



Università di Pisa

Facoltà di Medicina Veterinaria

Scuola di Specializzazione in “Sanità Animale, Allevamento e  
Produzioni Zootecniche”

Ricerca di *Rickettsia* del gruppo “Spotted Fever” in  
zecche antropofile raccolte in Toscana e Liguria

CANDIDATO

Dott. Gianluca Fichi

RELATORI:

Dott.ssa Ebani Valentina

Dott. Marco Selmi

19-10-2012

Per vivere in pace,  
è più necessario nascondere  
il merito che i difetti.  
**Anne Claude de Caylus,**  
*Grosley, XVIII sec.*

*I dedicate this thesis  
to all those who have  
a permanent place in Italy  
but they did not deserve it,  
because thanks to them  
I have never stopped  
to study and learn...*

---

<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>RIASSUNTO</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
<b>I CICLI DELLE ZOONOSI TRASMESSE DA ZECCHE</b>	<b>5</b>
<b>RICKETTSIA SFG</b>	<b>6</b>
MICROORGANISMO	6
TASSONOMIA	6
VETTORE	7
OSPITE SERBATOIO O RESERVOIR	10
DIAGNOSI NELLA ZECCA	10
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>12</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>13</b>
<b>CAMPIONI DI ZECCA</b>	<b>13</b>
<b>IDENTIFICAZIONE DELLE ZECCHE</b>	<b>15</b>
<b>ESTRAZIONE DEL DNA</b>	<b>15</b>
<b>CONTROLLO DI PROCESSO</b>	<b>15</b>
<b>PCR RICKETTSIA SFG</b>	<b>16</b>
<b>SEQUENZIAMENTO E ALLINEAMENTO</b>	<b>17</b>
<b>ANALISI FILOGENETICA</b>	<b>17</b>
<b>ANALISI STATISTICA</b>	<b>18</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>19</b>
<b>FLUSSO CENTRALE:</b>	<b>19</b>
<b>MONITORAGGIO AMBIENTALE:</b>	<b>21</b>
<b>FLUSSO PERIFERICO:</b>	<b>23</b>
<b>ANALISI DI OMOLOGIA E FILOGENETICA</b>	<b>23</b>
<b>DISCUSSIONI</b>	<b>28</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>32</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>33</b>

## Abstract

Several tick-borne rickettsiae cause human diseases and, in the last years, the increased use of molecular-based identification methods has resulted in new spotted fever group rickettsiae being characterized in ixodid ticks throughout Europe. To ascertain the *Rickettsia* Spotted Fever Group (SFG) that threatens people's health, during March 2012- September 2012 the infection by SFG rickettsiae in tick species that bit humans and in host-seeking ticks was investigated in several areas of Tuscany and Liguria coast, Italy. After the identification of the tick, the DNA was extracted and the samples were investigated for *gltA* and *rompA* gene. Successful DNA extraction was verified using PCR for mitochondrial 16S rDNA sequences of hard and soft ticks. Specie identification was performed by sequence analysis and alignment with existing sequences in GenBank. Ticks belonging to following species were analysed: *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma marginatum*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *R. turanicus*. Of 76 ticks removed from patients in Liguria and Tuscany hospitals, 18 (32.14%, 95% C. I. 19.91–44.37) resulted positive for *Rickettsia* SFG DNA. *R. monacensis* was the most amplified (n=8, 14.29%, 95% C. I. 5.12–23.45), followed by *R. helvetica* (n=5, 8.93%, 95% C. I. 1.96–16.40) and *Rickettsia sp.* CyRtu43S (n=1). A total of 442 host-seeking tick specimens were collected by dragging vegetation, corresponding to 444 nymphs (92.12%), 24 females (4.98%), and 11 males (2.28%). The adults were analysed singularly while the nymphs were analysed in pool of three subjects of the same species. In total of 186 samples amplified, 60 resulted positive for *R. monacensis* (32.26%, 95% C. I. 25.54–38.98) and 9 for *R. helvetica* (4.84%, 95% C. I. 1.75–7.92). Two male of *D. marginatus* resulted positive for *R. slovacica* and one female of *R. turanicus* for *R. massiliae*. *R. bellii* was amplified from an *I. ricinus* nymph. Of 404 *I. ricinus* nymphs analysed, 22.89% (95% C. I. 18.78–26.99) resulted positive for *Rickettsia* SFG DNA. The southern provinces of Tuscany (Leghorn and Pisa) showed the highest prevalence, respectively 41.52%, (I.C. 95% 29.05–53.99) and 35.63% (I.C. 95% 21.64–49.63).

## Riassunto

Molte rickettsie, trasmesse da morso di zecca, causano malattie nell'uomo e negli ultimi anni l'aumento dell'utilizzo di metodiche diagnostiche basate sull'analisi molecolare ha permesso la caratterizzazione di nuove rickettsie del gruppo Spotted Fever (SFG) in zecche della famiglia *Ixodidae* in tutta Europa. Per accertare le rickettsie SFG che minacciano la salute pubblica, tra marzo e settembre 2012, sono stati analizzati per ricerca di DNA di *Rickettsia* SFG campioni di zecche raccolte nella zona costiera delle regioni Toscana e Liguria e provenienti da tre flussi: flusso centrale (zecche derivate da pazienti dal pronto soccorso), monitoraggio ambientale (zecche raccolte in habitat) e flusso periferico (zecche raccolte da utenza sensibilizzata). La presenza di DNA di *Rickettsia* SFG nei campioni di zecca è stata ricercata utilizzando primer specifici per un frammento della regione *gltA* codificante per il gene della citrato sintetasi e per un frammento della regione *rompA* codificante per l'antigene di superficie OmpA. Come controllo di processo è stato utilizzato un frammento del DNA ribosomiale 16S specifico per le zecche. L'identificazione di specie è stata effettuata mediante analisi delle sequenze e allineamento con le sequenze presenti in GenBank. Le zecche analizzate appartenevano alle seguenti specie: *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma marginatum*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *R. turanicus*. Dei 76 campioni prelevati da paziente negli ospedali della Liguria e della Toscana, 18 (32,14%, I. C. 95% 19,91–44,37) sono risultati positivi per DNA di *Rickettsia* SFG. *R. monacensis* è stata, tra le diverse specie di *Rickettsia* SFG presenti in questi campioni, quella più frequentemente rilevata mediante PCR (n=8, 14,29%, I.C. 95% 5,12–23,45), seguita da *R. helvetica* (n=5, 8,93%, I.C. 95% 1,96–16,40) e *Rickettsia* sp. CyRtu43S (n=1). Un totale di 442 campioni di zecca in cerca di ospite sono stati raccolti mediante dragging, corrispondenti a 444 ninfe (92,12%), 24 femmine (4,98%) e 11 maschi (2,28%). Gli adulti sono stati analizzati singolarmente mentre le ninfe sono state analizzate in pool di tre soggetti della stessa specie. In totale dei 186 campioni amplificati, 60 sono risultati positivi per *R. monacensis* (32,26%, I. C. 95% 25,54–38,98) e 9 per *R. helvetica* (4,84%, I. C. 95% 1,75–7,92). Due maschi di *D. marginatus* sono risultati positive per *R. slovacica* e una femmina di *R. turanicus* è risultata positiva per *R. massiliae*. Un campione di *I. ricinus* ninfa ha presentato amplificato di *R. bellii* per il gene *gltA*. Delle 404 ninfe di *I. ricinus* analizzate il 22,89% (I. C. 95% 18,78–26,99) è risultato positive per *Rickettsia* SFG. Le province di Livorno e Pisa hanno presentato la prevalenza più alta, rispettivamente del 41,52% (I. C. 95% 29,05–53,99) e del 35,63% (I.C. 95% 21,64–49,63).

## Introduzione

Le malattie trasmesse da vettore sono considerate, da sempre, una delle maggiori piaghe dell'umanità. Nell'ultimo secolo, l'impegno profuso dall'intera comunità scientifica, ha permesso di controllare le più importanti malattie trasmesse da vettore nei paesi industrializzati. Tuttavia l'aumento dei viaggiatori internazionali ha dimostrato, come nel caso dell'epidemia di Chikungunya che si è sviluppata in Emilia Romagna nel 2007, che infezioni caratteristiche di paesi tropicali possono essere introdotte con estrema facilità nelle nostre regioni.

Queste malattie sono caratterizzate da una straordinaria integrazione tra patogeno, vettore, ospite ed ambiente. Inoltre, tali interazioni sono soggette a co-evoluzione prodotta dalle inevitabili conseguenze di pressioni antropiche, quali i mutamenti climatici, l'industrializzazione, le modifiche apportate al territorio e l'aumento della popolazione. A livello locale, queste co-evoluzioni sono responsabili della modifica di incidenza delle malattie nell'uomo e negli animali e giustificano l'apprensione di medici e veterinari e l'interesse nello studio dei meccanismi che regolano le interazioni.

\*\*\*\*\*

Le zecche (Acari: Ixodidae) sono artropodi ematofagi obbligati, altamente specializzati, in grado di nutrirsi su mammiferi, uccelli, rettili ed anfibi in quasi tutte le regioni del mondo e sono efficaci vettori di una ampia varietà di patogeni, inclusi virus, batteri, protozoi ed elminti (Cringoli, 2005; Estrada-Peña et al., 2004). Le zecche sono i vettori maggiormente coinvolti nella trasmissione di malattie infettive in Europa (Parola, 2004). Inoltre, in tema di patologie emergenti, delle diverse nuove malattie trasmesse da zecche identificate nell'ultimo ventennio, il maggior numero è stato segnalato in Europa, confermando, per questa area geografica, la presenza di habitat che supportano i cicli ecologici dei patogeni e la conseguente stabilizzazione delle patologie sul territorio (Parola et al., 2005; Parola and Raoult, 2001).

Le problematiche sanitarie di maggior impatto riguardano in modo particolare specie di zecca adattate ad ambienti naturali. In questo caso il rischio del contatto tra l'uomo e la zecca deriva dalla frequentazione di habitat infestati e questa opportunità può concretizzarsi esercitando in aree naturali attività turistiche, ricreative o anche professionali (Garbarino et al., 2003). Negli ultimi anni lo sviluppo dell'attività di agriturismo, l'aumento della popolazione di animali selvatici, la costituzione di aree protette e parchi naturali, la diffusione di sport come il trekking, ecc., sembrano aver favorito le opportunità per l'uomo di entrare in contatto con questi vettori (Gray et al., 2009).

L'attività di prevenzione nei confronti delle patologie trasmesse da zecche è orientata alla corretta identificazione del rischio sanitario, all'informazione degli esposti al rischio, al coinvolgimento dei sanitari ad un approccio multidisciplinare.

La corretta identificazione del rischio non può prescindere dalla conoscenza di: 1) ecologia, etologia e fenologia delle specie di zecche di maggior interesse (Sonenshine and Thomas, 1994); 2) meccanismi che regolano l'interazione tra patogeno, vettore ed ospite (Walker et al., 2003); 3) dati originali sulla distribuzione, densità e prevalenza di infezione dei vettori nell'area di studio (Rizzoli et al., 2011; <http://ecdc.europa.eu>).

### ***I cicli delle zoonosi trasmesse da zecche***

Tutti i cicli delle malattie trasmesse da zecche prevedono una triangolazione interattiva tra **ospite**, **vettore** e **microrganismo** (Nuttal and Labuda, 2004). La realizzazione del ciclo dipende da fattori limitanti, tipicamente definiti di tipo "intrinseco" (barriere fisiche, fisiologiche, cellulari) ed "estrinseco" (densità di ospiti e vettori, coincidenza spazio temporale, infettività, ecc), pertanto ogni singolo elemento del ciclo deve possedere particolari requisiti che rendano attiva la triangolazione (Sonenshine and Thomas, 1994).

L'ospite. Tipicamente divisi in ospiti riproduttivi, che semplicemente sostengono la popolazione di zecche con il pasto di sangue ed ospiti serbatoio o *reservoir*, sui quali la zecca perpetua l'infezione. Ospiti diversi possono modulare le due proprietà nei confronti di un dato binomio vettore-patogeno. La capacità di un reservoir si realizza essenzialmente con la competenza biologica, quindi il reservoir deve essere vulnerabile al patogeno, tollerarne lo sviluppo e garantire una infettività di lunga durata. In genere i micromammiferi sono buoni reservoir, ma anche all'interno di questa classe di animali, l'efficacia varia con la specie, l'età, il sesso, la stagionalità (Sonenshine and Thomas, 1994).

Il vettore. Le zecche sono efficienti vettori per una ampia varietà di microrganismi, tra cui virus, protozoi, rickettsie, spirochete. Le zecche della famiglia delle Ixodidae si nutrono solo tre volte, come larva, ninfa e adulto. Al pasto di sangue segue la muta o la riproduzione, cosicché, al contrario di quanto avviene per altri vettori, come ad esempio le zanzare, un determinato stadio che si è eventualmente infettato con il pasto di sangue, non può ritrasmettere l'infezione fino al pasto che effettuerà come stadio successivo. Questo aspetto, al fine di garantire l'infettività del vettore, introduce la necessità della trasmissione transtadiale del microrganismo, una evenienza inconsueta tra gli artropodi, ma che nelle zecche è resa possibile dai modesti processi istiolitici che intervengono nelle mute. In alcuni binomi il microrganismo infetta l'apparato riproduttivo della zecca e viene trasmesso per via transovarica, originando una progenie di larve infette. Anche nel caso della zecca, al fine di garantire la capacità vettoriale, è necessario il requisito della competenza, quindi la capacità di ingerire il patogeno con il sangue, tollerarne la moltiplicazione e lo sviluppo, inocularlo in un sito idoneo. Mentre per la sua efficienza di vettore è importante pasteggiare su reservoir che non abbandonino l'habitat ideale della zecca ed avere una densità relativa superiore a quella dell'ospite, per garantire un numero elevato di contatti infettanti nel periodo di massima infettività del reservoir (Sonenshine and Thomas, 1994).

Il microrganismo. Il microrganismo agente di una zoonosi trasmessa da zecche deve essere adatto ad infettare e moltiplicarsi alternativamente su tessuti di ospiti invertebrati e di vertebrati: questo significa

superare le alte temperature del corpo dei mammiferi e il loro sistema immunitario complesso, così come adattarsi alla variabilità di temperatura di un invertebrato ed al suo sistema di difesa più primitivo ma comunque efficace. Inoltre il successo dell'infezione dipende dall'interazione ospite-vettore e dalla capacità di utilizzare come veicolo i fluidi corretti, tipicamente il sangue nei vertebrati e la saliva nelle zecche (Sonenshine and Thomas, 1994).

Tra le zoonosi trasmesse dalla zecca un ruolo importante è rivestito dalla rickettsiosi.

### ***Rickettsia Spotted Fever Group***

#### **Microrganismo**

Le rickettsie sono piccoli batteri, coccobacilli, Gram negativi, parassiti intracellulari obbligati appartenenti alla classe delle Alphaproteobacteria (Gillespie et al., 2008). Appartengono all'ordine Rickettsiales che comprende tre famiglie: Holosporaceae, Anaplasmataceae e Rickettsiaceae, di cui *Rickettsia* fa parte (Gillespie et al., 2008).

Il nome deriva da Howard Ricketts microbiologo americano che per primo le descrisse come agenti causali della febbre delle Montagne Rocciose nel 1906 (Dobler and Wölfel, 2009). Il primo a identificarne la natura intracellulare fu invece Wolbach (1919) mediante colorazione di Gram e negli anni 30 e 40 Castaneda e Macchiavello ne descrissero le proprietà tintoriali (Parola et al., 2000). Per molto tempo descritti come "large virus", con l'avvento delle colture cellulari e della biologia molecolare sono state classificate come batteri, insieme ad *Ehrlichia* e *Anaplasma* (Dobler and Wölfel, 2009).

Sono quindi batteri intracellulari obbligati le cui dimensioni sono dell'ordine di  $0,3 \times 0,8 \mu\text{m}$  per  $0,5 \times 2,0 \mu\text{m}$ . La morfologia è quella dei Gram negativi ma sono rivestite da un glicocalice o "slime" e non sono visualizzabili alla colorazione di Gram, mentre lo sono con la colorazione di Gimenez e Giemsa (Renvoisé et al., 2009).

Essendo un microrganismo che si moltiplica solo all'interno di cellule di eucarioti, il suo genoma ha subito nel corso del suo percorso evolutivo adattamenti che lo hanno portato dall'essere un organismo a vita libera ad un parassita obbligato (Holste et al., 2000). L'analisi filogenetica ha infatti dimostrato che *Rickettsia* è l'organismo esistente più vicino all'antenato dei mitocondri (Anderson et al., 1998). Il suo genoma relativamente piccolo, circa  $1,1 \times 10^6$  paia di basi (bp), potrebbe essere quindi il risultato di un'evoluzione riduttiva confrontabile a quella che ha portato allo sviluppo dei moderni mitocondri (Holsten et al., 2000). Inoltre, il genoma di *Rickettsia* si distingue per la larga frazione di DNA non codificante (24 %), che negli altri batteri intracellulari obbligati non supera il 10 % ed è stato ipotizzato che questa frazione rappresenti ciò che rimane di geni che sono stati degradati da mutazioni e non sono stati rimossi (Anderson, 1998).

#### **Tassonomia**

Storicamente sono state classificate in tre gruppi maggiori sulla base delle caratteristiche sierologiche, chiamati "typhus group" (TG), "spotted fever group" (SFG) and "scrub typhus group" (Weinert et al., 2009).



L'analisi filogenetica ha messo invece in evidenza un'ampia diversità delle specie di *Rickettsia* che sono state classificate dapprima in 3 gruppi: SFG con più di 20 specie, TG con le 2 specie *R. prowazekii* e *R. typhi* e un gruppo ancestrale (AG) con *R. canadensis* e *R. bellii*. Successivamente gli intensi studi degli ultimi anni hanno suggerito che SFG sia costituito da due cladi fratelli, uno dei quali è adesso designato come gruppo transizionale (TRG), comprendente *R. felis* e *R. akari*, e derivati dall'AG non patogeno per i vertebrati (Weinert et al., 2009). Al momento secondo l'analisi filogenetica la specie *Rickettsia* risulta suddivisa quindi in almeno 4 gruppi: AG, TG, TRG e SFG; mentre studi basati su analisi parziale di sequenze anche di più geni suggeriscono ulteriori suddivisioni dell'albero filogenetico (Gillespie et al., 2011). Le rickettsiosi trasmesse da zecca (tick-borne rickettsioses) appartengono comunque tutte al SFG (Parola et al., 2005), ma le diverse rickettsiosi SFG variano comunque, a seconda della specie interessata, in severità, con un tasso del 23% di casi fatali per la Rocky Mountain Spotted Fever a forme afebrili e non riportate come fatali per *R. slovaca* e *R. aeschlimannii*, e nei sintomi, anche unici come per la linfadenopatia associata a *R. slovaca* (Sexton and Walker, 1999).

### **Vettore**

La maggior parte delle zecche infette da *Rickettsia* SFG appartengono alla famiglia *Ixodidae*, e la distribuzione di questo patogeno è legata quindi a quella della zecca infetta (Azad and Bear, 1998). L'infezione iniziale della zecca può avvenire quando zecche non infette si cibano su ospiti infetti (Socolovschi et al., 2008). La relazione tra *Rickettsia* e zecca è comunque piuttosto complessa e i meccanismi usati per sopravvivere nelle zecche durante il periodo invernale o durante la muta non sono ancora chiari. Sono capaci di rimanere quiescenti durante i lunghi periodi di inattività del vettore (fase transtadiale e ricerca dell'ospite), non utilizzando risorse stoccate e riducendo qualsiasi effetto sulla fitness. Quando la zecca inizia a nutrirsi, invece, il cambio di temperatura e la fisiologia dell'ospite inducono il batterio a emergere dalla fase dormiente e ad essere di nuovo infettante; si parla, infatti, di "riattivazione" (Socolovschi et al., 2009). Anche se alcuni studi hanno spiegato il fenomeno della riattivazione della virulenza dopo che le zecche infette acquisiscono il pasto di sangue, non è ben chiaro invece come i cambiamenti che avvengono nella fisiologia dell'intestino prima e dopo il pasto di sangue influenzino la crescita di questo microrganismo, la sua divisione cellulare e la differente espressione delle proteine di superficie (Azad and Bear, 1998).

Maggiore è la quantità di sangue che la zecca ingerisce, più alto è il livello di *Rickettsia* nel sangue dell'ospite vertebrato e più lungo è il tempo in cui la zecca rimane attaccata, maggiori sono le probabilità di infettarsi (Socolovschi et al., 2009).

Il sangue dell'ospite ingerito fluisce attraverso il canale formato dai cheliceri e l'ipostoma, attraverso la cavità faringea e il corto esofago e penetra nell'intestino medio e nel suo diverticolo. La digestione avviene tramite la lisi dei globuli rossi nel lume intestinale, penetrazione dell'emolisato nelle cellule digestive e digestione intracellulare di proteine e lipidi. Qui avviene il primo contatto del batterio con le cellule. *Rickettsia* interagisce con le cellule della zecca tramite recettori della superficie cellulare non ancora ben

conosciuti ed evade la risposta immunitaria della zecca. Una fosfolipasi, forse appartenente alle fosfolipasi D (PLD) potrebbe essere il fattore critico per l'internalizzazione e la sopravvivenza intracellulare di *Rickettsia*. È stato ipotizzato che PLD abbia le funzioni che la fosfolipasi A2 (PLA2) ha nel vertebrato: mediare l'entrata nelle cellule dell'ospite, evadere i fagosomi e facilitare le lesioni cellulari. Le cellule epiteliali dell'intestino medio della zecca sopportano un alto tasso di replicazione di *Rickettsia* senza alterare la loro ultrastruttura. Dopo aver attraversato la barriera del tratto digestivo, questo batterio penetra nella cavità corporea dell'artropode, sopravvive e si moltiplica per lungo tempo, virtualmente per tutta la vita del vettore. Le rickettsie che superano l'intestino medio invadono gli emociti, ottenendo un accesso virtuale a tutti i tessuti e agli organi e causando un'infezione sistemica nella zecca. Dopo 5 giorni dall'ingestione *R. rickettsii* può essere rinvenuta nei plasmociti della zecca (ninfa) e al momento in cui è completamente ingorgata e ha mutato allo stadio successivo (10-15 giorni dopo la replezione) tutti i tessuti sono fortemente infestati. È quindi capace di eludere le difese immunitarie dell'artropode che generalmente uccidono gli altri batteri. Questo avviene però solo nei vettori competenti, ovvero che hanno la capacità di ospitare e trasmettere determinate specie di *Rickettsia*. Per esempio *R. sibirica* induce una forte risposta cellulare nelle zecche che non sono il suo naturale vettore. Questa capacità sembra dipendere da una differente composizione dei recettori della zecca e dalla sua abilità di riconoscere e distruggere alcuni microrganismi. (Socolovschi et al., 2009).

La secrezione delle ghiandole salivari facilita l'alimentazione della zecca e gioca un ruolo importante nella propagazione di *Rickettsia*. Le ghiandole salivari infatti non sono organi in cui questi microrganismi vengono raccolti prima di essere rilasciate ma sono un sito di intensa moltiplicazione. Per quanto riguarda l'ovaio, *Rickettsia* probabilmente invade gli oociti durante l'oogenesi che segue il pasto di sangue. Lo sviluppo delle rickettsie nelle cellule interstiziali delle ninfe e più tardi anche negli oogoni e oociti ne permette la trasmissione transovarica. (Socolovschi et al., 2009).

Un'altra via di infezione per la zecca è però il "co-feeding", che può avvenire quando diverse zecche si nutrono l'una vicino all'altra sullo stesso ospite. La trasmissione sessuale invece da maschio infetto a femmina non infetta è stata descritta, ma la femmina in questo caso non sembra capace di trasmettere l'infezione per via transovarica alla sua progenie (Socolovschi et al., 2009).

Molto poco si conosce riguardo al processo di competizione interspecifica tra i microrganismi procarioti nella zecca, alcuni studi su *R. paecockii*, endosimbionte della zecca non patogeno per l'uomo, hanno evidenziato che questo microrganismo è mantenuto nella popolazione di questi artropodi tramite la trasmissione transovarica e le zecche infettate con esso sono refrattarie all'infezione ovarica con *R. rickettsii*, mentre non lo sono all'infezione sperimentale per via orizzontale. L'endosimbionte bloccherebbe quindi la trasmissione transovarica e se consideriamo che la maggior parte delle zecche ospita specie di *Rickettsia* non patogene, questa interferenza potrebbe avere un'importante significato epidemiologico. Ciò potrebbe infatti spiegare perché le zecche raccolte nei numerosi studi non sono infette con due o più specie di *Rickettsia* SFG (Azad and Bear, 1998). In tabella 1 vengono riportate le zecche considerate vettore per le diverse rickettsie SFG.

**Tabella 1:** *Rickettsia* SFG, malattia associata, vettore, reservoir e distribuzione (modificata da Dobler and Wölfel, 2009 e Gillespie et al., 2011; <http://www.cdc.gov>\*)

Specie	Malattia	Vettore	Reservoir *	Distribuzione geografica	Bibliografia del vettore
<i>R. aeschlimannii</i>	Tick bite fever	<i>Hyalomma marginatum marginatum</i>	Non conosciuto	Africa	Socolovschi et al., 2009
<i>R. africae</i>	African tick bite fever	<i>Amblyomma hebraeum</i> <i>A. variegatum</i>	Ruminanti	Africa Sud-Sahariana, Caraibi	Socolovschi et al., 2009
<i>R. amblyommii</i> §		<i>Amblyomma sp.</i>			Socolovschi et al., 2009
<i>R. australis</i>	Queensland tick typhus	<i>Ixodes holocyclus</i> <i>Ixodes tasmani</i>	Roditori	Australia, Tasmania	Sexton et al., 1991
<i>R. conorii</i>	Mediterranean spotted fever	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Cane e roditori	Mediterraneo, Medio oriente, India	Socolovschi et al., 2009
<i>R. heilongjiangensis</i>	Far East tick-borne spotted fever	<i>Dysmicoccus sylvarum</i>	Roditori	Est della Russia, Nord Cina	Duan et al., 2011
<i>R. helvetica</i>	Unruptive tick bite fever	<i>I. ricinus</i> <i>D. marginatus</i>	Roditori	Eurasia	Socolovschi et al., 2009 Dobec et al., 2009
<i>R. honei</i>	Flinders Island tick bite fever; Thailand tick bite fever	<i>R. haemaphysaloides</i> <i>I. granulatus</i>	Non conosciuto	Australia, Thailandia	Murphy et al., 2011
<i>R. japonica</i>	Japanese spotted fever	<i>H. longicornis</i> <i>I. ovatus</i>	Roditori	Giappone	Tabara et al., 2010
<i>R. marmionii</i>	Australian spotted fever	<i>Bothriocroton hydrosauri</i> ( <i>Aponomma hydrosauri</i> )	Roditori e rettili	Australia	Unsworth et al., 2007
<i>R. massiliae</i>	Tick bite fever	<i>R. turanicus</i>	Non conosciuto	Europa	Socolovschi et al., 2009
<i>R. monacensis</i>	Tick bite fever	<i>I. ricinus</i>	Non riportata	Europa	Socolovschi et al., 2009
<i>R. parkeri</i>	Macular fever	<i>A. maculatum</i> <i>A. triste</i> <i>A. tigrinum</i>	Roditori	Sud America, Nord America	Venzal et al., 2012
<i>R. peacockii</i> §		<i>D. andersoni</i>			Socolovschi et al., 2009
<i>R. raoultii</i> §		<i>D. reticulatus</i> <i>D. marginatus</i>			Socolovschi et al., 2009
<i>R. rhipicephali</i> §		<i>Dermacentor sp.</i>			Socolovschi et al., 2009
<i>R. rickettsii</i>	Rocky Mountain spotted fever	<i>D. andersoni</i> <i>D. variabilis</i>	Roditori	Sud America, Nord America	Socolovschi et al., 2009
<i>R. sibirica</i>	Siberian tick typhus	<i>D. nuttalli</i>	Roditori	Russia, Cina, Mongolia	Socolovschi et al., 2009
<i>R. sibirica subsp. mongolotimonae</i>	Tick-borne lymphangitis	<i>Hy. anatolicum</i>	Roditori	Sud Europa, Asia, Africa	Psaroulaki et al., 2005
<i>R. slovacca</i>	TIBOLA (tick-borne lymphadenitis)	<i>D. marginatus</i> <i>D. silvarum</i>	Lagomorfi e roditori	Eurasia	Socolovschi et al., 2009 Tian et al., 2012

§ Patogenicità non accertata

### **Ospite serbatoio o reservoir**

Perché la zecca si infetti è necessario un sufficiente livello di *Rickettsia* nel sangue di un vertebrato che funga da reservoir. *R. rickettsi* è stata isolata da diverse specie di piccoli mammiferi come: *Microtus pennsylvanicus*, *Pitymys pinetorum*, *Peromyscus leucopus*, *Sigmodon hispidus*, *Sylvilagus floridanus*, *Didelphis marsupialis virginiana*, *Eutamias amoenus*, *Lepus americanus* e *Spermophilus lateralis tescorum* (Socolovschi et al., 2009). Negli USA comunque l'alta prevalenza delle rickettsie SFG nelle zecche può essere spiegata con il contributo estensivo della trasmissione transtadiale. Il passaggio transovarico e transtadiale nel vettore assicurerebbe infatti la sopravvivenza del batterio senza richiedere la complessità di un sistema obbligato di reservoir multi-ospite (Socolovschi et al., 2009). Per sostenere un ciclo vitale con successo è presumibile però che gli animali selvatici agiscano come reservoir naturali anche di *Rickettsia* SFG, ma questa parte del ciclo vitale non è ancora chiara; sono pochi infatti gli studi che si sono concentrati sui roditori e sui piccoli mammiferi (Schex et al., 2011) e il ruolo dei vertebrati come reservoir non è stato ancora ampiamente esaminato (Elfving et al., 2010). I pochi studi effettuati, che hanno evidenziato animali con sierconversione o DNA di *Rickettsia* SFG in roditori e piccoli mammiferi selvatici, non hanno permesso di capire se vi era un'infezione persistente e un'escrezione in atto (Schex et al., 2011). Ratti, bestiame e piccoli mammiferi sono risultati positivi per alcune rickettsie SFG ma molti vertebrati risultano rickettsiemici solo per brevi periodi e in quel caso le zecche non sono in grado di acquisire l'infezione dal sangue dell'ospite (Elfving et al., 2010). Il Centre for Disease Control and Prevention comunque riporta per alcune rickettsie SFG l'ospite reservoir (tabella 1).

Anche studi sugli uccelli non hanno indicato questi animali come possibili reservoir per questi microrganismi seppur competenti nella trasmissione di *Rickettsia* alla larva di zecca (Elfving et al., 2010). Gli uccelli migratori sarebbero comunque un fattore importante per la distribuzione e l'espansione di questo patogeno (Elfving et al., 2010; Hildebrandt et al., 2010).

### **Diagnosi nella zecca**

In passato solo i laboratori di ricerca erano in grado di isolare le rickettsie da campioni clinici, ma con lo sviluppo delle colture cellulari per l'isolamento virale, il numero di laboratori capaci di isolare questo batterio è cresciuto (Angelakis, et al., 2012).

L'identificazione di specie o sierotipi di *Rickettsia* da singola zecca con queste tecniche rimaneva comunque complesso, laborioso e presentava diversi problemi (Gage et al., 1994). L'isolamento di *Rickettsia* dai campioni tramite le colture cellulari (cellule VERO), infatti, rimane comunque critico e il successo della coltivazione di questo batterio è basato sul numero di microrganismi nelle cellule, che dovrebbe essere il più alto possibile, e dallo step di centrifugazione, che migliora l'adesione dei batteri che si sono liberati dalla localizzazione intracellulare delle cellule in coltura (Angelakis, et al., 2012). Inoltre l'identificazione a livello di specie è comunque difficile mediante la sierologia a causa delle cross reazioni tra le diverse specie (Jado et al., 2006). Il metodo più utilizzato, la microimmunofluorescenza di Philip, fornisce un affidabile

raggruppamento di sierotipi, alcuni dei quali sono riconosciuti a livello di specie e concorda con test più laboriosi come la fissazione del complemento o il mouse toxin neutralization. La microimmunofluorescenza prevede comunque che le rickettsie siano isolate in colture cellulari o uova embrionate per fornire un materiale sufficiente per la sierotipizzazione e inoltre sono necessari una serie di sieri e antigeni la cui produzione è costosa e laboriosa (Gage et al., 1995).

La disponibilità di metodiche molecolari ha permesso quindi anche per *Rickettsia* SFG lo sviluppo di protocolli che sfruttano l'amplificazione di una regione ipervariabile e il suo successivo sequenziamento per una più sicura identificazione a livello di specie, colmando la scarsità di dati a livello globale sulle specie di *Rickettsia* circolanti nei vettori, negli ospiti reservoir e che causano malattia nell'uomo (Jado et al., 2006).

Regnery e colleghi nel 1994 descrissero un protocollo di PCR/RFLP (Polimorfismo della Lunghezza dei Frammenti di Restrizione) che permetteva di differenziare vari ceppi di *Rickettsia* in gruppi che concordavano con la classificazione dei sierotipi. (Gage et al., 1994). Contemporaneamente allo sviluppo di questa tecnica, diversi studi sono stati condotti con lo scopo di stabilire le relazioni genotipiche tra queste specie utilizzando il confronto tra sequenze di DNA. Stothard e Fuerst (1995) and Roux e Raoult (1995) per primi stabilirono la filogenesi basandosi sull'allineamento del gene che codifica il 16s rRNA mentre Roux e colleghi (1996) stabilì le relazioni tra le specie di *Rickettsia* confrontando il gene della citrato sintetasi (*gltA*) e dimostrando che questo era più sensibile del 16s rRNA (Fournier et al., 1998). L'utilizzo della sequenza del *gltA* permetteva però di stabilire interrelazioni filogenetiche solo tra rickettsie molto distanti dall'antenato comune delle SFG. Il gene che codifica per la proteina di membrana esterna A (rickettsial outer membrane protein A, rOmpA) invece è considerato un buon candidato per le analisi filogenetiche perché ha dimostrato di avere un grado di differenza interspecie maggiore rispetto al 16S rRNA e al *gltA* utilizzati in passato (Fournier et al., 1998). L'analisi del gene *rompA* mediante i primer *Rr190.70p-Rr190.602n* non è in grado però di rilevare la presenza di *R. helvetica*, forse perché il suo gene *rompA* è perso o modificato. *R. helvetica* è una delle poche specie SFG largamente diffusa in cui i primer utilizzati per l'amplificazione del gene *rompA* non producono un prodotto di amplificazione, insieme a *R. akari* (TRG), *R. australis* (non presente in Europa), e *R. bellii* (AG), ma costringe all'utilizzo di più primer e protocolli per il rilevamento di questo patogeno dalla zecca (Simser et al., 2002; Marquez et al., 1998).

## SCOPO DELLA TESI

Il presente studio si inserisce all'interno del progetto europeo denominato REDLAV (Reseau Tranfrontalier de Demustication et de Lutte Anti-Vectorielle) inserito nel programma di Cooperazione Italia-Francia "Marittimo" di cui è partner la ASL 2 di Lucca. Il progetto REDLAV mira a migliorare la governance in materia di gestione dei mezzi di lotta anti-vettoriale e di crisi in caso di epidemie, attraverso reti tra enti locali sul territorio di competenza, che corrisponde alle province tirreniche della regione Toscana, Liguria, Sardegna e Corsica. In questo ambito progettuale all'ASL 2 di Lucca è stato affidato uno studio sulla definizione del rischio di malattie trasmissibili attraverso il morso della zecca per la popolazione residente nel bacino di utenza del progetto REDLAV. Per realizzare l'obiettivo assegnato, l'ASL 2 di Lucca ha proposto di replicare sull'area di studio, la struttura di un sistema di sorveglianza attivo fin dal 2001, presso l'Osservatorio Permanente per Patologie a trasmissione Vettoriale (OPPV).

Il sistema di sorveglianza realizzato per REDLAV ha compreso più livelli:

- l'attivazione di un flusso centrale: pazienti in entrata per morso di zecca presso le Unità Operative di Pronto Soccorso delle Aziende Sanitarie coinvolte;
- l'attivazione di un flusso periferico: utenza non afferente al Pronto Soccorso sensibilizzata mediante informativa ad Enti o Associazioni o a mezzo di brochure;
- la realizzazione di monitoraggi ambientali.

In questo contesto, presso l'ASL 2 di Lucca è stato allestito un laboratorio di diagnostica molecolare di prima linea per la ricerca di agenti patogeni del genere *Borrelia* e *Rickettsia* in zecche antropofile al fine di raccogliere dati originali sulla distribuzione, densità e prevalenza di infezione dei vettori nell'area di studio.

Il presente studio si inserisce quindi all'interno di un ambito progettuale più ampio e ancora in corso, con lo scopo di effettuare una prima valutazione della presenza di *Rickettsia* del gruppo "Spotted Fever" nelle zecche afferenti al laboratorio mediante i diversi flussi, valutarne la prevalenza nelle diverse specie, sesso e stadio di zecca ed effettuare una caratterizzazione molecolare delle specie di *Rickettsia* SFG rilevate. Sono state quindi analizzate, mediante PCR, zecche raccolte nella regione Toscana e Liguria per la ricerca di DNA di *Rickettsia* SFG. In particolare la maggior parte sono stati campioni provenienti dal flusso costituito da raccolta in habitat naturali, che è stato il più veloce ad attivarsi. Inoltre, gli amplificati dei campioni risultati positivi sono stati sequenziati al fine di identificare le specie circolanti sul territorio toscano e ligure.

## Materiali e metodi

### *Campioni di zecca*

Da marzo 2012 a settembre 2012 sono stati analizzati per ricerca di DNA di *Rickettsia* SFG campioni provenienti dai seguenti tre flussi:

- Flusso centrale: zecche estratte da pazienti in entrata per morso di zecca presso le Unità Operative di Pronto Soccorso delle Aziende Sanitarie di Lucca, Pisa, Livorno e Genova. Il campione è stato estratto dal paziente mediante pinze O'TOM® e conservato in alcool etilico assoluto fino all'arrivo all'Osservatorio Permanente per Patologie a trasmissione Vettoriale (OPPV), ASL 2 di Lucca.
- Monitoraggio ambientale: effettuato dall'OPPV. Il monitoraggio ha compreso 59 siti distribuiti lungo la costa toscana e ligure (Figura 1) e 370 campionamenti. La raccolta delle zecche è stata effettuata con il metodo della coperta strisciata (dragging sample) che consiste nel raccogliere le zecche allo stato libero, cioè non fissate su ospiti. Il telo di 1 metro di larghezza e 1 metro di lunghezza viene trascinato dall'operatore, garantendo che rimanga sempre adeso al terreno, per 100 metri senza mai passare nello stesso punto (1 campionamento). Le ninfe sono state suddivise in pool di 3 individui, mentre adulti maschi e femmine sono stati inseriti singolarmente in provette distinte. Le province e i comuni delle due regioni interessate sono riportati in tabella 2:

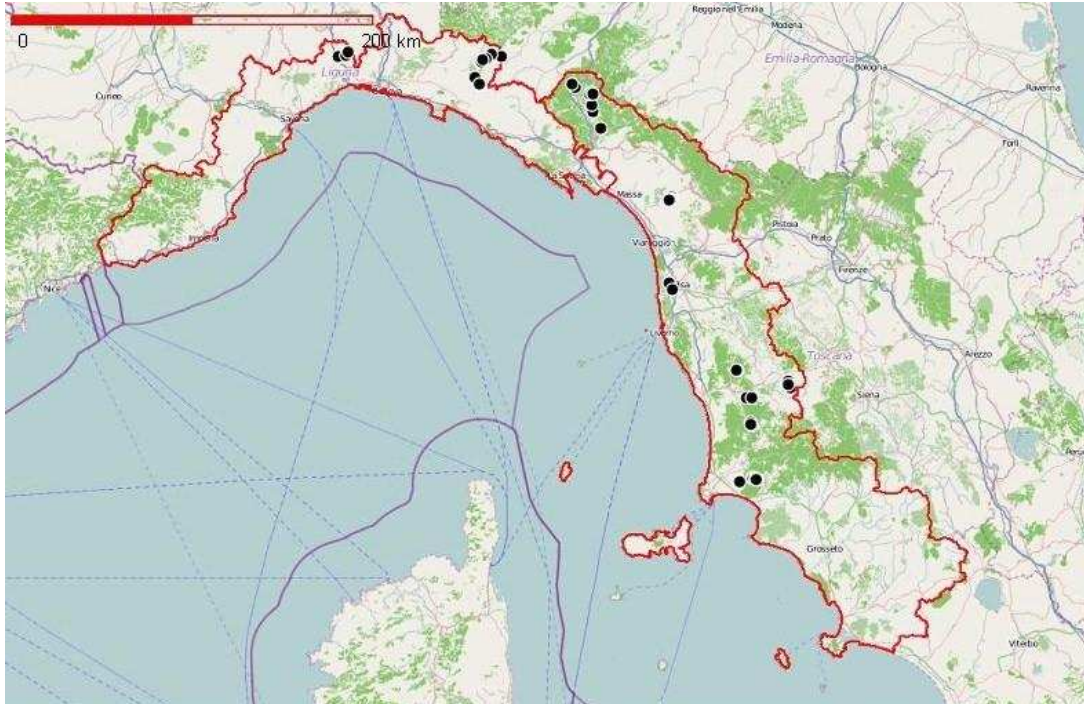
**Tabella 2:** Province e i comuni in cui è stato effettuato il monitoraggio ambientale per *Rickettsia* SFG

Provincia	Comune
Genova	Borzonasca
	Campo Ligure
Massa-Carrara	Filattiera
	Pontremoli
	Villafranca in Lunigiana
Lucca	Bagni di Lucca
	Barga
	Fabbriche di Vallico
	Lucca
	Molazzana
	Pescaglia
Pisa	Vergemoli
	Pisa
Livorno	Montecatini Val di Cecina
	Monteverdi Marittimo
	Volterra
Livorno	Piombino
Grosseto	Follonica

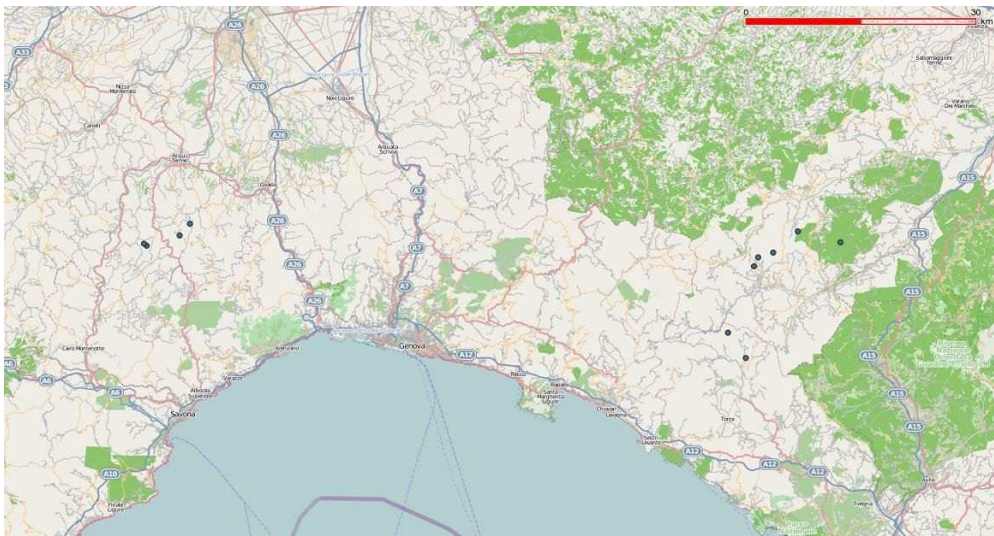
I siti di raccolta della regione Liguria sono riportati in figura 2, mentre quelli della regione Toscana in figura 3.

- Flusso periferico: ovvero utenza sensibilizzata mediante informativa ad Enti o Associazioni o a mezzo di brochure. In questo caso il campione è stato estratto da animali da compagnia (cane) dal proprietario e inviato all'OPP, ASL 2 di Lucca.

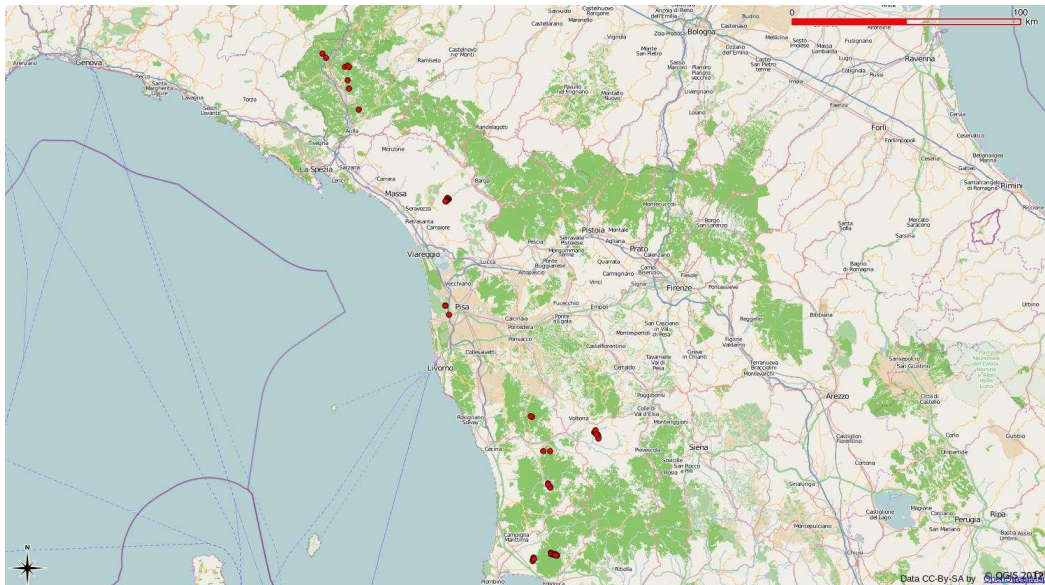
**Figura 1:** Siti di raccolta lungo la costa ligure e toscana



**Figura 2:** Siti di raccolta nella regione Liguria





**Figura 3:** Siti di raccolta nella regione Toscana

### ***Identificazione delle zecche***

L'identificazione dello stadio, sesso, genere e specie delle zecche pervenute attraverso i flussi attivati è stato effettuato dall'OPPV mediante chiavi dicotomiche riportate in letteratura (Cringoli et al., 2005; Manilla, 1998; Manilla and Iori, 1992, 1993).

### ***Estrazione del DNA***

Il campione di zecca, conservato in alcool etilico assoluto, è stato sottoposto, dopo eliminazione dell'alcool, a due lavaggi in PBS 1 X sterile mediante centrifugazione a 1000 g. Per l'estrazione del DNA è stato utilizzato il kit DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). Essendo la zecca rivestita da esoscheletro chitinoso, il campione è stato triturato mediante bisturi sterile dopo aggiunta di 30 µl di buffer ATL e successivamente omogenizzato tramite micro-pestello al fine di permetterne la lisi completa. Dopo aggiunta dei restanti 150 µl di buffer ATL e di 20 µl di proteinasi K il campione è stato sottoposto a trattamento termico in agitazione a 56 °C overnight. Il protocollo di estrazione è proseguito seguendo le istruzioni fornite dalla casa produttrice.

### ***Controllo di processo***

Per evitare la presenza di falsi negativi dovuti a errata estrazione del DNA dal campione è stato utilizzato come controllo di processo un frammento del DNA ribosomiale 16S specifico per le zecche. Il DNA estratto è stato quindi sottoposto a protocollo di amplificazione utilizzando come primer senso il 16S+ (5'-CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG-3') e come antisense il 16S- (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT-3') (d'Oliveira et al., 1997).

A 22,5 µl di una miscela di reazione contenente 12,5 µl di 2X Hot Gold Star Red Master Mix, 0,8 µM di Primer 16S+ , 0,8 µM di Primer 16S- e 8 µl di H<sub>2</sub>O sono stati aggiunti 2,5 µl di DNA.

L'amplificazione del gene 16S della zecca è stata effettuata utilizzando il seguente protocollo termico:

<i>Amplificazione DNA ribosomiale 16S</i>		
<b>Denaturazione</b>	92 °C per 1 min	} 10 cicli
<b>Annealing</b>	48 °C per 1 min	
<b>Estensione</b>	72 °C per 1 min e 30 sec	
<b>Denaturazione</b>	92 °C per 1 min	} 32 cicli
<b>Annealing</b>	54 °C per 35 sec	
<b>Estensione</b>	72 °C per 1 min e 30 sec	
<b>Estensione finale</b>	72 °C per 7 min	

(d'Oliveira et al., 1997)

La corretta estrazione è stata valutata mediante la presenza di un amplificato di 456 bp dopo corsa elettroferitica sul gel d'agarosio all'1%. In ogni reazione di amplificazione è stato utilizzato un controllo positivo costituito da DNA di zecca e un controllo negativo costituito da acqua per biologia molecolare sterile.

### **PCR *Rickettsia SFG***

La presenza di DNA di *Rickettsia SFG* nei campioni di zecca è stata ricercata utilizzando primer specifici per un frammento della regione *gltA* codificante per il gene della citrato sintetasi.

I primer utilizzati sono stati il primer senso RpCS.877p (5'- GGG GGC CTG CTC ACG GCG G-3') e l'antisense Rrl90.602n (5'- ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A-3') (Regnery et al., 1990).

A 45 µl di una miscela di reazione contenente 25 µl di 2X Hot Gold Star Red Master Mix, 0,8 µM di RpCS.877p e 0,8 µM di Primer RpCS.1258n e 16 µl di H<sub>2</sub>O sono stati aggiunti 5 µl di DNA.

L' amplificazione del frammento del gene *gltA* è stata effettuata utilizzando il seguente protocollo termico:

<i>Amplificazione gene gltA</i>		
<b>Denaturazione</b>	95 °C per 3 min	
<b>Denaturazione</b>	95 °C per 20 sec	} 35 cicli
<b>Annealing</b>	48 °C per 30 sec	
<b>Estensione</b>	60 °C per 2 min	
<b>Estensione finale</b>	72 °C per 7 min	

(Regnery et al., 1990)

La presenza di un amplificato di 381 bp dopo corsa elettroferitica sul gel d'agarosio all'1% ha indicato la presenza di DNA di *Rickettsia* SFG nel campione.

I campioni risultati positivi all'amplificazione del gene *gltA*, sono stati analizzati ulteriormente utilizzando primer specifici per un frammento della regione *ompA* codificante per l'antigene di superficie OmpA. I primer utilizzati sono stati il primer senso Rr190.70p (5'-ATG GCG AAT ATT TCT CCA AAA-3') e l'antisense Rr190.602n (5'-AGT GCA GCA TTC GCT CCC CCT-3') (Morita et al., 2004). La doppia amplificazione è stata scelta in virtù del fatto che la sequenza del *gltA* non è un buon candidato per l'analisi filogenetica ma il gene *rompA* non è in grado di rilevare la presenza di *R. helvetica* (Fournier et al., 1998; Simser et al., 2002).

A 45 µl di una miscela di reazione contenente 25 µl di 2X Hot Gold Star Red Master Mix, 0,8 µM di Primer Rr190.70p e 0,8 µM di Primer Rr190.602 e 16 µl di H<sub>2</sub>O sono stati aggiunti 5 µl di DNA.

L'amplificazione del frammento del gene *rompA* è stata effettuata utilizzando il seguente protocollo termico:

<i>Amplificazione gene rompA</i>	
<b>Denaturazione</b>	95 °C per 3 min
<b>Denaturazione</b>	95 °C per 45 sec
<b>Annealing</b>	55 °C per 30 sec
<b>Estensione</b>	72 °C per 1 min e 30 sec
<b>Estensione finale</b>	72 °C per 7 min

(Morita et al., 2004)

La presenza di un amplificato di 530 bp dopo corsa elettroferitica sul gel d'agarosio all'1% ha indicato la presenza di DNA di *Rickettsia* SFG nel campione.

In entrambe le reazioni di amplificazione è stato utilizzato un controllo positivo costituito da DNA di *Rickettsia slovaca* amplificato secondo gli stessi protocolli e sequenziato per il frammento del gene *rompA* (Max identity 100 %, Query Coverage 95, Total score 887) e un controllo negativo costituito da acqua per biologia molecolare sterile.

### ***Sequenziamento e allineamento***

I campioni di amplificato risultati positivi per *Rickettsia* SFG sono stati inviati alla ditta PRIMM srl (San Raffaele Biomedical Science Park, Milano) dove sono stati sequenziati secondo metodo Sanger. Le sequenze sono state elaborate mediante programma di allineamento BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) e l'analisi di omologia è stata effettuata tramite il programma Blast dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### ***Analisi filogenetica***

Le sequenze ottenute sono inoltre state allineate con le sequenze di *Rickettsia* SFG più significative riportate su GeneBank per confermare l'identificazione ed è stata effettuata l'analisi filogenetica mediante il software

Mega 5.1. L'analisi filogenetica è stata determinata secondo le assunzioni di Kimuras con un modello a due variabili ed è stata utilizzata per costruire il dendrogramma con il metodo neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987). Il valore di confidenza per i rami individuali è stato determinato mediante analisi bootstrap con 1000 repliche (Bertolotti et al., 2006)

### ***Analisi statistica***

I dati di prevalenza sono stati elaborati mediante il software statistico R (R Development Core Team, 2011), sono stati inoltre calcolati i limiti superiore e inferiore dell'Intervallo di Confidenza (I.C.) al 95%. I dati di prevalenza di ninfe positive per *Rickettsia* SFG nelle diverse province sono stati analizzati mediante il test di Friedman per confronti multipli non parametrici, il test del  $\chi^2$  per i gruppi con più di 6 soggetti e il test esatto di Fisher per i gruppi con numerosità inferiore.

Al fine di ottenere i dati sulla prevalenza dell'agente patogeno riferiti alla singola zecca, i risultati riguardanti i pool di 3 ninfe sono stati sottoposti ad un'analisi statistica utilizzando la seguente formula, dove  $p$  = probabilità stimata che la singola zecca sia infetta,  $n$  = numero di campioni non infetti,  $N$  = numero di campioni esaminati,  $k$  = numero di esemplari per ciascun pool (Cinco et al. 1998):

$$p = 1 - \sqrt[k]{\frac{n}{N}}$$

## Risultati

Sono stati analizzati in totale 249 campioni di zecca provenienti dai tre flussi descritti precedentemente e così distribuiti: 56 da paziente (pa, flusso centrale), 186 da habitat (ha, monitoraggio ambientale) e 7 da animale (an, flusso periferico). Le zecche analizzate appartenevano alle seguenti specie: *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma marginatum*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *R. turanicus*. Dei 249 campioni analizzati 96 sono risultati positivi per DNA di *Rickettsia SFG*, con una positività del 38,55%. (I.C. 95% 32,51–44,60) Le specie di *Rickettsia SFG* identificate sono state le seguenti: *R. helvetica*, *R. slovacca*, *R. monacensis*, *R. massiliae*, *Rickettsia sp. CyRtu43S* e un *Candidatus Rickettsia hoogstraalii* isolato Et161B. Sebbene non appartenente al gruppo SF oggetto del presente lavoro, è stata identificata anche una *R. bellii* (AG).

### **Flusso centrale:**

Le zecche di questo flusso sono state identificate come appartenenti alle seguenti specie: *D. marginatus* (n=3, 5,35%), *H. punctata* (n=1, 1,79%), *H. marginatum* (n=2, 3,57%), *I. ricinus* (n=39, 69,64%), *I. (P.) hexagonus* (n=3, 5,35%) e *R. sanguineus* (n=7, 12,50%) (tabella 3). Riguardo a stadio e sesso, la percentuale è stata di 35,71% per le ninfe (n=20), 57,14% per le femmine (n=32) e 5,36% per i maschi (n=3). Delle 56 zecche rimosse da 56 pazienti, 18 (32,14%, I.C. 95% 19,91–44,37) sono risultate positive per *Rickettsia sp.* *R. monacensis* è stata, tra le diverse specie di *Rickettsia SFG* presenti in questi campioni, quella più frequentemente rilevata mediante PCR (n=8, 14,29%, I.C. 95% 5,12–23,45), seguita da *R. helvetica* (n=5, 8,93%, I.C. 95% 1,96–16,40). Tutti i campioni positivi per *R. helvetica* sono stati ottenuti dall'amplificazione da zecche della specie *I. ricinus*. Anche i campioni positivi per *R. monacensis* sono stati ottenuti da *I. ricinus*, eccetto un amplificato che è derivato da DNA estratto da *I. (P.) hexagonus*. Inoltre, sono state amplificate *Rickettsia sp. CyRtu43S* (n=1) da *R. sanguineus* e un presunto *Candidatus Rickettsia hoogstraalii* isolato Et161B (n=1) da *I. (P.) hexagonus*. Tre campioni sono risultati positivi per l'amplificato del gene *gltA*, e di questi uno anche per l'amplificato del gene *rompA*, ma il sequenziamento non ha permesso l'identificazione della specie di *Rickettsia*. Quindi, i due campioni nei quali è stata rilevata la presenza solo di *gltA* sono stati identificati come positivi per *Rickettsia sp.*, mentre il campione positivo per entrambi i geni (*gltA* e *rompA*) è stato indicato come positivo per *Rickettsia SFG*.

Sebbene non oggetto del presente studio, perché non provenienti dalle regioni Liguria e Toscana, ma essendo all'interno di un progetto transfrontaliero, sono stati analizzati anche 2 campioni di zecca provenienti dalla Corsica e pervenuti tramite questo flusso. I campioni sono stati identificati come *R. sanguineus* e sono risultati negativi per *Rickettsia SFG*. In tabella 3 sono riportate le positività per *Rickettsia spp.* nella specie, stadio, sesso e provenienza delle zecche analizzate.

**Tabella 3:** *Rickettsia* spp. identificate nelle zecche analizzate provenienti dal flusso centrale.

Regione	Provincia	Comune	N	Specie zecca	stadio	Positivi	Specie <i>Rickettsia</i>
Liguria	Genova	Bargagli	1	<i>H. punctata</i>	♀	0	
Liguria	Genova	Campo Ligure	5	<i>I. ricinus</i>	ninfa	0	
Toscana	Firenze	Reggello	1	<i>D. marginatus</i>	♂	0	
Toscana	Lucca	Bagni di Lucca	1	<i>I. ricinus</i>	ninfa	0	
Toscana	Lucca	Borgo a Mozzano	1	<i>I. ricinus</i>	♀	1	<i>R. helvetica</i>
Toscana	Lucca	Capannori	2	<i>I. ricinus</i>	ninfa	1	<i>R. monacensis</i>
			1	<i>I. (P.) hexagonus</i>	ninfa	1	<i>R. monacensis</i>
Toscana	Lucca	Castiglione di Garfagnana	1	<i>I. ricinus</i>	ninfa	1	<i>R. helvetica</i>
Toscana	Lucca	Coreglia Antelminelli	1	<i>I. ricinus</i>	ninfa	0	
Toscana	Lucca	Lucca	7	<i>I. ricinus</i>	ninfa	3	<i>R. monacensis</i>
						1	<i>R. helvetica</i>
Toscana	Lucca	Lucca	10	<i>I. ricinus</i>	♀	2	<i>R. monacensis</i>
						1	<i>Rickettsia</i> SFG
Toscana	Lucca	Lucca	2	<i>I. (P.) hexagonus</i>	♀	1	Candidatus <i>Rickettsia</i> <i>hoogstraalii</i> isolate Et161B
Toscana	Lucca	Lucca	1	<i>R. sanguineus</i>	♀	0	
Toscana	Lucca	Lucca	1	n.c.		0	
Toscana	Lucca	Pescaglia	2	<i>I. ricinus</i>	♀	1	<i>R. helvetica</i>
Toscana	Lucca	Pescaglia	1	<i>D. marginatus</i>	♀	0	
Toscana	Pisa	Pisa	1	<i>I. ricinus</i>	ninfa	0	
Toscana	Pisa	Volterra	1	<i>I. ricinus</i>	ninfa	0	
Toscana	Pisa	Volterra	2	<i>I. ricinus</i>	♀	1	<i>Rickettsia</i> sp
Toscana	Pisa	Volterra	1	<i>R. sanguineus</i>	♂	0	
Toscana	Pisa	Volterra	1	<i>H. marginatum</i>	♂	0	
Toscana	Livorno	Piombino	5	<i>I. ricinus</i>	♀	1	<i>R. monacensis</i>
						1	<i>R. helvetica</i>
Toscana	Livorno	Piombino	1	<i>H. marginatum</i>	♀	0	
Toscana	Livorno	Piombino	3	<i>R. sanguineus</i>	♀	1	<i>Rickettsia</i> sp. CyRtu43S
Toscana	Grosseto	Follonica	1	<i>D. marginatus</i>	♀	1	<i>Rickettsia</i> sp.
Corsica			2	<i>R. sanguineus</i>	♀	0	

**Monitoraggio ambientale:**

Il monitoraggio ha coinvolto in totale 6 province e 20 comuni, e ha compreso 64 siti distribuiti lungo la costa toscana e ligure per un totale di 362 campionamenti. Dei 64 siti analizzati 53 sono risultati positivi per la presenza di zecche, e su 362 campionamenti effettuati ne sono risultati positivi 148. La distribuzione dei siti e dei campionamenti risultati positivi per presenza di zecche è riportata in tabella 4.

**Tabella 4:** Numero di siti e numero di campionamenti effettuati nel monitoraggio ambientale e siti e campionamenti risultati positivi per presenza di zecche.

Provincia	Comune	Località	Siti	Siti positivi	Campionamenti	Campionamenti positivi
Genova	Campo Ligure	Beigua	2	2	9	6
Genova	Campo Ligure	Capanne di Marcarolo	2	2	7	6
Genova	Borzonasca	Caregli	1	1	7	1
Genova	Borzonasca	Giacopiane	1	1	6	1
Genova	Genova	Lago Le lame	2	0	7	0
Genova	S. Stefano Aveto	Monte Penna	2	1	12	1
Genova	Rezzoaglio	Passo	1	1	4	3
Massa	Filattiera	Gigliana	1	1	9	9
Massa	Pontremoli	Grongola	1	1	7	6
Massa	Villafranca	Irola	1	1	8	5
Massa	Filattiera	Logarghena	4	4	20	11
Massa	Villafranca	Merizzo	1	1	3	3
Massa	Pontremoli	Succisa	1	1	4	1
Lucca	Bagni di Lucca	n.r.	1	1	1	1
Lucca	Barga	n.r.	1	1	1	1
Lucca	Fabbriche di Vallico	n.r.	1	1	1	1
Lucca	Lucca	n.r.	1	1	1	1
Lucca	Molazzana	n.r.	1	1	1	1
Lucca	Vergemoli	M.te Forato	9	9	43	40
Pisa	Volterra	Berignone	7	5	50	11
Pisa	Montecatini Val di Cecina	Miemo	2	2	16	4
Pisa	Montecatini Val di Cecina	Querceto	2	2	12	5
Pisa	Pisa	S.Rossore	4	4	30	9
Livorno	Piombino	Casalappi	5	4	32	9
Livorno	Suvereto	Montioni	3	1	27	6
Livorno	Piombino	Sterpaia	1	1	5	2
Grosseto	Follonica	Montioni	6	3	39	4
<b>Totale</b>			<b>64</b>	<b>53</b>	<b>362</b>	<b>148</b>

In totale, sono stati analizzati 186 campioni, ma considerando che i campioni di ninfe erano costituiti da pool di 3 soggetti, sono stati analizzate in questo flusso 482 zecche. Le specie raccolte durante i dragging sono state le stesse pervenute da paziente, con esclusione di *H. marginatum* e la presenza invece di *R. turanicus*. Entrando nel particolare, 6 zecche sono state identificate come *D. marginatus* (2,07%), 33 come *H. punctata* (6,84%), 417 come *I. ricinus* (84,75%), 6 come *I. (P.) hexagonus* (1,24%), 3 come *R. sanguineus* (0,62%) e 2

come *R. turanicus* (0,41%). Riguardo a sesso e stadio, la quasi totalità delle zecche raccolte erano ninfe (n=444, 92,12%), 24 sono risultate femmine (4,98%) e 11 i maschi (2,28%). Dei 186 campioni analizzati, 78 sono risultati positivi all'amplificazione del DNA di *Rickettsia* sp. (41,94%, I.C. 95% 34,84–49,03). Anche in questo caso *R. monacensis* è stata la specie più frequentemente amplificata (n=60, 32,26%, I.C. 95% 25,54–38,98) insieme a *R. helvetica* (n=9, 4,84%, I.C. 95% 1,75–7,92), e, per entrambe, tutti gli amplificati sono risultati da DNA estratto da zecche identificate come *I. ricinus*. Le zecche positive per *R. helvetica* erano inoltre tutte nello stadio di ninfa. L'amplificato di *R. slovacca* è stato ottenuto solo in due campioni dei 186 analizzati (1,07%), entrambi identificati come *D. marginatus* maschio e provenienti uno da Pescaglia (LU) e uno da Filattiera (MS). Un campione di *R. turanicus* femmina proveniente da Montecatini Val di Cecina (PI) è risultato positivo per *R. massiliae* (0,54%). Due campioni di *I. ricinus* ninfa invece, provenienti uno da Villafranca (MS) e l'altro da Vergemoli (LU), e un campione di *D. marginatus* maschio proveniente da Borzonasca (GE), sono risultati positivi per l'amplificato del gene *gltA*, ma il sequenziamento non ha permesso l'identificazione della specie di *Rickettsia*. Un campione di *I. ricinus* ninfa raccolto a Villafranca in Lunigiana (MS) ha presentato amplificato di *R. bellii* (AG) per il gene *gltA*.

Visto l'alto numero di *I. ricinus* analizzate (n = 416) e la presenza in tutte le provincie campionate dello stadio di ninfa è stato possibile effettuare analisi statistica per la prevalenza di *Rickettsia* sp. in questa specie. La prevalenza totale è risultata del 22,12 % (92 positivi su 416, I.C. 95% 18,13–26,10), in particolare gli adulti di *I. ricinus* hanno presentato una prevalenza del 21,43% (3 positivi su 14, I.C. 95% 0,00–42,92), mentre le ninfe del 22,89% (92 positivi su 404, I.C. 95% 18,78–26,99) e i due stadi non hanno presentato una differenza significativa al test del  $\chi^2$  (P=0,7914). Il calcolo della prevalenza sulle ninfe è stato effettuato utilizzando il fattore di correzione per valutare la probabilità di positività del singolo soggetto analizzando un pool di tre ninfe. Le prevalenze delle ninfe di *I. ricinus* nelle diverse provincie sono riportate in tabella 5. Il test di Friedman per confronti multipli non parametrici ha evidenziato una differenza significativa (P<0,05) in tutti i gruppi, mentre il test del  $\chi^2$  ha mostrato differenze altamente significative tra le prevalenze nelle diverse provincie (P<0,01). Mediante la scomposizione dei gradi di libertà del  $\chi^2$  sono state quindi confrontate le prevalenze di infezione per *Rickettsia* SFG nelle ninfe di *I. ricinus* ottenute nelle provincie oggetto dello studio (esclusa la provincia di Grosseto). Le significatività sono riportate in tabella 5 e in particolare per la provincia di Livorno è stata evidenziata una differenza altamente significativa della prevalenza rispetto alle provincie più a Nord. Per la provincia di Grosseto con una numerosità inferiore a 5 di zecche positive è stato utilizzato il test esatto di Fisher che non ha evidenziato differenze con gli altri gruppi.



**Tabella 5:** Prevalenza di *Rickettsia* SFG in ninfe di *I. ricinus* raccolte nel monitoraggio ambientale

Provincia	Ninfe esaminate	Ninfe positive per <i>Rickettsia</i> SFG	Prevalenza di <i>Rickettsia</i> SFG (%)	I.C. 95% inferiore	I.C. 95% superiore
Genova	54	8	15,14 <sup>ab</sup>	5,58	24,70
Massa-Carrara	189	34	17,79 <sup>abB</sup>	12,86	23,91
Lucca	48	8	17,45 <sup>bcA</sup>	6,71	28,19
Pisa	45	16	35,63 <sup>c</sup>	21,64	49,63
Livorno	60	25	41,52 <sup>acA</sup>	29,05	53,99
Grosseto	6	0	0,00	0,00	0,00

A, B: P<0,01; a,b,c: P<0,05 al test del  $\chi^2$

### **Flusso periferico:**

Il flusso periferico è stato il più lento ad attivarsi essendo legato alla sensibilizzazione dell'utenza. Per questo motivo i campioni analizzati sono stati soltanto 7, tutti provenienti da animale da compagnia, e per la quasi totalità dalla zona di Lucca in cui risiede l'OPPV, ASL 2 di Lucca. Le poche specie ricevute dal flusso periferico sono state 6 *I. ricinus* (3 dal comune di Castiglione di Garfagnana, 2 da quello di Lucca e 1 da quello di Campo Ligure) 1 *D. marginatus* (dal comune di Lucca) tutte nello stadio di femmina adulta. Nessuna di queste è risultata positiva per amplificato di *Rickettsia* sp.

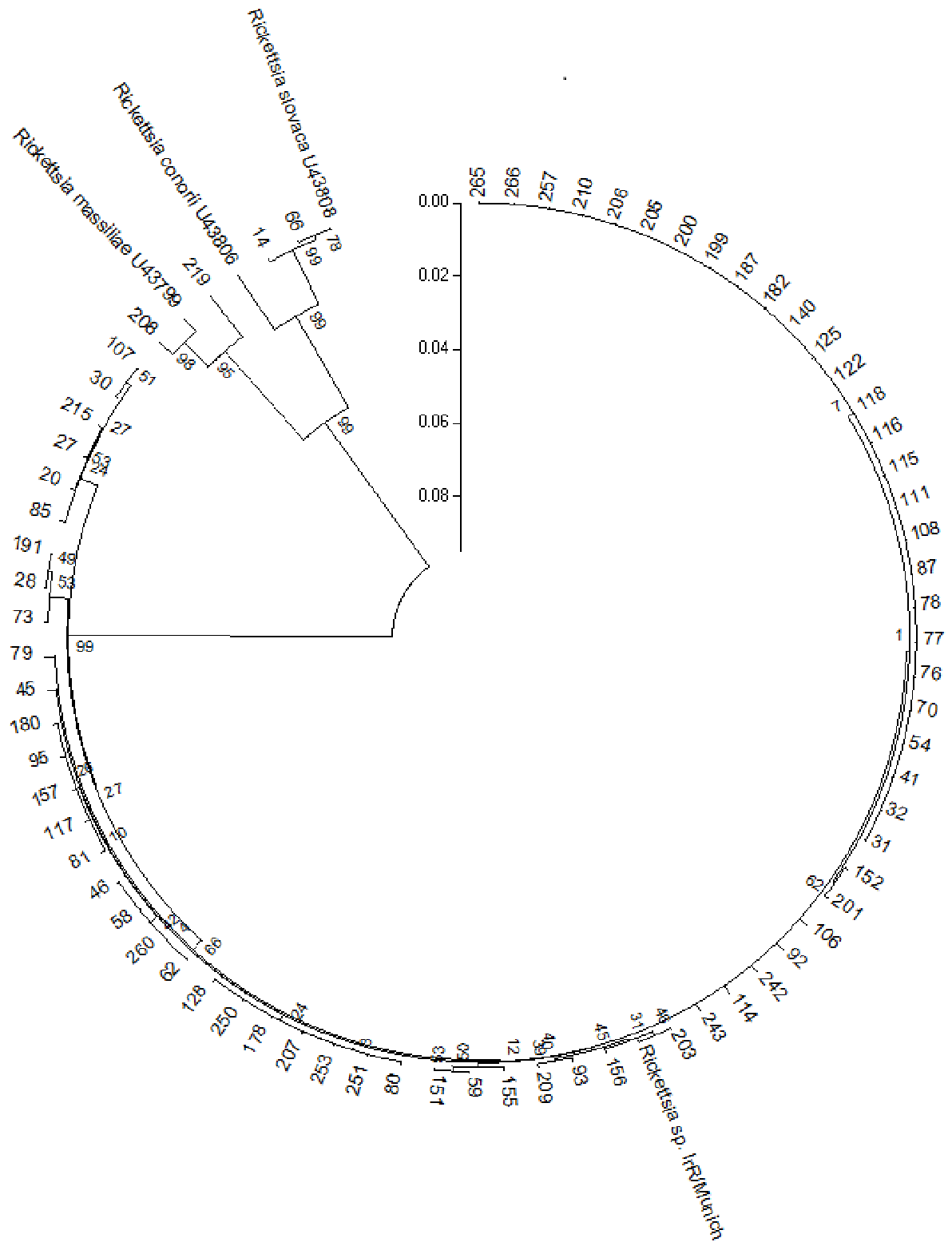
### **Analisi di omologia e filogenetica**

Per i campioni risultati positivi per il gene *gltA* e *rompA*, il sequenziamento degli amplificati è stato effettuato sul secondo, candidato migliore per l'analisi filogenetica, mentre per i campioni positivi solo per il gene *gltA* è stato inevitabilmente utilizzato questo per il sequenziamento, l'analisi di omologia e filogenetica. Le sequenze *rompA* ottenute sono state allineate e confrontate con le sequenze di *Rickettsia* SFG più significative disponibili su GeneBank. L'analisi filogenetica ha confermato l'identificazione delle specie effettuata mediante l'analisi di omologia dell'amplificato del gene *rompA*. In figura 4 è riportato l'albero filogenetico dei campioni analizzati e delle specie scelte dal database. Sono state utilizzate a questo scopo i ceppi *R. slovacca* U43808, *R. massiliae* U43799, *R. conorii* U43806, e il ceppo *Rickettsia* sp. IRr/Munich riconosciuto come primo isolato di *R. monacensis* in letteratura (Simser et al, 2002). I ceppi 14 e 66 riportati in figura sono i due campioni risultati positivi per *R. slovacca* all'analisi di omologia (identità del 99%), mentre il campione 208 è quello identificato come *R. massiliae* (identità del 99%) e il 219 come *Rickettsia* sp. CyRtu43S (identità del 99% con *Rickettsia* sp. CyRtu43S e del 98% con *R. massiliae*).

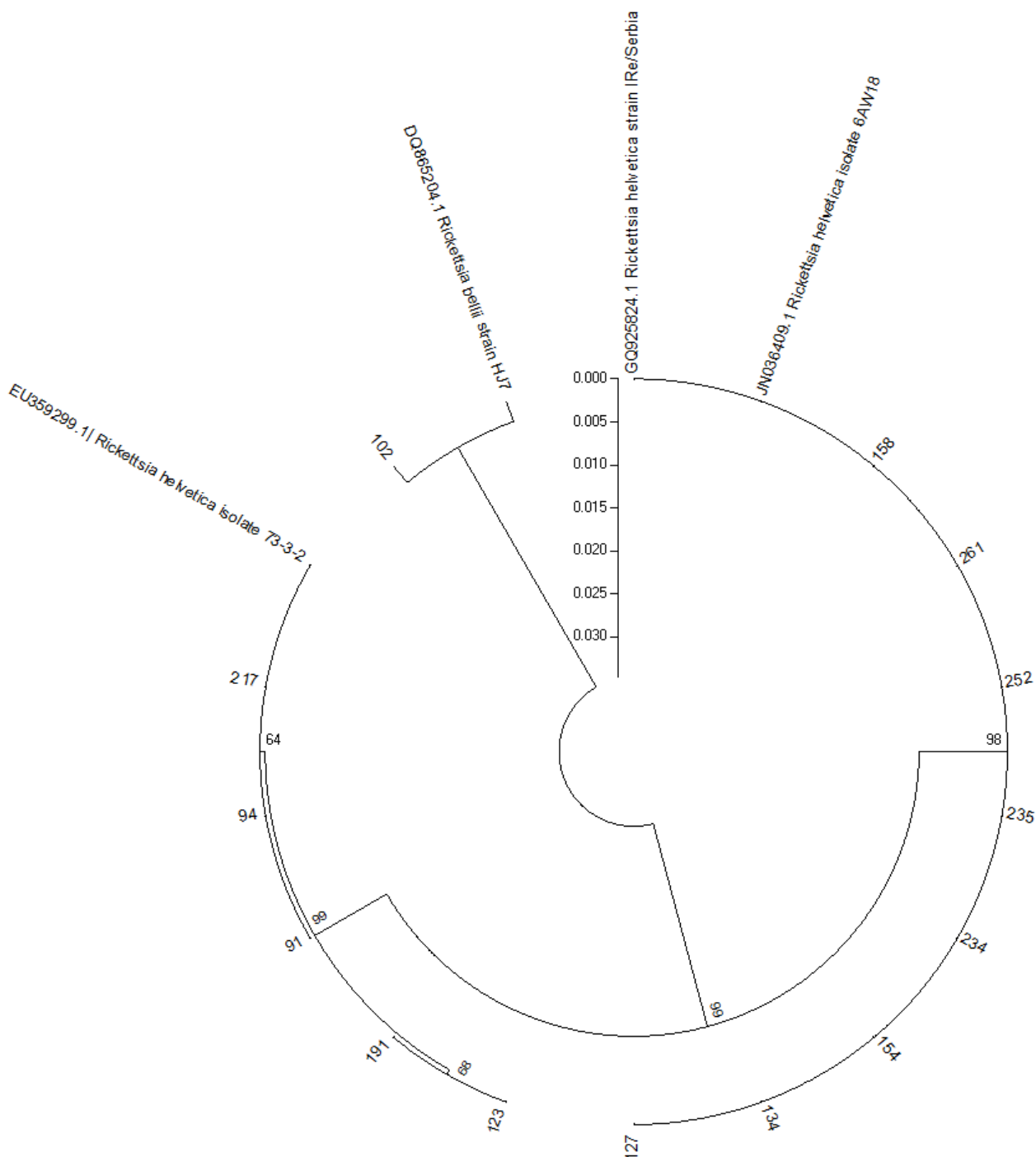
L'analisi filogenetica delle sequenze degli amplificati del gene *gltA*, ha confermato l'identità delle rickettsie identificate come *R. helvetica* (fig. 5). I sequenziamenti del presente studio sono stati confrontati con le sequenze per cui avevano mostrato maggior omologia (*Rickettsia helvetica* isolato 6AW18, *Rickettsia helvetica* isolato 73-3-2, *Rickettsia helvetica* isolato 6AW18). Come appare in figura 5 sebbene divisi in due cluster, l'analisi filogenetica conferma l'identificazione degli amplificati con *R. helvetica*. Il campione 102 si conferma come appartenente invece al cluster di *R. bellii* (identità del 98%).

Un'ulteriore analisi filogenetica è stata effettuata per i ceppi del presente studio identificati come *R. monacensis*. In questa seconda analisi sono stati inclusi tutti i ceppi disponibili su GeneBank, come *R. monacensis* ma identificati nel corso del tempo con altre sigle. Inoltre, sono stati inclusi nell'analisi i ceppi italiani ed europei verso cui gli amplificati avevano mostrato maggiore omologia. Visto l'alto numero di *R. monacensis* sia dal flusso centrale (pa) che dal monitoraggio ambientale (ha) i campioni da noi analizzati sono stati identificati anche in base al flusso di provenienza, alla provincia e al comune di origine. Come si evince dalla figura 6, la maggior parte dei campioni identificati come *R. monacensis* nel presente studio rientrano in un cluster principale di cui fa parte *Rickettsia* sp. IRr/Munich, mentre 11 campioni clusterizzano con il ceppo *Rickettsia* sp. IRS3 e con due ceppi identificati in letteratura come *R. monacensis*. L'amplificato con presunta identificazione con *Rickettsia hoogstraalii* isolato Et161B (identità dell'80%) è derivato dal sequenziamento del gene *gltA* di un campione, risultato positivo ad entrambi i geni, ma non sequenziabile per il gene *rompA*.

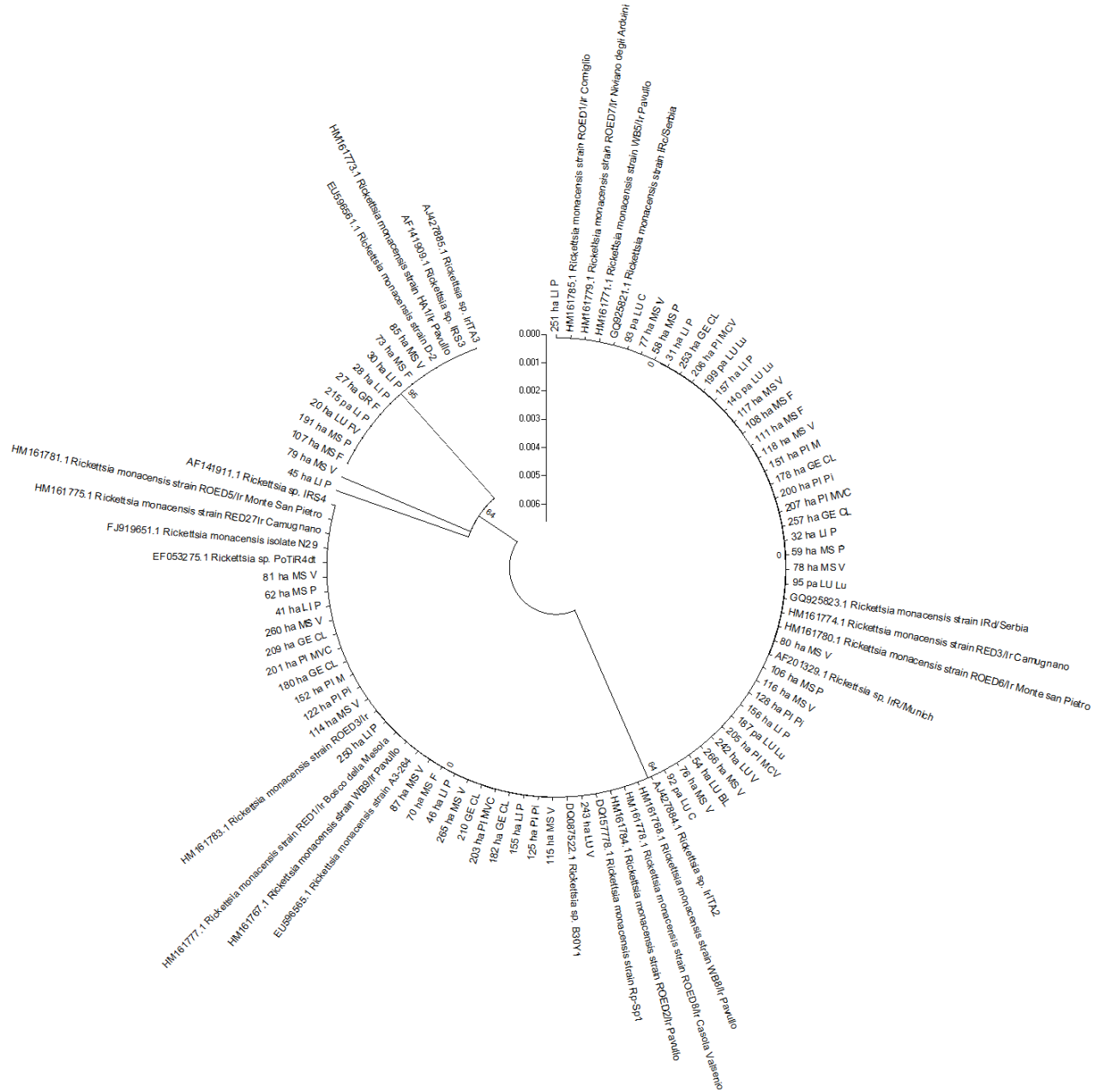
**Figura 4:** Albero filogenetico di *Rickettsia* SFG dedotto dal confronto delle sequenze del gene *ompA* mediante il software Mega 5.1. L'analisi filogenetica è stata determinata secondo le assunzioni di Kimuras con un modello a due variabili ed è stata utilizzata per costruire il dendrogramma con il metodo Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987). Il valore di confidenza per i rami individuali è stato determinato mediante analisi bootstrap (Bertolotti et al., 2006). I numeri ai nodi sono la proporzione di 1000 repliche mediante bootstrap che supportano la topologia. La scala rappresenta la differenza nucleotidica in percentuale.



**Figura 5:** Albero filogenetico di *Rickettsia helvetica* dedotto dal confronto delle sequenze del gene *gltA* mediante il software Mega 5.1. L'analisi filogenetica è stata determinata secondo le assunzioni di Kimuras con un modello a due variabili ed è stata utilizzata per costruire il dendrogramma con il metodo Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987). Il valore di confidenza per i rami individuali è stato determinato mediante analisi bootstrap (Bertolotti et al., 2006). I numeri ai nodi sono la proporzione di 1000 repliche mediante bootstrap che supportano la topologia. La scala rappresenta la differenza nucleotidica in percentuale.



**Figura 6:** Albero filogenetico di *Rickettsia monacensis* dedotto dal confronto delle sequenze del gene *ompA* mediante il software Mega 5.1. L'analisi filogenetica è stata determinata secondo le assunzioni di Kimuras con un modello a due variabili ed è stata utilizzata per costruire il dendrogramma con il metodo Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987). Il valore di confidenza per i rami individuali è stato determinato mediante analisi bootstrap (Bertolotti et al., 2006). I numeri ai nodi sono la proporzione di 1000 repliche mediante bootstrap che supportano la topologia. La scala rappresenta la differenza nucleotidica in percentuale.



## Discussioni

Nel presente studio sono stati analizzati una parte dei dati provenienti dalle attività realizzate dall'Osservatorio Permanente per Patologie a trasmissione Vettoriale (OPPV) della ASL 2 di Lucca, nell'ambito di un progetto comunitario denominato REDLAV. Tali dati hanno permesso una prima valutazione della presenza di *Rickettsia* del gruppo "Spotted Fever" nelle zecche che sono pervenute all'Osservatorio dalle regioni Liguria e Toscana. Le zecche provenienti dal flusso centrale sono state prevalentemente *I. ricinus* (n=39, 69,64%) e *R. sanguineus* (n=7, 12,50%). Questi dati confermano uno studio effettuato in provincia di Savona, negli anni 1995 e 1996, in cui 318 zecche sono state raccolte da paziente e le specie più frequenti sono state *I. ricinus* (89,3%) e *R. sanguineus* (9,8%) (Manfredi et al., 1999). In quel caso, sono stati identificati nell'uomo tutti gli stadi di *I. ricinus*, mentre di *R. sanguineus* solo ninfe e adulti. I campioni da noi analizzati non hanno invece mostrato la presenza di larve di *I. ricinus* né di ninfe di *R. sanguineus*. Per quanto riguarda le specie riscontrate corrispondono a quelle riportate da Manfredi e collaboratori (1999) fatta eccezione per *R. bursa*, di cui non è stata rilevata la presenza né dai campioni provenienti dal flusso centrale né dal monitoraggio ambientale. Uno studio condotto invece in provincia di Belluno negli anni 2000–2001 per la ricerca di *Bartonella* su 271 zecche rimosse da paziente ha evidenziato una percentuale minore di *R. sanguineus* (0,4%), e una percentuale maggiore di *I. ricinus* (98,9%) (Sanogo et al., 2003). La variabilità nella composizione delle zecche antropofile dipende comunque essenzialmente dall'ambiente da cui proviene il flusso, nel nostro caso i dati sono stati raccolti, inoltre, in un anno particolare da un punto di vista climatico, dove è attesa una flessione della densità di *Ixodes*. Sebbene non molti gli studi effettuati su zecche raccolte nei pronto soccorso da pazienti per la ricerca di *Rickettsia* SFG, uno studio condotto in Spagna, in provincia di Soria, su 185 zecche raccolte da 179 pazienti ha evidenziato una diversa percentuale delle specie di zecca (*D. marginatus*, 55,5%, *I. ricinus*, 12,4% e *R. bursa*, 11,9%) e una positività di 26 zecche per *Rickettsia* SFG (Merino et al., 2005). Dieci zecche estratte da un paziente nel 1997 all'Ospedale di Careggi in Firenze sono risultate invece positive per *Rickettsia* IrITA2 (Beninati et al., 2002). Nel nostro caso la positività per *Rickettsia* SFG è stata di 18 su 56 (32,14%), quindi più alta rispetto a quella dello studio spagnolo. Il maggior numero di campioni positivi in questo flusso è risultato per *R. monacensis* (n=8, 14,29%) e *R. helvetica* (n=5, 8,93%).

La prima segnalazione della patogenicità per l'uomo di *R. monacensis* è riportata da Jado e colleghi nel 2007 in Spagna in due pazienti con segni di Mediterranean Spot Fever, tra cui rash cutanei, mal di testa e dolori articolari (Jado et al., 2007) mentre in Italia è riportato un caso recente del 2011 in una ragazza a Sassari (Madeddu et al., 2012). L'ospite riportato in letteratura per questa *Rickettsia* è *I. ricinus*, ma nel nostro caso anche un campione di ninfa di *I. (P.) hexagonus* proveniente da questo flusso è risultato positivo per *R. monacensis*. In letteratura, non risultano però segnalazioni di questa *Rickettsia* SFG in questa specie di zecca, comunque poco studiata. *R. helvetica* è stata rinvenuta in *I. ricinus* in molti paesi europei, ma sebbene il principale vettore sia questa specie, è riportata la presenza anche in *Dermacentor reticulatus* (Nilson et al.,

1999). Questa *Rickettsia* è considerata poco patogena (infezione mite e autolimitante con febbre, mal di testa e mialgia) ma casi gravi sono stati dimostrati, tra cui un caso di meningite subacuta (Nilson et al., 2010). In Italia nel 2004 tre casi umani di Rickettsiosi sono stati associati a *R. helvetica* (Ciceroni et al., 2006).

Riguardo alle altre *Rickettsie* identificate da questo flusso, il campione di *Rickettsia* sp. *CyRtu43S* in *R. sanguineus* ha mostrato una correlazione filogenetica con *R. massiliae*. *R. sanguineus* può trasmettere *R. massiliae*, patogeno cosmopolita emergente (Parola et al., 2008), con un caso dimostrato di trasmissione dell'infezione da *R. massiliae* (Parola et al., 2008). Di questa rickettsia, per la prima volta identificata in un *Rhipicephalus* a Marsiglia, il primo caso è stato diagnosticato proprio in Italia da Vitale e colleghi in un paziente con sintomi febbrili, escara necrotica e rash maculopapulare (2006). Riguardo al campione di *I. (P.) hexagonus* in cui è stato identificato DNA presunto di *Candidatus Rickettsia hoogstraalii* isolato Et161B (identità dell'80% per il gene *gltA* e mancata amplificazione per il gene *rompA*), sono necessarie ulteriori analisi per il gene 16S e *rompB*. La mancanza dell'amplificazione del gene *rompA* e l'omologia del 80% della sequenza del gene *gltA* non permettono infatti una sicura identificazione con *Candidatus Rickettsia hoogstraalii*, isolato anche in Croazia (Duh et al., 2010).

Gli studi effettuati in Toscana e Liguria su *Rickettsia* SFG riportano dati molto variabili sulla prevalenza e sulle specie circolanti in questi territori. In uno studio effettuato in Toscana su campioni di sangue prelevati da lavoratori nelle foreste toscane tra il 1988 e 1991 è emersa una positività sierologica del 2,4% per *R. conorii*, 3,4% per *R. slovacica*, 3,0% per *R. mongolotimonae*, 2,8% per *R. massiliae* e 1,0% per *R. helvetica* (Aquilini et al., 2000). Un altro studio effettuato sempre in Toscana ma su zecche raccolte tramite dragging nel 2004 (1248 *I. ricinus* e 12 *Rhipicephalus* sp.) ha, invece, evidenziato una prevalenza di *Rickettsia* SFG del 38,5% in ninfe di *I. ricinus*, del 34,6 negli adulti e del 50,0% (6 positivi su 12) in adulti di *Rhipicephalus* sp. (Bertolotti et al., 2006). In questo caso le specie di *Rickettsia* SFG identificate sono state *Rickettsia* strain Bar29 in *Rhipicephalus* sp. e *Rickettsia* IrITA2 (23,1% sia in adulti che ninfe), *Rickettsia* IrITA3 (9,2% nelle ninfe e 7,7% negli adulti), *R. helvetica* (1,5% nelle ninfe e 1,9% negli adulti) e *Rickettsia* SFG non identificata (4,7% nelle ninfe e 1,9% negli adulti) in *I. ricinus* (Bertolotti et al., 2006).

In un altro studio, condotto negli anni 2007-2008 in zecche in cerca di ospite nella valle del fiume Serchio, il 30,77% di *D. marginatus* è risultata positiva (4 su 13) per *R. slovacica*, un *R. sanguineus* è risultato positivo *Rickettsia* SFG (1 su 1) e il 4,17% di 120 *I. ricinus* raccolte è risultato positivo per *Rickettsia* SFG (*Rickettsia* sp. IRS3, *Rickettsia* sp. IRS4 e *R. helvetica*) (Martello, 2009).

Nel nostro caso la positività per *Rickettsia* sp. è stata complessivamente più alta (41,94%) e le specie di *Rickettsia* SFG identificate sono risultate distribuite in maniera diversa: *R. monacensis* (32,26%), *R. helvetica* (4,84%), *R. slovacica* (1,07%) e *R. massiliae* (0,54%). Dall'analisi della prevalenza in ninfe di *I. ricinus* nelle diverse province oggetto del dragging emerge però un'alta variabilità, per altro significativa. Se si esclude la provincia di Grosseto in cui le ninfe di *I. ricinus* analizzate sono state soltanto 6, la prevalenza sembra aumentare da Nord a Sud, con il 15,14% di Genova e il 41,52% di Livorno. Questo indica che come avviene per *Borrelia* (Rizzoli et al., 2011) studi su scala locale spesso rivelano un'incidenza più alta rispetto

a quella riportata su scala regionale, e fa sì che il monitoraggio della *Rickettsia* SFG localmente possa essere un fattore importante per prevenire la malattia.

Nel nostro studio la *R. monacensis* è stata quella maggiormente amplificata sia nei campioni da paziente che in quelli del monitoraggio ambientale. Gli studi in letteratura non riportano questa specie in queste zone ma dal primo isolamento e caratterizzazione di *R. monacensis* nel 1998 in *I. ricinus* a Monaco (Germania), effettuata mediante l'analisi di tre geni (16S rRNA, *rompA* e *gltA*), era subito emersa una stretta relazione con altre rickettsie identificate precedentemente come Cadiz agent, IRS3 e IRS4 (Simser et al, 2002). Il ceppo IrR/Munich<sup>T</sup> in questione, identificato come *R. monacensis*, infatti all'analisi filogenetica del 16S rRNA aveva mostrato una similarità del 100 % con i precedenti tre ceppi, a quella del gene *gltA* una similarità del 100 % con IRS4, del 99,77 % con IRS3 e del 97,01 % con il Cadiz agent, mentre per il gene *rompA* 99,62 % con IRS4, 98,88 % con IRS3 e 98,12 % con il Cadiz agent (Simser et al., 2002). Precedentemente, Sekeyova e collaboratori (2000) avevano identificato due nuove specie di *Rickettsia* spp. molto simili tra loro nelle zecche *I. ricinus* raccolte sul territorio slovacco. Queste vennero chiamate *IRS3* e *IRS4* e formano un gruppo filogeneticamente separato all'interno dello SFG. Questi due ceppi sono stati isolati anche in *I. ricinus* in Germania (Silaghi et al., 2008). In Italia, Beninati et al. (2002) hanno rilevato la presenza in zecche *I. ricinus* di due ceppi che sono stati denominati *Rickettsia* sp. Ir ITA2 e *Rickettsia* sp. Ir ITA3 e hanno sequenze molto simili rispettivamente a *Rickettsia* sp. *IRS4* e *Rickettsia* sp. *IRS3*. La presenza di questi due strain è stata confermata anche in Toscana (Bertolotti et al., 2006). Negli anni successivi però molti autori hanno iniziato a considerare IrR/Munich<sup>T</sup>, IRS3 e IRS4 appartenenti alla specie *R. monacensis* (Jado et al., 2008; Radulovic et al., 2011; Sarih et al., 2008). Un altro studio del 2008 effettuato in Portogallo seppur distinguendo tra *R. monacensis* e IRS3 ha messo in evidenza come i due ceppi isolati avessero identità del 100% uno con *R. monacensis* e il ceppo identificato come IrITA2 e l'altro con il ceppo IRS3 e IrITA3 (De Carvalho et al., 2008). E' quindi da considerarsi ancora aperta la questione se tutti questi ceppi così strettamente correlati appartengano alla specie *R. monacensis*. La maggior parte dei campioni identificati come *R. monacensis* nel presente studio rientrano in un cluster principale di cui fa parte *Rickettsia* sp. IrR/Munich e IrITA2 (fig. 6), mentre 11 campioni clusterizzano con il ceppo *Rickettsia* sp. *IRS3* e Ir ITA3 e con due ceppi identificati in letteratura come *R. monacensis*.

E' di notevole interesse l'identificazione di *R. helvetica* (4,84%) già identificata anche in altre aree della Toscana (Bertolotti et al., 2006; Tomassone et al., 2006) e responsabile di casi umani di rickettsiosi in Europa (Parola and Raoult 2001) e di *R. slovacca* (1,07%) agente causale della linfadenopatia da zecca (TIBOLA) e già riportata con una prevalenza del 32,1% in *D. marginatus* raccolti da cinghiali in provincia di Lucca (Selmi et al., 2008).

Un campione di *I. ricinus* ninfa ha presentato amplificato di *R. bellii* (identità del 98%) per il gene *gltA* e l'analisi filogenetica ha confermato la clusterizzazione di questo amplificato con questa specie. *R. bellii* è un organismo non considerato patogeno che occupa una posizione ambigua nella classificazione delle Rickettsie, esibendo una limitata cross reattività antigenica sia con il gruppo SF che con il Transizionale. Da un punto di vista filogenetico è inserito nel gruppo ancestrale (AG) e riportato in America Meridionale in particolare



nelle zecche del genere *Amblyomma* (Laburna et al., 2004; Horta et al., 2006; Fortes et al., 2010; Orgzewalska et al., 2012). Negli ultimi anni sono emerse però evidenze di infezioni in vertebrati (capibara e cani) nel sud del Brasile anche se un ruolo patogenico non è mai stato dimostrato (Fortes et al., 2010). In Europa sono poche le segnalazioni di questa *Rickettsia* riportate in letteratura, tra cui una *R. bellii-like* in Olanda (Sprong et al., 2009) e la sequenza *R. bellii* 369L42-1 depositata in GeneBank da Roullet e colleghi (2004), Faculte de Medecine, Unite des Rickettsies, Marsiglia, Francia, ma a cui non corrisponde una pubblicazione, per cui non è possibile risalire alla zona di provenienza.

Il nostro studio ci permette di affermare che nelle aree considerate, *Rickettsia* del gruppo Spotted Fever è presente nelle zecche e il dato della prevalenza di infezione per le specie di vettori presenti, risulta indispensabile per valutare, unitamente alle abitudini di vita della popolazione, il rischio infettivo a livello locale.

Risulta quindi sempre più utile la sorveglianza per le patologie trasmesse da vettore e la sensibilizzazione del cittadino ad essere più attento e scrupoloso, sottolineando il fatto che la nostra area di studio è considerata un'area a rischio. La valutazione del rischio permette infatti di attuare delle azioni di prevenzione indirette, quali l'informazione al corretto utilizzo del territorio, misure comportamentali da adottare per evitare il morso di zecca, utilizzo di insettopellenti e insetticidi, etc. Inoltre le analisi effettuate sulle zecche provenienti dal flusso centrale (paziente morso da zecche) da parte della struttura dell'OPPV, con l'identificazione del reperto e la valutazione della presenza di DNA di patogeni trasmissibili da parte di questi artropodi, permettono ai medici di svolgere indagini diagnostiche più veloci ed un trattamento farmacologico appropriato qualora si manifestino sintomi di malattie trasmesse da zecche.

## **RINGRAZIAMENTI**

Si ringrazia il Dott. Ambrogio Pagani, Responsabile della Unità Operativa di Sanità Animale, il Dott. Marco Selmi, Responsabile dell'Osservatorio Permanente per Patologie a trasmissione Vettoriale (OPPV), per aver creduto nelle mie capacità e avermi dato l'opportunità di seguire fin dalla nascita il laboratorio di diagnostica molecolare di prima linea per la ricerca di agenti patogeni in zecche antropofile. Ringrazio inoltre la Dott.ssa Carla Landucci ed il Dott. Pierluigi Bianuci per l'ospitalità presso la U.O. di Biotossicologia, del Laboratorio di Sanità Pubblica Area Vasta Toscana Nord Ovest. Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Enrica Ricci, collega presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Sezione di Pisa, per il continuo confronto e per la correzione della parte di biologia molecolare, e il Dott. Luigi Marangi per il supporto nella parte statistica. Inoltre ringrazio i tecnici di laboratorio biomedico: Donatella Simonetti, Franca Migliaccio, Flavio Vezzosi e Raffaella Mancini, per la fiducia che hanno dimostrato nei miei confronti, per il supporto al lavoro svolto e per il clima piacevole e familiare in cui mi hanno permesso di effettuare questa esperienza che ha accresciuto le mie conoscenze. Ringrazio infine il Dott. Roberto Nardini che la sera prima della consegna della tesi ha trovato gli errori da correggere che mi erano sfuggiti, magari non tutti.

## Bibliografia

1. Andersson S.G. E., Zomorodipour A., Andersson J. O., Sicheritz-Pontén T., Alsmark U.C.M., Podowski R.M., Naslund A.K., Eriksson A.-S., Winkler H.H., Kurland C.G. 1998 The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *NATURE*, 396: 133-143
2. Angelakis E., Richet He., Rolain J.-M., La Scola B., Raoult D. 2012 Comparison of Real-Time Quantitative PCR and Culture for the Diagnosis of Emerging Rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis.* 6 (3): e1540
3. Aquilini D., Parola P., Salvo E., Paladini A. 2000 Seroepidemiology of the Rickettsioses, Human Granulocytic Ehrlichiosis, Lyme Disease, Q Fever, and Tularemia in forestry workers in Tuscany, Italy. *Journal of Spirochetal and Tick borne Diseases*, 2: 35-41
4. Azad A. F., Beard C. B. 1998 Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerging Infectious Diseases* 4 (2): 179-186
5. Beninati T., Lo N., Noda H., Esposito F., Rizzoli A., Favia G., Genchi C. First Detection of Spotted Fever Group Rickettsiae in *Ixodes ricinus* from Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9): 983-986
6. Bertolotti L., Tomassone L., Tramuta C., Grego E., Amore G., Ambrogi C., Nebbia P., Mannelli A. 2006 *Borrelia lusitaniae* and Spotted Fever Group Rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Tuscany, Central Italy. *Journal of Medical Entomology*, 43 (2): 159-165
7. Ciceroni L., Pinto A., Ciarrocchi S., Ciervo A. 2006 Current knowledge of rickettsial diseases in Italy. *Ann N Y Acad Sci* 1078: 143-149
8. Cinco M., Padovan D., Murgia R., Poldini L., 1998. Rate of infection of *I. ricinus* ticks with *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* and group VS 116 in an endemic focus of Lyme disease in Italy. *Europ. J. of Microbiol. and Inf. Dis.*, 17: 90-94
9. Cringoli G, 2005. *Mappe parassitologiche 6 Zecche*. Series Editor: 26
10. Cringoli G., Iori A., Rinaldi L., Veneziano V., Genchi C. 2005 *Zecche*. Rolando Editore, Napoli. 308 pp.
11. De Carvalho I. L., Milhano N., Santos A.S., Almeida V., C. Barros S.C., De Sousa R., Nuncio M.S. 2008 Detection of *Borrelia lusitaniae*, *Rickettsia* sp. IRS3, *Rickettsia monacensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* Collected in Madeira Island, Portugal. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*, 8 (4): 575-579
12. Dobec M., Golubic D., Punda-Polic V., Kaeppli F., Sievers M. *Rickettsia helvetica* in *Dermacentor marginatus*. *Emerging Infectious Diseases*, 15 (1): 98-100
13. Dobler G., Wölfel R. 2009 Typhus and other Rickettsioses. *Deutsches Ärzteblatt International*, 106(20): 348–54
14. d'Oliveira C., van der Weide M., Jacquiet P., Jongejan F. Detection of *Theileria anulata* by the PCR in ticks (Acari: Ixodidae) collected in cattle in Mauritania. *Exp. Appl, Acarol.*, 21 (5): 279-91

15. Duh D., Punda-Polic V., Avsic-Zupanc T., Bouyer D., Walker D.H., Popov V.L., Jelovsek M., Gracner M., Trilar T., Bradaric N., Kurtti T.J., Jasna Strus J. 2010 *Rickettsia hoogstraalii* sp. nov., isolated from hard and soft-bodied ticks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 977–984
16. Elfving K., Olsen B., Bergström S., Waldenström J., Lundkvist A., Sjöstedt A., Mejlom H., Nilsson K. 2010 Dissemination of Spotted Fever *Rickettsia* agents in Europe by migrating birds. *Plos one*, 5 (1): e8572
17. Estrada Peña A., Bouttour A., Camicas L., Walke A.R., 2004. Ticks of domestic animals in the Mediterranean Region, University of Zaragoza: 131
18. Fortes F.S., Silveira I., Moraes-Filho J., Leite R.V., Bonacim J.E., Biondo A.W., Labruna M.B., Molento M.B., 2010 Seroprevalence of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia felis* in dogs, São José dos Pinhais, State of Paraná, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 19 (4): 222-227
19. Fournier P.-E., Roux V., Raoult D. 1998 Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 839-849
20. Gage K.L., Schrumph M.E., Karstens R.H., Burgdorfer W., Schawn T.G. 1994 DNATyping of rickettsiae in naturally infected ticks using a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism system. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50 (2): 247-260
21. Garbarino C., Fabbi M., Loli Piccolomini L. 2003 Animali selvatici e zoonosi: aspetti di interesse pratico per gli operatori del settore in relazione al rischio biologico. *J. Mt. Ecol.*, 7: 119- 123
22. Gillespie J.J., Joardar V., Williams K.P., Driscoll T., Hostetler J.B., Nordberg E., Shukla M., Walenz B., Hill C.A., Nene V.M., Azad A.F., Sobral B.W., Calerc E., 2011 A *Rickettsia* genome overrun by mobile genetic elements provides insight into the acquisition of genes characteristic of an obligate intracellular lifestyle. *Journal of Bacteriology*, 194 (2): 376–394
23. Gillespie J.J., Williams K., Shukla M., Snyder E.E., Nordberg E.K., Ceraul S.M., Dharmanolla C., Rainey D., Soneja J., Shallom J.M., Vishnubhat N.D., Wattam R., Purkayastha A., Czarl M., Crasta O., Setubal J.C., Azad A.F., Sobral. B.S. 2008 *Rickettsia* Phylogenomics: Unwinding the Intricacies of Obligate Intracellular Life. *Plos One*. 3 (4): e2018
24. Gray J. S., Dautel H., Estrada-Pêna, A., Kahl O., Lindgren E. 2009 Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2009: 593232
25. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98
26. Hildebrandt A., Franke J., Meier F., Sachse S., Dorn W., Straube E. 2010 The potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 1 (2): 105-107
27. Holste D., Weiss O., Grosse I., Herzel H. 2010 Are Noncoding Sequences of *Rickettsia prowazekii* Remnants of “Neutralized” Genes? *J Mol Evol* , 51:353–362

28. Horta M.C., Pinter A., Schumaker T.T.S., Labruna M.B. 2006 Natural Infection, Transovarial Transmission, and Transstadial Survival of *Rickettsia bellii* in the Tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078: 285-289
29. [http://ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/emerging\\_and\\_vector\\_borne\\_diseases/Pages/index.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/emerging_and_vector_borne_diseases/Pages/index.aspx) (available 11-09-2012)
30. Jado I., Escudero R., Gil H., Jiménez-Alonso M.A., Sousa R., García-Pérez A.L., Rodríguez-Vargas M., Lobo B., Anda P. 2006 Molecular Method for Identification of *Rickettsia* Species in Clinical and Environmental Samples. *Journal Of Clinical Microbiology*, 44 (12): 4572–4576
31. Jado I., Oteo J.A., Aldámiz M., Gil H., Escudero R., Ibarra V., Portu J., Portillo A., Lezaun M.J., García-Amil C., Rodríguez-Moreno I., Anda P. 2007 *Rickettsia monacensis* and Human Disease, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 13 (9): 1405-1407
32. Labruna M.B., Whitworth T., Horta M.C., Bouyer D.H., W. McBride J.W., Pinter A., Popov V., Gennari S.M., Walker D.H. 2004 *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian Spotted Fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (1): 90–98
33. Madeddu G., Mancini F., Caddeo A., Ciervo A., Babudieri S., Maida I., Fiori M.L., Rezza G., Mura M.S. 2012 *Rickettsia monacensis* as Cause of Mediterranean Spotted Fever–like Illness, Italy. *Emerg Infect Dis.*, 18(4): 702–704
34. Manfredi M.T., Dini V., Piacenza S., Genchi C. 1999 Tick species parasitising people in an area endemic for tick borne diseases in north west Italy. *Parassitologia*, 41 (1): 41-45
35. Manilla G. and Iori A. 1992 Illustrated key to the ticks of Italy. I. Larval stages of the species of the Ixodinae subfamily (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). *Parassitologia* 34: 83-95
36. Manilla G. and Iori A. 1993 Illustrated key to the ticks of Italy. II. Nymphal stages of the species of the Ixodinae subfamily (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). *Parassitologia* 35: 37-45
37. Manilla G. 1998 *Fauna d'Italia. Acari. Ixodida*. Bologna, Ed. Calderini.
38. Márquez F.J., Muniain M.A., Soriguer R.C., Izquierdo G., Rodríguez-Baño J.S., Borobio M.V. 1998 genotypic identification of an undescribed spotted fever group *Rickettsia* in *Ixodes ricinus* from southwestern Spain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58(5): 570–577
39. Martello E., 2009. Tesi di laurea: "Search of bacterial zoonotic agents in Ixodidae ticks in Lucca Province" ("Ricerca di agenti di zoonosi batteriche nelle zecche Ixodidae in provincia di Lucca") Faculty of Veterinary Medicine of Torino, Grugliasco, Italy
40. Morita C., El Hussein A.R.M., Matsuda E., Gabbar K.M.A.A., Muramatsu Y., Rahman M.B.A., Eleragi A.M.H., Hassan S.M., Agnes Mumbi Chitambo A.M., Ueno H. 2004 Spotted fever group rickettsiae from ticks captured in Sudan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57: 107-109
41. Murphy H., Renvoisé A., Pandey P., Parola P., Raoult D. 2011. *Rickettsia honei* infection in human in Nepal, 2009. *Emerging Infectious Diseases*, 17 (10): 1865-7

- 
42. Nilsson K., Lindquist O., Liu A.J., Jaenson T.G., Friman G., Pålsson C. 1999 *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. *J Clin Microbiol* 37(2): 400-403
  43. Nuttall P. A., Labuda M. 2004 Tick–host interactions: saliva-activated transmission *Parasitology* 129: S177–S189.
  44. Ogrzewalska M., Literak I., Cardenas-Callirgos J.M., Capek M. , Labruna M.B. 2012 *Rickettsia bellii* in ticks *Amblyomma varium* Koch, 1844, from birds in Peru. *Ticks Tick Borne Dis.* 3(4): 254-6
  45. Parola P. 2004 Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27(5):297-304
  46. Parola P., Paddock C.D., Raoult D. 2005 Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. *Clin Microbiol Rev.* 18(4): 719–756
  47. Parola P., Raoult D. 2001 Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 7: 80-83
  48. Parola P., Socolovschi C., Jeanjean L., Bitam I., Fournier P.-E., Sotto A., Labauge P., Roul D. 2008 Warmer Weather Linked to Tick Attack and Emergence of Severe Rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis* 2(11): e338
  49. Psaroulaki A., Germanakis A., Gikas A., Scoulica E., Tselentis Y. 2005 Simultaneous detection of “*Rickettsia mongolotimonae*” in a patient and in a tick in Greece. *J Clin Microbiol*, 43:3558–9
  50. Radulovic´ Z., Chochlakis D., Tomanovic´ S. , Milutinovic´ M., Tselentis Y., Psaroulaki A. 2011 First Detection of Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks in Serbia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11 (2): 111-115
  51. Regnery R.L., Spruill C.L., Plikaytis B.D. 1990 Genotypic identification of Rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*, 173 (5): 1576-1589
  52. Renvoisé A., Mediannikov O., Raoult D. 2009 Old and new tick-borne rickettsioses. *International Health*, 1 (1): 17-25
  53. Rizzoli A., Rosà R., Mantelli B., Pecchioli E., Hauffe H., Tagliapietra V., Beninati T. Neteler M., Genchi C., 2004 *Ixodes ricinus*, transmitted diseases and reservoirs, *Parassitologia* 46 (1-2): 119-122
  54. Saitou, N., Nei M. 1987 The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425
  55. Sanogo Y. O., Davoust B., Parola P., Camicas J.L., Brouqui P., Raoult D. 2003 Prevalence of *Rickettsia* spp. in *Dermacentor marginatus* ticks removed from game pigs (*Sus scrofa*) in southern France. *Ann N Y Acad Sci*, 990: 191-195
  56. Sarih M., Socolovschi C., Boudebouch N., Hassar M., Raoult D., Parola P. 2008 Spotted fever group rickettsiae in ticks, Morocco. *Emerg Infect Dis*, 14 (7): 1067-1073
  57. Schex S., Dobler G., Riehm J., Müller J., Essbauer S. 2011 *Rickettsia* spp. in Wild Small Mammals in Lower Bavaria, South-Eastern Germany. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11 (5): 493-502

- 
58. Sekeyová Z., Fournier P.E., Reháček J., Raoult D. 2000 Characterization of a new spotted fever group rickettsia detected in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) collected in Slovakia. *J Med Entomol* 37 (5): 707-713.
  59. Selmi M., Bertolotti L., Tomassone L., Mannelli A. 2008 *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor marginatus* and tick-borne lymphadenopathy, Tuscany, Italy. *Emerg Infect Dis* 14 (5): 817-820
  60. Sexton DJ, Walker DH Spotted fever group rickettsioses. 1999 In: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, editors. *Tropical infectious diseases, principles, pathogens, and practice*. Philadelphia: Churchill Livingstone: 579–84
  61. Silaghi C., Gilles J., Höhle M., Pradel I., Just F.T., Fingerle V., Küchenhoff H., Pfister K. 2008 Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany. *J Med Entomol* 45 (5): 948-955
  62. Simser J.A., Palmer A.T., Fingerle V., Wilske B., Kurtti T.J., Munderloh U.G. 2002 *Rickettsia monacensis* sp. nov., a Spotted Fever Group Rickettsia, from Ticks (*Ixodes ricinus*) Collected in a European City Park. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (9): 4559–4566
  63. Socolovschi C., Mediannikov O., Raoult D., Parola P. 2008 The relationship between spotted fever group Rickettsiae and Ixodid ticks. *Vet. Res.* 40 (2): 34 pp.
  64. Sonenshine D. E., Thomas N. 1994 *Ecological Dynamics of Tick-Borne Zoonoses*. Oxford University press, New York, p. 47-53
  65. Sprong H., Wielinga P.R., Fonville M., Reusken C., Brandenburg A.H., Borgsteede F., Gaasenbeek C., van der Giessen J.W.B. 2009 *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. *Parasites & Vectors*, 2 (41): pp.7
  66. Tabara K., Kawabata H., Arai S., Itagaki A., Yamauchi T., Katayama T., Fujita H., Takada N. 2010 High incidence of Rickettsiosis correlated to prevalence of *Rickettsia japonica* among *Haemophysalis longicornis* ticks. *J. Vet. Med. Sci.*, 73 (4): 507-510
  67. Tian Z.-C., Liu G.-Y., Shen H., Xie J.-R., Luo J., Tian M.Y 2012 First report on the occurrence of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* in *Dermacentor silvarum* in China. *Parasites and Vectors*, 5:19
  68. Tomassone L., Ambrogi C., Ragagli C., Mannelli A. 2006 Rickettsie del gruppo febbre bottonosa in zecche Ixodidae nel Parco Nazionale dell'Appennino Tosco- Emiliano: problemi di salute pubblica e per la tutela della biodiversità, II workshop Nazionale di epidemiologia veterinaria– Perugia
  69. Unsworth N., Stenos J., Graves S.R., Faa A.G, Cox G.E., Dyer J.R., Boutlis C.S., Lane A.M., Show M.D., Robson J., Nissen M.D. 2007 Flinder Island Spotted Fever Rickettsioses caused by “marmionii” strain of *Rickettsia honei*, Eastern Australia. *Emerging Infectious Diseases*, 13 (4): 566-573
  70. Venzal M.J., Estrada Peña A., Portillo A., Mangold J.A., Castro O., De Souza C.G., Félix M.L., Pérez-Martínez L., Santibàñez S., Oteo J.A. 2012 *Rickettsia parkeri*: a rickettsial pathogen transmitted by ticks in endemic area for spotted fever rickettsiosis in southern Uruguay. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 54 (3): 131-134

71. Vitale G., Mansueto S., Rolain J.M., Raoult D. 2006 *Rickettsia massiliae* human isolation. *Emerging Infectious Diseases*, 12 (1): 174-175
72. Walker D.H., Valbuena G.A., Olano J.P. 2003 Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. *Ann N Y Acad Sci*, 990: 1-11
73. Weinert L.A., Werren J.H., Aebi A., Stone G.N., Jiggins F.M. 1 2009 Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *BMC Biology*, 7 (6): 15 pp.