinary Medicine* (2016) 9:582

## **Abstract**

Corsica is a mountainous French island in the north-western Mediterranean Sea. It is a rural area, where pig farming is a major economic activity. Although no acute respiratory outbreaks due to swine influenza A viruses (swIAVs) have ever been reported in this free-ranging pig breeding system, influenza A viruses (IAVs) could be circulating within this pig population. A serological study was conducted as a first approach to domestic pigs and wild boars. Serum samples from 543 pigs raised on 91 different farms were collected during the 2013-2014 slaughtering season, and 279 sera from wild boars were obtained over four hunting seasons (between 2009 and 2014). They were first analysed by ELISA and then IAV positive and doubtful sera were subjected to haemagglutination inhibition tests using antigens representative of the four major enzootic swIAV lineages in Europe, i.e. avian-like swine H1N1 (H1<sub>av</sub>N1), pandemic-like swine H1N1 (H1N1pdm), H1N2 and H3N2. According to the ELISA results, 26.4% (CI95%: 17.7–36.7%) of herds had at least one positive animal (positive or doubtful by ELISA) and 12.4% (CI95%: 7.8–19.8%) of the pigs tested positive. Using the test characteristics (sensitivity and specificity), the true seroprevalence among Corsican pigs was estimated to be 16.4% (95% CI: 9.9 – 26.3). Antibodies directed against two different viral lineages were identified: H1N1pdm (in 66.2% and 45.8% of the IAV positive pigs and farms respectively) and H1<sub>av</sub>N1 (15.0% and 20.8% respectively). Evidence of exposure to viruses from two distinct lineages were detected on a single farm but in two different animals. Among the wild boars, 1.4% (CI95%: 0.4–3.6%) tested positive by ELISA and antibodies against the same two viruses were detected. Altogether, these results suggest that swIAVs from at least two different lineages are circulating among Corsican pigs, i.e. the H1N1pdm virus, probably introduced during the 2009 pandemic, and the H1<sub>av</sub>N1 virus, which is the most frequent swIAV in Europe. The low frequency of positive results observed in the Corsican wild boars hunted suggests that they would not play a major role in IAV dispersion dynamics on the island.

**Key words:** Swine influenza A virus, seroprevalence, pig, wild boar, Corsica

## **1- Introduction**

Swine influenza is a respiratory disease of pigs very similar to human influenza. It is generally benign but can be exacerbated by co-infections or be maintained within domestic herds. Thus, it can cause substantial health problems and heavy economic losses for the porcine sector (Vincent et al., 2017). Swine influenza A viruses (swIAV) also concern public health in two ways. On the one hand, they are zoonotic by nature (Myers et al., 2007). On the other hand, pigs can potentially serve as mixing vessels, thus permitting the adaptation of avian viruses to mammals, and the production of reassortants between influenza viruses originating from different animal reservoirs (Olsen et al., 2000). A new H1N1 reassortant containing genes previously adapted to the porcine species has emerged in humans in 2009 and was responsible for the last pandemic (H1N1pdm). It has confirmed the necessity, for human healthcare reasons, to study the viruses circulating in pigs. The H1N1pdm virus, which had never been detected in pigs before being identified in humans, was transmitted from humans to pigs during the pandemic, and has since become enzootic in many porcine populations around the world, and particularly throughout Europe (Watson et al., 2015). Since then, four distinct virus lineages have been recognised as enzootic in European pigs: the “avian-like swine H1N1” (H1<sub>av</sub>N1), the “human-like reassortant swine H3N2” (H3N2), the “human-like swine H1N2” (H1<sub>hu</sub>N2) and the “pandemic-like swine H1N1” (H1N1pdm) (Simon et al, 2014).

Corsica is a French island in the north-western Mediterranean Sea, 15 km North of Sardinia and 90 km West of Tuscany in Italy. It is the fourth largest Mediterranean island (approximately 180 km long and 70 km wide), and also the most mountainous and most forested. There are two departments (Corse-du-Sud and Haute-Corse) and 365 municipalities (the smallest administrative unit in France) in Corsica (Figure 1). The island is sparsely populated (36 inhabitants per km<sup>2</sup>), and while tourism is the leading economic activity, livestock farming (sheep, goats, pigs and cattle) is also an important one. Approximately 50,000 pigs (mainly local pigs) are bred in Corsica and among them 4,000 sows are used for reproduction. They are bred and raised free-range on almost 360 farms, but only 100 of these represent their owners' main income. A little more than 9,000 pigs are slaughtered every year from November to April in official slaughterhouses (ODARC et al., 2015) but much more are slaughtered illegally at homes. This seasonality in slaughter is linked to the traditional free-range Corsican pigs breeding. Indeed, pigs are used to be fed and fattened with acorns and chestnuts found on grassland during autumn and winter just before slaughter. The importation of live pigs is very limited and they are usually not mixed with local pigs. No respiratory outbreaks due to swine influenza A viruses have ever been reported in Corsica, probably due to the lack of health monitoring in swine.

However, swIAVs could be circulating among Corsican pigs, especially since the 2009 pandemic, when many herds were contaminated worldwide due to reverse zoonosis (Simon et al., 2014). No study on this issue has ever been carried out in Corsica to date. Moreover, as important interactions occur between this free-ranging pig population and wild boars (*Sus scrofa*), swIAVs may circulate from one species to the other, as ever shown for Hepatitis E virus (Jori et al., 2016).

The aim of this work was to assess through serological investigations whether IAVs are circulating among Corsican pigs and, if so, to identify the nature of the viral hemagglutinins (HA) towards whom antibodies are detected, leading to hypothesize the virus lineages that would be involved. Serum samples from wild boars killed by hunters were also analysed to evaluate the extent to which swIAVs may be circulating in the wild *Suidae* population.

## **2- Material and methods**

### *2.1. Sampling*

During the 2013-2014 slaughtering season (from November to April), blood samples from adult domestic pigs (most of them between 1.5 and 3 years old) bred in Corsica were obtained from the four Corsican slaughterhouses available for pigs (three in Corse-du-Sud and one in Haute-Corse, Fig. 1A). The sample size per slaughterhouse was proportional to the number of pigs slaughtered. The national identification system was used to trace the origin of pigs back to municipality level and to determine the owner. Pigs to be sampled were selected using systematic random sampling of each batch from same herd to be slaughtered the day of the sampling visit.

The sample size was first calculated assuming that expected prevalence would be the same as that in continental France, i.e. between 20 and 25% of animals (Hervé et al., 2011). Given the official number of pigs slaughtered every year in Corsica ( $n = 9,000$ ), a relative precision of 20% and a confidence interval level set at 95%, an initial sample size of 281 pigs was thus obtained to estimate this expected prevalence. However, having no previous data about IAV circulation in Corsican pigs, it was decided to nearly double the calculated sample size to account for the large uncertainty. Thus, 543 pigs were sampled at the slaughterhouses. This sample number was sufficient for estimating a pig-level prevalence value of 15% minimum with a relative precision of 20% and a confidence level of 95%.

The animals were randomly selected from the slaughter line. As very small batches could be slaughtered in Corsican slaughterhouses, batches of less than two pigs were excluded. Consequently, the expected number of sampled farms was approximately 90, which was again sufficient for estimating a farm-level prevalence value of 45% minimum with a relative precision of 20% and a confidence interval of 95% for the overall population of 360 Corsican farms. The number of pig farms included in the study ( $n = 91$ ) was not subjected to a strict sampling plan; indeed, it was directly related to the slaughtered pigs. The proportion of positive farms is therefore given as an observed frequency.

Samples from wild boars were obtained from one hunting team (10-20 hunters) over four hunting seasons (from August to February) between 2009 and 2014. These hunters hunt in different areas of the island (but mostly in the centre of Corsica) and they used to collect samples. As there is no reliable assessment of the number of wild boars in Corsica, the collected sera could only be used to report an observed frequency of positive results among the wild boars hunted by this team between 2009 and 2014. The hunters specified the municipality where the wild boars were killed.

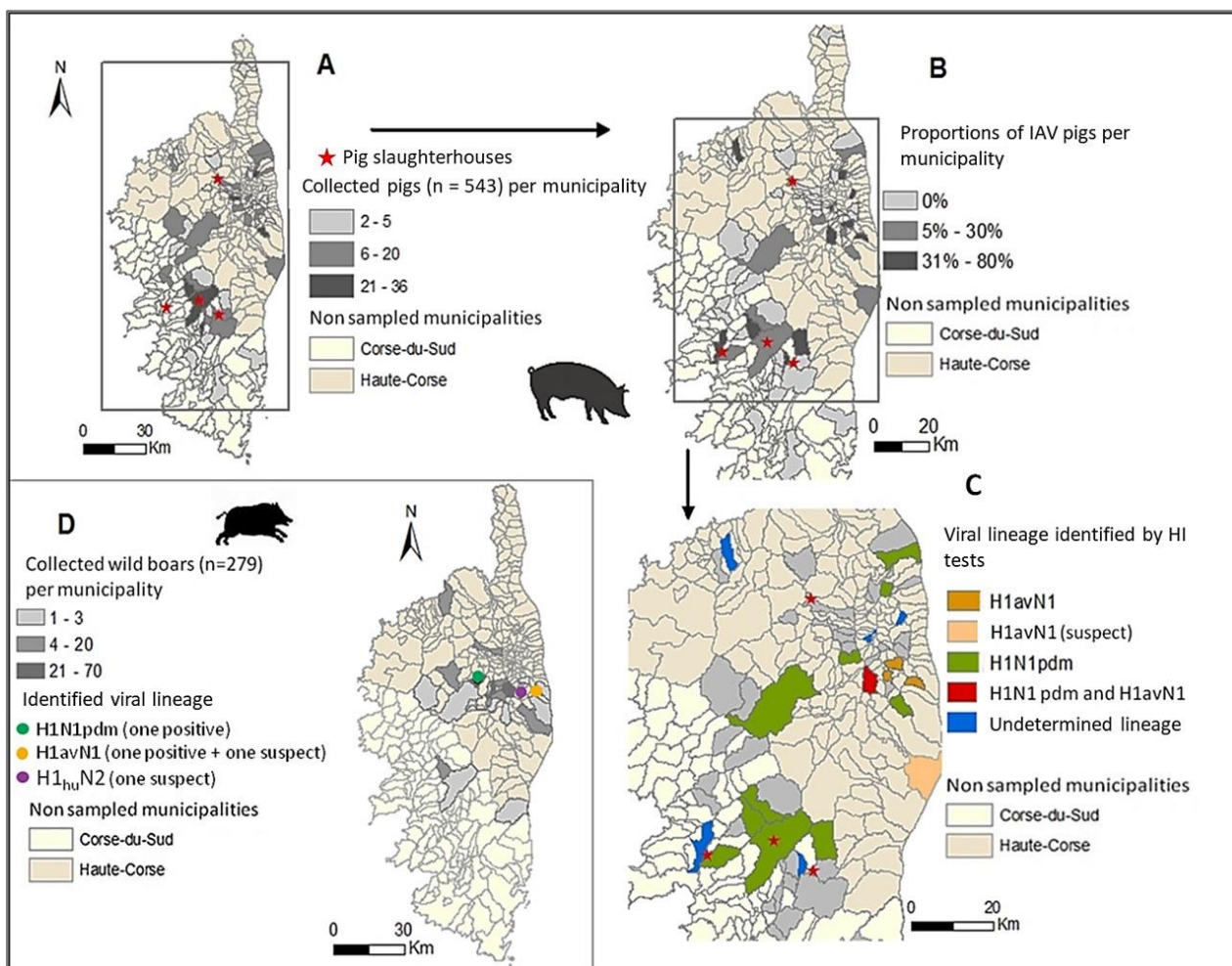
### *2.3. Serological testing*

Serum samples were first screened by ELISA to detect antibodies directed against the nucleoprotein of all influenza A viruses (IAV) using the ID Screen® Antibody Influenza A Competition kit (ID-Vet, Montpellier, France) according to the manufacturer's instructions. In a previous study conducted by the French National Reference Laboratory for Swine Influenza, this ELISA was shown to provide reasonably good diagnostic performance (unpublished data). The specificity (Sp) and the sensitivity (Se) of this kit were evaluated as Sp = 100% (95% CI: 98.7 – 100;  $n = 294$  negative sera from SPF pigs) and Se = 75.4% (95% CI: 70.2 – 80;  $n = 293$  positive sera from infected pigs). In the present study, positive animals (IAV+) were pigs or wild boars with a positive (S/N ratio > 50%) or doubtful (S/N ratio between 45 to 50%) serum. Other animals (S/N < 45%) were considered negative (IAV-). A pig herd (or a farm) was considered positive if at least one sampled animal tested IAV-positive.

Sera from IAV+ animals were then tested against antigens representative of the viral lineages currently enzootic in pigs throughout Europe, i.e. A/Sw/Cotes d'Armor/0388/2009 (H1<sub>av</sub>N1), A/Sw/Sarthe/0255/2010 (H1N1pdm), A/Sw/Scotland/410440/94 (H1<sub>hu</sub>N2) and A/Sw/Flanders/1/98 (H3N2), through haemagglutination inhibition (HI) assays performed according to standard procedures (OIE, 2008). Two-fold serum dilutions were tested starting from a dilution of 1:10. Titers



equal to or above 20 were considered positive; those equal to 10 were considered doubtful and those below 10, negative. Given the high specificity of the HI test, as confirmed in low cross-reactions using reference antigens and homologous control sera (data not shown), cross-reactivity is expected to be limited, especially between subtypes. However, it may exist between some lineages within a subtype, such as H1<sub>av</sub>N1 and H1N1pdm (Kyriakis et al., 2010). Thus, if antibodies against multiple lineages were found in one farm, antibody titers of individual animals were taken into account and interpretation rules were applied in order to discriminate between multiple infections and serological cross-reactions, as previously described (Kyriakis et al., 2013). Briefly, if the same animal had antibodies against several antigens, it was interpreted as positive against the antigen with the highest titer, considering the other lower titers as cross-reactions in the HI test. An animal showing the same antibody titer level against several lineages was multivalent-positive. Thus, a farm was considered positive for a subtype when at least one pig was found positive.



**Figure 1.** Location of IAV-positive animals and virus lineages (A: pigs collected per municipality; B: IAV-positive pigs; C: viral lineages identified in the pigs; D: wild boars collected and virus lineages identified in the wild boars).

## 2.4. Data analysis

The individual seroprevalence estimates of IAVs within the pig population were obtained using a generalised estimating equations (GEE) logistic model with a farm cluster effect (proc genmod, SAS 9.4) to take into account the correlated results expected among pigs sampled in a same farm. In the GEE model, an exchangeable correlation matrix structure was used. As the ELISA characteristics are known (sensitivity and specificity), the true seroprevalence could be estimated (Rogan and Gladen, 1978). Concerning IAV positive farms and positive wild boars, proportions were calculated with exact binomial confidence intervals (CI) of 95%. The proportions for each lineage were calculated among the positive animals (positive or doubtful by ELISA) or farms (with at least one positive animal). Differences in proportions were considered statistically significant if  $P < 0.05$ .

## 3- Results

### 3.1. Pigs

A total of 543 adult pigs from 91 different farms located in 56 municipalities were included in this study (Fig. 1A). Nearly 53% of the animals were from the department of Haute-Corse (Fig. 1A), and six animals per farm were collected on average (95% CI: 5.0 – 6.9). Among the 543 collected pigs, 80 were found IAV positive (68 clearly positive and 12 doubtful by ELISA test), leading to an estimated apparent pig-level seroprevalence of 12.4% (95% CI: 7.8 – 19.8) in Corsica (Table 1). The intra-herd correlation in the GEE logistic model was 0.43. Individual seroprevalence values in Haute-Corse and Corse-du-Sud were 14.5% and 10.1% respectively, but were not significantly different ( $p=0.45$ ). The true seroprevalence of IAV among Corsican pigs was estimated to be 16.4% (95% CI: 9.9 – 26.3). Positive animals were found in 20 out of the 56 municipalities from which the sampled pigs originated. Thirteen of them were located in Haute-Corse and seven in Corse-du-Sud (Fig. 1B).

Twenty-four out of the 91 sampled pig farms (26.4%; 95% CI: 17.7 – 36.7) had at least one positive pig. The within-herd frequency of positive animals for IAV-positive farms (adjusted with respect to the number of pigs sampled per farm) was 35.2% (95% CI: 24.7 – 45.7; Table 1).

After the HI tests performed using antigens bearing HAs from H1<sub>av</sub>, H1<sub>pdm</sub>, H1<sub>hu</sub> and H3<sub>swIAV</sub> lineages, respectively, it appeared that none of the 80 IAV+ sera contained antibodies directed against the H3N2 virus. Only 2/80 sera, both issued from a single herd, gave low positive HI titers (20) to the H1<sub>hu</sub>N2 antigen. As these sera concurrently obtained higher HI titers with the H1N1<sub>pdm</sub>

(320 and 640, respectively) and the H1<sub>av</sub>N1 (80 and 160, respectively) antigens, these sera were not interpreted H1<sub>hu</sub>N2 positive. The stronger potential cross-reactivity within H1 subtype was observed for H1pdm and H1<sub>av</sub> antigens. Positive or doubtful results towards the H1N1pdm virus were obtained in 56 and four sera, respectively. Positive HI titers ranged from 20 to 640, with a mean HI titer of 140. These 60/80 sera came from 15/24 IAV+ farms. In two of them, the H1pdm-positive sera tested negative with the H1<sub>av</sub>N1 antigen. By contrast, in the 13 other farms, most H1pdm-positive sera concurrently obtained doubtful or positive HI titers with the H1<sub>av</sub>N1 virus. However, they were lower at the individual level in nine of them, leading to interpret these farms as H1N1pdm positive only.

**Table 10.** Proportion of IAV ELISA-positive pigs and pig farms in Corsica

Analysis level	IAV+ percentage	95% CI
Animal (n = 543)	12.4* (True seroprevalence: 16.4%)	7.8 – 19.8 (9.9 – 26.3)
Farm (n = 91)	26.4	17.7 – 36.7
Within-herd (n = 24)	35.2	24.7 – 45.7

\*GEE logistic model estimate accounting for the farm cluster effect; CI=Confidence Interval

**Table 11.** Proportion (and number) of the different virus lineages against which antibodies were identified in the sera of IAV-positive animals and farms

Virus lineage	IAV+ pigs (n = 80)	IAV+ farms (n = 24)
H1N1pdm	66.2% (53)	45.8% (11)
H1 <sub>av</sub> N1	15.0% (12)	20.8% (5)
Doubtful results for H1 <sub>av</sub> N1	1.3% (1)	4.2% (1)
H1N1pdm and H1 <sub>av</sub> N1	0.0% (0)	4.2% (1)
Negative for each of the 4 lineages (H1 <sub>av</sub> N1, H1N1pdm, H1 <sub>hu</sub> N2 and H3N2)	17.5% (14)	25.0% (6)

In the last four farms with positive or doubtful results with H1N1pdm and H1<sub>av</sub>N1, one was interpreted positive towards both antigens and the three others were interpreted positive to the H1<sub>av</sub>N1

only. Finally, two farms had sera that were found positive to the H1<sub>av</sub>N1 virus only. Altogether, at the individual level, positive and doubtful results towards the H1<sub>av</sub>N1 lineage were obtained in 39 and 13 sera, respectively. Positive HI titers ranged from 20 to 160, with a mean HI titer of 61.5.

Thus, according to the rules followed to interpret HI tests taking into account possible cross-reactivity within H1 subtype, antibodies against two different viral lineages were identified in the Corsican pig population, i.e H1N1pdm and H1<sub>av</sub>N1 (Fig. 1C and Table 2). Antibodies against H1N1pdm were considered in 66.2% of IAV positive animals (n = 80) and in almost 46% of the farms where IAV infection was evidenced (n = 24). Antibodies directed against this lineage was found both in Haute-Corse and Corse-du-Sud (Fig. 1C). Antibodies against the H1<sub>av</sub>N1 lineage were detected in 15% of IAV-positive pigs and almost 21% of positive farms. An additional farm had a suspect result (highest HI titer was 10) for the H1<sub>av</sub>N1 lineage. All H1<sub>av</sub>N1-positive or doubtful farms were located in a limited area in the eastern part of Haute-Corse (Fig. 1C). Both H1N1pdm and H1<sub>av</sub>N1 lineages were interpreted positive together on one farm located in Haute-Corse, (Fig. 1C). The nature of the IAV antibodies could not be determined by HI tests in six farms (Table 2); three of them had only one ELISA doubtful pig among the tested animals.

### 3.2. Wild boars

A total of 279 wild boars were collected over four hunting seasons (96 in 2009-2010, 89 in 2010-2011, 86 in 2012-2013 and 8 in 2013-2014) in 25 municipalities but most of these animals (95.2%) were killed in the department of Haute-Corse (Fig. 1D). Four serum samples were found positive or doubtful, which indicated an observed proportion of positive/doubtful results among the hunted wild boars of 1.4% (95% CI: 0.4-3.6). Two of them were from wild boars hunted in 2009-2010. One was found positive to H1<sub>av</sub>N1 with a HI titer of 20, while the other was doubtful towards H1<sub>hu</sub>N2 (Fig. 1D). The two other sera were from wild boars hunted in 2012-2013. One was suspected of possessing antibodies to H1<sub>av</sub>N1 and the other one contained antibodies mostly directed against the H1N1pdm virus, with a HI titer of 160 (against an HI titer of 20 with the H1<sub>av</sub>N1 virus).

## 4- Discussion

This is the first study reporting the circulation of IAVs in domestic and wild *Suidae* populations in Corsica. The seroprevalence of Corsican pigs bred in a free-range system and the apparent prevalence at Corsican pig farm level were respectively 16.4% and 26.4%. In Continental France and

in Italy which are the two closer area to Corsica, no serological studies have been carried out since the 2009 pandemic. At animals' level, the seroprevalence of swIAV was 23.2% in France (Hervé et al., 2011) and 63% in Italy (Van Reeth et al., 2008), reaching 48.8% and 88% of positivity at the farm level, respectively. Even if the serological profiles of these pig populations have certainly evolved since the introduction of the H1N1pdm virus in 2009 (Simon et al., 2014), these results show that the pig populations are more exposed to swIAVs in Continental France and Italy than in Corsica Island.

Antibodies against two viral lineages were identified in samples from Corsican pigs: the H1N1pdm virus, which was predominant (66% of IAV-positive pigs) and detected in both Haute-Corse and Corse-du-Sud; and the H1<sub>av</sub>N1 virus (15% of IAV-positive pigs), which was only found in a small area of Haute-Corse (Fig. 1C).

During the 2009 pandemic, samples from Corsican human patients (n = 54) with influenza-like illness were analysed to detect influenza viruses; H1N1pdm was the only influenza A virus identified and it was found in 63% of the patients (Falchi et al., 2011). Thus, H1N1pdm has clearly spread widely within the human Corsican population, and was certainly transmitted from humans to pigs, as it has all over the world (Nelson and Vincent, 2015). Indeed, pigs were shown to be highly susceptible to H1N1pdm virus infection due to its origins, and many pig populations that were swIAV-free (or almost free) before the pandemic became infected, as in Norway for example, probably because of a lack of immunity to IAVs and/or reduced viral competition (Er et al., 2016). The Corsican situation resembles that reported in another two French islands where pigs are also relatively raised free-range: New Caledonia (south-western Pacific Ocean) and Reunion Island (south-western Indian Ocean), where no acute respiratory outbreaks due to swine influenza A viruses were reported in pigs before the pandemic (Marchal et al., 2011; Cardinale et al., 2012). In these territories, IAV seroprevalence values among pigs were found to be higher than 80% in 2010-2011, H1N1pdm being the only lineage identified. Subsequent to human-to-pig transmission at the time of the pandemic and introduction into pig populations, it has also to be noted that Corsican pigs, as others, could get infected with the H1N1pdm during annual epidemics in humans, as this virus has become a seasonal virus in humans (Watson et al., 2015). No data is available about swIAV circulation in Corsica before 2009, but the fact that H1<sub>av</sub>N1-positive pigs were found in addition to H1N1pdm-positive pigs in these samples from 2013-2014 indicates that H1<sub>av</sub>N1 viruses might have been circulating among Corsican pigs for several years (perhaps even before the pandemic) as elsewhere in France and Europe, where it is still the most frequently identified swIAV (Simon et al., 2014). Even if the importation of live pigs from

continental France or any other country is very limited in Corsica, the number of these animals is not precisely known and H1<sub>av</sub>N1 viruses could have been introduced from imported animals.

For six IAV+ farms, the nature of the serum antibodies was not determined in HI tests using reference antigens representative for the European enzootic swIAVs. This was probably due to a lower sensitivity of the HI test as compared to ELISA, and/or different amounts of hemagglutinin (HA) and nucleoprotein (NP) antibodies, as both methods do not detect the same type of antibodies. Indeed, among these six farms, three had only one IAV+ animal which was doubtful by ELISA test, so the undetermined results in HI tests might not draw useful conclusions. However, it could not be excluded that IAV antibodies were directed against an IAV antigen that was not tested in this study, especially in the three other positive farms.

It appears that the frequent interactions between Corsican pigs and wild boars have not really impacted IAV transmission to the wild *Suidae* population. The observed proportion of positive sera from wild boars (1.4%) was very low, and similar to that found in continental France (between zero and 8.8%), suggesting that IAVs were not circulating to a large extent in wild populations (Vittecoq et al., 2012; Payne et al., 2011). Among the Corsican wild boar population, H1<sub>av</sub>N1 lineage (one positive and one doubtful result by HI test) was suggested in the same area where pigs were found positive for this lineage. Even if one wild boar had a doubtful result for the H1<sub>hu</sub>N2 lineage, the lineages identified in Corsican wild boars matched those found in domestic pigs, confirming the hypothesis stated in other French studies that wild boars can become infected with the viruses shed by pigs, but that they do not play a major role in swIAV dispersion dynamics.

Further investigations are now necessary to refine the status of Corsica regarding IAV infections in pigs and to confirm the current circulation of H1N1pdm and H1<sub>av</sub>N1 viruses. This serological study needs to be complemented by virological investigations into respiratory outbreaks and the isolation of IAVs from domestic Corsican pigs.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to the staff of slaughterhouses at Ponte-Leccia, Cuttoli, Cozzano and Bastelica for their help in collecting samples, and to Olivier Fontana (DDCSPP, Corse-du-Sud), Bastien Trabucco (ARGPRC) and Sidonie Lefebvre (DDCSPP, Haute-Corse) for organising the sample collection.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Funding**

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial or not-for-profit sectors.

### **References**

- Cardinale, E., Pascalis, H., Temmam, S., Hervé, S., Saulnier, A., Turpin, M., Barbier, N., Hoarau J., Quéguiner, S., Gorin, S., Foray, C., Roger, M., Porphyre, V., André, P., Thomas, T, de Lamballerie, X., Koussay Dellagi, K., Simon, G., 2012. Influenza a (H1N1) pdm09 virus in pigs, Reunion Island. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1665-68.
- Er, C., Skjerve, E., Brun, E., Framstad, T., Lium, B., 2016. Occurrence and spread of influenza A(H1N1)pdm09 virus infection in Norwegian pig herds based on active serosurveillance from 2010 to 2014. *Epidemiol. Infect.* 144, 3148-3165.
- Falchi, A., Amoros, J. P., Arena, C., Arrighi, J., Casabianca, F., Andreoletti, L., Turbelin, C., Flahault, A., Blanchon, T., Hanslik, T., Varesi, L., 2011. Genetic structure of human A/H1N1 and A/H3N2 influenza virus on Corsica Island: phylogenetic analysis and vaccine strain match, 2006–2010. *PLoS One* 6, e24471.
- Hervé, S., Gorin, S., Quéguiner, S., Barbier, N., Eveno, E., Dorenlor, V., Eono, F., Madec, F., Rose, N., Simon, G., 2011. Estimation of influenza seroprevalence in slaughter pigs in France in 2008-2009. *J. Rech. Porcine* 43, 281-282.
- Jori, F., Laval, M., Maestrini, O., Casabianca, F., Charrier, F., Pavio, N., 2016. Assessment of Domestic Pigs, Wild Boars and Feral Hybrid Pigs as Reservoirs of Hepatitis E Virus in Corsica, France. *Viruses*, 8, 236.
- Kyriakis, C. S., Olsen, C. W., Carman, S., Brown, I. H., Brookes, S. M., Van Doorselaere, J., Van Reeth, K., 2010. Serologic Cross-Reactivity with Pandemic (H1N1) 2009 Virus in Pigs, Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 16 (1), 96-99.

- Kyriakis, C.S., Rose, N., Foni, E., Maldonado, J., Loeffen, W.L.A., Madec, F., Simon, G., Van Reeth, K., 2013. Influenza A virus infection dynamics in swine farms in Belgium, France, Italy and Spain, 2006–2008. *Veterinary Microbiology*, 162, 543-550.
- Marchal, C., Hervé, S., Rose, N., Simon, G., 2011. Transmission of the pandemic influenza A/H1N1 virus (2009) to the pig population of New Caledonia. *Bull. Epid. Santé Anim. Alim.* 43, 17-21.
- Myers, K. P., Olsen, C. W., Gray, G. C., 2007. Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 44, 1084-1088.
- Nelson, M. I., Vincent, A.L., 2015. Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human-animal interface. *Trends Microbiol.* 23, 142-53.
- ODARC, DRAAF, chambre d’agriculture de la Corse, 2015. Chiffres clés de l’agriculture corse.
- OIE, 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th ed. Chapter 2.8.8 (Swine influenza), 1128–1138.
- Olsen, C. W., Carey, S., Hinshaw, L., Karasin, A. I., 2000. Virologic and serologic surveillance for human, swine and avian influenza virus infections among pigs in the north-central United States. *Arch. Virol.* 145, 1399-1419.
- Payne, A., Rossi, S., Lacour, S. A., Vallée, I., Garin-Bastuji, B., Simon, G., Séverine Hervé, S., Pavio, N., Richomme, C., Dunoyer, C., Bronner, A., Hars, J., 2011. Health report on wild boar focusing on trichinosis, Aujeszky’s disease, brucellosis, hepatitis E and swine influenza viruses in France. *Bull. Epi. Santé Anim. Alim.* 44, 2-8.
- Rogan, W., Gladen, B., 1978. Estimating prevalence from the results of a screening test, *American Journal of Epidemiology.* 107, 71–76.
- Simon, G., Larsen, L. E., Dürrwald, R., Foni, E., Harder, T., Van Reeth, K., Markowska-Daniel, I., Reid, S.M., Dan, A., Maldonado, J., Huovilainen, A., Billinis, C., Davidson, I., Agüero, M., Vila, T., Hervé, S., Østergaard Breum, S., Chiapponi, C., Urbaniak, K., Kyriakis, C.S., ESNIP3 consortium, Brown, I.H., Loeffen, W., 2014. European surveillance network for influenza in pigs: surveillance programs, diagnostic tools and swine influenza virus subtypes identified in 14 European countries from 2010 to 2013. *PLoS One* 9, e115815.



Van Reeth, K., Brown, I. H., Dürrwald, R., Foni, E., Labarque, G., Lenihan, P., Maldonado, J., Markowska-Daniel, I., Pensaert, M., Pospisil, Z., Koch, G., 2008. Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002–2003. *Influenza and other respiratory viruses*, 2(3), 99-105.

Vincent, A.L., Perez, D.R., Rajao D, Anderson, T.K., Abente E.J., Walia R.R., Lewis N.S., 2017. Influenza A virus vaccines for swine. *Veterinary microbiology*, 206,35-44.

Vittecoq, M., Grandhomme, V., Simon, G., Herve, S., Blanchon, T., Renaud, F., Thomas, F., Gauthier-Clerca, M., Van der Werf, S., 2012. Study of influenza A virus in wild boars living in a major duck wintering site. *Infect. Genet. Evol.* 12, 483-486.

Watson, S.J., Langat, P., Reid, S.M., Lam, T.T., Cotten, M., Kelly, M., Van Reeth, K., Qiu, Y., Simon, G., Bonin, E., Foni, E., Chiapponi, C., Larsen, L., Hjulsgager, C., Markowska-Daniel, I., Urbaniak, K., Dürrwald, R., Schlegel, M., Huovilainen, A., Davidson, I., Dan, A., Loeffen, W., Edwards, S., Bublot, M., Vila, T., Maldonado, J., Valls, L., Brown, I.H., Pybus, O.G., Kellam, P., 2015. Molecular Epidemiology and evolution of influenza viruses circulating within European swine between 2009 and 2013. *J. Virol.* 89, 9920-9931.

## Résumé en anglais

**Title:** Ticks and Tick-borne pathogens from Corsica, a Mediterranean island environment

**Abstract:**

Corsica is a French mountainous Mediterranean island presenting a large diversity of natural environments. Hunting and hiking are very popular and livestock farming is an important economic activity (sheep, goats, pigs and cattle); it is of a semi-extensive to an extensive type of farming and animals are often in contact with wildlife. Therefore, important interactions occur between livestock, wildlife and humans in a small area. This context could favour both the presence of a great diversity of tick species and the circulation of tick-borne pathogens. However, neither the tick fauna nor the pathogens they transmit have been systematically investigated in Corsica. Cattle were chosen as a model host to investigate the Corsican tick fauna because its farming system is still of a very extensive type (with a low frequency of acaricide treatments). For one year, 1,938 ticks were collected from cattle in the three Corsican cattle slaughterhouses. Eight tick species were found infesting cattle: *Rhipicephalus (Rh.) bursa* (56% of the collected ticks), *Hyalomma (Hy.) marginatum* (21%), *Hy. scupense* (9%), *Ixodes (I.) ricinus* (6%), *Haemaphysalis (Ha.) punctata* (5%), *Rh. sanguineus sensu lato* (2%), *Rh. (Boophilus) annulatus* (0.7%) and *Dermacentor (D.) marginatus* (0.3%). The cattle infestation rate remained high all year (63% of animals) and several tick species showed seasonal variation of their activity. During the same period, ticks from other domestic animals (small ruminants, horses, domestic carnivores) and wild animals (wild boars, mouflons, deer, hedgehogs, birds) were occasionally collected. A total of 3,134 ticks were collected (60 % from Cattle), several host preferences were clearly shown and another species, *Ha. sulcata*, was found on mouflons.

A real-time PCR chip was used for high-throughput microfluidic real-time PCR amplification (BioMark™ dynamic arrays, Fluidigm Corporation, USA). This advanced methodology permitted the simultaneous detection of 27 bacterial (from the genus *Borrelia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, *Bartonella*, *Neoehrlichia*, *Coxiella* and *Francisella*) and 12 parasitic species (from the genus *Babesia* et *Theileria*) in pools consisted in one to five ticks. In almost half (48%) of the 569 analysed samples (1,523 ticks), DNA from at least one pathogen was detected and 11 species of tick-borne-pathogens (TBPs), among them seven were zoonotic, from six genera were reported. TBPs were found in ticks from all collected hosts and were present in more than 80% of the investigated area. The detection of DNA of certain species confirmed the previous identification of these pathogens in Corsica, such as

*Rickettsia aeschlimannii* (23% of pools), *Rickettsia slovaca* (5%), *Anaplasma marginale* (4%) and *Theileria equi* (0.4%), but most TBP DNAs identified had not previously been reported in Corsican ticks. This included *Anaplasma phagocytophilum* (16%), *Rickettsia helvetica* (1%), *Borrelia afzelii* (0.7%), *Borrelia miyamotoi* (1%), *Bartonella henselae* (2%), *Babesia bigemina* (2%) and *Babesia ovis* (0.5%). Crimean-Congo Haemorrhagic Fever (CCHF) virus was investigated individually in tick species known to be vectors (*Hyalomma* spp.) or carriers (*Rh. bursa*) of this virus. RNA of the CCHF virus was not found in the analysed samples (322 pools; 1,015 ticks) but a serological survey led on 3,890 domestic ruminants showed that 9.1% of these animals had antibodies against CCHF virus highlighting the probable circulation of a strain of this virus in Corsica.

**Keywords:** Ticks (Ixodidae), Tick-borne pathogens, Corsica, wild animals, domestic animals







## Tiques et agents pathogènes transmis en Corse, milieu insulaire méditerranéen

### Résumé :

La Corse est une île méditerranéenne montagneuse, présentant une grande diversité de biotopes, où les interactions entre l'homme, les animaux domestiques et la faune sauvage sont multiples. Malgré un contexte à priori favorable, l'étude des tiques et des agents pathogènes qu'elles transmettent n'avait fait l'objet d'aucune étude exhaustive en Corse. Le cheptel bovin insulaire, élevé dans un état de semi-liberté (avec une utilisation restreinte de traitements acaricides), a été utilisé comme modèle pour dresser un état des lieux des espèces de tiques présentes sur le territoire. Durant une année, près de 2 000 tiques ont été collectées dans les trois abattoirs bovins de l'île. Huit espèces ont été identifiées : *Rhipicephalus bursa* (56% des tiques prélevées), *Hyalomma marginatum* (21%), *Hyalomma scupense* (9%), *Ixodes ricinus* (6%), *Haemaphysalis punctata* (5%), *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (2%), *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (0,7%) et *Dermacentor marginatus* (0,3%). Des collectes plus ponctuelles réalisées sur d'autres animaux domestiques et sauvages (1200 tiques collectées) ont permis de mettre en évidence des préférences d'infestations envers certains hôtes animaux, et d'identifier une espèce supplémentaire, *Haemaphysalis sulcata* (prélevée sur des mouflons).

Un outil de PCR micro-fluidiques en temps réel à haut débit (BioMark™ dynamic arrays, Fluidigm Corporation, USA) a été utilisé pour rechercher 27 bactéries (des genres *Borrelia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, *Bartonella*, *Neoehrlichia*, *Coxiella* et *Francisella*) et 12 espèces de parasites (des genres *Babesia* et *Theileria*) dans des pools composés d'une à cinq tiques. Près de la moitié des 569 échantillons (1 523 tiques analysées) étaient porteurs de l'ADN d'au moins un micro-organisme. Les séquences génétiques de 11 agents pathogènes, dont sept sont zoonotiques, ont été détectées : *Rickettsia aeschlimannii* (23% des pools analysés), *Anaplasma phagocytophilum* (16%), *Rickettsia slovaca* (5%), *Anaplasma marginale* (4%), *Bartonella henselae* (2%), *Babesia bigemina* (2%), *Rickettsia helvetica* (1%), *Borrelia miyamotoi* (1%), *Borrelia afzelii* (0,7%), *Babesia ovis* (0,5%) et *Theileria equi* (0,4%). Le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF), recherché de façon individuelle dans plus de 1 000 tiques, n'a pas été identifié mais une enquête sérologique réalisée sur 3 890 ruminants domestiques a montré que 9,1% des animaux étaient porteurs d'anticorps dirigés contre le virus, suggérant ainsi la circulation d'une souche du virus CCHF en Corse.

**Mots-clés :** Tiques (Ixodidae), agents pathogènes, Corse, faune sauvage, animaux domestiques