



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Dipartimento di Scienze della Vita

Via Giorgieri, 7-9 - 34127 TRIESTE

XXI CICLO DEL

DOTTORATO DI RICERCA IN FARMACOLOGIA, CHEMIOTERAPIA E MICROBIOLOGIA

---

## **MESSA A PUNTO DI METODICHE MOLECOLARI PER LA RICERCA E L'IDENTIFICAZIONE DI AGENTI PATOGENI TRASMESSI DA ZECHE IN *IXODES RICINUS* E NELL'UOMO**

(Settore scientifico-disciplinare MED/07 MICROBIOLOGIA E MICROBIOLOGIA CLINICA)

DOTTORANDA

**DR.SSA ROMINA FLORIS**

COORDINATORE DEL COLLEGIO DEI DOCENTI

**CHIAR.MO PROF. *TULLIO GIRALDI***

*UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE*

FIRMA: \_\_\_\_\_

RELATORE/TUTORE

**CHIAR.MA *PROF. SSA MARINA CINCO***

*UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE*

FIRMA: \_\_\_\_\_

**ANNO ACCADEMICO 2007/2008**

## INDICE

### Introduzione

1. BORRELIOSI O MORBO DI LYME	pag 1
1.1. <i>Borrelia burgdorferi</i>	pag 1
1.2. Epidemiologia	pag 3
1.3. Patogenesi	pag 6
1.4. Diagnosi	pag 10
1.5. Terapia	pag 11
1.6. Identificazione di <i>B. burgdorferi</i> in <i>I. ricinus</i>	pag 11
2. RICKETTSIOSI	pag 13
2.1. <i>Rickettsia</i> spp	pag 13
2.2. Epidemiologia	pag 14
2.3. Patogenesi	pag 17
2.4. Diagnosi	pag 19
2.5. Terapia	pag 21
2.6. Identificazione di <i>Rickettsia</i> in <i>I. ricinus</i>	pag 21
3. ANAPLASMOSI	pag 22
3.1. <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	pag 22
3.2. Epidemiologia	pag 23
3.3. Patogenesi	pag 25
3.4. Diagnosi	pag 26
3.5. Terapia	pag 28
3.6. Identificazione di <i>A. phagocytophilum</i> in <i>I. ricinus</i>	pag 28
4. ENCEFALITE TBE	pag 29
4.1. Virus TBE	pag 29
4.2. Epidemiologia	pag 31
4.3. Patogenesi	pag 34
4.4. Diagnosi	pag 36
4.5. Prevenzione	pag 36
4.6. Identificazione del virus TBE in <i>I. ricinus</i>	pag 37
5. BABESIOSI	pag 39
5.1. <i>Babesia</i> spp	pag 39
5.2. Epidemiologia	pag 42
5.3. Patogenesi	pag 44
5.4. Diagnosi	pag 46
5.5. Terapia	pag 48
5.6. Identificazione di <i>Babesia</i> in <i>I. ricinus</i>	pag 48
6. LA ZECCA <i>I. RICINUS</i>	pag 50

**Scopo della tesi**

7. SCOPO DELLA TESI	pag 54
---------------------	--------

**Materiali e metodi**

8. MATERIALI E METODI	pag 55
8.1. Area di studio	pag 55
8.2. Metodo di raccolta di <i>Ixodes ricinus</i>	pag 60
8.3. Ceppi patogeni di riferimento	pag 61
8.4. Campioni biologici da pazienti	pag 62
8.5. Estrazione degli acidi nucleici	pag 62
8.6. Quantificazione del DNA estratto dai ceppi di riferimento	pag 63
8.7. Amplificazione del DNA e RNA	pag 63
8.8. Controlli positivi e negativi	pag 68
8.9. Visualizzazione degli ampificati	pag 69
8.10. Identificazione delle specie infettanti in <i>I. ricinus</i>	pag 69
8.11. Analisi statistica dei dati	pag 71
8.12. Mappa spaziale del rischio per la borreliosi di Lyme	pag 71
8.13. <i>Multiplex PCR</i>	pag 72

**Risultati**

9. ABBONDANZA DI <i>Ixodes ricinus</i>	pag 73
10. <i>B. BURGDORFERI</i> NELLE ZECCHE <i>I. RICINUS</i>	pag 75
10.1. Identificazione di <i>B. burgdorferi</i>	pag 75
10.2. Presenza di <i>B. burgdorferi</i> nelle zecche raccolte nel 2005	pag 75
10.3. Genospecie di <i>B. burgdorferi</i> negli esemplari di <i>I. ricinus</i> raccolti durante l'anno 2005	pag 81
10.4. Presenza di <i>B. burgdorferi</i> nelle zecche raccolte nel 2006	pag 83
10.5. Sviluppo del rischio spaziale per la borreliosi di Lyme in regione FVG	pag 85
11. <i>RICKETTSIA</i> NELLE ZECCHE <i>I. RICINUS</i>	pag 87
11.1. Identificazione di <i>Rickettsia</i> spp	pag 87
11.2. Presenza di <i>Rickettsia</i> nei campioni di zecca raccolti nel 2005	pag 87
11.3. Presenza di <i>Rickettsia</i> nei campioni di zecca raccolti nel 2005	pag 89
12. <i>ANAPLASMA</i> NELLE ZECCHE <i>I. RICINUS</i>	pag 94
12.1. Identificazione di <i>A. phagocytophilum</i>	pag 94
12.2. Presenza di <i>A. phagocytophilum</i> nei campioni di zecca raccolti nel 2005	pag 94
12.3. Presenza di <i>A. phagocytophilum</i> nei campioni di zecca raccolti nel 2006	pag 96

13. VIRUS TBE NELLE ZECCHHE <i>I. RICINUS</i>	pag 99
13.1. Identificazione del virus TBE	pag 99
13.2. Presenza del virus TBE nelle zecche raccolte nel 2005	pag 99
13.3. Identificazione del sottotipo del virus TBE	pag 103
14. <i>BABESIA</i> NELLE ZECCHHE <i>I. RICINUS</i>	pag 104
14.1. Area di studio e campionamento di <i>I. ricinus</i>	pag 104
14.2. Identificazione di <i>Babesia</i> spp	pag 105
14.3. Presenza di <i>Babesia</i> nei campioni di zecca raccolti negli anni 2006-2007	pag 106
14.4. Identificazione della specie di <i>Babesia</i>	pag 108
15. <i>MULTIPLEX</i> PCR	pag 115
15.1. Creazione dei <i>primer</i>	pag 115
15.2. Verifica dell'efficienza dei <i>primer</i>	pag 117
16. ANALISI DI CAMPIONI BIOLOGICI DA PAZIENTI	pag 123
 <b>Discissione e conclusioni</b>	
17. DISCUSSIONE E CONCLISIONI	pag 126
 <b>Bibliografia</b>	
18. BIBLIOGRAFIA	pag 136

**Seguono:**

- PRODOTTI DELLA RICERCA
- RIASSUNTO
- RINGRAZIAMENTI

# INTRODUZIONE

# 1. BORRELIOSI O MORBO DI LYME

Il termine morbo di Lyme prende il nome da Lyme, contea del Connecticut dove nel 1975 si manifestarono forme artritiche reumatoidi giovanili con una frequenza superiore alla media di circa 100 volte. La patologia era solitamente preceduta da una manifestazione epidermica denominata eritema cronico migrante (ECM) (Steer et al., 1977).

L'agente eziologico della malattia venne isolato nel 1982 da Willy Burgdorfer, che lo identificò come una spirocheta appartenente al genere *Borrelia* dopo averlo estratto dall'intestino di alcuni esemplari di *Ixodes dammini* (oggi *I. scapularis*) (Burgdorfer et al., 1982). In onore dello scopritore all'agente eziologico venne dato il nome di *Borrelia burgdorferi* (Johnson et al., 1984).



**Figura 1.1.** *Borrelia burgdorferi*.

## 1.1. *Borrelia burgdorferi*

### Classificazione

L'agente eziologico della borreliosi di Lyme è una spirocheta appartenente all'ordine *Spirochaetales*, genere *Borrelia*, superspecie *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*). Inizialmente *B. burgdorferi* è stata considerata monospecifica. In seguito all'isolamento di numerosi ceppi da campioni umani, vettori e animali serbatoio, si è rivelata notevolmente eterogenea. All'interno della superspecie *B. burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s. l.) sono state individuate 14 genospecie (Brouqui et al., 2004) che differiscono tra loro per la patogenicità. Fino ad oggi sono state riconosciute responsabili di patologie nell'uomo le genospecie: *B. burgdorferi* sensu stricto (*B. burgdorferi* s. s.), *B. afzelii* e *B. garinii* (Baranton et al., 1998); non si esclude che anche le genospecie *B. valaisiana* (Escudero et al., 2000), *B. lusitaniae* (Collares-Pereira et al., 2004), *B. bissettii* e *B. spielmani* (Wang et al., 1999) possano essere causa di borreliosi.

## Morfologia

*B. burgdorferi* presenta tutte le caratteristiche generali delle spirochete: esiguo spessore, presenza di endoflagelli e tipica forma spiralata sinistrorsa (Figura 1.1). Ciò che distingue *B. burgdorferi* dalle altre spirochete sono lunghezza, larghezza, passo d'elica e numero di flagelli (Tabella 1.1.).

Lunghezza	7-24 $\mu\text{m}$
Spessore (diametro)	0.2-0.5 $\mu\text{m}$
Passo d' elica	1.7-3.3 $\mu\text{m}$
Numero di flagelli	7-12
Tubuli citoplasmatici	assenti

**Tabella 1.1.** Caratteristiche morfologiche di *B. burgdorferi*.

La parete cellulare di *B. burgdorferi* è elicoidale, flessibile e costituita da peptidoglicano. La membrana esterna consiste in un doppio foglietto fosfolipidico al di sotto del quale ci sono da 7 a 12 filamenti assiali, indicati come endoflagelli, che si dipartono da entrambe le estremità del corpo cellulare batterico. Nella porzione mediana del batterio gli endoflagelli si possono sovrapporre o meno, a seconda della specie, consentendo al microrganismo una notevole motilità anche in ambienti fortemente viscosi con movimenti laterali e continui cambi di direzione (Goldstein et al., 1996; Oschmann et al., 1999).

Risponde negativamente alla colorazione di Gram, ma non presenta LPS tipico dei batteri Gram negativi; possiede una membrana plasmatica esterna più uno strato sottile di peptidoglicano contenente acido muramico e ornitina, e una membrana plasmatica interna che racchiude il citoplasma e gli organelli (Oschmann et al., 1999)

Dal punto di vista metabolico, *B. burgdorferi* è un batterio microaerofilo, con un tempo medio di duplicazione di circa 16 ore (Cinco, 1998). La coltivazione in vitro richiede un terreno molto ricco, conosciuto con il nome di Barbour-Stonner-Kelly II modificato, che contiene i 20 aminoacidi, vitamine, siero di coniglio che fornisce gli acidi grassi necessari (Fraser et al., 1997; Barboue e Hayes, 1986) e N-acetilglucosammina (Barbour, 1984) indispensabile per la sintesi del peptidoglicano in quanto non è biosintetizzabile da *Borrelia* (Cinco, 1998; Barboue e Hayes, 1986).

## Genetica

L'organizzazione genomica del batterio è atipica, sia all'interno delle Spirochete che tra i Procarioti. Comprende un cromosoma lineare di circa 1000 kb (853 geni) e fino a 20 plasmidi, sia lineari che circolari, di dimensioni comprese tra 9 e 75 kb, che codificano per proteine immunodominanti e ai quali è associata la virulenza (Oschmann et al., 1999). I plasmidi conferiscono al batterio uno spiccato polimorfismo antigenico grazie al quale il batterio riesce a eludere il sistema immunitario (Bergstrom et al., 1992). I plasmidi sono generalmente presenti in singola copia o in poche copie (Oschmann et al., 1999) e le loro estremità sono chiuse da telomeri (Frazer et al., 1997).

Nel cromosoma sono assenti i geni necessari a molte delle reazioni biosintetiche fondamentali. La carenza di questi geni spiega l'elevata richiesta di nutrienti nel terreno di coltura (Oschmann et al., 1999).

Sul plasmide lineare lp54 è localizzato il gene *ospA* che codifica per la lipoproteina integrale di membrana esterna OspA di 31-33 kDa con funzioni antigeniche (Oschmann et al., 1999). La lipoproteina è alquanto eterogena nelle sequenze tra ceppi europei ed americani e viene distinta in serotipi identificativi delle specie. Negli Stati Uniti d'America è presente un solo serotipo di OspA: il tipo 1, espresso da *B. burgdorferi* s. s., unica specie endemica. In Europa sono presenti 7 serotipi diversi di OspA: *B. burgdorferi* s. s. presenta il serotipo 1, *B. afzelii* il serotipo 2, *B. garinii* i serotipi 3, 4, 5, 6 e 7 (Michel et al., 2003).

## 1.2. EPIDEMIOLOGIA

### Ospiti vettori e genospecie

Ciascuna genospecie patogena di *B. burgdorferi* viene veicolata da un vettore preferenziale, ha una diversa distribuzione geografica e conferisce una sintomatologia clinica predominante (Tabella 1.3.) (Barbour and Hayes, 1986; Levine et al., 1985; Burgdorfer et al., 1985).

In Europa il vettore è *I. ricinus* (vedi capitolo 6, pag 51) e le principali specie di *B. burgdorferi* s. l. considerate patogene sono: *B. burgdorferi* s. ss, *B. garinii* e *B. afzelii*. La specie *B. burgdorferi* s. s. da prevalentemente artrite, ma l'infezione può manifestare anche l'ECM o la neuroborreliosi. L'infezione da *B. afzelii* porta soprattutto a forme patologiche cutanee, sia acute che croniche, mentre *B. garinii* è legata in genere a forme neurologiche della malattia (Balmelli et al., 1995).

GENOSPECIE	VETTORE	DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA	SITOMATOLOGIA CLINICA
<i>B. burgdorferi</i> s. s.	<i>I. ricinus</i> in Europa, <i>I. scapularis</i> e <i>I. pacificus</i> in USA	Europa e USA	Artrite
<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus</i> in Europa, <i>I.</i> <i>persulcatus</i> in Asia	Europa e Asia	Neuroborreliosi
<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus</i> in Europa, <i>I.</i> <i>persulcatus</i> in Asia	Europa e Asia	Forme cutanee: ECM, acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)

**Tabella 1.3.** Vettore, distribuzione geografica e sintomatologia delle varie genospecie di *Borrelia*.

Negli Stati Uniti d'America l'unica specie infettante è *B. burgdorferi* s. s.. Le patologie ad essa legate sono l'eritema migrante e le forme artritiche, mentre raramente si manifestano forme neurologiche (Shapiro, 2008).

#### **Animali serbatoio**

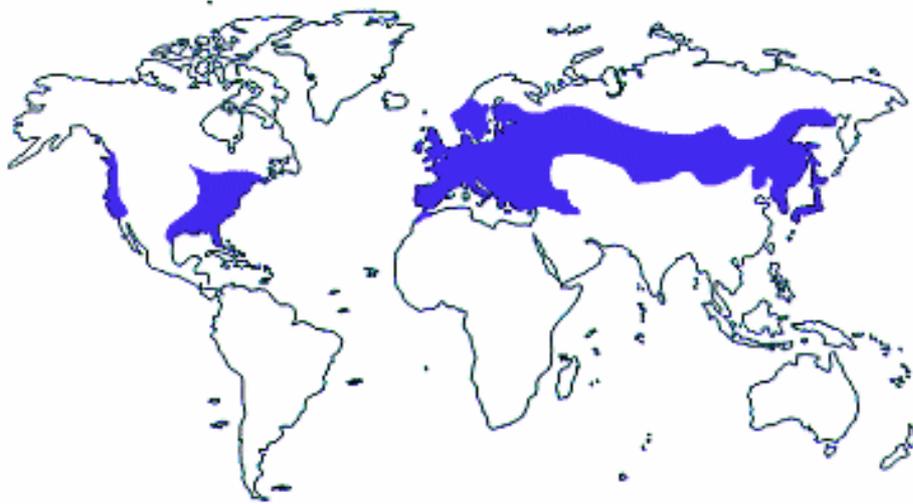
Gli animali serbatoio sono importanti per la sopravvivenza di *B. burgdorferi* in quanto fungono da ospite. Il batterio si riproduce senza danni evidenti per l'animale e senza che quest'ultimo produca una risposta anticorpale in grado di eliminare il batterio. I più comuni animali serbatoio di *Borrelia* sono piccoli roditori, uccelli passeracei, uccelli migratori, caprioli, cervi, volpi e ricci (Tilly et al., 2008).

Alcuni animali domestici come cani, cavalli, ovini e bovini possono fungere da ospiti occasionali, presentando sintomatologie riconducibili a quelle umane (Littman, 2003).

Si è rilevata un'associazione tra le specie di *B. burgdorferi* s. l. e ospiti vertebrati specifici: *B. afzelii* è presente in piccoli roditori, *B. garinii* e *B. valaisiana* sono presenti in uccelli (Piesman and Gern, 2004), *B. burgdorferi* s. s. è presente sia in uccelli che roditori (Richter et al., 2004).

#### **Distribuzione del morbo di Lyme nel mondo**

La diffusione della borreliosi è collegata alla distribuzione del vettore zecca. La malattia è ubiquitaria dal momento che casi di morbo di Lyme sono stati segnalati in tutti i continenti.



**Figura 1.2.** Distribuzione del morbo di Lyme nel mondo.

In **Europa** la malattia di Lyme è diffusa dal Mediterraneo sino a latitudini elevate (escluso Atlantico Settentrionale). Ha carattere endemico in Germania, Austria, Svizzera, Francia, Slovenia, Spagna settentrionale, Croazia settentrionale, Svezia meridionale, Inghilterra, parte dell'Italia, e si presenta con notevole incidenza nell'est europeo: Russia, Romania, Ungheria e Cechia (Shapiro, 2008). A livello europeo è stato riscontrato un valore di prevalenza medio di *B. burgdorferi* nelle zecche compreso tra il 5 e il 25% (Randolph, 2001).

In **Italia** i primi casi segnalati risalgono al 1985 e 1986 in Liguria e Friuli Venezia Giulia rispettivamente (Crovato et al., 1985; Trevisan, 1986; Cinco et al., 1998a). Le principali regioni interessate dalla borreliosi di Lyme sono: Friuli Venezia Giulia, Veneto, Trentino Alto Adige e Liguria. Recentemente sono stati segnalati casi anche in Emilia Romagna, Toscana e Lazio (Parodi, 2004).

La **regione FVG** è stata dichiarata zona endemica per la borreliosi di Lyme già nel 1984 (Crovato et al., 1985). Nel 1989 è stato isolato il primo ceppo di *Borrelia*, identificato come *B. garinii*, in un campione di zecca (Cinco et al., 1989). Tra il 1995 e il 2005 sono stati notificati 336 casi umani di borreliosi, con un incremento di 121 casi nel 2007 e 170 casi nel 2008 (dati gentilmente forniti dalla Direzione Regionale della Salute e della Protezione Sociale della Regione FVG).

## 1.3. PATOGENESI

### Sintomatologia clinica

La borreliosi di Lyme è una sindrome multisistemica che interessa cute, articolazioni, sistema nervoso centrale e periferico, diversi organi interni (es. cuore) e occhio (Oschmann et al., 1999).

Apparati interessati	Stadio I (localizzato) LB precoce (1-3 settimane)	Stadio II (disseminato) LB precoce (2-7 mesi)	Stadio III (persistente) LB tardiva (7-12 mesi)
<i>Cute</i>	Eritema chronicum migrans	Lymphadenosis benigna cutis, rash, eritema diffuso, orticaria, linfocitoma	Acrodermatitis chronica atrophicans, lesioni sclerodermia simili (lichen)
<i>Sistema muscolo-scheletrico</i>		Artralgia, mialgia, dolori ai tendini e alle ossa con brevi attacchi di artrite, miositi, osteomieliti	Attacchi di artrite prolungati, artrite cronica, periostite o sublussazione dell' articolazione sottostante l' acrodermatite
<i>Sistema nervoso</i>		Meningite, neurite cranica, paralisi di Bell, neuroborreliosi, sindrome di Bannwarth, encefalite, motoneurite multipla, mielite	Encefalomielite cronica, paraparesi spastica, atassia, disordini mentali, poliradiculopatia cronica, neuroborreliosi cronica
<i>Sistema linfatico</i>	Linfoadenopatia regionale	Linfoadenopatia regionale o generalizzata, splenomegalia	
<i>Cuore</i>		Blocco atrio-ventricolare, miopericardite, pancardite	
<i>Occhio</i>		Congiuntivite, irite, coroidite, emorragia o distacco della retina, panoftalmite	Cheratite
<i>Fegato</i>		Epatite lieve o ricorrente	
<i>Sistema respiratorio</i>		Mal di gola non essudativo, tosse secca	
<i>Reni</i>		Ematuria microscopica o proteinuria	
<i>Sistema genito-urinario</i>		Orchite	
<i>Sintomatologia costituzionale</i>	Di lieve entità	Grave malessere o spossatezza	Spossatezza

**Tabella 1.4.** Sintomatologia del morbo di Lyme per stadi.

La malattia si manifesta in più stadi, ciascuno caratterizzato da peculiari sintomatologie cliniche (Tabella 1.4.). Se non curata, la malattia può evolvere in manifestazioni più gravi e croniche a carico degli apparati interessati nella fase iniziale della malattia. Gli stadi successivi compaiono a distanza di settimane o mesi dall'ingresso di *B. burgdorferi* nell'organismo (Steer, 1989; Dattwyler, 1990) o addirittura dopo una sua apparente eradicazione (Ortenzio e Trevisan, 2004). La malattia può attraversare tutti e tre gli stadi, saltarne uno oppure manifestarsi in uno qualsiasi dei tre stadi (Oschmann et al., 1999).

### **Stadio I:** precoce con infezione localizzata

La più tipica manifestazione clinica del primo stadio è l'eritema cronico migrante (ECM), manifestazione cutanea dovuta alla moltiplicazione centrifuga delle spirochete (Figura 1.3.) e viene associato a tutte e tre le specie patogene. Si presenta come un alone rosso intorno al morso della zecca con al centro fenomeni di regressione di colorazione (Tomao et al., 1999). L'ECM può localizzarsi in qualsiasi parte del corpo e comparire da 5 a 25 giorni dopo il morso della zecca. In un'alta percentuale di casi *B. burgdorferi* è presente nel circolo sanguigno già in questo stadio (Trevisan, 2004; Cinco et al., 2004).



**Figura 1.3.** Esempio di eritema cronico migrante (ECM).

### **Stadio II:** precoce e disseminato

Nei giorni o nelle settimane successivi al contagio, *Borrelia* invade l'organismo, diventano rintracciabile nel sangue (spirochetemia). A livello cutaneo questo stadio è caratterizzato da una manifestazione rara ma tipica, il linfocitoma borreliotico (LABC), sostenuto più frequentemente da *B. garinii* (Trevisan, 2004). Si manifesta con un'infiltrazione simil tumorale della pelle, di colore blu-rosso, spesso localizzata al lobo dell'orecchio, al capezzolo o all'areola mammaria (Oschmann et al., 1999; Wilske and Shriefer, 2003).

In questo stadio, inoltre, è frequente la comparsa di lesioni giunzionali quali artrite monoarticolare, oligoarticolare e poliarticolare asimmetrica, di solito localizzate al ginocchio o alle grandi articolazioni (Rovetta, 2004). L'artrite di Lyme è associata frequentemente a *B. burgdorferi* s. s. (Oschmann et al., 1999; Wilske and Shriefer, 2003).

Le manifestazioni neurologiche sono causate prevalentemente dalla specie *B. garinii*. Si osservano molteplici quadri clinici, quali meningite asettica, encefalopatia, meningoradiculite, polimeningoradiculonevrite e lesioni di paia di nervi cranici che portano a paralisi facciale come la "paralisi di Bell" (Brouqui et al., 2004; Bisin, 2004), o nervi periferici (Strle, 2004). Un altro quadro neurologico osservabile è l'encefalomielite cronica oscillante che può simulare una sclerosi a placche con interessamento dell'encefalo, nervi ottici, tronco encefalico e cervelletto (Bisin, 2004).

Nel 5% dei casi ci può essere un coinvolgimento cardiaco: l'ECG evidenzia uno stato di miocardite con disordini di conduzione e talvolta blocco atrio-ventricolare che in genere ha un decorso benigno con recupero completo nella maggioranza dei pazienti (Oschmann et al., 1999; Sinagra, 2004).

### **Stadio III:** cronico e persistente

Il terzo stadio della malattia avviene dopo 5-7 mesi dalla comparsa dei primi segni dell'ECM e può perdurare anche per molti anni. In questo stadio non è mai stata descritta una remissione spontanea (Oschmann et al., 1999). *B. burgdorferi* è in grado di persistere nei tessuti dell'ospite grazie all'elusione degli anticorpi (Nangara et al., 1996; Cinco, 1998) e del complemento (Kraiczky et al., 2001; Pausa et al., 2003), modificazioni antigeniche (Cinco, 1998), localizzazione in siti non raggiungibili dagli anticorpi e formazione di cisti (Alban et al., 2000; Brorson and Brorson, 1997; Murgia et al., 2002). Inoltre, resiste alla fagocitosi, al killing fagocitario e persiste all'interno dei macrofagi (Montgomery et al., 1993; Aberer et al., 1996; Garcia et al., 1997; Hulinska et al., 1995).

La Late Lyme disease (LLD) o forma tardiva della borreliosi di Lyme è caratterizzata dalla presenza di manifestazioni cutanee (in particolare manifestazioni atrofosclerodermiche) ed extracutanee di tipo articolare e neurologico che assumono carattere di cronicità. Le manifestazioni cutanee atrofosclerodermiche del III stadio sono: l'acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) di Pick-Herxheimer, il lichen sclerosus et atrophicus (LSA) (Oschmann et al., 1999; Breitner et al., 2001), l'aretoderma (Bauer et al., 2003), l'atrophoderma profundum di Pierini-Pasini e la morphea (Oschmann et al., 1999; Scaini e Trenisan, 2004). Le dermatopatie risultano più frequenti nelle aree endemiche con larga prevalenza della specie *B. afzelii* (Trevisan, 2004).

Una delle manifestazioni cutanee caratteristiche di questa fase è l'ACA di Pick-Herxheimer, spesso associata alla presenza nella cute di *B. afzelii*, che si presenta con un processo di atrofizzazione della struttura muscolare sottostante l'area in cui era presente l'ECM. Inizia con una caratteristica decolorazione rosa chiaro o bluastra con infiltrazione, dopodiché progredisce in atrofia della pelle e spesso viene complicata da cambiamenti sclerodermici siti a livello delle superfici estensorie delle estremità (mani, piedi, ginocchia e glutei), specie in prossimità delle articolazioni (Oschmann et al., 1999; Stinco, 2004). Il colore delle aree interessate diventa rosa-violaceo con riflessi bluastrici cianotici o rosso-brunastri (Figura 1.4). L'atrofia si estende poi al tessuto sottocutaneo e a quello muscolare.



**Figura 1.4.** Esempi di acrodermatitis chronica atrophicans.

Un'altra manifestazione cutanea è l'anutoderma, caratterizzata da perdita localizzata del tessuto elastico del derma per danneggiamento delle fibre elastiche. Si presenta come una piccola ma ben definita lesione atrofica che alla palpazione produce un'ernia all'interno; è causata dalla perdita di normali fibre elastiche (Bauer et al., 2003; Padovan et al., 2004).

Anche l'occhio può venir interessato dalla borreliosi. L'oftalmoborreliosi, descritta per la prima volta da Steere et al. nel 1985, è una manifestazione rara. Nel I stadio, qualora l'eritema migrans sia sopra l'occhio, porta a congiuntivite. Nel II stadio possono essere infette tutte le parti dell'occhio con manifestazioni quali corioretinite, iridociclite, miosite oculare e cheratite. Nel III stadio, che compare anche dopo anni, si manifesta cheratite bilaterale spesso accompagnata da manifestazioni extraoculari della malattia (Oschmann et al., 1999).

## 1. 4. DIAGNOSI

La prima osservazione viene effettuata in base alla sintomatologia clinica, tuttavia l'aspecificità con cui si presenta la malattia richiede l'ausilio di metodiche diagnostiche di laboratorio.

### **Diagnosi sierologica**

La ricerca di anticorpi anti-*B. burgdorferi* rappresenta il metodo più usato per la diagnosi della borreliosi di Lyme (Dattwyler, 1989). Il protocollo della sierologia, universalmente accettato, prevede di usare test sierologici di primo livello (ELISA o test immunoenzimatico) e test di secondo livello (Western Blot). La sensibilità di questo metodo durante l'infezione iniziale risulta molto bassa. In genere gli anticorpi non sono rilevabili prima di 3-6 settimane dopo l'avvenuta infezione (Craft et al., 1986; Steer, 1989). Nella fase precoce la produzione di IgM è discreta o nulla, il che porta a sieronegatività nel 20-30% dei casi osservati (Eiffert et al., 1996). Nel II e III stadio vengono prodotte in modo predominante le IgG (specie in caso di artrite e ACA), mentre le IgM nella maggior parte dei casi sono assenti (Wilske et al., 1993). In caso di neuroborreliosi gli anticorpi vengono rilevati nel liquido cefalorachidiano. Nei pazienti con ECM, l'esecuzione delle indagini sierologiche per la conferma della diagnosi non è indicata, perciò l'ECM rimane una diagnosi clinica (Rorai, 2004). Bisogna considerare, inoltre, la possibilità che la sierologia possa risultare negativa per tutto il corso dell'infezione, mentre una sierologia positiva potrebbe indicare solo un'infezione pregressa (Rudenko et al., 2005).

### **Isolamento di *B. burgdorferi* da campioni biologici**

L'isolamento può esser fatto da coltura di biopsia cutanea, sangue e liquor (Preac-Mursic et al., 1991). La coltura è un metodo lento, in quanto richiede tempi di crescita molto lunghi (fino a un mese), sovracrescita di una specie o inquinamento da altri microrganismi. Inoltre, spesso non è attendibile a causa della bassa concentrazione del batterio nei fluidi biologici che può dare falsi negativi (Rudenko et al., 2005).

### **Evidenziazione istochimica**

La ricerca di *B. burgdorferi* mediante evidenziazione istochimica nei tessuti (de Koning et al., 1986) prevede l'analisi delle biopsie fissate con formalina e paraffina, sezionate con il microtomo in fettine di 15 µm ciascuna e osservate al microscopio previa colorazione argentea. Questo metodo è poco usato in quanto può dare artefatti (de Koning et al., 1986).

## PCR su campioni biologici

La PCR è stata una delle tecniche più rivoluzionarie nel campo della biologia molecolare con molteplici applicazioni, in particolare in campo diagnostico. Le caratteristiche proprie di specificità, sensibilità e rapidità nella risposta fanno di questa tecnica uno strumento diagnostico ideale. La reazione a catena della polimerasi (PCR) viene applicata a campioni biologici quali biopsia cutanea, sangue, liquido cefalorachidiano, liquido sinoviale e urina (Moter et al., 1994; Priem et al., 1997; Schmidt, 1997; Rosa and Schwan, 1989; Persing et al., 1990; Nielsen et al., 1990; Goodman et al., 1991; Wallich et al., 1990; Schwartz et al., 1992).

## 1.5. TERAPIA

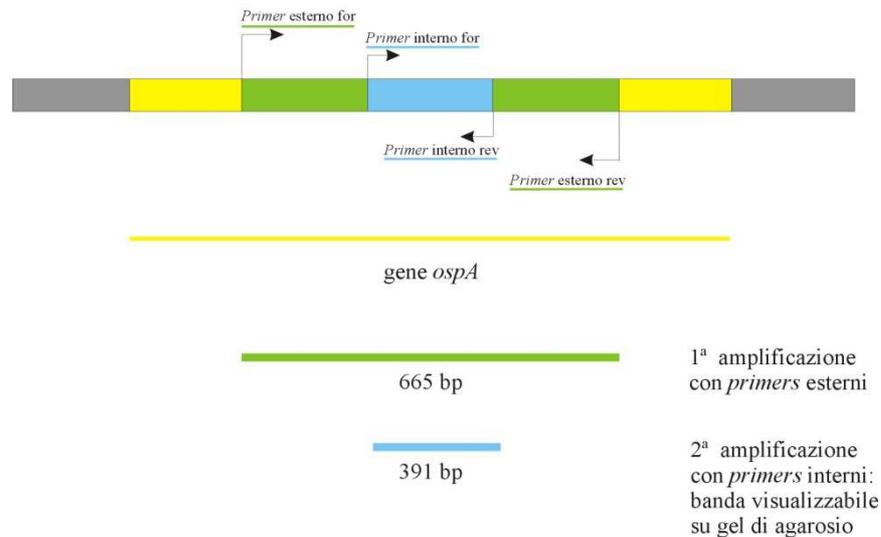
I medici solitamente si attengono al protocollo suggerito dall'EUCALB (European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis), gruppo di studio a livello Europeo nato nel 1997. Il trattamento terapeutico è diversificato in base alla manifestazione clinica, e dunque in base allo stadio raggiunto dalla malattia. I farmaci antibiotici più usati sono Amoxicillina, Doxiciclina e Ceftriaxone (<http://meduni09.edis.at/eucalb/cms/index>).

## 1. 6. IDENTIFICAZIONE DI *B. burgdorferi* IN *I. ricinus*

In diversi lavori scientifici la presenza di *Borrelia* nei campioni di zecca è stata ricercata impiegando la tecnica della PCR, con *primer* specifici per lo spazio intergenico tra il gene 5S dell'rRNA (*rrf*) e il gene codificante per la sub-unità 23S (*rrl*) del genoma di *Borrelia* (Postic et al., 1994; Rijpkema et al., 1995). Questi geni si ritrovano ripetuti in tandem e sono presenti in più copie nel genoma il che conferisce buona sensibilità al sistema di amplificazione (Postic et al., 1994).

Nel 1994 Moter et al. disegnarono dei *primer* specifici per una porzione del gene *ospA* da usare con la tecnica della *nested*-PCR su biopsie cutanee. La *nested*-PCR è una doppia amplificazione che conferisce estrema sensibilità tecnica: dopo la prima PCR con *primer* esterni l'amplificato viene usato come stampo per la seconda reazione con *primer* interni. Ciò permette di ottenere una sequenza di 391 bp, visibile su gel di agarosio (Figura 1.5).

## Porzione del plasmide lp54



**Figura 1.5.** Schema della *nested*-PCR sul gene plasmidico *ospA* di *B. burgdorferi*.

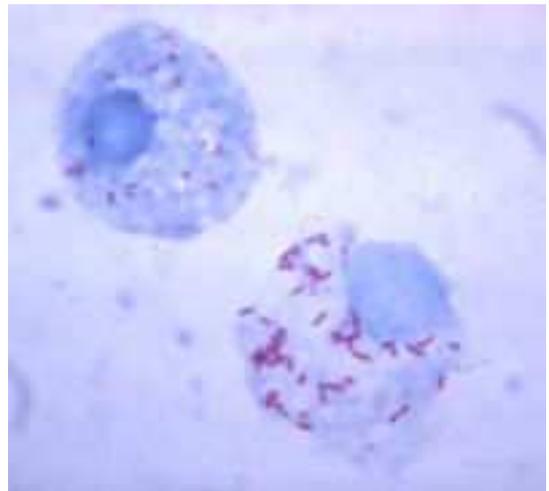
Gli stessi *primer* sono stati poi ripresi da Priem et al. nel 1997, che ne hanno ottimizzato la sensibilità di amplificazione su vari campioni biologici umani. Questo sistema è stato applicato con successo nel nostro laboratorio per confermare la diagnosi di borreliosi di alcuni pazienti. Dal momento che i *primer* per il gene *ospA* sono specifici e in grado di identificare le diverse genospecie di *B. burgdorferi* s. l., abbiamo pensato di creare un sistema di genotipizzazione basato sulla tecnica di restrizione enzimatica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) al fine di identificare la specie infettante (Floris et al., 2007).

Questa tecnica è stata applicata anche per la genotipizzazione di *B. burgdorferi* s. l. presente nei campioni di zecca raccolti nell'area di studio comprendente la regione FVG e l'area transfrontaliera slovena.

## 2. RICKETTSIOSI

Le rickettsiosi sono patologie causate da batteri intracellulari obbligati appartenenti al genere *Rickettsia*; sono tra le più vecchie malattie trasmesse da zecche conosciute dalla medicina (Raoult and Roux, 1997). La febbre delle Montagne Rocciose dovuta a *R. rickettsii* è stata confermata come patogena per l'uomo nel 1899 (Hammarsten, 1983; Ricketts, 1991).

La febbre bottonosa del mediterraneo è stata descritta per la prima volta in Tunisia (Parola and Raoult, 2001b) e l'agente eziologico, *R. conorii*, è stato individuato nel 1932 (Raoult and Roux, 1997). Recenti studi condotti su casi atipici di rickettsiosi in aree endemiche hanno portato alla descrizione di nuove sindromi cliniche causate da altre specie di *Rickettsia*, tra cui *R. helvetica* in Europa (Fournier et al., 2000).



**Figura 2.1.** *Rickettsia* spp.

### 2.1. *Rickettsia* spp.

#### Classificazione

Il genere *Rickettsia* è incluso nella famiglia *Rickettsiaceae*, ordine *Rickettsiales*. Le rickettsie patogene per l'uomo vengono suddivise in due gruppi principali in base alle caratteristiche cliniche della malattia (Raoult and Roux, 1997):

1. Gruppo della febbre maculosa (spotted fever group-**SFG**): *Rickettsia rickettsii*, trasmessa dalle zecche, è l'agente eziologico della febbre delle montagne rocciose (Rocky Mountain Spotted Fever – RMSF) presente in America. Altre rickettsie di questo gruppo che danno patologia nell'uomo sono *R. conorii* e *R. slovaca* (febbre bottonosa e malesseri simili), *R. akari* (rickettsial pox), *R. japonica* (Japanese spotted fever), *R. sibirica* (tifo nord-asiatico delle zecche), *R. africae* (febbre africana del morso di zecca), *R. helvetica* (perimiocardite), e altre.

2. Gruppo del tifo (typhus group-TG): *Rickettsia prowazekii* è l'agente eziologico del tifo epidemico trasmesso dal pidocchio. L'infezione viene generalmente trasmessa per contatto umano tramite i pidocchi, perciò è associata ad una scarsa igiene. Altre rickettsiae di questo gruppo sono *R. typhi* e *R. felis*. Il tifo murino è causato dalla trasmissione di *R. typhi* da ratti, gatti e opossum all'uomo tramite le pulci. *R. felis* è la causa di un tifo simile a quello murino trasmesso dalle pulci di gatti e opossum.

In aggiunta alle 21 specie riconosciute, sono stati descritti più di 20 isolati di *Rickettsia*. La classificazione di questi isolati è confusa dal momento che non sono stati ancora completamente caratterizzati e quindi non hanno ricevuto una designazione di specie (Fournier et al., 2003).

### **Morfologia e genetica**

Le *Rickettsiae* sono parassiti intracellulari obbligati di cellule eucariotiche, Gram-negativi, aerobici, senza flagelli, di forma coccoide o coccobacillare con dimensioni poco maggiori dei grandi virus (0.3-0.5 x 0.8-2.0); possono presentarsi in forme isolate o in brevi catenelle (Parola et al., 2005).

Hanno un genoma molto piccolo di circa 1.0-1.5 milioni di basi che contiene circa 830 geni codificanti proteine funzionali molto simili ai geni mitocondriali in base alla sequenza e alla filogenesi. Circa un quarto del genoma è composta da DNA non codificante, la più alta proporzione mai trovata in un microrganismo; queste sequenze non codificanti potrebbero essere ciò che rimane dei geni "neutralizzati" da *Rickettsia* nel suo adattamento al parassitismo (Andersson et al., 1998 e 1999).

## **2.2. EPIDEMIOLOGIA**

### **Ospiti vettori e animali serbatoio**

Gli Ixodidi sono i principali vettori delle specie di *Rickettsia* del gruppo SFG (vedi capitolo 6, pag. 51). *Rickettsia* può infettare e moltiplicarsi in quasi tutti gli organi della zecca in particolare nelle ghiandole salivari (Parola and Raoult, 2001a). Quando le ovaie e gli ovociti delle femmine adulte sono infette, può esser trasmessa per via transovarica fino alla progenie successiva, e agli stadi successivi tramite la trasmissione transstadiale. Le specie di *Rickettsia* che infettano le ghiandole salivari delle zecche possono esser trasmesse all'ospite vertebrato

durante il pasto di sangue, perciò, come le larve, anche le ninfe e gli adulti possono essere tutti infettivi per gli ospiti vertebrati suscettibili (Parola et al., 2005). Quest'ultimi possono sviluppare una rickettsiemia con sintomi clinici, perciò va considerato il loro ruolo come reservoir dell'infezione nelle zone endemiche (Raoult and Roux, 1997).

Inoltre, è stata descritta la trasmissione sessuale da maschio a femmina nelle zecche *I. ricinus* e *D. andersoni* (Hayes et al., 1980).

### **Distribuzione della rickettsiosi umana nel mondo**

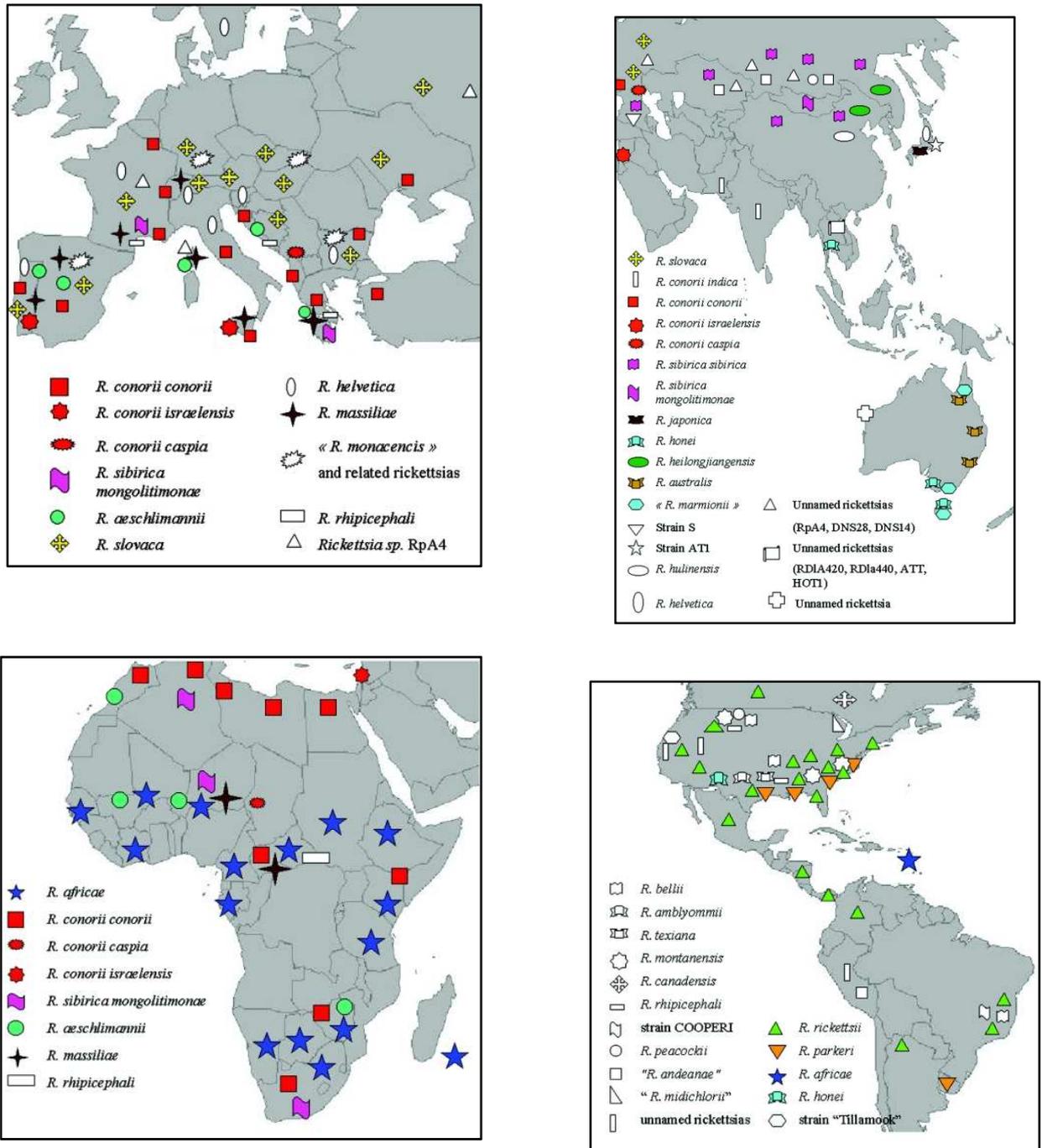
Le specie di *Rickettsia* di entrambi i gruppi SFG e TG sono diffuse in tutto il **mondo** (Raoult and Roux, 1997) (Figura 2.2). Alcune specie presentano una localizzazione geografica ben definita, come *R. rickettsii* che è presente in Nord e Sud America (Sexton and Kaje, 2002; Angerami et al., 2006), *R. sibirica* in Eurasia e Asia (Brouqui et al., 2007), *R. australis* in Australia (Graves et al., 2006), *R. japonica* in Giappone (Mahara, 2006). Altre specie sono state individuate in regioni anche molto distanti; tra queste c'è *R. acari* che circola in USA, Ucraina, Croazia e Corea (Saini et al., 2004), e *R. conorii*, ampiamente diffusa nell'area del Mediterraneo (Sud Europa, Africa, Israele) ma anche in India (Parola, 2006; Brouqui et al., 2007; Kamarasu et al., 2007). In Europa sono presenti anche le specie patogene *R. helvetica* and *R. slovacca* trasmesse dalle zecche *I. ricinus* and *Dermacentor marginatus*, rispettivamente (Parola and Raoult 2001a; Beninati et al. 2002; Lakos 2002, Sanogo et al. 2003a; Beninati et al. 2005).

*Rickettsia prowazekii* predomina in Russia (Tarasevich et al., 2006), mentre *R. typhi* e *R. felis* sono diffuse in tutto il mondo (Parola, 2006; Graves et al., 2006; Bernabeu et al., 2006; Hawley et al., 2007; Civen and Ngo, 2008).

*R. conorii*, agente eziologico della Febbre bottonosa del Mediterraneo (FBM) è la rickettsiosi più diffusa nell'area del Mediterraneo e l'unica rickettsiosi endemica in **Italia**. In base ai recenti rapporti pubblicati dall'Istituto Superiore di Sanità, 4604 casi di rickettsiosi sono stati registrati tra il 1998 e il 2002, quasi tutti erano casi di Mediterranean spotted fever (MSF) causato da *R. conorii*. Dal momento che il vettore di *R. conorii*, *Rhipicephalus sanguineus*, preferisce climi temperati, questa patologia è comune in Italia centrale e meridionale (Tringali et al. 1986; Ciceroni et al. 2006).

Nel 2004, tre casi di una forma lieve di rickettsiosi in nord Italia sono stati attribuiti a *R. helvetica* con esame sierologico (Fournier et al. 2004). Questa specie è presente in zecche provenienti da territori confinanti con la nostra regione, come il Veneto (Beninati et al. 2002; Sanogo et al. 2003b) e la Slovenia (Parola and Raoult 2001b; Prosenc et al. 2003).

In regione FVG, sono stati diagnosticati due casi di rickettsiosi, ma non è stata determinata la specie infettante (Ciceroni et al. 2006). Recentemente è stato dimostrato che nel siero di un gruppo di forestali attivi in regione FVG erano presenti anticorpi contro *R. conorii*, ma anche contro *R. helvetica* (Cinco et al., 2006).



**Figura 2.2.** Distribuzione delle specie di *Rickettsia* nel mondo. I simboli colorati indicano le specie di patogeno, mentre i simboli bianchi indicano le specie di possibile o non nota patogenicità (da Parola et al., 2005)

## 2.3. PATOGENESI

### Fattori di patogenicità

*Rickettsia* viene inoculata nel derma della pelle tramite il morso della zecca oppure attraverso ferite cutanee tramite le feci di pulci e pidocchi. Il batterio diffonde attraverso il circolo sanguigno e infetta l'endotelio. L'aderenza alla cellula ospite è il primo passo della patogenesi mediata da adesine come la proteina OmpA della membrana esterna (Li and Walker, 1998; Feng et al., 2004). Una volta adesa alla membrana della cellula ospite, *Rickettsia* viene fagocitata probabilmente inducendo la fagocitosi della cellula ospite dal momento che può entrare in cellule che normalmente non fagocitano. Una volta fagocitata, esce velocemente dal fagosoma ed entra nel citoplasma tramite un processo di evasione mediato dalla fosfolipasi A2 del batterio (Walker et al., 2001).

Le osservazioni fatte su colture cellulari in laboratorio suggeriscono che le rickettsiae del gruppo TG vengono rilasciate dalla cellula ospite per lisi cellulare, mentre le rickettsiae del gruppo SFG in genere si accumulano in gran numero e non lisano la cellula ospite ma escono dalla cellula stimolando la polimerizzazione di code di actina dell'ospite con conseguente influxo di acqua (Gouin et al., 1999).

### Sintomatologia clinica

La malattia da rickettsiosi varia nella gravità clinica a seconda della virulenza della specie infettante e dei fattori legati all'ospite, quali età, sesso, alcolismo e altre malattie preesistenti. Le specie di *Rickettsia* più virulenti sono *R. rickettsii* e *R. prowazekii*, che portano ad un tasso di mortalità significativo, a meno che la malattia non venga trattata precocemente nel corso dell'infezione con un efficace antibiotico, in genere la doxiciclina (Parola et al., 2005).

Generalmente la malattia ha un periodo di incubazione di circa 7-10 giorni dopo il morso della zecca infetta. L'esordio della malattia è improvviso, con sintomi simili a quelli dell'influenza (Brouqui et al., 2007). Il meccanismo di azione patogena è principalmente legato alla sede di proliferazione del batterio, rappresentata dalle cellule endoteliali delle arteriole e dei capillari che sono stimulate all'accrescimento e alla divisione (Raoult and Roux, 1997). L'iperplasia delle cellule endoteliali e la formazione di trombi provocano l'ostruzione dei vasi per effetto della quale si verifica una fuoriuscita dei globuli rossi nei tessuti circostanti e un accumulo di cellule infiammatorie. Alla lesione endoteliale e alla formazione di cospicui infiltrati intorno ai vasi colpiti, possono seguire disordini funzionali

secondari, la cui sintomatologia e gravità variano a seconda dell'organo colpito (cute, miocardio, encefalo). Si può osservare la compromissione primaria del sistema nervoso centrale e dei reni (Rovero and Raoult, 2008).

La diffusione cellula-cellula nell'endotelio (Walker et al., 2003) può provocare la necrosi di una zona di derma ed epidermide di circa 1 cm di diametro circondata da un eritema; questa lesione necrotica nerastra viene definita escara o *tache noire* (Figura 2.3). L'escara non si manifesta nel tifo epidemico e murino e viene osservata raramente nella Febbre delle Montagne Rocciose; in quest'ultimo caso è più frequente osservare un rash cutaneo diffuso (Figura 2.4) (Dantas-Torres, 2007; Rovero and Raoult, 2008).

Le specie di *Rickettsia* del gruppo SFG spesso manifestano una linfadenopatia regionale nel drenaggio dell'escara, suggerendo che il microrganismo può diffondere precocemente, attraverso i vasi linfatici, in tutto il corpo e infettare principalmente le cellule endoteliali. Vengono così instaurati molti focolai di infezione contigui di cellule dei vasi sanguigni che provocano danni vascolari che si manifestano come rash, pneumonia interstiziale, encefalite, nefrite interstiziale, e miocardite interstiziale; ci possono essere anche lesioni al fegato, parete gastrointestinale, pancreas e potenzialmente a qualsiasi tessuto vascolarizzato del corpo. Forme clinicamente atipiche sono quelle anesantematiche che possono presentarsi con febbre, escara in assenza di febbre oppure con una linfadenite isolata. L'epatosplenomegalia è presente nel 50% dei casi circa (Brouqui et al., 2004 e 2007).



**Figura 2.3.** Escara cutaneo dovuto all'infezione da *Rickettsia*



**Figura 2.4.** Rash cutaneo dovuto all'infezione da *Rickettsia*

Di recente è emerso che altre specie di *Rickettsia* sono implicate nella patologia umana; queste sono state isolate in alcune specie di zecche che sicuramente mordono l'uomo (Raoult and Roux, 1997; Estrada-Pena and Jongejan, 1999). Una di queste è la specie *R. helvetica*, trasmessa da *I. ricinus* e sospettata di causare l'“*aneruptive fever*” su base sierologica (Fournier et al., 2004); il DNA di rickettsia è stato trovato in casi di perimiocardite (Nilsson et al., 2002), nel granuloma di un paziente con sarcoidosi (Nilsson et al., 2002), in un paziente con febbre acuta con escara (Nilsson et al., 2005b) e nelle valvole aortiche in un paziente con cardiopatia (Nilsson et al., 2005a).

## 2.4. DIAGNOSI

La decisione di iniziare il trattamento antibiotico dovrebbe essere presa sulla base della diagnosi clinica, senza attendere la conferma di laboratorio.

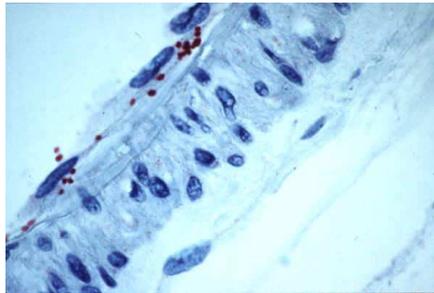
### Diagnosi sierologica

La sierologia è il metodo più facile per la diagnosi da rickettsiosi. La tecnica di microimmunofluorescenza (MIF) è largamente accettata come la metodica di riferimento (La Scola and Raoult, 1997). Entrambi gli anticorpi IgM e IgG possono essere individuati tra i 7 e 15 giorni dalla comparsa dei sintomi. Il primo prelievo viene eseguito precocemente durante il corso della malattia, e il secondo prelievo dopo 2 settimane. Se non viene rilevato un incremento quadruplo del titolo anticorpale, un terzo campione di sangue deve essere prelevato dopo 4-6 settimane (Brouqui et al., 2007).

Le proteine di superficie ad alto peso molecolare, come OmpA e OmpB, contengono epitopi specie-specifici che forniscono le basi per la serotipizzazione di *Rickettsia*. Si usano tecniche MIF comparative (Parola et al., 2005) dato che il risultato sierologico positivo ottenuto dall'analisi di un solo antigene non implica necessariamente che la malattia sia stata causata dalla specie di *Rickettsia* a cui l'antigene è correlato a causa della cross-reattività tra le diverse specie (Raoult and Roux, 1997). Anche il Western blotting può dare dei falsi positivi dovuti alla cross-reattività degli anticorpi, che sono principalmente diretti contro il LPS (Parola and Raoult, 2001b).

Un tempo veniva molto usata la reazione di Weil-Felix che si basa sulla sieroagglutinazione di ceppi di *Proteus* Ox19, Ox2, oppure OxK, grazie ad una reattività immunologica crociata con alcune specie di *Rickettsia*. Oggi questa tecnica è considerata superata vista la scarsa sensibilità e specificità e ha valore ai fini della conferma diagnostica solo in casi eccezionali (La Scola and Raoult, 1997).

Il metodo immunologico può essere inoltre usato per identificare *Rickettsia* in campioni di biopsia tramite colorazione con *immunostaining* (Figura 2.5). La biopsia viene eseguita nel punto in cui si osserva il rash cutaneo prima della terapia antibiotica. Dal momento che *Rickettsia* è distribuita in modo focale nella lesione, questo test riesce a individuare l'agente al massimo nel 70% dei casi (Raoult and Roux, 1997; Brouqui et al., 2007).



**Figura 2.5.** Colorazione tramite *immunostaining* di un campioni di biopsia infetto da *Rickettsia* (strutture circolari rosse).

### **Coltivazione in vitro**

L'isolamento di *Rickettsia* è di fondamentale importanza nel descrivere le rickettsiosi. *Rickettsia* è generalmente isolata dal sangue, biopsie cutanee. Le rickettsie possono crescere in vitro in colture cellulari di tessuto (Marrero and Raoult, 1989). Lo svantaggio è che l'isolamento può essere condotto soltanto in laboratori con biosicurezza di livello 3 (Brouqui et al., 2007).

### **Diagnosi molecolare**

Metodi molecolari basati sulla PCR hanno consentito lo sviluppo di uno strumento sensibile, specifico e rapido per ricercare e identificare *Rickettsia* nei campioni di sangue e biopsie cutanee. Sono stati descritti vari set di *primer* specifici per i geni *ompA*, *ompB*, *gltA* e gene D di *Rickettsia* e possono essere impiegati in qualsiasi laboratorio con relativa facilità (Parola et al., 2005).

## 2.5. TERAPIA

Il regime antibiotico convenzionale applicato nella cura della SFG rickettsiosi è 7-14 giorni di somministrazione orale di doxiciclina, 200 mg (Raoult and Maurin, 2002). E' stato dimostrato che una terapia con 2.5 mg/kg di minociclina per 3 settimane è più sicura per i bambini e così si può prevenire la decolorazione dei denti causata dalle tetracicline, di conseguenza questa terapia potrebbe rappresentare una alternativa sicura ed efficace in età pediatrica (Cascio et al., 2004).

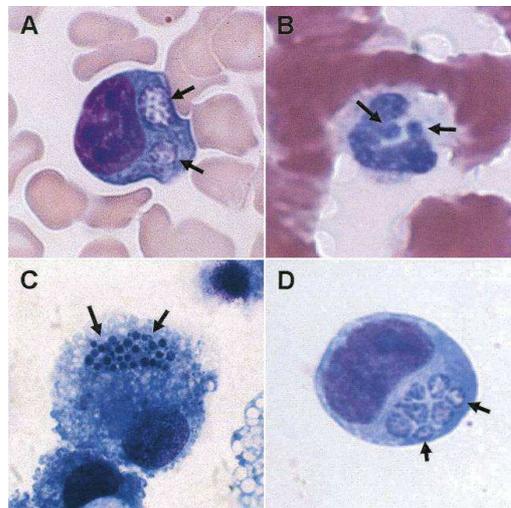
I fluorochinoloni hanno dimostrato di essere efficienti per il trattamento della Mediterranean spotted fever. I fluochinoloni somministrati per 7-10 giorni possono esser considerati come una valida alternativa alle tetracicline nel trattamento della "spotted fevers". Comunque, come le tetracicline, non sono raccomandati in età pediatrica e in gravidanza (Brouqui et al., 2007).

## 2.6. IDENTIFICAZIONE DI *Rickettsia* IN *I. ricinus*

*Rickettsia* è stata ricercata tramite PCR nel vettore zecca della specie *I. ricinus* in tutti i paesi europei. I target genetici più usati per l'analisi molecolare sono i geni *gltA*, *ompA*, *ompB* e il gene per la subunità 16S rRNA; il sequenziamento e l'analisi di omologia degli amplificati ha permesso di dimostrare che *R. helvetica* è ampiamente distribuita su tutto il territorio europeo (Nilsson et al. 1999a; Beninati et al. 2002; Prosenc et al. 2003; Hartelt et al., 2004; Sreter-Lancz et al., 2005; Stanczak, 2006). Dall'analisi degli amplificati degli stessi target sopra descritti è stato possibile identificare una nuova specie chiamata *R. monacensis* in un campione di zecca in Germania (Simser et al. 2002). In seguito si è visto che questa specie è presente anche in zecche di altri paesi europei e che dove esser considerata come specie potenzialmente patogena per l'uomo (Jado et al. 2007; Sreter-Lancz et al., 2005).

### 3. ANAPLASMOSI

L'anaplasmosi HGA (Human Granulocytic Anaplasmosis) è una malattia causata dal patogeno *Anaplasma phagocytophilum* e trasmessa da zecche Ixodidi. E' stata identificata per la prima volta nel 1990 in un paziente del Wisconsin che morì di febbre alta 2 settimane dopo il morso di una zecca (Chen et al., 1994). I primi casi umani sono stati registrati in Europa nel 1996 (Petrowec et al., 1997) e da allora altri casi sono stati riportati nei paesi europei (Blanco and Oteo, 2002).



**Figura 3.1.** *Ehrlichia chaffeensis* (A e C) e *Anaplasma phagocytophilum* (B e D) in monociti di sangue periferico; le frecce indicano le morule formate dai microrganismi.

#### 3. 1. *Anaplasma phagocytophilum*

##### Classificazione

*Anaplasma phagocytophilum* appartiene alla famiglia delle *Rickettsiaceae*; la sua classificazione ha subito sostanziali revisioni nell'arco negli anni. Nel 1994, attraverso l'applicazione su larga scala dell'amplificazione molecolare e del sequenziamento del DNA, l'agente eziologico venne riconosciuto come differente da *Ehrlichia chaffeensis*. All'inizio venne chiamato agente HGE (Bakken et al., 1994; Chen et al., 1994), ma studi morfologici e sierologici successivi indicarono uno stretto se non addirittura identico rapporto con i patogeni animali *E. equi* e *E. phagocytophila*. Durante il processo di classificazione del

patogeno umano, studi filogenetici hanno dimostrato la divergenza tra gli organismi definiti ehrlichiae, e un'accurata riorganizzazione adesso posiziona questi batteri precedentemente classificati come *E. phagocytophila*, *E. equi* e l'agente HGE all'interno di un genere differente come singola specie, *A. phagocytophilum* (Chen et al., 1994; Dumler et al., 2001).

### **Morfologia**

La specie *Anaplasma* è composta da piccoli batteri intracellulari obbligati di 0.2-1.0 µm di diametro con una parete Gram-negativa (Walker and Dumler, 1996), a cui manca il meccanismo di biosintesi del LPS (Lin and Rikihisa, 2003). Il batterio risiede in un endosoma precoce, dove si moltiplica per fissione binaria e cresce in un raggruppamento chiamato morula (Figura 3.1). *A. phagocytophilum* cresce in cellule mieloidi o granulociti che; è stata propagata in cellule leucemiche di promielociti umane HL-60 e KG-1, cellule mielocitiche THP-1, colture cellulari endoteliali, e colture cellulari di zecche (Dumler et al., 2001).

## **3.2. EPIDEMIOLOGIA**

### **Ospiti vettori e animali serbatoio**

L'ecologia di *A. phagocytophilum* non è ancora completamente chiara. Si sa che il batterio viene mantenuto nel ciclo di trasmissione delle zecche *Ixodes* (vedi capitolo 6, pag 51). L'infezione si instaura dopo un pasto di sangue infetto, e il batterio viene trasmesso per via transstadiale, ma non per via transovarica (Dumler et al., 2001). HGA viene sempre più riconosciuta come un'importante e frequente causa di febbre dopo il morso di una zecca in numerose zone dell'Europa e degli USA (Walker and Dumler, 1996; Bakken et al., 1996; Aguero-Rosenfeld et al., 1996).

La trasmissione e propagazione di *A. phagocytophilum* avviene nei grossi mammiferi quali cavalli, bovini, pecore, capre, cani, gatti, mentre piccoli mammiferi sono il reservoir dell'anaplasmosi. Diversi roditori e altre specie di animali contribuiscono alla diffusione dell'anaplasmosi in vari paesi europei (Petrovec et al., 2003; Bown et al., 2003; Alberti et al., 2005; Bjoersdorff et al., 2001), come i caprioli che hanno un ruolo principale nel ciclo biologico di *I. ricinus* (Oporto et al., 2003). I caprioli sono i principali reservoir per *A. phagocytophilum* in Europa centrale e Scandinavia con un'alta seroprevalenza di circa il 95% e un valore variabile di infezione dimostrata tramite PCR che varia da 12,5% in Cechia fino all' 85,6% in Slovenia (Skarphedinsson et al., 2005).

L'espansione di vettori e reservoir in nuove località geografiche è stato osservato in diversi stati, come ad esempio in Spagna (Oporto et al., 2003), in Austria (Petrovec et al., 2003), in Cechia (Petrovec et al., 2003) e in Danimarca (Skarphedinsson et al., 2005). Il ruolo degli uccelli migratori nel trasferimento a lungo raggio delle zecche potrebbe essere importante dal momento che le stesse sequenze di *A. phagocytophilum* sono state identificate da ricercatori svedesi in zecche infette raccolte da uccelli migratori, da campioni umani e da animali domestici (Bjoersdorff et al., 2001).

### **Distribuzione dell'anaplasmosi HGA nel mondo**

La sua diffusione è a livello internazionale, e le aree endemiche includono gli USA, l'Europa, e l'Asia (Cina, Russia siberiana, e Corea) (Dumler et al., 2007). *A. phagocytophilum* è presente in quasi tutti gli stati degli USA (Wimberly et al., 2008) con 2963 casi umani diagnosticati tra il 1994 e il 2005, di cui 700 casi soltanto nell'anno 2005 (Dumler et al., 2007).

Ci sono dati sierologici che indicano la presenza di infezioni HGA in diversi stati europei; la seroprevalenza varia da valori negativi o prossimi allo zero fino al 28%. La prevalenza dell'agente patogeno nelle zecche è solitamente più elevata negli adulti rispetto le ninfe e varia dallo zero o quasi fino al 30% (Strle, 2004b).

Le infezioni sintomatiche in **Europa** sembrano rare; fino al 2005 sono stati riportati 66 casi, a differenza di una seroprevalenza media del 6,2%, con punte del 21% in alcuni stati europei, mentre la prevalenza media nelle zecche infette è risultata del 3% (Dumler et al., 2005). La maggior parte dei pazienti proviene dall'Europa centrale (Slovenia) e Scandinavia (Svezia), ma ci sono casi singoli provenienti da vari altri paesi europei (Strle, 2004b). Recenti studi siero-epidemiologici suggeriscono che molte infezioni non vengono riconosciute, e in aree endemiche la popolazione infettata varia tra il 15 % e 36% (Bakken et al., 1998; Agüero-Rosenfeld et al., 2002).

In **Italia** la prevalenza di *A. phagocytophilum* è del 24.4% nelle zecche *I. ricinus*, mentre nell'uomo oscilla tra il 1.5% (Cinco et al., 1998b), dato supportato da uno studio serologico che ha evidenziato una positività anticorpale del 8.6% nella popolazione (Nutti et al., 1998). *A. phagocytophilum* è stata identificata tramite PCR nelle zecche raccolte in Lazio (Sanogo et al., 2003b) e Veneto (Favia et al., 2001) e in uno studio sierologico condotto sulla popolazione residente nelle province di Belluno e Trento (Sanogo et al., 2003b). Nel 1998 sono stati confermati i primi 2 casi di HGA in **regione FVG** (Ruscio and Cinco, 2003) e ad oggi sono stati diagnosticati 5 casi umani (Beltrame et al., 2006). Un'indagine sierologica condotta 2 anni più tardi sui forestali ha riportato una seroprevalenza per *Anaplasma* del 0.6%

(Cinco et al., 2004). D'altro canto, in uno studio annuale condotto su pazienti morsi da zecca in regione FVG è stato riportato che il 9% di questi pazienti era infetto da *A. phagocytophilum* (Beltrame et al., 2006).

### 3.3. PATOGENESI

#### Sintomatologia clinica

La patologia causata da *A. phagocytophilum* (HGA) porta a quadri clinici variabili; in genere nei pazienti compare un malessere febbrile severo con mal di testa, mialgia, artralgia e coinvolgimento del tratto gastro-intestinale, polmoni, fegato e SNC (Walker and Dumler, 1996; Bakken et al, 1996; Agüero-Rosenfeld et al., 1996; Hardalo et al., 1995). Le complicanze quali neuropatie periferiche e isolati paralisi facciale sono rare, ma quando presenti possono persistere per settimane o mesi (Olano and Walker, 2002; Dumler et al., 2005). Il rash cutaneo viene osservato nel 6% dei casi, mentre un rash non specifico può manifestarsi nella co-infezione con *B. burgdorferi*, che può causare simultaneamente l'eritema migrante.

In ogni caso, infezioni sintomatiche possono verificarsi spesso in regioni endemiche e variano in severità, da febbre moderata e autolimitante fino alla morte. Una severità sufficiente a far ricoverare il paziente si osserva nella metà dei casi sintomatici ed è associato con l'età avanzata, un'aumentata conta dei neutrofili, un minor numero di linfociti circolanti, anemia, immunodepressione (Bakken et al, 1996). Circa il 5%-7% dei pazienti necessita di cure intensive. I casi fatali per HGA sono circa il 0.7%, in genere dovuti a complicanze dovute ad infezioni opportunistiche (Bakken and Dumler, 2000), o dove la diagnosi tardiva e il trattamento sono stati fattori aggravanti (Bakken et al., 1994; Walker and Dumler, 1996; Bakken et al, 1996; Hardalo et al., 1995; Lepidi et al., 2000).

Complicazioni gravi sono una sindrome simile allo shock tossico o settico, coagulopatia, problemi respiratori, miocardite, insufficienza renale, emorragie, polineuropatia demielinizzante e infezioni opportunistiche. A differenza dei risultati ottenuti sull'osservazione degli animali, non c'è stata alcuna evidenza della persistenza di *A. phagocytophilum* nell'uomo (Brodie et al., 1986). La discrepanza tra la carica batterica e le modificazioni isto-patologiche suggerisce che la malattia dipende dagli effettori immunitari che inavvertitamente danneggiano i tessuti (Dumler et al., 2005).

### **Fattori di patogenicità**

L'infezione da *A. phagocytophilum* altera significativamente il funzionamento e la fisiologia dei neutrofili. Il patogeno sopravvive all'inizio del suo ingresso detossificando il superossido prodotto dai fagociti neutrofili, probabilmente grazie all'azione del superossido dismutasi batterica (Ohashi et al., 2002; Carlyon et al., 2004). Dopo l'internalizzazione, l'endosoma non matura e non accumula marcatori caratteristici dei tardi endosomi o fagolisosomi (Webster et al., 1998). Come risultato, il vacuolo non viene acidificato o fuso ai lisosomi. Il patogeno si divide fino alla lisi cellulare o viene scaricato per infettare le altre cellule.

Nella linea cellulare HL-60 infetta è stata osservata l'incapacità di generare la respirazione a causa della ridotta trascrizione dei componenti della ossidazione fagocitica. Comunque questo difetto sembra limitato ai neutrofili infetti ed è il meccanismo principale che permette l'infezione intracellulare. La riduzione dell'ossidazione fagocitaria potrebbe avere altri effetti, incluso una riduzione nella regolazione locale dell'infiammazione (Carlyon et al., 2002; Choi and Dumler, 2003).

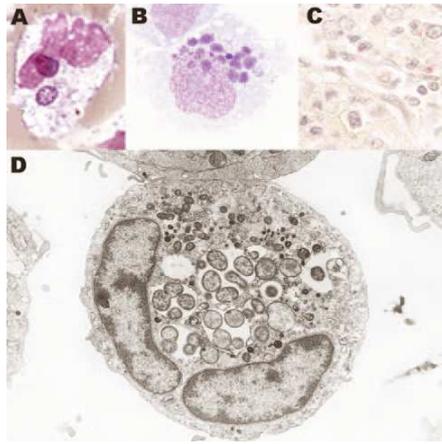
Un'altra normale funzione dei neutrofili è l'apoptosi, che regola l'infiammazione tramite la morte programmata delle cellule dei neutrofili attivati in genere tra le 24 e 48 ore. L'induzione dell'apoptosi dei neutrofili infetti da *A. phagocytophilum* è ritardata di circa 24 ore (Ge et al., 2005). L'infezione provoca, inoltre, un'alterazione significativa delle normali funzioni dei neutrofili, incluso l'adesione alle cellule endoteliali e transmigrazione, motilità, degranulazione e fagocitosi (Choi et al., 2003 e 2004; Garyu et al., 2005).

## **3. 4. DIAGNOSI**

Esistono diversi approcci di laboratorio per confermare una diagnosi da HGA che devono essere applicati ad intervalli diversi dall'inizio della malattia:

### **Diagnosi diretta**

Si esamina lo striscio di sangue periferico colorato con il metodo di Wright ricercando le morule, che vengono evidenziate come inclusioni citoplasmatiche blu stipate nei neutrofili. Questo è il metodo diagnostico più rapido che può essere usato dopo la comparsa della malattia (Figura 3.2). La sensibilità diagnostica è più alta durante la prima settimana di infezione (Bakken and Dumler, 2000; Bakken et al., 2001).



**Figura 3.2.** *Anaplasma phagocytophilum* in neutrofilo di sangue periferico umano.

### Diagnosi sierologica

La serodiagnosi è il metodo più sensibile per la conferma diagnostica di HGA (Bakken and Dumler, 2000; Bakken et al., 1996; Olano and Walker, 2002; Bakken et al., 2002). Il test serologico più usato è basato sull'individuazione degli anticorpi fluorescenti diretti verso *A. phagocytophilum* in toto. Gli anticorpi polivalenti conferiscono una sensibilità del 82%-100% (Walls et al., 1999). Esistono vari problemi potenziali legati alla diagnosi serologica che potrebbero offuscare l'interpretazione di un risultato positivo:

- gli anticorpi IgG possono persistere per mesi oppure anni dopo l'infezione in assenza di ricadute o manifestazioni cliniche persistenti (Bakken et al., 2002; Dawson et al., 1990);
- in alcune regioni esiste un'alta seroprevalenza, anche tra individui senza alcun sintomo clinico di infezione (Bakken et al., 1998; Agüero-Rosenfeld et al., 2002);
- l'analisi di un unico siero prelevato nella fase acuta potrebbe risultare in una identificazione di non più del 3% dei pazienti affetti da HGA (Bakken et al., 2002).

Perciò, una reazione serologica positiva in un paziente senza sintomi clinici non indica necessariamente un'infezione attiva, persistente o cronica (Bakken et al., 2002).

### Coltivazione in vitro

Un metodo diagnostico è l'isolamento in coltura di *A. phagocytophilum* dal sangue del paziente (Goodman et al., 1996). Il problema maggiore legato alla coltivazione è che esistono soltanto pochi laboratori competenti in colture cellulari, dato che questa tecnica necessita di una particolare coltura cellulare priva di antibiotico non comunemente disponibile nei laboratori clinici. *A. phagocytophilum* può venir isolata coltivando una frazione di leucociti oppure sangue con EDTA su promielociti HL-60 umani (Goodman et al., 1996).

### **Diagnosi molecolare**

La PCR su sangue evita la necessità di coltivare il patogeno, e la rapidità nella risposta è fondamentale per la prescrizione di una corretta terapia. La sensibilità della PCR si è dimostrata relativamente alta, in grado di confermare una presunta diagnosi di anaplasmosi nel 67% e 90% dei casi clinici (Bakken and Dumler, 2000; Horowitz et al., 1998).

## **3.5. TERAPIA**

Dati empirici dimostrano che tutte le forme di anaplasmosi rispondono alle tetracicline (Maurin et al., 2003). Questo antibiotico è preferito perchè è somministrabile oralmente, meglio tollerato ed ha minori effetti collaterali nei bambino sotto gli 8 anni. L'eccellente suscettibilità in vitro supporta l'impressione clinica sull'efficacia delle tetracicline per debellare l'anaplasmosi HGA (Maurin et al., 2003). Nei casi in cui la doxiciclina è controindicata (gravidanza, allergia), alcuni dati supportano regimi alternativi, come il trattamento con rifampicina (Krause et al., 2003).

## **3.6. IDENTIFICAZIONE DI *A. phagocytophilum* IN *I. ricinus***

La ricerca del microrganismo nelle zecche è stata effettuata tramite *primer* diretti verso il gene 16S rRNA (Grzeszczuk et al., 2006) e verso il gene *ankA*, una delle componenti genetiche di *A. phagocytophilum* più studiate (Caturegli et al., 2000; Park et al., 2004). Il gene *ankA* codifica una proteina di circa 153-160 kDa con almeno 11 “*ankyrin repeats*” all'estremità N-terminali e un'estremità C-terminale con varie ripetizioni in tandem senza alcuna omologia con altre proteine. AnkA forma un complesso con la cromatina del nucleo dei granulociti infetti legandosi al DNA nucleare ricco in AT (Park et al., 2004). Un gene omologo ad *ankA* e usato ampiamente come bersaglio genetico negli screening su zecca è il gene *epank1* (Walls et al., 2000). La messa a punto della PCR specifica per il gene *epank1* su alcuni campioni di zecca raccolti sul Carso ha dimostrato una grande sensibilità e specificità di amplificazione per cui si è scelto questo sistema per analizzare le zecche provenienti dalla regione FVG e area transfrontaliera slovena.

## 4. ENCEFALITE TBE

L'encefalite TBE (tick-borne encephalitis) è una delle neuro-infezioni più pericolose in Europa ed Asia. Viene causata dal virus TBE (Figura 4.1) scoperto nel 1937 da Lev Zilber durante una spedizione nell'estrema Russia orientale alla ricerca dell'agente eziologico dell'encefalite acuta associata al morso della zecca (Gritsun et al., 2003).

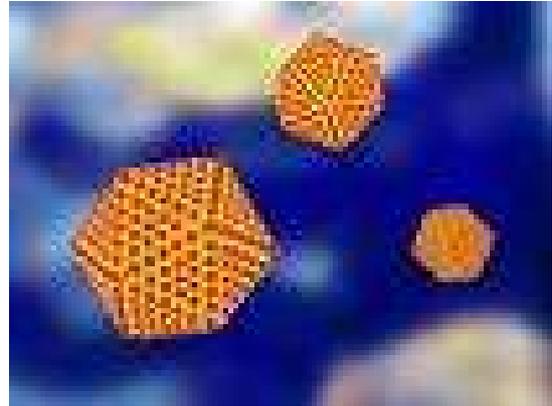


Figura 4. 1. Virus TBE

### 4.1. Virus TBE

#### Classificazione

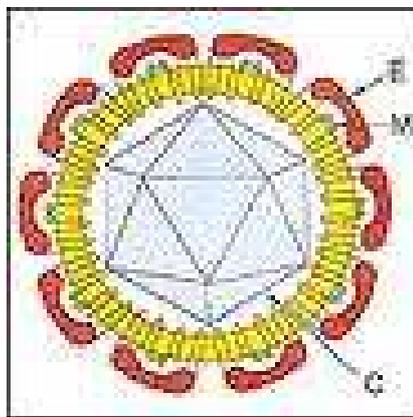
Il virus TBE appartiene al gruppo dei tick-borne flavivirus, famiglia *Flaviviridae*, genere *Flavivirus* (Heinz et al., 2000). La specie TBEV include tre sottotipi denominati Western European, largamente distribuito in Europa e trasmesso da *I. ricinus*, e i sottotipi Far-Eastern e Siberian presenti dal Far East fino ai paesi baltici e trasmessi da *I. persulcatus* ([www.tbe-info.com](http://www.tbe-info.com)). Sono dei virus complessi strettamente correlati tra loro che infettano il sistema nervoso centrale.

Diversamente dalla loro ampia diffusione geografica, i diversi ceppi di virus TBE sono strettamente correlati dal punto di vista antigenico tanto che per la maggior parte del primo periodo di ricerca si è creduto che circolasse un unico virus attraverso Europa, Siberia e estrema Russia orientale. L'esistenza di due differenti varianti genetiche, una europea e l'altra russa, è stata evidenziata nel 1944 (Chumakov et al., 1944) e le differenze tra questi virus vennero successivamente confermate da test serologici (Clarke, 1960). Sulla base della sintomatologia clinica e localizzazione geografica venne proposto un terzo sottotipo di virus TBE, confermato poi da analisi antigeniche (Gritsun et al., 2003). Il sequenziamento nucleotidico ha ora validato la distinzione tra i tre virus TBE, nonostante la loro stretta similitudine antigenica e biologica (Mandl et al., 1989; Pletnev et al., 1990; Safronov et al., 1991; Gritsun et al., 1993a, 1997; Wallner et al., 1995, 1996; Ecker et al., 1999) e li ha

definiti come tre sottotipi della stessa specie di virus TBE, chiamati western European, Siberian e Far Eastern (Heinz et al., 2000).

### Morfologia e genetica

I virioni maturi presentano un diametro di circa 50 nm e sono costituiti da un core elettron denso circondato da un doppio strato lipidico contenente due glicoproteine del mantello E (envelope) e M (membrana) (Figura 4.2). La glicoproteina M è presente nei virioni immaturi come precursore prM che subisce proteolisi diventando M durante l'uscita dei virioni dalla cellula (Gritsun et al., 2003).



**Figura 4. 2.** Morfologia del virus TBE.

La glicoproteina E è la principale proteina di superficie della particella virale. Interagisce con i recettori cellulari e media la fusione tra virus e membrana. Nei mammiferi, inoltre, induce la produzione di anticorpi neutralizzanti che giocano un ruolo importante nell'instaurare una risposta immunitaria protettiva nell'ospite (Heinz, 1986). Il core consiste di un genoma ad RNA a filamento singolo con polarità positiva di circa 11 kb in lunghezza, e una proteina C del capsido. L'RNA genomico contiene un ORF (open reading frame) e codifica una poliproteina di circa 3400 aminoacidi che viene tagliata da proteasi virali e cellulari nelle tre proteine strutturali (C, M, e E) e diverse proteine non strutturali (NS1-5). Durante il ciclo di infezione, le proteine NS3 (elicasi) e NS5 (RNA polimerasi-RNA dipendente) formano dei complessi di polimerizzazione che sono probabilmente associati alle membrane attraverso la proteina NS1 e NS2 (Lindenbach and Rice, 2001). La proteina NS1, in precedenza chiamata "antigene solubile", induce la risposta immunitaria protettiva contro i flavivirus (Gould et al., 1986; Schlesinger et al., 1986; Cane and Gould, 1988; Jacobs et al., 1992). L'ORF di tutti i

flavivirus è affiancato da una regione 5' UTR (UnTranslated Region) di circa 130 nucleotidi e una 3' UTR di circa 400-700 nucleotidi. In queste regioni l'RNA forma delle strutture secondarie definite "stem-loop" che probabilmente servono come elementi *cis*-attivi per l'amplificazione, traduzione o impacchettamento del genoma (Gritsun et al., 1997; Proutski et al., 1997; Rauscher et al., 1997).

Dal momento che il virus possiede un mantello lipidico, può essere inattivato dai solventi organici e dai detergenti. Comunque, l'RNA virale purificato e adeguatamente preservato dalla degradazione è ancora infettivo se iniettato direttamente nel cervello del topo (Gritsun and Gould, 1995).

## 4.2. EPIDEMIOLOGIA

### Ospiti vettore e trasmissione della malattia

Nell'ambiente naturale il virus TBE viene mantenuto in ciclo tramite le zecche e gli ospiti serbatoio (vedi capitolo 6, pag. 51). *I. ricinus* è la specie di zecche dure dominante in Europa e il vettore epidemiologicamente più importante per il sottotipo Western European TBE. I sottotipi Far Eastern e Siberian vengono trasmessi prevalentemente da *I. persulcatus* che comprende l'80-97% di tutte le specie di zecche presenti sugli Urali, Siberia e l'estrema regione orientale della Russia. In alcune regioni europee c'è una sovrapposizione di queste due specie (Gritsun et al., 2003).

Le zecche rimangono infette lungo tutto il loro ciclo dal momento che i virus si sono adattati alle caratteristiche comportamentali e fisiologiche delle zecche, in particolare al fatto che si nutrono di sangue, al tipo di digestione e al passaggio tra uno stadio di sviluppo e l'altro (Nuttall et al., 1994). La persistenza del virus nelle zecche avviene per trasmissione transovarica e transstadiale, ma anche per trasmissione del virus tra zecca infetta e non infetta quando queste pastano vicine (*co-feed*) sullo stesso ospite senza che quest'ultimo sviluppi una viremia rilevabile (Labuda et al., 1993). Infatti, la sezione cutanea su cui la zecca pasta è un importante sito per la replicazione virale dove le cellule circolanti fungono da veicoli per la trasmissione del virus dalla zecca infetta a quella non infetta tramite il *co-feeding*. Questi dati supportano l'idea che la viremia è probabilmente un prodotto, piuttosto che un prerequisito, della trasmissione del virus (Labuda et al., 1996).

### **Ruolo delle zecche e delle specie di roditori nella selezione delle varianti del virus TBE**

L'influenza delle zecche sulle proprietà biologiche del virus TBE è stato dimostrato in esperimenti di laboratorio (Khozinskaya et al., 1985; Gritsun et al., 2003; Labuda et al., 1994). Passaggi consecutivi in numero limitato del virus TBE esclusivamente nelle zecche ha portato alla selezione di varianti virali differenti dal virus parentale. In seguito al suo riadattamento all'ospite topo, il virus ha recuperato il suo fenotipo originale, suggerendo che i cambiamenti fenotipici, risultanti dalla selezione, hanno riguardato la proteina virale del mantello. Infatti, il sequenziamento della glicoproteina E del mantello ha evidenziato un aminoacido differente tra il virus originale e quello adattato alla zecca (Labuda et al., 1994). Un meccanismo di selezione dei virus con differenti caratteristiche patogene è stato suggerito sulla base di un confronto sistematico di sequenze della proteina E dei flavivirus (Gritsun et al., 1995). E' stato dimostrato che la distribuzione nella variazione degli aminoacidi nella proteina recettoriale E presente nel mantello non avviene a caso, ma è concentrata su 19 distinti gruppi di aminoacidi ipervariabili ai quali possono essere assegnate differenti proprietà biologiche, ad esempio: differenze antigeniche, mutazioni puntiformi tra il ceppo selvatico e quello vaccinale, alterato tropismo. La combinazione degli aminoacidi in questi *cluster* potrebbero determinare l'aspetto patogeno di un particolare isolato virale e possono essere considerati dei *marker* genetici. L'adattamento del virus TBE a specifiche cellule di mammifero è anche accompagnato da sostituzioni aminoacidiche multiple che hanno permesso di mappare i differenti *cluster* (Mandl et al., 2001).

L'ospite mammifero, inoltre, può influenzare la replicazione a breve termine del virus in un sito localizzato della pelle durante il co-feeding di zecche infette e non infette (Labuda et al., 1996). La trasmissione tramite il co-feeding può avvenire anche su un ospite immunizzato (Jones et al., 1997; Labuda et al., 1997) e questo può offrire un'opportunità per la selezione di virus mutanti naturali che sono presenti nella popolazione di flavivirus trasmessi da zecche (Gao et al., 1994).

### **Distribuzione del virus TBE nel mondo**

I sottotipi Far Eastern e Siberian sono largamente distribuita sugli Urali, in Siberia e nell'estrema Russia orientale, mentre il sottotipo Western European TBE domina in Europa, anche se in alcune regioni europee c'è una sovrapposizione con i sottotipi asiatici (Gritsun et al., 2003) (Figura 4.3).

Casi di encefalite TBE sono stati registrati in varie parti d'Europa (Figura 4.4), tra cui Austria, Croazia, Cechia, Estonia, Finlandia, Francia, Germania, Ungheria, Lettonia, Lituania, Polonia,

Slovacchia, Slovenia, Svezia e Svizzera (Roggendorf et al., 1981; Lindgren and Gustafson, 2001; Ormaasen et al., 2001; Gritsun et al., 2003, Herpe et al., 2007, Kaiser, 2008).



**Figura 4.3.** Distribuzione del virus TBE nel mondo.

In **Italia**, casi umani di encefalite TBE sono stati registrati dal 1967 in alcuni siti di infezione sporadici in Italia nord-orientale e centrale. Il virus è stato isolato per la prima volta in Toscana nel 1975 (Amaducci et al., 1978; Verani et al., 1979). Altri focolai d'infezione sono stati descritti negli anni '90 in 2 regione del nord-est d'Italia (Trentino Altoadige e Veneto), entrambe confinanti con l'Austria, dove l'infezione è storicamente endemica (Hudson et al., 2001). A livello nazionale soltanto 18 casi di TBE sono stati diagnosticati nel periodo 1975–1991, e 84 nuovi casi sono stati segnalati tra il 1992 e il 2001 (Ciufolini et al., 1999). Analisi biomolecolari dei virus isolati da campioni di zecca hanno dimostrato l'appartenenza di questi ceppi al sottotipo Western European TBE (Hudson et al., 2001; Caruso, 2003).



**Figura 4. 4.** Distribuzione del virus TBE in territori confinanti con l'area di studio.

In regione **Friuli Venezia Giulia** (FVG), studi di seroprevalenza hanno evidenziato una percentuale di seropositività per il virus TBE di 1.2% nel 1979 (Verani et al., 1979) e 0.6% nel 2003 (Cinco et al., 2004). L'encefalite TBE è storicamente conosciuta nella vicina Slovenia con un'incidenza annua, negli ultimi cinque anni, di 4.34, 1.37 e 10.30 nelle province di confine di Nova Gorica, Koper e Kranj (Logar et al., 2006). Nonostante ciò, il primo caso di encefalite TBE è stato diagnosticato soltanto nel 2003 in un comune pedemontano (Beltrame et al., 2005). Fino ad oggi sono stati notificati 32 casi di TBE in regione FVG, con un costante incremento di 4 casi all'anno tra il 2007 e il 2008 (dati gentilmente forniti dalla Direzione Regionale della Salute e della Protezione Sociale della Regione FVG).

### 4.3. PATOGENESI

#### **Sintomatologia clinica**

Il periodo medio di incubazione del virus TBE è di circa 7-14 giorni. I sintomi classici compaiono all'improvviso tanto che i pazienti possono a volte ricordare l'ora esatta della comparsa. In genere i primi sintomi includono affaticamento per circa 1-2 giorni, con dolore

alla nuca, spalle e parte bassa della schiena, aumento della temperatura corporea fino a 38-39°C e un senso di nausea accompagnato da vomito. In seguito i dolori muscolari diventano più gravi e rimangono localizzati alla nuca, spalle, parte bassa della schiena. In alcuni pazienti compaiono sintomi legati alla meningite. Va sottolineato che l'infezione umana con il virus TBE di sottotipi differenti risulta nello sviluppo di manifestazioni cliniche di severità variabile, perciò l'incidenza delle diverse forme (diversi gradi) di TBE varia nelle differenti regioni (Gritsun et al., 2003).

In Europa l'encefalite spesso è asintomatica oppure si presenta come un malessere simil-influenzale che soltanto nel 20%–30% dei pazienti progredisce in una seconda fase caratterizzata da disordini neurologici quali meningite, meningoencefalite e, in misura minore, meningoencefalomielite (Kaiser, 2008). Il decorso della malattia è generalmente senza sequele. I casi fatali sono inferiori all'1% e la malattia è meno grave nei bambini rispetto gli adulti (Kaiser *et al.*, 1999; Gritsun et al., 2003; Kaiser, 2008). In stati quali l'Austria la percentuale di casi fatali era del 1% circa prima della campagna vaccinale, e ora i casi fatali vengono raramente registrati sia in Austria che in quei paesi europei dove è stata attuata una vaccinazione di massa (Kunz et al., 1976, 1980; Barrett et al., 1999).

In Siberia circa l'80% delle infezioni da virus TBE (sottotipo Siberian) che portano a malattia presentano febbre senza sequele neurologiche. Sono frequentemente richiesti il ricovero in ospedale e particolari cure mediche e c'è la tendenza per i pazienti a sviluppare forme croniche di TBE quali forme paralitiche osservate in circa il 7-8% dei casi e l'epilessia di Kozshevnikov in circa il 4-5%. Circa il 7% dei pazienti muore dopo un'encefalite acuta (Gritsun et al., 2003).

Nell'estrema Russia orientale, invece, l'incidenza della TBE è inferiore che in Siberia, ma casi fatali e disabilità sono maggiori tanto che in alcune regioni raggiungono il 60% (Gritsun et al., 2003). L'infezione umana con il sottotipo Far Eastern porta alla forma più grave di disordini a livello del sistema nervoso centrale con la tendenza per il paziente a sviluppare meningoencefalite o poliencfalite accompagnata da perdita di coscienza e stanchezza cronica. I casi fatali variano tra il 20-60%. Forme lente di progressione della malattia sono state raramente osservate e la malattia è più grave nei bambini rispetto gli adulti (Gritsun et al., 2003).

## 4.4. DIAGNOSI

La diagnosi clinica necessita di conferma laboratoristica, data l'aspecificità della sintomatologia e, quindi, la necessità di differenziare l'infezione da virus TBE da altre cause di meningoencefalite.

### **I° fase: Isolamento del virus e Diagnosi molecolare**

Durante la prima fase della malattia (fase viremica), prima della siero-conversione, la diagnosi di encefalite TBE può essere confermata tramite isolamento del virus TBE dal sangue del paziente (Holzmann, 2003). Sempre in questa fase, il genoma del virus può essere ricercato nel sangue o liquor tramite trascrizione inversa associata a PCR (RT-PCR) (Holzmann, 2003). Nella seconda fase della malattia, quando c'è la comparsa dei sintomi neurologici, queste due metodiche diagnostiche non sono più applicabili (Puchhammer-Stöckl et al., 1995).

### **II° fase: Diagnosi sierologica**

Il metodo d'elezione per la diagnosi di laboratorio è l'esame sierologico. Gli anticorpi di classe IgM e IgG, diretti principalmente contro la glicoproteina E di membrana, sono evidenziabili nel siero e nel liquor. Vengono prodotti fin dall'inizio della seconda fase della patologia, in genere associata al ricovero ospedaliero del paziente in seguito alla comparsa di sintomi neurologici, e il loro titolo anticorpale sale rapidamente (Holzmann, 2003). Attualmente nella routine diagnostica i classici metodi di rilevazione di anticorpi quali la neutralizzazione, la fissazione del complemento e l'inibizione dell'emoagglutinazione (HI) sono stati sostituiti da saggi immunoenzimatici ELISA grazie alla semplicità di esecuzione e alla facilità di automazione di questa metodica (Holzmann, 2003).

## 4.5. PREVENZIONE

La vaccinazione è un efficace sistema di prevenire l'infezione da virus TBE (Kaiser, 2008).

I primi tentativi di creare un'immunoprofilassi contro il virus TBE sono stati fatti in Russia nei primi anni '40 utilizzando un vaccino inattivato preparato dal cervello di topo infettato con il virus. Da allora numerose generazioni di vaccini inattivati sono stati prodotti e testati nei trial clinici sull'uomo. Le proprietà protettive del vaccino inattivato sono in genere associate ai virioni, in particolare alla proteina E del mantello (Gritsun et al., 2003).

Il vaccino inattivato purificato e concentrato ha dimostrato di ridurre considerevolmente l'incidenza della TBE, particolarmente in Austria (Kunz et al., 1976,1980; Barrett et al., 1999; Heinz et al., 2004), dove il vaccino è stato usato estensivamente dal 1980; nei vaccinati che hanno completato il protocollo vaccinale di tre dosi è stata stimata una protezione del 96-99%. Il vaccino è sicuro sia negli adulti che nei bambini e stabilisce una memoria immunologica di lunga durata (Barrett et al., 1999). La crescente copertura vaccinale è risultata in un costante declino della morbilità della TBE in Austria con circa 50 casi di encefalite all'anno, a differenza dei 700 casi all'anno registrati nelle vicine Cechia e Slovacchia, dove un intenso programma vaccinale non è stato attuato (Gritsun et al., 2003).

Un vaccino simile a quello austriaco è disponibile in Russia. Esperimenti su topi hanno dimostrato che conferisce lo stesso livello di immunità del vaccino austriaco. In piccoli trial sull'uomo (600 000 individui) è stato dimostrato che il vaccino è altamente immunogeno e che possiede bassa reattogenicità, però la sua applicazione è limitata da problemi logistici ed economici per cui è difficile valutare la reale efficacia sulla popolazione. In alcuni casi è stato constatato che la malattia si manifesta anche nelle persone vaccinate, con la differenza che compare dopo un periodo di latenza prolungato. Ciò pone il problema della presenza di diversi ceppi di virus che sono antigenicamente diversi tra loro (Gritsun et al., 2003).

In questo momento si stanno sviluppando numerosi nuovi tipi di vaccini contro il virus TBE, incluso la produzione di particelle subvirali ricombinanti che rappresentano il mantello virale vuoto contenente le proteine E e prM (Heinz et al., 1995; Allison et al., 1999; Holzer et al., 1999). Anche un plasmide di DNA che esprime le proteine subvirali secrete è in grado di indurre protezione immunitaria contro dosi letali di virus TBE (Schmaljohn et al., 1997, 1999; Aberle et al., 1999). Inoltre, è stato dimostrato un ruolo protettivo indotto dalle proteine non-strutturali NS1, NS3 e NS5 che stimolano la produzione di cellule T (Kulkarni et al., 1992; Gagnon et al., 1996; Zeng et al., 1996; Chen et al., 1999) e di conseguenza includendo queste proteine non-strutturali ricombinanti nel futuro vaccino sintetico potrebbe migliorare le proprietà immunogene protettive.

#### **4.6. IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS TBE IN *I. ricinus***

La ricerca delle sequenze genomiche del virus TBE nelle zecche, vettori responsabili della diffusione del patogeno tra gli ospiti serbatoio e quelli finali, è stata attuata impiegando la tecnica della trascrizione inversa del RNA associata a PCR. Diversi monitoraggi della

presenza del virus nelle zecche sono stati effettuati amplificando bersagli relativamente costanti nella loro sequenza genica, quali il gene NS5 (Han et al., 2001 e 2005), la regione non codificante all'estremità 5' (5'NCR) dell'RNA virale (Han et al., 2001), e la regione non codificante all'estremità 3' (5'NCR) dell'RNA virale (Brinkley et al., 2008). Sono state disegnate anche coppie di *primer* specifiche per il gene E, che codifica la glicoproteina E di membrana (Puchhammer-Stöckl et al., 1995), un gene altamente variabile (Mandl et al., 2001) per il quale bisogna ridisegnare i *primer* in funzione della specifica sequenza genica del ceppo virale che circola in una determinata zona. Con questo sistema Hudson e coll. nel 2001 dimostrarono che il virus TBE presente nelle zecche delle province di Trento e Belluno presentava un'omologia superiore al 98% con le sequenze del virus TBE diffuso in Austria.

## 5. BABESIOSI

Il protozoo del genere *Babesia* è l'agente eziologico della babesiosi. Prende il nome da Babes Victor, il primo che nel 1888 in Romania individuò questo parassita come causa della “emoglobinuria febbrile nella mucca” (Vial et al., 2006).

In seguito tale patologia venne riscontrata in diversi animali e nel 1957 in Jugoslavia venne diagnosticato il primo caso di babesiosi nell'uomo (Kjemtrup and Conrad, 2000). Il fatto che anche l'uomo potesse essere infettato da tale patogeno era già stato ipotizzato nel 1904 da Wilson e Chowning che avevano chiamato questo patogeno con il termine *Pyroplasma Hominis* (Kjemtrup and Conrad, 2000).

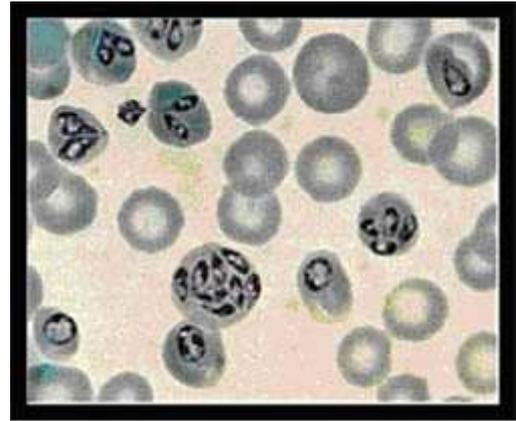


Figura 5.1. *Babesia* all'interno di eritrociti

### 5.1. *Babesia* spp.

#### Classificazione

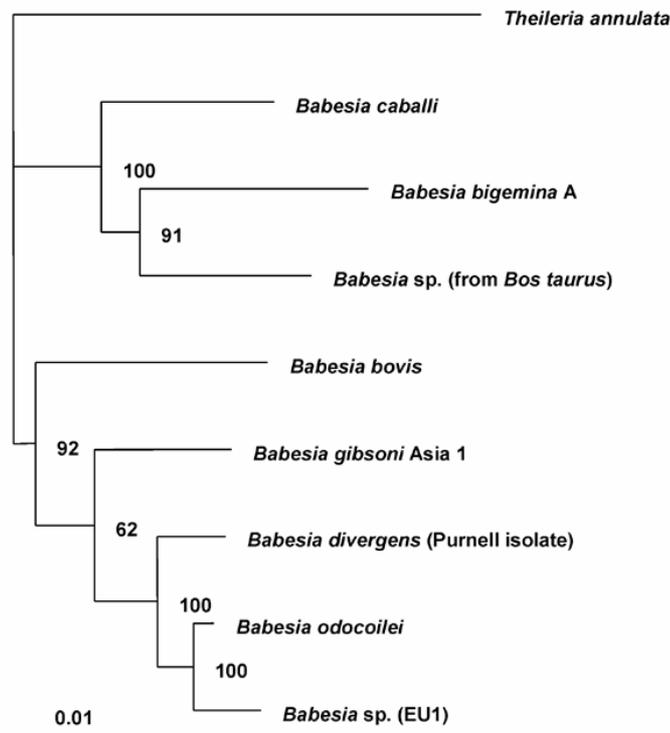
*Babesia* è un protozoo eucariota appartenente al phylum *Apicomplexa*, classe *Aconoidasica*, ordine *Piroplasmorida*, famiglia *Babesidae*. Inizialmente le specie di *Babesia* vennero identificate sulla base di parametri morfologici delle forme intra-eritrocitarie visibili al microscopio osservando strisci di sangue provenienti da animali infetti (Figura 5.1). La famiglia di *Babesia* è stata suddivisa in base alle dimensioni in due gruppi: le piccole babesie (1-2,5  $\mu\text{m}$ ) che comprende le specie *B. gibsoni*, *B. microti* *B. rodhaini* e le grandi babesie (2.5–5.0  $\mu\text{m}$ ) che include *B. bovis*, *B. caballi*, *B. canis*. Questa classificazione morfologica coincide con la caratterizzazione filogenetica basata sulla comparazione delle sequenze di DNA codificanti per la subunità ribosomiale 18S (Homer et al., 2000).

Attualmente sono state descritte più di 100 specie di *Babesia* che infettano una grande varietà di vertebrati (Tabella 5.1).

<b>Animali</b>	<b>Specie di <i>Babesia</i></b>
Bovini	<i>B.bigemina</i> , <i>B.bovis</i> , <i>B.divergens</i> e <i>B.major</i>
Pecore e Capre	<i>B.motasi</i> e <i>B.ovis</i>
Equini	<i>B.caballi</i> e <i>B.equi</i>
Maiali	<i>B.perroncitoi</i> e <i>B.trautmanni</i>
Cani	<i>B.canis</i> e <i>B.gibsoni</i>
Felini	<i>B.felis</i>
Roditori	<i>B.microti</i>
Ungulati selvatici	<i>B.capreoli</i> , <i>B.odocoilei</i> , <i>B.divergens</i>

**Tabella 5.1.** Specie di *Babesia* ed animale ospite

Recentemente è stata descritta una nuova specie denominata *Babesia* EU1 isolata da due pazienti, uno Austriaco e uno Italiano (Herwaldt et al. 2003). Il sequenziamento del gene 18S rRNA del parassita ha rilevato un'alta omologia con la specie *B. divergens*, anch'essa considerata patogena per l'uomo. Per questo nuovo ceppo scoperto in Europa, è stata proposta la classificazione di specie con il nome di *B. venatorum* (Figura 5.2) (Herwaldt et al., 2003).



**Figura 5.2.** Albero filogenetico basato sul sequenziamento del gene 18S rRNA che include la nuova specie EU1 (Herwaldt et al. 2003).

## Morfologia

*Babesia* ha una forma variabile, tipicamente piriforme ma anche rotonda, allungata o a sigaro.

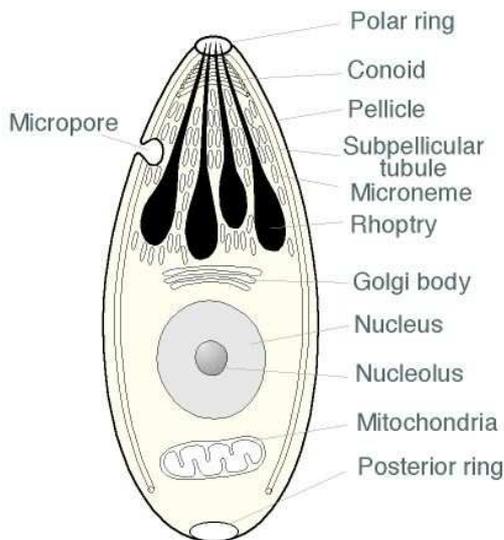


Figura 5.3. Struttura di *Babesia*

Il termine *Apicomplexa* è dovuto al fatto che questi protozoi presentano il **complesso apicale**, un apparato con funzione secretrice situato all'estremità anteriore; è costituito dall'anello polare formato dalle **roptrie**, organelli sacciformi con un lungo collo che si estendono nell'apertura dell'anello polare, e dai **micronemi** ossia piccole strutture sparse intorno alle roptrie. A questo livello avviene il riconoscimento dei recettori cellulari dell'ospite.

La morfologia di *Babesia* varia anche a seconda dell'ospite che il parassita infetta (Kakoma et al., 1993).

## Ciclo biologico

Il ciclo è in larga parte **intracellulare** con una fase di sviluppo **sessuata** (gamogonica) che ha luogo nel vettore, ed una **asessuata** (sporogonica) che si osserva nell'ospite vertebrato. I piroplasmidi sono parassiti dei globuli rossi in quanto rappresentano il loro habitat ideale: hanno una parete sottile, sono costantemente in movimento, assorbono materiale nutritivo ed eliminano facilmente prodotti metabolici. Inoltre, queste cellule hanno un alto contenuto proteico e contengono ossigeno ad alte concentrazioni. Il globulo rosso costituisce il mezzo di trasporto più conveniente per passare dall'ospite vertebrato al vettore ematofago (Homer et al., 2000).

I parassiti presenti negli eritrociti vengono ingeriti dal **vettore zecca** mentre questo morde per assumere il pasto di sangue. Nell'intestino della zecca avviene la fase sessuata della riproduzione di *Babesia* (Homer et al., 2000). Alcune di esse iniziano a formare dei nuovi organelli detti *Strahlenkorper* che si ritiene siano coinvolti nella fusione dei gameti (Kakoma et al., 1993; Rudzinska et al., 1983). Da quest'ultimo fenomeno si origina lo zigote che attraversa la parete intestinale e invade gli altri tessuti, raggiunge le ghiandole salivari attraverso l'emolinfa e passa alla fase di sporogonia con lo sviluppo degli **sporozoiti** che

vengono inoculati durante il successivo morso (Kakoma et al., 1998; Karakashian et al., 1983). Gli sporozoiti vanno a parassitare direttamente le emazie in cui avviene la riproduzione asessuata (merogonia) con formazione di **merozoiti**, cioè, nel globulo rosso si trasformano in **trofozoiti** che si dividono per scissione binaria dando origine a dei merozoiti che possono assumere varie forme (Homer et al., 2000). La formazione di questi merozoiti può portare alla lisi dell'eritrocita. Alcuni trofozoiti, invece, aumentano di dimensioni e dopo essere stati ingeriti da una nuova zecca, nel suo intestino danno origine a dei **gametofiti** che, una volta usciti dai globuli rossi, si sviluppano a formare dei gameti (Homer et al., 2000).

## 5.2. EPIDEMIOLOGIA

### Ospiti vettori e animali serbatoio

L'infezione degli Ixodidi ha origine da un pasto di sangue di alcuni giorni su animali infetti da *Babesia* in fase batteriémica, ma che non presentano i comuni sintomi dell'infezione (vedi capitolo 6, pag. 51). Questi animali, definiti animali riserva (serbatoio) di *Babesia*, sono piccoli roditori, volatili, caprioli, cervi. È rilevante notare l'esistenza di una associazione tra genospecie di *Babesia* e animali riserva (Tabella 5.1), nonché la distribuzione geografica: in Europa *B. microti* è stata trovata soprattutto nei volatili, mentre in USA è presente nei piccoli roditori; *B. divergens* è diffusa nel bestiame (Europa) e nei roditori (Giappone) (Leiby, 2006). La trasmissione transstadiale (utilizzata come unica modalità di trasmissione) avviene solo per due specie conosciute, *B. microti* e *B. equi*, per le quali non avviene la trasmissione transovarica. Per la maggior parte delle specie di *Babesia* esiste, invece, la trasmissione transovarica associata alla transstadiale. Per diverse specie di *Babesia* le zecche possono rimanere infettive per numerose generazioni successive (Uilenberg, 2006).

### Trasmissione della malattia

Le zecche trasmettono *Babesia* tramite il morso; a differenza degli animali riserva, che non mostrano alcun segno evidente della babesiosi, negli ospiti occasionali quali l'uomo l'infezione si arresta e c'è la possibilità che manifestino la malattia.

L'uomo può incontrare l'infezione anche per via **congenita** e per via **trasfusionale**. In America sono stati registrati casi di babesiosi neonatale in seguito a infezione congenita (Fox,

2006; Leiby, 2006), mentre sono stati riportati più di 50 infezioni da *B. microti* e 2 da *Babesia* WA-1 e CA-1 per trasfusione di sangue infetto (Leiby, 2006).

### **Distribuzione della babesiosi umana nel mondo**

Il primo caso di babesiosi nell'uomo è stato diagnosticato nel 1957 in Jugoslavia, mentre negli USA il primo caso umano si è registrato in California nel 1968 (Genchi, 2007). Le infezioni umane da *Babesia* sono causate principalmente da 2 specie: *B. microti* e *B. divergens*. Queste specie sembrano avere una loro distribuzione geografica ben definita, ovvero *B. microti* è presente soprattutto negli USA, mentre *B. divergens* predomina in Europa (Genchi, 2007) (Tabella 5.2). Queste specie, inoltre, presentano un vettore preferenziale diverso: in USA *B. microti* viene veicolata da *I. scapularis*, mentre in Europa *B. divergens* viene trasmessa da *I. ricinus* (Leiby, 2006).

Fino ad oggi sono stati riportati negli USA 300 casi di babesiosi umana: la specie prevalente era *B. microti* (Genchi, 2007). In **Europa** i casi registrati sono circa 60 in prevalenza causati da *B. divergens* (Genchi, 2007), ma anche da altre specie: il primo e, ad oggi, unico caso autoctono di *B. microti* è stato individuato in Germania nel 2007, mentre due casi di babesiosi causata da *Babesia* EU1 sono stati rilevati in Italia (Emilia-Romagna) e in Austria; di recente in Germania il ceppo di *Babesia* isolato da un paziente ha dimostrato un'alta omologia con la specie EU1, ed è stato formalmente definito come specie EU3 (Herwaldt et al., 2003 ; Haselbarth et al., 2008 ; Hildebrandt et al., 2007).

Anche se il numero di babesiosi umana in Europa non è elevato, diversi studi di seroprevalenza suggeriscono che *Babesia* circoli nell'uomo con una frequenza più alta di quanto suggerito dalla casistica. In Svizzera alcuni studi serologici hanno registrato una prevalenza di *B. microti* dell'1.5%, in Italia (Trentino) del 3.4%, in Germania dell' 1,7% per *B. microti* e dell' 11,5% per *B. divergens* (Genchi, 2007). Recenti studi di seroprevalenza effettuati su tutto il territorio Europeo hanno riportato un'incidenza del 3,6- 5,4% (Haselbarth et al., 2007), la maggior parte registrata in Francia e nel Regno Unito (Kjemtrup and Conrad, 2000).

Altri studi hanno posto l'attenzione sulla prevalenza di *Babesia* negli animali che eventualmente fungono da serbatoio e nei vettori. In Slovenia e in Francia la presenza di *Babesia* nei caprioli è risultata essere rispettivamente del 76,5% e 59% (Duh et al., 2005; Bonnet et al., 2007). *Babesia* è largamente diffusa nelle zecche della specie *I. ricinus* nei diversi paesi europei con prevalenze altamente variabili: si va da valori relativamente bassi dell'1% registrati in Germania (Hartelt et al., 2004), 1,5% in Cechia (Rudolf et al., 2005), del

2% in Polonia (Pleniasek et al., 2006) e 3,7% in Svizzera (Hilpertshausen et al., 2006) fino a valori più elevati (20.6%) in Francia (Halos et al., 2005). Studi condotti in territori confinanti con la nostra regione hanno dimostrato valori di prevalenza intermedi: un lavoro pubblicato da Duh e coll. nel 2001 ha riportato la presenza di *Babesia* nel 9,6% delle zecche analizzate in Slovenia, mentre in uno studio condotto su zecche nel territorio della provincia di Belluno è stata riscontrata una prevalenza di *Babesia* variabile tra l'1,6% e il 6% (Piccolin et al., 2006).

AGENTE EZIOLOGICO	DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA	VETTORI	OSPITI RISERVA
<u><i>Babesia microti</i></u>	USA (nordest) Europa	<i>Ixodes scapularius</i> <i>Ixodes trianguliceps</i> <i>Ixodes ricinus</i>	Piccoli roditori Volatili, piccoli roditori
<u><i>Babesia divergens</i></u>	Giappone Europa USA (KY, MO, WA)	<i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes ricinus</i> Sconosciuto	Piccoli roditori Bestiame Sconosciuto
<u><i>Babesia-like agents</i></u> WA-1, CA-1 EU-1	USA Europa (Austria, Italia)	<i>Ixodes pacificus?</i> <i>Ixodes ricinus</i> *	Sconosciuto Cervi, caprioli

\* Duh et al., 2005 Cervids as Babesiae Hosts, Slovenia.

**Tabella 5.2.** Caratteristiche tipiche delle specie di *Babesia* patogene per l'uomo (Leiby et al., 2006)

## 5.3. PATOGENESI

### Fattori di patogenicità

La patogenesi dell'infezione da *Babesia* è da ascrivere a 2 meccanismi principali: 1) la lisi degli eritrociti infettati con conseguente **anemia**, e 2) l'aumentata **citoaderenza** degli eritrociti all'interno dei vasi sanguigni. L'emolisi, sia intra che extra-vascolare, è causata dalla riproduzione asessuata del parassita all'interno delle emazie (Mosqueda et al, 2002 A e B; Hoyte 1965 e 1971). I globuli rossi infettati si presentano deformati e sono più rigidi della norma, questo fa sì che venga favorito il loro sequestro da parte della milza. Diverse specie di *Babesia* hanno sviluppato delle strategie per evitare la cattura da parte della milza attraverso un fenomeno di vasodilatazione generalizzata con conseguente ipotensione. Ciò fa sì che le emazie infette circolino con difficoltà e rimangano intrappolate in masse coagulate favorendo il moltiplicarsi dei parassiti. Il protozoo, una volta internalizzato nella cellula ospite, rilascia

le proteine SBP-1, SBP-2, SBP-3 al fine di creare le condizioni ottimali per la sua proliferazione (Ruef et al., 2000; Bannister and Mitchell, 2003). Queste proteine vengono secrete dal corpo sferico del complesso apicale che è presente nel genere *Babesia* al posto dei granuli densi (Hines et al., 1995a; Dowling et al., 1996; Ruef et al., 2000; Sam Yellowe, 1996). La fase eritrocitica di *Babesia* si manifesta con sintomi clinici severi quali febbre alta, anemia, ematuria, emoglobinuria nell'ospite infetto (Homer et al., 2000).

### **Sintomatologia clinica**

In Europa i casi di babesiosi umana sono da considerarsi come emergenze mediche, mentre negli USA sono più diffuse infezioni asintomatiche o subcliniche. I quadri clinici più gravi di babesiosi umana sono stati osservati in soggetti immunocompromessi, anziani o persone sottoposte a splenectomia (Homer, 2000).

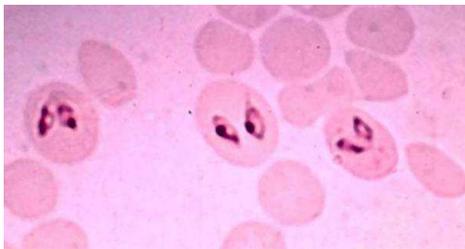
La sintomatologia, causata dalla lisi dei globuli rossi, inizia a svilupparsi a distanza di 1-6 settimane dal morso della zecca e può variare da forme asintomatiche a casi letali (Benach et al., 1981). L'andamento della malattia, infatti, dipende molto sia dalla specie di *Babesia* sia dallo stato immunitario dell'ospite, dall'età e dalla razza. Ci sono stati casi in cui l'infezione si è manifestata subito nella fase più acuta tanto da essere paragonabile alla malaria fulminante, con comparsa di febbre elevata (40 C°) malessere, spossatezza, anemia, mialgia (Homer, 2000). In alcuni casi si è avuta la comparsa di nausea, vomito, sudorazione notturna ed ematuria; tali sintomi sembrano essere legati ad una più elevata parassitemia (Benach et al., 1981; Persing et al., 1995). Le manifestazioni più acute dell'infezione possono durare da qualche giorno ad alcuni mesi e ciò si verifica nei casi più gravi soprattutto negli anziani e negli splenectomizzati (Homer, 2000). Le infezioni dovute a *B. divergens*, presente soprattutto in Europa, sembrano essere più gravi rispetto a quelle causate da *B. microti*. La presenza o l'assenza di molte manifestazioni cliniche generalmente dipendono dai livelli di parassitemia (Pruthi et al., 1995). Nei casi più gravi i pazienti possono andare incontro a uno stato simile allo shock, con edema polmonare e insufficienza renale (Gorenflot et al., 1998). Tra i possibili fattori aggravanti non ancora citati ci sono le **coinfezioni**, ovvero, la possibilità che un paziente possa venir infettato, oltre che da *Babesia*, anche da un altro patogeno (Mitchell et al., 1996; Krause et al., 2002).

## 5.4. DIAGNOSI

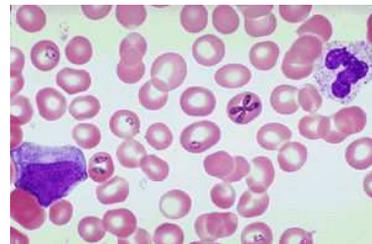
La diagnosi si basa sull'osservazione della sintomatologia clinica, tuttavia l'aspecificità e la sporadicità con cui si presenta la malattia richiede l'ausilio di metodiche diagnostiche di laboratorio.

### Diagnosi diretta

L'indagine di laboratorio tradizionale e più attendibile è la ricerca microscopica dei parassiti negli strisci ematici dopo colorazione con Giemsa (Figura 5.4). Si possono notare in tal caso delle forme intra-eritrocitarie ad anello, con nuclei periferici ben colorati (porpora) e una sezione centrale citoplasmatica chiara che può essere azzurrina (Krause, 2003). La specie *B. microti* presenta dei merozoiti di circa 1,5-2  $\mu\text{m}$  (Kakoma et al., 1993), mentre quelli di *B. divergens* sono di dimensioni variabili da 1 a 3  $\mu\text{m}$  (Gorenflot et al., 1998). Oltre alle forme ad anello, sono riscontrabili configurazioni piriformi (i trofozoiti) che possono essere singole o in coppia, in rari casi si possono trovare 4 merozoiti all'interno di un globulo rosso uniti all'apice in senso verticale ed orizzontale (configurazione a croce maltese). I parassiti risultano individuabili nel sangue periferico per un tempo che va da 3 a 12 settimane dall'infezione (Ruebush et al., 1977).



*B. bigemina*



*B. microti*

**Figura 5. 4.** Morfologia di alcune specie di *Babesia* in strisci di sangue osservati al microscopio.

### Diagnosi sierologica

La ricerca di anticorpi anti *Babesia* viene effettuata tramite immunofluorescenza indiretta che ha dimostrato una buona sensibilità e specificità nella diagnosi delle infezioni croniche da *B. microti*. Questo test utilizza antigeni derivati da criceti di laboratorio infettati da *B. microti* (Telford et al., 1998). Nella fase acuta dell'infezione il titolo anticorpale può essere da 10 a 20 volte più alto del cut off con un declino costante in un periodo che può variare da settimane a

mesi (Pruthi et al., 1995). Il titolo dell'anticorpo può rimanere elevato per un periodo che può andare da 13 mesi fino a 6 anni (Persing et al., 1995). Nei casi di test negativi o inconclusi, IFATs (indirect immuno-fluorescent anti-body tests) è ancora un test sensibile e specifico (Brandt et al., 1977). Il lato negativo del test sierologico è che altri parassiti protozoi potrebbero creare una cross-reattività generando falsi positivi (Persing et al., 1995). Diversamente, pazienti immunodepressi e pazienti i cui campioni ematici vengono raccolti all'inizio dell'infezione possono dare falsi negativi (Benezra et al., 1987; Ong et al., 1990), mentre i pazienti splenectomizzati e HIV positivi generalmente hanno un titolo molto basso (Homer, 2000).

### **Xenodiagnosi**

E' un tipo di diagnosi che prevede l'inoculazione in animali suscettibili di un campione di sangue prelevato dal soggetto in esame. Per le infezioni da *B. microti* viene utilizzato il criceto, mentre per quelle da *B. divergens* i gerbilli o bovini splenectomizzati. Il limite maggiore di questa tecnica consiste nel fatto che non tutte le specie di *Babesia* che infettano l'uomo sono in grado di moltiplicarsi negli animali da laboratorio; inoltre, c'è da considerare il tempo di latenza poichè sono necessari da 7 a 10 giorni prima che i parassiti siano visibili. Questa tecnica viene utilizzata nel caso i livelli di parassitemia siano particolarmente bassi (Gorenflot et al., 1998).

### **Coltivazione in vitro**

*Babesia* può essere coltivata in vitro, sia a scopo diagnostico che di mantenimento del ceppo. La tecnica utilizzata viene indicata con il termine MASP (microaerophilous stationary phase). Questo sistema di coltivazione è il più conveniente per la crescita di *Babesia*. Il livello di sensibilità di questa metodica ai fini diagnostici è alquanto basso, viene perlopiù utilizzata per amplificare possibili infezioni con bassa parassitemia, ma non è indicata per la diagnosi nell'uomo (Canning et al., 1987; Goff et al., 1988).

### **Diagnosi molecolare**

Ci sono casi di persone con parassitemia molto bassa che potrebbero sfuggire all'individuazione e che pertanto necessitano di tecniche più sensibili come le metodiche molecolari. Sono state sviluppate PCR in grado di individuare l'infezione da *Babesia* attraverso l'amplificazione di specifiche sequenze del genoma del protozoo. Il primo target utilizzato da Persing et al. nel 1992 è stato una porzione del gene 18S rRNA che si è rivelato

ottimale perché è presente in molte copie in ciascun organismo. In seguito, diverse coppie di *primer* dirette verso altre porzioni del gene 18S rRNA sono state impiegate con successo nella diagnosi molecolare di babesiosi sia nell'uomo che negli animali (Herwaldt, 2003; Haselbarth, 2007; Centeno-lima, 2003; Caccio et al., 2002; Hildebrandt, 2007).

## 5.5. TERAPIA

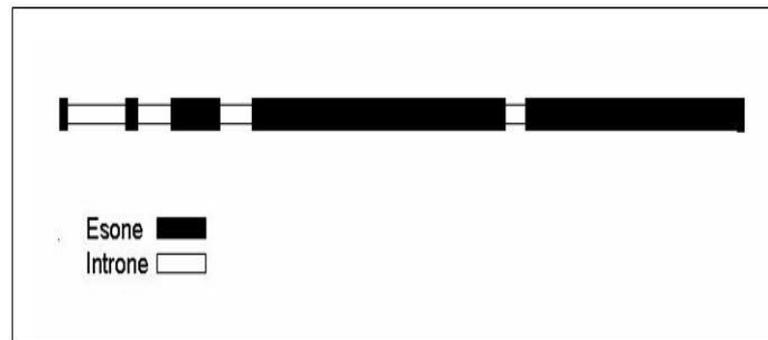
Inizialmente, diversi farmaci antimalarici, inclusa la **cloroquina**, sono stati utilizzati nel trattamento della babesiosi, erroneamente diagnosticata come infezione da *P. falciparum*. L'azione antinfiammatoria della cloroquina contribuisce all'abbassamento della febbre, ma non agisce sul parassita e non rappresenta perciò una valida opzione terapeutica. Nel 1982, per la prima volta, è stata sperimentata una combinazione di **clindamicina** e **chinina**. Questa associazione di farmaci ha iniziato ad essere il trattamento di prima scelta per questa infezione anche se nei casi di pazienti splenectomizzati e affetti da HIV sembra non essere sufficiente. Successivamente si è sperimentata una seconda combinazione di sostanze quali **atovaquone** e **azitromicina** che si è dimostrata valida. Recenti indagini hanno evidenziato che le due terapie hanno un'efficacia paragonabile nel trattamento dei sintomi lievi e moderati, anche se azitromicina e atovaquone sono più vantaggiosi perché meglio tollerati. Comunque, per le infezioni gravi in cui la parassitemia nel sangue è superiore al 5% viene scelta la cura con clindamicina e chinina (Krause, 2003).

Per quel che riguarda la babesiosi negli animali, il medicinale utilizzato è attualmente l'**imidocarb**, chemioterapico non impiegato nell'uomo, che blocca l'entrata di inositolo negli eritrociti causando la morte delle babesie (Vial et al, 2006).

## 5.6. IDENTIFICAZIONE DI *Babesia* IN *I. ricinus*

Dal momento che la zecca è il vettore responsabile della diffusione del patogeno tra gli ospiti serbatoio e quelli finali, il monitoraggio della prevalenza di *Babesia* nelle zecche è uno dei sistemi di sorveglianza attuato in molti paesi colpiti dalla babesiosi. Per amplificare il DNA del patogeno presente nell'estratto di zecca sono stati impiegate numerose coppie di *primer* dirette verso il gene 18S rRNA con sensibilità molto diverse (Bonnet, 2006; Foppa, 2002; Piccolin et al., 2006; Armstrong, 1998; Grey, 2002; Wojcik-Fatla, 2006; Casati, 2006).

In un lavoro realizzato nel 2000 da Cacciò e coll, sono stati disegnati dei *primer* specifici il gene che codifica la  $\beta$ -tubulina di *Babesia* ( Figura 5.6), una proteina presente nei microtubuli delle cellule e importante nella formazione del citoscheletro. La presenza, dentro il frammento del gene amplificato, di un introne che varia ampiamente in lunghezza e sequenza, ha permesso di differenziare le specie direttamente sulla base del peso molecolare del prodotto di amplificazione.



**Figura 5.6.** Gene della  $\beta$ -tubulina di *Babesia*

Il sistema è stato messo a punto su sette specie diverse dimostrando di essere in grado di identificare specie di *Babesia* filogeneticamente distanti tra loro. Trattandosi di una *nested-PCR* (vedi pag 12), la sensibilità del sistema risulta più elevata rispetto alle altre PCR; ciò che viene visualizzato è il prodotto della seconda amplificazione.

L'impiego di questo sistema di amplificazione, associato ad un sistema di PCR specifico per il gene 18S rRNA, ci è sembrato l'approccio migliore per attuare un primo screening della presenza di *Babesia* spp. sul territorio del Carso triestino.

## 6. LA ZECCA *I. ricinus*

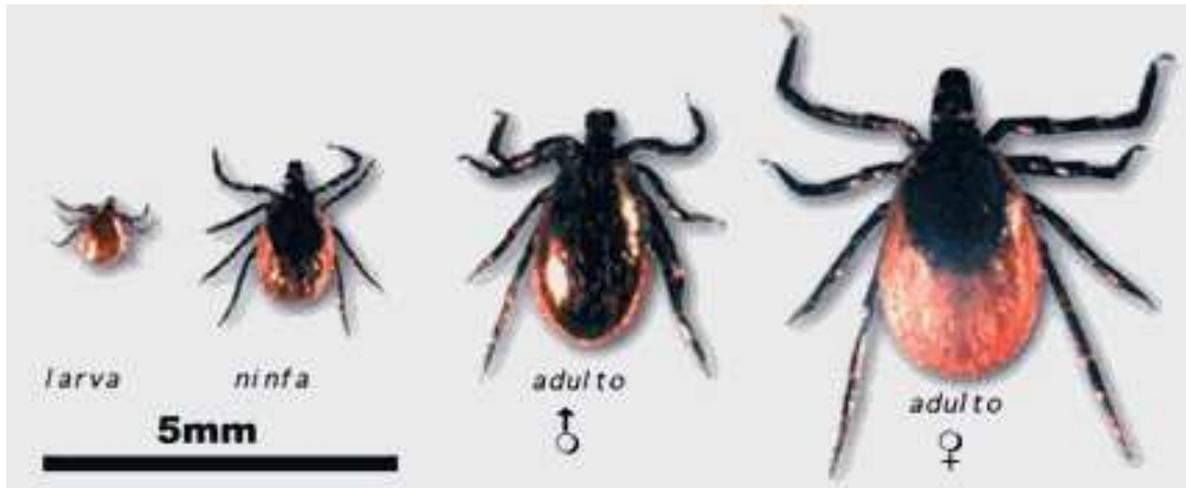
Le zecche sono **vettori** in grado di trasmettere l'infezione di vari agenti patogeni, tra cui *B. burgdorferi* (Barbour and Hayes., 1986), virus TBE (Gritsun et al., 2003), *Rickettsia* spp. (Parola and Raoult., 2001), *A. phagocytophilum* (Dumler et al., 2001) e *Babesia* spp. (Leiby, 2006), da un ospite all'altro tramite il morso durante il pasto di sangue. Le zecche del genere *Ixodes* (o zecche dure) sono artropodi ematofagi appartenenti alla classe degli Aracnidi, sottoclasse Acari. Come già accennato nei capitoli precedenti, presentano una notevole specificità territoriale: in Europa, e in particolare nella nostra regione FVG, il vettore è rappresentato da *I. ricinus*, nel continente Nordamericano dominano *I. scapularis* e *I. pacificus*, mentre *I. persulcatus* è l'ematofago prevalente nel continente asiatico (Tabella 6.1).

IXODIDAE	SPECIE	TERRITORIO
	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i> <i>I. scapularis</i> <i>I. pacificus</i>	<i>Europa</i> <i>Russia, Asia</i> <i>Nord-Est Stati Uniti</i> <i>Ovest Stati Uniti</i>

**Tabella 6.1.** Distribuzione delle principali specie di *Ixodes* nel mondo.

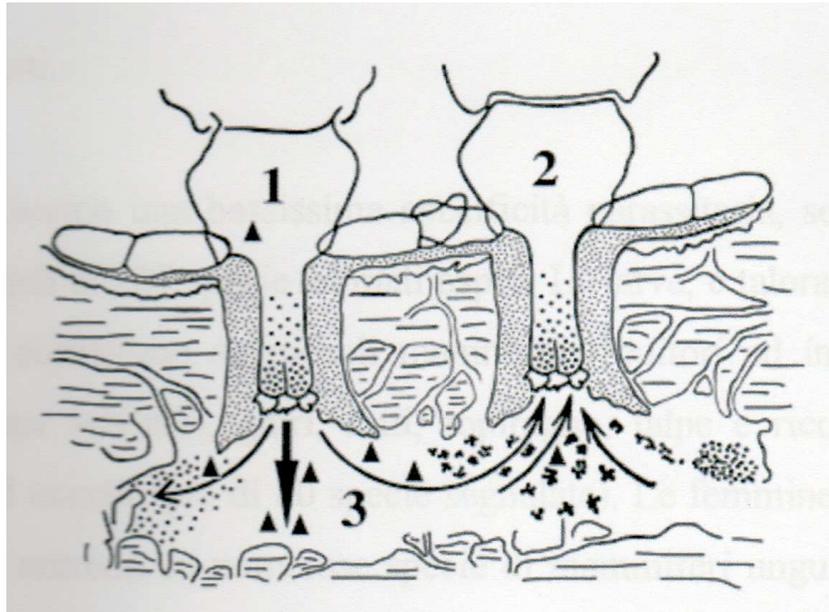
Le dimensioni del corpo di *I. ricinus* variano da 1 a 8 mm, le femmine dopo il pasto di sangue possono raggiungere 1 cm di lunghezza. Le forme adulte e ninfali presentano 8 zampe, mentre le larve sono esapodi. Nelle forme mature è possibile distinguere il sesso della zecca grazie alla colorazione rosso scuro dello scudo nella femmina. La riproduzione è sessuata e avviene sull'ospite vertebrato, tuttavia sono state osservate femmine inseminate anche prima del pasto ematico, indice che la copula può avvenire anche sul terreno (Manilla, 1998).

Il ciclo biologico di *I. ricinus* è composto da 3 stadi di sviluppo separati da mute: larva, ninfa e adulto (Figura 6.1); il parassitismo obbligato, ovvero, il pasto di sangue su un ospite, è la condizione necessaria per il passaggio da uno stadio di sviluppo a quello successivo (Manilla, 1998).



**Figura 6.1.** Stadi di sviluppo della zecca: larva, ninfa e adulti (maschio e femmina)

*I. ricinus* fa parte della categoria delle zecche a “tre ospiti” o polifasiche, cioè, che pastano su individui diversi ad ogni stadio (Figura 6.3). La presenza dell’ospite è captata dal parassita tramite l’organo di Haller, posto sulle zampe anteriori, che rileva le tracce di CO<sub>2</sub>, ammoniaca, acido lattico e movimento. Una volta percepiti gli stimoli, la zecca si lascia cadere sull’ospite; normalmente le zecche sono più attive nelle ore diurne (Manilla, 1998). Durante il pasto sull’ospite la zecca rilascia alcune sostanze con la saliva: sostanze anestetiche, anticoagulanti, antinfiammatorie e immunosoppressive. Ad ogni pasto la zecca si attacca all’ospite con l’apparato boccale e inizia a nutrirsi alternando momenti di suzione e rigurgito: l’adulto si nutre in media per 14 giorni, la ninfa per 7-8 giorni mentre la larva al massimo per 6 giorni. Durante il pasto vi è reciproco scambio di sostanze, microrganismi e tossine dall’ospite al parassita e viceversa (Cheng et al., 1964; Manilla, 1998). Gli *Ixodidi* si possono infettare durante un pasto di sangue di alcuni giorni su animali infettati, ma che non presentano sintomi. Questi animali prendono il nome di **animali riserva** o **animali serbatoio**, vale a dire specie in cui il patogeno riesce a sopravvivere anche per tutta la vita senza dare segni evidenti nell’ospite. Animali riserva possono essere caprioli, roditori, lepri, uccelli e altri. Oltre all’infezione degli *Ixodidi* derivante dalla suzione di sangue infetto da animali serbatoio, è stato osservato anche il **fenomeno del cofeeding** (Figura 6.2), ovvero il passaggio dell’agente patogeno da una zecca infetta ad un’altra non infetta quando pastano vicine (Randolph et al., 1996). In sostanza, l’affollamento contemporaneo di più zecche in suzione su una ristretta superficie cutanea, favorirebbe il passaggio delle spirochete tra zecche contigue prima della loro diluizione nel torrente circolatorio.



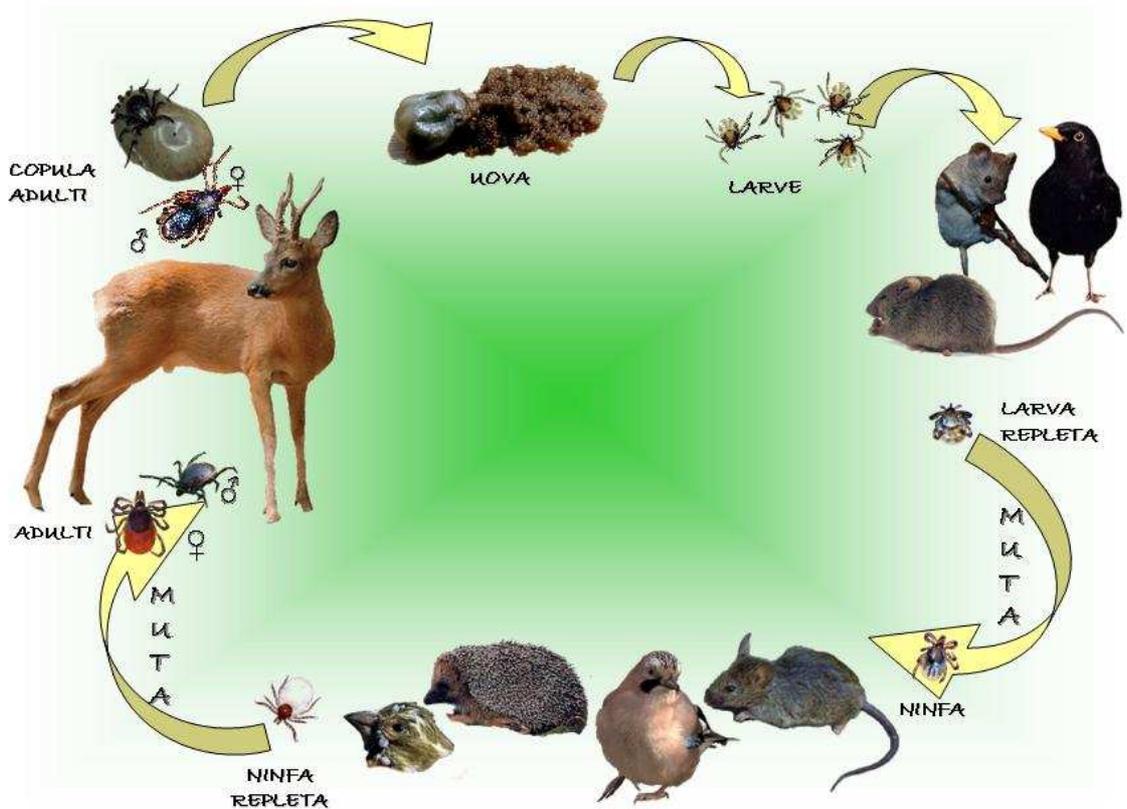
**Figura 6.2.** Schema dell'infezione di *I. ricinus* tramite *cofeeding*: 1) zecca infetta che trasmette il patogeno, 2) zecca non infetta che acquisisce l'infezione, 3) focus dell'infezione.

Mentre gli animali riserva non presentano sintomi, questo non accade per gli **ospiti occasionali**, tra cui l'uomo, nei quali l'infezione si arresta e c'è la possibilità che manifestino la malattia pur non trasmettendo a loro volta l'infezione (Littman, 2003).

E' importante definire come, una volta infettata la zecca, tale infezione venga mantenuta e trasmessa ad altri organismi: si parla di trasmissione verticale e trasmissione orizzontale dell'infezione. Con il termine **trasmissione verticale** si indica sia la trasmissione trans ovarica che la trasmissione transtadiale. Nella **trasmissione transovarica**, l'infezione primaria viene acquisita dalle femmine adulte che trasmettono il patogeno per via ovarica alla generazione successiva, la quale sarà infettiva per l'ospite vertebrato in tutti gli stadi di sviluppo grazie alla **trasmissione transtadiale** (Crippa et al., 2002; Nefedova et al., 2004). Per **trasmissione orizzontale** si intende il propagarsi dell'infezione ad animali non infetti e, dunque, in questo caso gli *Ixodidi* fungono da amplificatori dell'infezione, oltre che serbatoio della stessa.

La durata totale del ciclo biologico di *Ixodes* (1-3 anni) varia in relazione a numerosi fattori quali, ad esempio, la reperibilità dell'ospite e le condizioni ambientali. L'umidità relativa infatti influenza il ciclo, che può avere una dinamica stagionale di tipo bimodale, con un picco di abbondanza nei mesi primaverili (marzo-aprile) e poi un secondo picco in autunno (settembre-ottobre). Questa tendenza bimodale si ritrova in particolare nelle zone endemiche

per la Borreliosi di Lyme. *I. ricinus* si trova in massima concentrazione tra i 500 e i 1000 m, mentre è molto rara sopra i 1500 m (Furlanello et al., 2003). La vegetazione ha un ruolo importante nella presenza della zecca che preferisce zone collinari e montagnose in prossimità di arbusti ed erba incolta, in boschi (latifoglie o misti) ricchi di lettiere ed humus. Un ciclo veloce di circa un anno si ha nelle condizioni ottimali di umidità relativa prossima al 90% e temperatura tra i 17 e i 28 C° (Manilla, 1998).



**Figura 6.3.** Ciclo biologico di *I. ricinus*. (Dr.ssa Barbara Boemo)

# SCOPO DELLA TESI

## 7. SCOPO DELLA TESI

Da quanto espresso nell'introduzione si può asserire che le infezioni trasmesse da *I. ricinus* nella Regione Friuli Venezia Giulia sono un problema in costante aumento. Il morbo che registra il maggiore numero di casi è la borreliosi di Lyme annoverando circa 100 nuovi pazienti all'anno, un valore probabilmente sottostimato. Di non minore importanza risulta l'encefalite da virus TBE, mentre cinque casi clinici di anaplasmosi sono stati descritti di recente nell'alto Friuli. Sebbene non segnalati, casi di rickettiosi e babesiosi sono stati diagnosticati in territori confinanti con la nostra regione.

Dal momento che la presenza e prevalenza di un agente infettante nel suo vettore è un parametro importante per la valutazione del rischio, lo scopo del presente lavoro è stato quello di svolgere un'indagine per stabilire la prevalenza di patogeni trasmessi da zecche in campioni di *I. ricinus* raccolti all'interno del territorio del FVG e lungo l'area slovena a ridosso del confine orientale. Il monitoraggio del territorio tramite la conoscenza del grado di infettività nel vettore può infatti rappresentare un valido strumento di controllo nell'ambito delle misure preventive nei confronti delle zoonosi trasmesse da zecche.

E' stata quindi progettata una mappatura del territorio regionale al fine di identificare le zone a rischio per *B.burgdorferi*, virus TBE, *Anaplasma*, *Rickettsia* e *Babesia*, in campioni di zecca *I. ricinus* seguendo le seguenti tappe:

- ▶ Individuare apposite stazioni di raccolta in ambienti fitoclimatici rappresentativi del territorio e raccolta di esemplari di zecche;
- ▶ Nelle zecche raccolte effettuare la ricerca dei sopracitati patogeni impiegando tecniche di biologia molecolare; la successiva genotipizzazione dei campioni risultati positivi avrebbe poi consentito di individuare le specie infettanti;
- ▶ I risultati di prevalenza dei patogeni nelle zecche e l'abbondanza di quest'ultime avrebbero permesso di valutare il rischio potenziale di tali infezioni nell'area di studio;
- ▶ Mediante l'utilizzo di Sistemi Informativi Geografici (GIS), inoltre, si è pensato di integrare i dati ambientali ritenuti responsabili della distribuzione e dell'abbondanza delle zecche sul territorio con l'abbondanza delle zecche raccolte e i risultati di prevalenza di *B. burgdorferi* nel vettore al fine di sviluppare una **mappa di rischio per il morbo di Lyme** riferita a tutto il territorio della regione FVG;
- ▶ Infine, mi sono proposta, sulla base dei dati ottenuti con le prevalenze riscontrata verso i singoli patogeni, di disegnare un sistema *multiplex* PCR al fine di rilevare la co-presenza dei microorganismi patogeni *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. e *Babesia* spp. con un'unica reazione di amplificazione.

# MATERIALI E METODI

## 8. MATERIALI E METODI

### 8.1. Area di studio

L'area di studio comprende la regione Friuli Venezia Giulia ed una parte del territorio transfrontaliero della Slovenia (Figura 8.1); è un'area altamente eterogenea e la geologia è caratterizzata da terreno calcareo e dolomiti. L'altitudine varia di circa 3000 m attraverso una distanza di soli 160 km lungo l'asse nord-sud. Il clima muta da mediterraneo/sub-mediterraneo lungo la costa a sub-mediterraneo/sub-atlantico nelle prealpi e alpino/artico in montagna (Poldini and Feoli 2001).

Le stazioni di raccolta delle zecche sono state definite in base ai seguenti criteri:

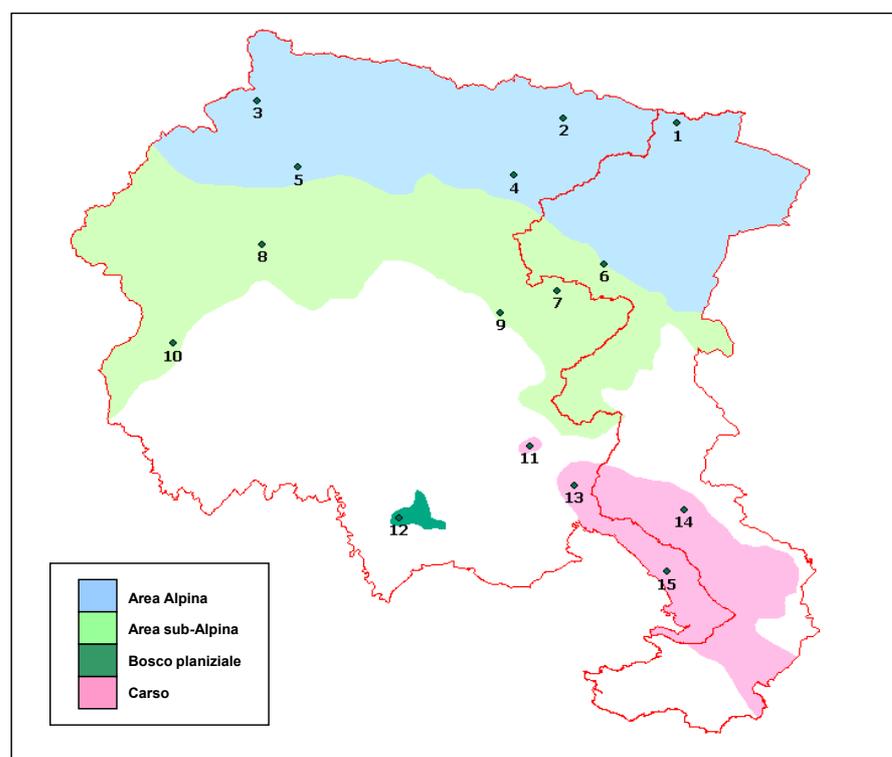
- distribuzione e numero di casi di borreliosi di Lyme,
- distribuzione e numero di casi di encefalite TBE,
- habitat ottimali per la sopravvivenza e lo sviluppo di *Ixodes ricinus*,
- aree rappresentative dal punto di vista ambientale,

e sono state collocate in quattro diverse zone fitoclimatiche identificate seguendo la classificazione biogeografica descritta da Poldini e Feoli (2001):

1. La **Zona 1 (area alpina)** comprende il territorio alpino nella parte settentrionale dell'area di studio. La grande prossimità dell'arco alpino al mare influenza fortemente le caratteristiche morfologiche e strutturali delle valli, che sono profondamente incise, con pendenza del 11%–12% e solcate da torrenti. Le montagne raggiungono picchi di oltre 2600 m. La precipitazione annuale è di 1500–1600 mm. L'arco alpino comprende in maggioranza conifere e sottobosco, è caratterizzato da complessi vegetazionali appartenenti agli ordini *Fagetalia* (*F. sylvaticae*), *Vaccinio-Piceetalia* e *Erico-Pinetalia* (*Pinus sylvestris*). Foreste di abete rosso di Norvegia sono presenti ad altitudini maggiori, anche se le vette più alte sono dominate dalle specie *Pinus nigra* e *Pinus sylvestris*.
2. La **Zona 2 (area prealpina)** è posizionata immediatamente a sud della zona alpina: è un'area subalpina nella quale l'altitudine decresce fino a 600 m e le precipitazioni sono di 3000 mm. Quest'area è dominata da comunità di piante appartenenti all'ordine *Fagetalia* (boschi di fagete).
3. La **Zona 3 (bosco planiziale)**, che include soltanto la stazione di Selva D'arvonchi (ID 12), rappresenta ciò che rimane della foresta che un tempo ricopriva la maggior parte della pianura friulana. L'intensa attività umana in quest'area ha ridotto notevolmente la diversità e la densità della vegetazione lasciando un basamento frammentato di

coenosi transitoria di boschi composti da querce *Quercus petraea* (*Erhytronio-Carpinion*) e carpini (*Carpinion orientalis*).

4. La **Zona 4 (area carsica)** include il roccioso paesaggio carsico localizzata nella parte più orientale del Friuli Venezia Giulia a cavallo del confine italo-sloveno. Il Carso è un altipiano calcareo che si erge ripido dalla costa (altitudine media 250 m) interrotto da una serie di colline che possono raggiungere anche i 670 m. La superficie del territorio è caratterizzata da diversi aspetti morfologici, alcuni dei quali del tutto particolari: ad esempio doline, scogliere, gole. Le doline sono sicuramente le più tipiche conformazioni territoriali del carso: sono delle depressioni del terreno con umidità relativa molto alta, forte escursione termica e una vegetazione molto ricca. Ha un clima di transizione che varia dal clima mediterraneo lungo la costa fino a un clima con evidenti caratteristiche continentali sull'altipiano. La vegetazione consiste in un gradiente di piante mediterranee lungo la costa e una coenosi continentale nella zona interna più alta. La vegetazione è strettamente correlata al tipo di clima; ingenerale predominano una vegetazione di tipo meso-mediterranea (*Ostryo-Quercetum ilicis*) e gariga (*Stipo-Salvietum officinalis*). La stazione di campionamento “Colle di Medea” (ID 11) rientra in questa area specifica senza tuttavia esserne completamente rappresentata.



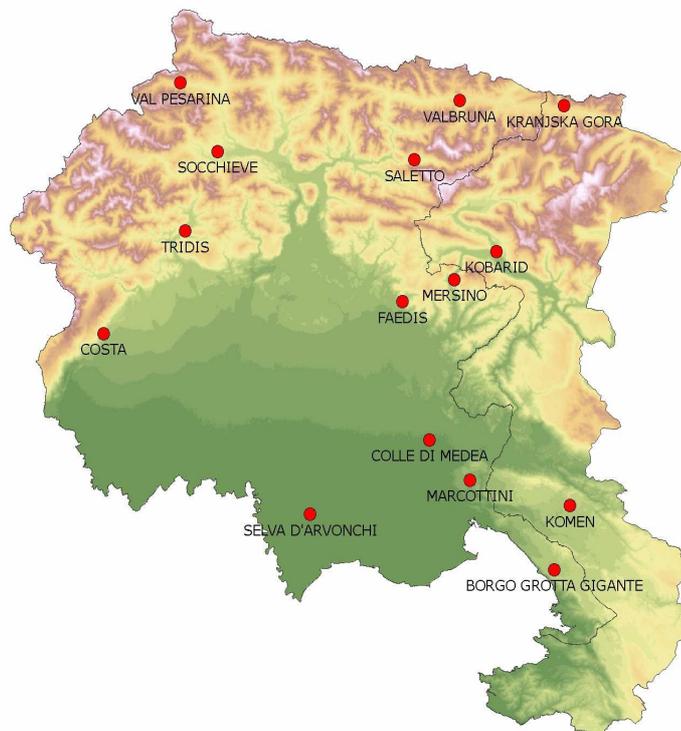
**Figura 8.1.** Regione FVG e territorio transfrontaliero Italia – Slovenia: aree biogeografiche.

Molte specie di animali selvatici e domestici sono presenti nell'area di studio. La fauna selvatica include caprioli (*Capreolus capreolus* L.), cinghiali (*Sus scrofa* L.), volpi rosse (*Vulpes vulpes* L.), scoiattoli (*Sciurus vulgaris* L.), lepri (*Lepus europaeus*), topi (*Apodemus* spp.), lucertole (*Podarcis muralis*) e svariate specie di uccelli residenti e migratori.

Nel **2005** sono stati campionati 15 siti (Tabella 8.1 e Figura 8.2); le raccolte sono state ripetute per tre volte nell'arco dell'anno, in primavera, estate e autunno, per un totale di 45 rilievi.

Zona	ID	Località (m a. s. l.)
1	1	Kranjska gora (947)
	2	Valbruna (836)
	3	Val Pesarina (558)
	4	Saletto (558)
	5	Socchieve (450)
2	6	Kobarid (293)
	7	Mersino (842)
	8	Tridis (425)
	9	Faedis (242)
	10	Costa d'Aviano (346)
3	12	Selva d'Arvonchi (3)
	11	Colle di Medea (101)
	13	Marcottini (89)
	14	Komen (264)
	15	Borgo Grotta Gigante (212)

**Tabella 8.1.** Elenco delle stazioni campionate nell'anno 2005.

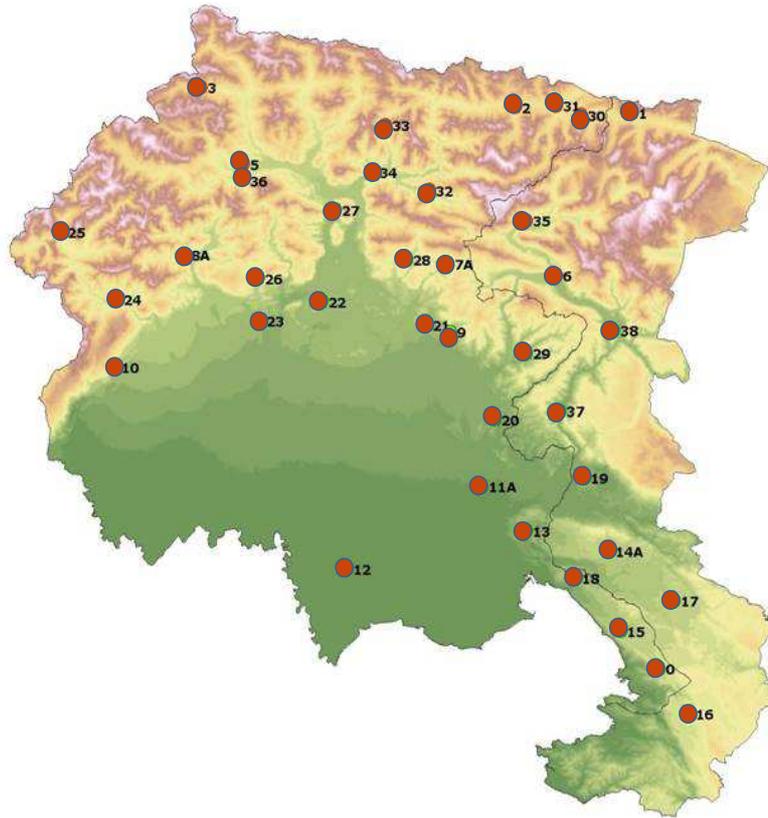


**Figura 8.2.** Stazioni di campionamento 2005.

Nell'anno **2006** è stato aumentato il numero di siti di campionamento al fine di aumentare la copertura del territorio, perciò le zecche sono state raccolte una sola volta in 38 siti diversi (Tabella 8.2 e Figura 8.3).

Stazioni		
Zona	ID	Località (m a. s. l.)
1	1	Kranjska gora (947)
	2	Valbruna (836)
	3	Val Pesarina (558)
	5	Socchieve (450)
	30	Fusine in Val Romana (792)
	31	Tarvisio (805)
	33	Val Aupa (599)
	34	Campiole (370)
	35	Pluzna (371)
2	36	Preone (540)
	6	Kobarid (293)
	7A	Taipana (722)
	8A	Inglagna (368)
	9	Faedis (242)
	10	Costa (346)
	20	Bosco Romagno (105)
	21	Savorgnano del Torre (168)
	22	Majano (167)
	23	Valeriano (180)
	24	Barcis (475)
	25	Cimolais (680)
	26	Clauzetto (559)
	27	Lago Di Cavazzo (202)
28	Vedronza (334)	
29	Osgnetto (177)	
32	S.Giorgio (464)	
3	12	Selva d'Arvonchi (3)
4	0	Padriciano (348)
	11	Colle di Medea (101)
	13	Marcottini (89)
	14A	Sveto (319)
	15	Borgo Grotta Gigante (212)
	16	Ocizla (440)
	17	Dobravljje (337)
	18	Malchina (163)
	19	Panovec (116)

**Tabella 8.2.** Elenco delle stazioni campionate nell'anno 2005.



**Figura 8.3.** Stazioni di campionamento 2006.

Per valutare la presenza di *Babesia* nelle zecche presenti sul territorio regionale sono state effettuate due raccolte eccezionali durante la primavera dell'anno 2006 e 2007 nelle stazioni di Padriciano e Basovizza, nell'area del **Carso triestino** (Tabella 8.3 e Figura 8.4).

ID	località
0	Padriciano
01	Basovizza
1G	Basovizza
1R	Basovizza
1V	Basovizza

**Tabella 8.3.** Stazioni di campionamento 2006-2007.



Figure 8. 4. Stazioni di campionamento 2006-2007 indicate dalla freccia.

## 8.2 Metodo di raccolta di *Ixodes ricinus*

La raccolta delle zecche è stata effettuata con il metodo della coperta strisciata (*dragging sample* o *flagging*) che consiste nel raccogliere le zecche allo stato libero, cioè non fissate su ospiti (Figura 8.5). Un panno bianco di flanella di circa 1m<sup>2</sup> è stato trascinato lentamente sulla vegetazione fino a coprire un'area di 100 m<sup>2</sup>. Il metodo si basa sul caratteristico comportamento (*ambushing*) di molti Ixodidi, tra cui anche *I. ricinus*, che attendono appostati sull'erba sui cespugli o sulla lettiera in posizione d'attesa (con palpi e primo paio di zampe protesi) il passaggio di un potenziale ospite su cui attaccarsi.



Figura 8.5. Raccolta zecche mediante “flagging”.

Gli esemplari sono stati prelevati dalla coperta e inseriti in provette di plastica sterili. In laboratorio sono stati identificati lo stadio di sviluppo (ninfe e adulti) e il sesso delle zecche adulte tramite un microscopio binoculare. Le ninfe sono state suddivise in *pool* di 3 individui, mentre adulti maschi e femmine sono stati inseriti singolarmente in provette distinte. Prima di ogni raccolta sono stati annotati i dati relativi alla temperatura dell'aria, umidità relativa e condizioni meteorologiche. I campioni sono stati conservati ad una temperatura di -40°C fino al momento dell'estrazione degli acidi nucleici.

### 8.3. Ceppi patogeni di riferimento

In ogni amplificazione è stato incluso un controllo positivo costituito da 100 pg di DNA estratto dai ceppi patogeni di riferimento coltivati in laboratorio (Tabella 8.4).

specie	ceppo	laboratorio di provenienza
<i>Borrelia burgdorferi</i> s. s.	B31	Laboratorio Spirochete
<i>B. garinii</i>	BITS	
<i>B. garinii</i>	B29	
<i>B. afzelii</i>	NANCY	
<i>B. bissettii</i>	DN127	Prof. G. Baranton, Istituto Pasteur di Parigi
<i>B. valaisiana</i>	VS116	
<i>B. spielmani</i>	A14S	
<i>Rickettsia helvetica</i>	C9P9	
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>		
Virus TBE	IR454	Dr.ssa Ciufolini, Laboratorio di Virologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma (Ciufolini <i>et al.</i> , 1999).
<i>Babesia divergens</i>	BABBO	Dr.ssa R. Galuppi, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna
<i>Babesia divergens</i>	SLO1	Dr.ssa D. Duh, Istituto di Microbiologia e Immunologia, Università di Lubiana
<i>Babesia</i> EU1	SLO3	
<i>Babesia microti</i>	G1, G2	Prof. Klaus-Peter Hunfeld, Università di Francoforte

**Tabella 8.4.** Ceppi patogeni di riferimento

#### Coltivazione di *B. burgdorferi*

Le specie di *Borrelia* sono stati coltivate in terreno Barbour-Stonner-Kelly (BSK) II modificato (Barbour, 1984), in condizioni di microaerofilia e alla temperatura di 34°C. La coltivazione è stata protratta per almeno due settimane, a seconda della velocità di crescita dei

ceppi utilizzati. I ceppi sono stati usati per valutare la sensibilità della nested-PCR, la specificità della genotipizzazione e come controlli positivi in ogni amplificazione.

## 8.4. Campioni biologici da pazienti

Sono stati analizzati i campioni biologici:

- prelievo di sangue del **Paziente 52**, maschio, anni 67, sintomatologia: rallentamento ideomotorio, instabilità posturale, vertigini, febbre, (38°C), impaccio nell'eloquio, confabulazione, sviluppo di poliradicoloneurite, ritenzione urinaria. Esame del liquor: limpido.
- prelievi di sangue e liquor (CSF) del **Paziente 53**, maschio, anni 58, sintomatologia: artromialgie persistenti, parestesie, ipostenia agli arti inferiori bilateralmente; storia di riscontri sierologici di infezione da *B. burgdorferi*; ha effettuato numerosi trattamenti antibiotici con dosaggio e durata imprecisate.

## 8.5. Estrazione degli acidi nucleici

Il contenuto di ogni provetta (*pool* di ninfe o adulti) è stato omogeneizzato con micro-pestelli sterili per facilitare la successiva estrazione degli acidi nucleici. Il DNA è stato estratto usando il Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation), attenendosi alle indicazioni del produttore.

Il DNA è stato estratto dai campioni biologici di pazienti seguendo il protocollo fornito dal kit commerciale High Pure Template Preparation Kit (Roche Diagnostics). Gli estratti sono stati poi conservati a -20°C.

Le colture dei ceppi sono state precipitate con centrifugazione a 13,000 x g per 10 minuti, risospese in 200 µl di tampone PBS 1X ed estratte con lo stesso kit commerciale.

L'RNA virale è stato estratto da zecche singole adulte con il metodo del TRIzol (Invitrogen) applicando la procedura fornita dalla ditta produttrice. Lo stesso protocollo è stato usato per estrarre il genoma virale dal ceppo di riferimento IR 454. L'RNA estratto è stato ridissolto in 10µL di acqua ultrapura DNase-RNase-free.

## 8.6. Quantificazione del DNA estratto dai ceppi di riferimento

La quantificazione del DNA è stata eseguita mediante uno spettrofotometro Unikon 930 (Kontron Instruments), leggendo il valore di assorbanza fornito dallo strumento in corrispondenza di una  $\lambda$  pari a 260 nm ed applicando la legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon lc$$

dove: A = assorbanza,  $\epsilon$  = coefficiente di estinzione molare ( $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), l = cammino ottico (cm), c = concentrazione (M)

## 8.7. Amplificazione del DNA e RNA

specie	bersaglio	nome primer	sequenza 5'→3'	prodotto amplificato
<i>Borrelia burgdorferi</i>	spazio intergenico 5s-23s	B C	CTGCGAGTTCGCGGGAGA TCCTAGGCATTACACCATA	225 bp
<i>Borrelia burgdorferi</i>	gene plasmidico <i>ospA</i>	<i>ospA</i> esterno 1 <i>ospA</i> esterno 2 <i>ospA</i> interno 1 <i>ospA</i> interno 2	GGGAATAGGTCTAATATTAGCC CACTAATTGTTAAAGTGGAAAGT GCAAAATGTTAGCAGCCTTGAT CTGTGTATTCAAGTCTGGTTCC	665 bp 391 bp
<i>Rickettsia</i>	gene 16S rRNA	Ric RicRE	TCTAGAACGAACGCTATCGGTAT TTTCATCGTTTTAACGGCGTGGACT	757 bp
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	gene <i>epank1</i>	LA1 LA6	GAGAGATGCTTATGGTAA CGACAGCCATCATGTGAC	
Virus TBE	regione non codificante all'estremità 5' (5'-NCR)	5NCR1 (esterno) 5NCR2 (esterno) 5NCR3 (interno) 5NCR4 (interno)	GCGTTTGCTTCGGA CTCTTTCGACACTCGTCGAGG CGGATAGCATTAGCAGCG CCTTTCAGGATGGCCTT	153 bp 128 bp
<i>Babesia</i>	gene per la $\beta$ -tubulina	F34 (esterno) R323 (esterno) F79 (interno) R206 (interno)	TGTGGTAACCAGAT (t/c)GG(a/t)GC CAA TCnGT(a/g)TA(a/g)TGnCC(t/c)T T(a/g)GCCCA GA(a/g)CA(t/c)GGnATnGA(t/c)C CnGTAA AC(a/t/g)GA(a/g)TCCATGGT(a/t /g)CCnGG(t/c)T	variabile
<i>Babesia</i>	gene 18S rRNA	BABES1 BABES2	GYTTTGTAAATTGGAATGATGG CCAAAGACTTTGATTTCTCTC	560 bp

**Tabella 8.5.** Sequenze dei primer usati nelle analisi di amplificazione genomica dei patogeni.

La Tabella 8.5 riporta le caratteristiche dei *primer* usati per la ricerca di agenti patogeni nelle zecche e nei campioni biologici umani. Tutti i *primer* sono stati sintetizzati dalla Sigma-Genosys Ltd (UK).

Tutte le amplificazioni sono state eseguite in un termociclatore Termocycler PTC 200 (Biozym Hessich Oldensford)

### ***Borrelia burgdorferi*: amplificazione dello spazio intergenico 5S-23S**

La presenza di *Borrelia* nei campioni di zecca è stata ricercata impiegando la tecnica della PCR, con *primer* specifici per lo spazio intergenico tra il gene 5S dell'rRNA (*rrf*) e il gene codificante per la subunità 23S (*rrl*) del genoma di *Borrelia* (Tabella 8.5) (Postic et al., 1994). La miscela di reazione era composta da 2.5 µl di DNA stampo estratto, 1X tampone di reazione per *Taq* polimerasi (Promega Corporation), 0.3 µM di ogni *primer*, 200 µM di ogni desossinucleotide (Amersham Biosciences), 0.8 U di *Taq* polimerasi (*Taq* DNA Polymerase in storage buffer B, Promega Corporation), acqua ultrapura fino ad un volume totale di 25µl.

Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti:

PROGRAMMA "BC"			
n° di cicli	denaturazione T / t	appaiamento T / t	allungamento T / t
1	94°C / 3'		
40	94°C / 1'	50°C / 1'	72°C / 1'
1			72°C / 5'

### ***Borrelia burgdorferi*: amplificazione del gene plasmidico *ospA***

Tutti i campioni risultati positivi all'amplificazione con i *primer* specifici per lo spazio intergenico 5S-23S, sono stati amplificati una seconda volta con *primer* diretti verso il gene plasmidico *ospA* di *Borrelia* (Priem et al., 1997). La tecnica impiegata è quella della *nested-PCR*, cioè, la ri-amplificazione di un primo frammento con *primer* interni. In particolare, l'amplificazione con i *primer* esterni produce un frammento di 665 bp che funge da stampo per la successiva PCR con i *primer* interni. Il prodotto della seconda PCR, lungo 391 bp, viene visualizzata su gel di agarosio (Tabella 8.5 e Figura 1.5, pag. 12).

La miscela di reazione conteneva: 2.5 µl del DNA estratto, 1X tampone di reazione per *Taq* polimerasi (Promega Corporation), 1.5 mM di MgCl<sub>2</sub> (Promega Corporation), 0.3 µM di ogni *primer*, 200 µM di ogni desossinucleotide (Amersham Biosciences), 0.8 U di *Taq* polimerasi

(*Taq* DNA Polymerase in Storage Buffer B, Promega Corporation), e acqua ultrapura fino a un volume finale di 25  $\mu$ l.

La *nested* PCR è stata eseguita con 2.5  $\mu$ l del primo amplificato, nelle stesse condizioni di reazione della prima PCR. Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti:

PROGRAMMA "P66"				
n° di cicli		denaturazione T / t	appaiamento T / t	allungamento T / t
1° PCR	nested-PCR			
1	1	94°C / 2'		
40	25	94°C / 1'	42°C / 1'	72°C / 1'
1	1			72°C / 10'

### ***Rickettsia*: amplificazione del gene per la subunità 16S rRNA**

La presenza di diverse specie di *Rickettsia* è stata indagata amplificando il gene per la subunità 16S rRNA (Nilsson et al. 1999). Le sequenze sono riportate in Tabella 8.5.

La miscela di reazione conteneva 2.5  $\mu$ l del DNA estratto, 1X tampone di reazione per *Taq* polimerasi (New England Biolabs), 0.3  $\mu$ M di ogni *primer*, 200  $\mu$ M di ogni desossinucleotide (Eppendorf), 0.8 U di *Taq* polimerasi (New England Biolabs), e acqua ultrapura fino a un volume finale di 25  $\mu$ l. Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti:

PROGRAMMA "RICK2"			
n° di cicli	denaturazione T / t	appaiamento T / t	allungamento T / t
1	95°C / 3'		
40	94°C / 30''	65°C / 30''	72°C / 1'
1			72°C / 10'

### ***Anaplasma phagocytophilum*: amplificazione del gene *epank1***

Per la ricerca di *Anaplasma phagocytophilum* sono stati utilizzati i *primer* diretti verso il gene *epank1* (Walls et al., 2000). Le sequenze sono riportate in Tabella 8.5.

La miscela di reazione conteneva 2.5  $\mu$ l del DNA estratto, 1X tampone di reazione per *Taq* polimerasi (New England Biolabs), 0.3  $\mu$ M di ogni *primer*, 200  $\mu$ M di ogni desossinucleotide (Eppendorf), 0.8 U di *Taq* polimerasi (New England Biolabs), e acqua ultrapura fino a un volume finale di 25  $\mu$ l. Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti:

PROGRAMMA "HGE"			
n° di cicli	denaturazione T / t	appaiamento T / t	allungamento T / t
1	94°C / 3'		
2	94°C / 30''	62°C / 30''	72°C / 30''
2	94°C / 30''	60°C / 30''	72°C / 30''
2	94°C / 30''	58°C / 30''	72°C / 30''
2	94°C / 30''	56°C / 30''	72°C / 30''
28	94°C / 30''	54°C / 30''	72°C / 30''
1			72°C / 5'

### **Virus TBE: amplificazione della regione non codificante all'estremità 5' (5'-NCR) del genoma virale**

La ricerca del virus TBE è stata effettuata tramite retrotrascrizione del RNA virale associata ad una doppia amplificazione (*nested-PCR*) della regione non codificante all'estremità 5' (5'-NCR) del genoma virale (Suss *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2001). Le sequenze sono riportate in Tabella 8.5.

Per la retro trascrizione è stata utilizzata la *Tth* DNA polimerasi in grado di effettuare entrambe le reazioni di retrotrascrizione e amplificazione del DNA nella stessa provetta con un solo sistema di tamponi. La retrotrascrizione è stata eseguita in un volume finale di 20 µL contenente 2.5 µL di RNA estratto e i seguenti reagenti: 1× RT buffer (Promega Corporation), 0.2 mM di ogni desossinucleotide (Amersham Biosciences), 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 pmol del *primer* esterno 5NCR2, 2.5 U di *Tth* DNA polymerase (Promega Corporation), 25 U di RNaseOUT (Invitrogen), alla temperatura di 60°C per 45'.

La sintesi del secondo filamento di DNA (prima PCR) è stata eseguita aggiungendo ai 20 µL di soluzione di retrotrascrizione: 15 pmol del *primer* esterno 5NCR1, 1× chelate buffer (Promega Corporation), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> e acqua ultrapura DNase-RNase-free fino ad un volume finale di 100 µL, alle seguenti condizioni di amplificazione:

PROGRAMMA DI PCR "PCR-TBEV"			
n° di cicli	denaturazione T / t	appaiamento T / t	allungamento T / t
1	95°C / 5'		
40	94°C / 30''	55°C / 30''	70°C / 30''
1			70°C / 5'

La seconda amplificazione (*nested-PCR*) è stata eseguita con 5 µL della prima PCR in un volume finale di 25 µL di soluzione di reazione contenente: 1× PCR buffer (Promega Corporation), 7.5 pmol di ogni *primer* interno (5NCR3 e 5NCR4), 0.2 mM di ogni

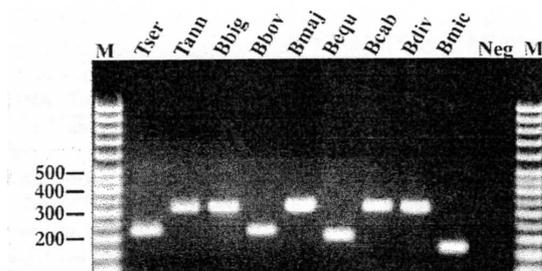
desossinucleotide (Amersham Biosciences), 0.8 U di *Taq* polimerasi (*Taq* DNA Polymerase in storage buffer B, Promega Corporation), acqua ultrapura fino ad un volume totale di 25 $\mu$ l. Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti:

PROGRAMMA DI PCR "NPCR-TBEV"			
n° di cicli	denaturazione T / t	appaiamento T / t	allungamento T / t
1	94°C / 3'		
30	94°C / 30''	55°C / 30''	72°C / 30''
1			72°C / 10'

Il prodotto della *nested*-PCR è stato visualizzato come una banda da 128 bp.

### ***Babesia*: amplificazione del gene per la $\beta$ -tubulina**

La presenza di *Babesia* nei campioni di zecca è stata ricercata tramite *nested* PCR con *primer* specifici per il gene della  $\beta$ -tubulina di *Babesia* (Cacciò et al., 2000). Le sequenze sono riportate in Tabella 8.5. Questi *primer* si appaiano con sequenze omologhe presenti nel primo e secondo esone; la differenza della banda dipende dalla lunghezza dell'introne presente nel frammento amplificato. La *nested*-PCR produce un frammento diverso a seconda della specie e può variare da 169 bp a 319 bp (Figura 8.6).



**Figura 8.6.** Elettroforesi su gel di agarosio della *nested*-PCR sul gene della  $\beta$ -tubulina di *Babesia* (Cacciò et al., 2000)

La miscela di reazione conteneva 2.5  $\mu$ l del DNA estratto, 1X tampone di reazione per *Taq* polimerasi (New England Biolabs), 0.3  $\mu$ M di ogni *primer*, 200  $\mu$ M di ogni desossinucleotide (Eppendorf), 0.8 U di *Taq* polimerasi (New England Biolabs) e acqua ultrapura fino a un volume finale di 25  $\mu$ l. La *nested*-PCR è stata eseguita usando 5  $\mu$ l del primo prodotto di amplificazione come stampo, nelle stesse condizioni di reazione e con lo stesso programma della prima PCR. Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti:

PROGRAMMA "BABFR"			
n° di cicli	denaturazione T / t	appaiamento T / t	allungamento T / t
1	95°C / 5'		
34	94°C / 1'	62°C / 30''	72°C / 1'
1			72°C / 5'

### ***Babesia*: amplificazione del gene 18S rRNA**

Tutti i campioni risultati positivi all'amplificazione del gene della  $\beta$ -tubulina tramite *nested*-PCR, sono stati nuovamente amplificati con *primer* specifici diretti verso il gene 18S rRNA di *Babesia* (Tabella 8.5). Sono stati usati i *primer* chiamati BABES su indicazione del Dott. Cacciò dell'Istituto superiore di Sanità di Roma; questi *primer* sono stati disegnati dal Dott. Pleniasek (Center for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, USA) e al momento non sono stati ancora pubblicati. La miscela di reazione conteneva 2.5  $\mu$ l del DNA estratto, 1X tampone di reazione per *Taq* polimerasi (New England Biolabs), 0.3  $\mu$ M di ogni *primer*, 200  $\mu$ M di ogni desossinucleotide (Eppendorf), 0.8 U di *Taq* polimerasi (New England Biolabs) e acqua ultrapura fino a un volume finale di 25  $\mu$ l. Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti:

PROGRAMMA "BABES"			
n° di cicli	denaturazione T / t	appaiamento T / t	allungamento T / t
1	95°C / 3'		
39	94°C / 30''	50°C / 30''	72°C / 1'
1			72°C / 7'

## **8. 8. Controlli positivi e negativi**

Ogni esperimento di amplificazione include uno o più controlli negativi contenente la miscela di reazione con l'aggiunta di acqua ultrapura a sostituire il DNA stampo allo scopo di evidenziare eventuali contaminazioni nella procedura di amplificazione.

Inoltre, uno o più controlli positivi costituiti da 100 pg del DNA estratto dai ceppi patogeni di riferimento (Tabella 8.4) sono usati a dimostrazione dell'efficienza e specificità delle PCR.

## 8.9. Visualizzazione degli amplificati

Le reazioni di PCR sono state verificate caricando 15 µl dell'amplificato e 3 µl di tampone di caricamento (30% glicerolo e 0,025% Blu di bromofenolo) su gel di agarosio al 3% (SeaKem LE Agarose - Cambrex) in tampone TBE 1X e sottoposti a corsa elettroforetica (130V per 40 min) .

Il gel è stato successivamente colorato per immersione in una soluzione colorante di Etidio Bromuro (intercalante del DNA) in concentrazione finale di 0.5 µg/ml, per un tempo di 45 min. Gli amplificati sono stati visualizzati al transilluminatore a UV e fotodocumentati. Per ogni corsa è stato caricato un pozzetto con 5 µl di peso molecolare da 100 pb (Promega Corporation).

## 8.10. Identificazione delle specie infettanti in *I. ricinus*

### Analisi RFLP e sequenziamento di *Borrelia burgdorferi* s.l.

Nel nostro laboratorio è stato recentemente sviluppato un nuovo sistema di genotipizzazione tramite l'analisi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) degli amplificati ottenuti con la *nested*-PCR specifica per una porzione del gene plasmidico *ospA* già descritta (Floris et al., 2007).

Specie	RFLP pattern (bp)				
	<i>MseI</i>	<i>SpeI</i>	<i>AlwI</i>	<i>MnII</i>	<i>TaqI</i>
<i>B. afzelii</i>	208/183	/	/	/	242/149
<i>B. garinii</i>	134/98/85/74	/	/	297/112	/
<i>B. burgdorferi</i> s. s.	183/134/74	270/121	227/164	/	/
<i>B. valaisiana</i>	183/134/74	/	/	/	/
<i>B. bissettii</i>	183/134/74	/	165/165/62	224/167	/
<i>B. spielmanii</i>	165/148/60/18	/	/	/	/

**Tabella 8.6.** Profili elettroforetici (*pattern*) previsti con l'analisi RFLP sul gene plasmidico *ospA* per le diverse specie di *B. burgdorferi* (Floris et al., 2007)

La genotipizzazione ha previsto un primo taglio con l'endonucleasi *Mse I* in grado di identificare chiaramente le specie *B. afzelii*, *B.garinii* e *B. spielmani*, mentre le specie

*B.burgdorferi* s.s., *B.valaisiana* e *B.bisettii*, accomunate dallo stesso *pattern*, hanno richiesto una ulteriore restrizione con l'enzima *Alw* I. Gli altri enzimi sono stati usati come controprova della specie identificata con i precedenti tagli. Per ogni restrizione sono stati usati 10 µl di amplificato e 0.5 U di enzima, seguendo le condizioni di reazione riportate dalla casa produttrice New England Biolabs (Tabella 8.6).

I frammenti di restrizione sono stati visualizzati con elettroforesi (100 V per 45 minuti) su gel di agarosio *high resolution* al 4% (MetaPhore, Biospa) in tampone TBE 1X. Il gel è stato colorato immergendolo in una soluzione di bromuro di etidio in concentrazione finale di 0.5 µg/ml per 40 minuti. Gli amplificati sono stati visualizzati al transilluminatore a UV e fotodocumentati. Per ogni corsa è stato caricato un pozzetto con 7 µl di un marcatore di peso molecolare da 100 bp o 25 bp (Promega Corporation).

Alcuni campioni con *pattern* di restrizione atipici sono stati sequenziati e identificati; si è altresì provveduto al sequenziamento di alcuni amplificati con *pattern* di restrizione attesi al fine di confermare la specificità e affidabilità del sistema di genotipizzazione RFLP. Le sequenze sono state ottenute tramite un Applied Biosistem ABI PRISM automated DNA sequencer (CRIBI – Università di Padova). L'analisi di omologia è stata effettuata tramite il programma Blast dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). L'analisi filogenetica di alcune sequenze è stata effettuata tramite il software Vector (Invitrogen).

### **Sequenziamento di *Rickettsia*, *Anaplasma*, Virus TBE**

I campioni positivi sono stati sequenziali tramite un Applied Biosistem ABI PRISM automated DNA sequencer (CRIBI – Università di Padova). L'analisi di omologia è stata effettuata tramite il programma Blast dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e il software ChromasPro Version 1.41. mediante allineamento con le sequenze depositate in banca dati GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### **Sequenziamento e analisi filogenetica di *Babesia***

I campioni risultati positivi dall'amplificazione del gene della  $\beta$ -tubulina e 18S rRNA di *Babesia* sono stati sequenziati tramite un Applied Biosistem ABI PRISM automated DNA sequencer (BMR GENOMICS – Università di Padova). L'identificazione della specie di *Babesia* è stata ottenuta mediante allineamento con le sequenze depositate in banca dati GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando il software ChromasPro Version 1.41. Gli alberi filogenetici sono stati costruiti tramite il programma Multalin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) disponibile in rete.

## 8.11. Analisi statistica dei dati

### Calcolo della prevalenza d'infezione per singola zecca

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 (Cinco et al. 1998a; Cinco et al. 1998b):

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

Dove: p = probabilità stimata che la singola zecca sia infetta, n = numero di zecche non infette, N = numero di campioni esaminati, k = numero di esemplari per ciascun *pool*

### Indice di rischio (IR)

L'indice di rischio (IR), ovvero il rischio di essere morsi da una zecca infetta è un parametro di semplice derivazione che dipende dall'abbondanza delle zecche presenti sul territorio e dalla loro percentuale di infezione. L'IR è stato calcolato rapportando il numero di zecche risultate infette ai 100 m<sup>2</sup> (numero di zecche infette/100 m<sup>2</sup>).

## 8.12. Mappa spaziale del rischio per la borreliosi di Lyme

La mappa del rischio spaziale di infezione da *B. burgdorferi* è stata creata partendo dai dati sulla prevalenza di infezione delle zecche *I. ricinus* nelle stazioni campionate nell'area di studio durante gli anni 2005 e 2006.

Questi risultati sono stati successivamente interpolati con l'abbondanza del vettore calcolata (predetta) sul territorio in esame. Quest'ultima analisi è stata effettuata partendo da parametri ecologici ed ambientali che caratterizzano l'area di studio e che risultassero condizionare il ciclo e la presenza di *I. ricinus*. Tutti questi fattori condizionanti, come ad esempio le informazioni sulla vegetazione, l'altitudine, la presenza di ospiti serbatoio e la piovosità, sono stati messi in relazione tramite la formula di seguito riportata, e poi inseriti in un GIS (Sistema Geografico Informatico). Da questa elaborazione è stata ottenuta una **mappa spaziale del rischio per la di borreliosi di Lyme** nella regione Friuli Venezia Giulia, con una risoluzione di 1 km<sup>2</sup>.

Formula:

$$\text{Log}(Y) = - 8.613 + 0.2923 \cdot \text{LST} + 40.77 \cdot \text{LSWI} - 85 \cdot \text{LSWI}^2 - 3.936 \cdot \text{EVI}^2 + 0.002161 \cdot \text{DEM} + 0.118 \cdot (\text{ROE DEER MAP}) + 0.01057 \cdot (\text{FOREST UNDERSTORY COMPLEXITY INDEX}).$$

dove:

**LST:** temperatura superficiale (MODIS)

**LSWI:** indice delle acque superficiali (MODIS)

**EVI:** indice vegetazionale (MODIS)

**ROE DEER MAP:** abbondanza di caprioli, come da censimento effettuato dall'Ufficio regionale per la protezione della fauna e dell'ambiente nel 2005.

**FOREST UNDERGROWTH COMPLEXITY INDEX:** indice di complessità del sottobosco.

**DEM:** modello digitale che riporta le altitudini dell'area di studio. Non sono state prese in considerazione le altitudini sopra i 1300 m perché a questi livelli la presenza di zecche decresce drasticamente (Furlanello et al., 2003).

**Y:** numero di zecche raccolte per 100 m<sup>2</sup>

### 8.13. *Multiplex-PCR*

L'analisi di omologia delle sequenze dei patogeni depositate in banca dati GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) è stata effettuata tramite il software ChromasPro Version 1.41. Le sequenze dei *primer* sono state disegnate con il programma Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) disponibile in rete. I *primer* sono stati sintetizzati dalla ditta Sigma-Genosys Ltd.

Le reazioni di amplificazione con le singole coppie di *primer* sono state visualizzate caricando tutto l'amplificato e 5 µl di tampone di caricamento (30% glicerolo e 0,025% Blu di bromofenolo) su gel di agarosio al 3% (SeaKem LE Agarose - Cambrex) in tampone TBE 1X e sottoposti a corsa elettroforetica (130V per 40 min) .

Le reazioni di amplificazione con il sistema *multiplex-PCR* sono stati visualizzati con elettroforesi (100 V per 45 minuti) su gel di agarosio *high resolution* al 4% (MetaPhore, Cambrex) in tampone TBE 1X, caricando tutto l'amplificato e 5 µl di tampone di caricamento (30% glicerolo e 0,025% Blu di bromofenolo).

Entrambi i tipi di gel sono stati colorati immergendoli in una soluzione di bromuro di etidio in concentrazione finale di 0.5 µg/ml per 40 minuti. Gli amplificati sono stati visualizzati al transilluminatore a UV e fotodocumentati. Per ogni corsa è stato caricato un pozzetto con 5 µl di un marcatore di peso molecolare da 100 bp (Promega Corporation).

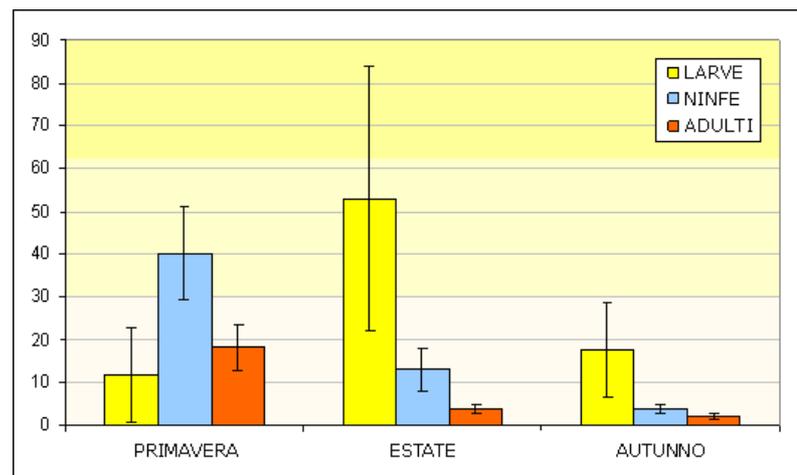
# RISULTATI

## 9. ABBONDANZA DI *Ixodes ricinus*

### Abbondanza delle zecche *I. ricinus* raccolte nell'anno 2005 e 2006

Gli esemplari di *I. ricinus* raccolti nelle 15 stazioni di campionamento durante l'anno 2005 sono stati in totale 2443; di questi, 1049 sono stati raccolti in primavera, 1045 in estate e 350 in autunno. La popolazione di zecche era composta per il 50% di larve, il 35% ninfe e il restante 15% adulti.

Le informazioni quantitative raccolte permettono di definire la loro distribuzione temporale durante l'anno. La dinamica stagionale delle ninfe e degli adulti ha mostrato un andamento unimodale con un picco primaverile che decresce progressivamente con il sopraggiungere della stagione estiva ed autunnale per ogni area biogeografia (Figura 9.1).



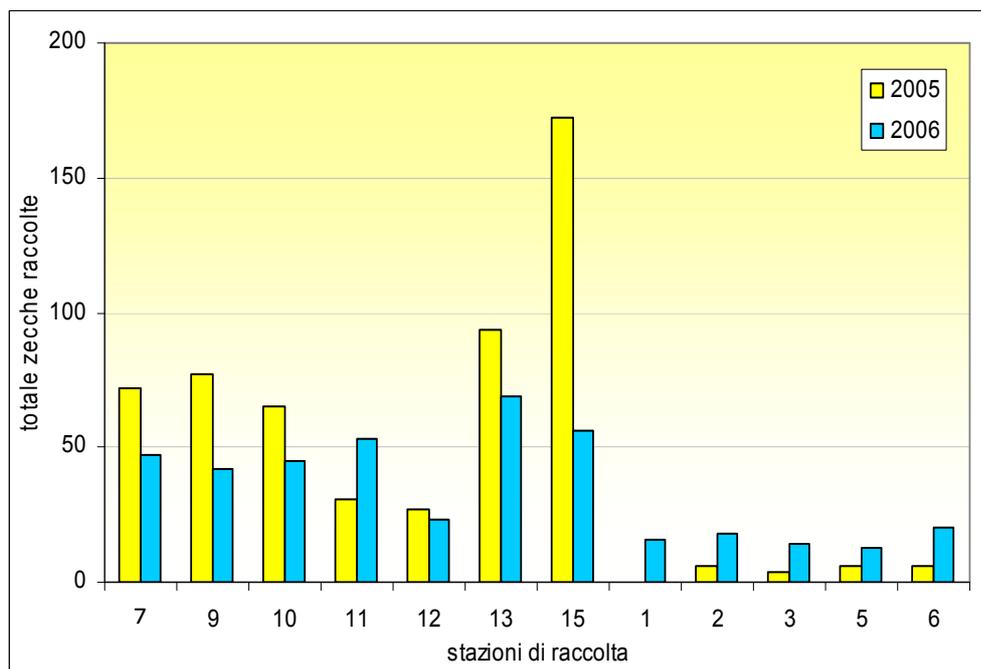
**Figura 9.1.** Dinamica stagionale di *I. ricinus* nell'anno 2005

Al contrario le larve hanno evidenziato un picco nella stagione estiva; la presenza delle larve nei vari ambienti, è risultata irregolare, sia per quanto riguarda la distribuzione sul territorio (ovvero una distribuzione “a spot”, senza cioè una logica precisa collegabile a particolari fattori), sia per la grande variabilità, in termini quantitativi, di larve raccolte all'interno di una stessa stagione. Ciò è imputabile alle modalità di nascita delle larve, derivate dalla schiusa di agglomerati di uova.

Proprio per la succitata difficoltà di riconoscere nella dinamica di distribuzione delle larve un modello valido, **le successive analisi molecolari sono state eseguite esclusivamente sugli individui allo stadio adulto e ninfae.**

Durante l'anno 2006 le zecche sono state campionate in 38 stazioni dell'area di studio una sola volta, per lo più nei mesi primaverili. In totale sono state raccolte 1927 zecche appartenenti alla specie *I. ricinus*, di cui il 18% erano larve, il 60% ninfe e il 21% adulti.

Dal confronto delle raccolte 2005-2006 effettuate nelle stesse stazioni di campionamento in primavera (Figura 9.2) si osserva che la densità di zecche è maggiore nell'area carsica (ID13 e 15). Inoltre, si nota che la zona con la minor presenza di zecche è risultata l'area alpina (ID 1-5), mentre le stazioni incluse nel paesaggio prealpino hanno riportato abbondanze intermedie (ID 7-10). L'unica stazione appartenente all'area biogeografia del bosco planiziale (ID 12) si è inserita su abbondanze medio-basse.

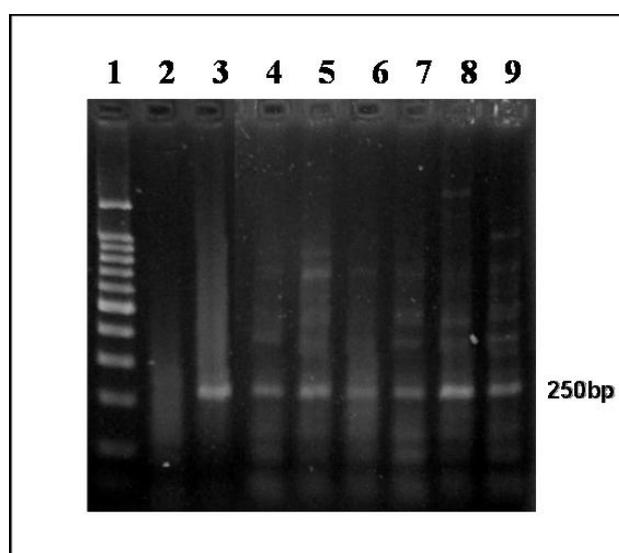


**Figura 9.2.** Confronto di abbondanze nei due anni di raccolta. Sono state considerate le stazioni campionate in primavera sia nell'anno 2005 che 2006

## 10. *B. BURGDORFERI* NELLE ZECCHE *I. RICINUS*

### 10.1. Identificazione di *B. burgdorferi*

L'amplificazione con *primer* specifici per lo spazio intergenico 5S-23S di *B. burgdorferi* ha permesso di individuare i campioni di zecche infettati dal microorganismo. In Figura 10.1 si possono osservare gli amplificati da circa 250 bp di alcuni campioni di *I. ricinus* risultati positivi per *B. burgdorferi*.



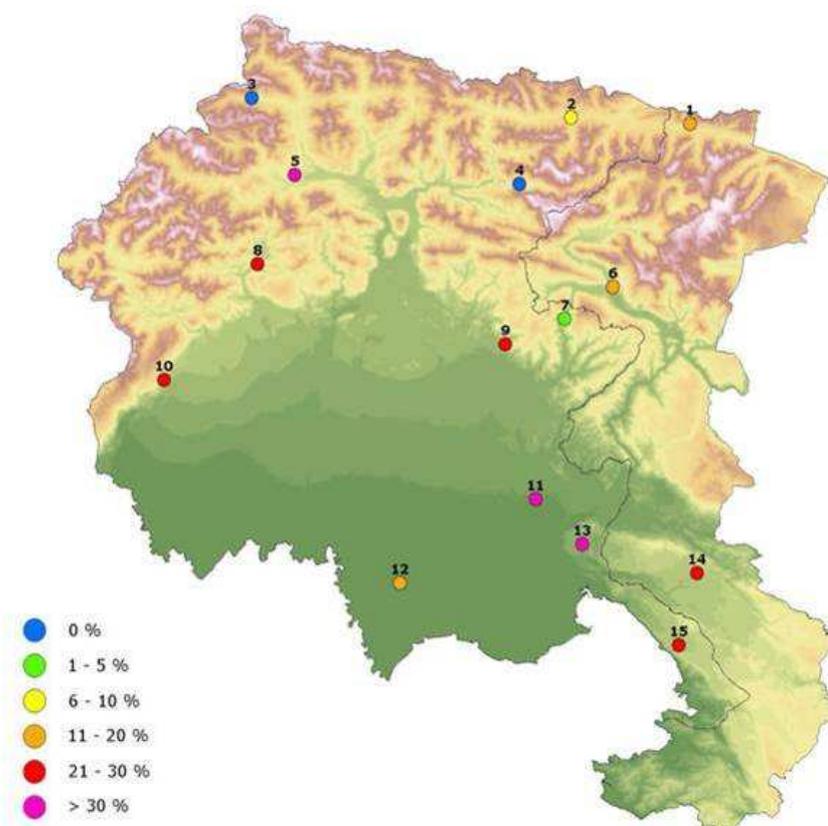
**Figura 10.1.** Visualizzazione su gel di agarosio delle bande da 250 bp di alcuni campioni di *I. ricinus* risultati positivi all'amplificazione con *primer* specifici per lo spazio intergenico 5S-23S di *B. burgdorferi*; corsia 1: PM 100 bp, corsia 2: controllo negativo; corsia 3: *B. burgdorferi* (controllo positivo), corsie 4-9: DNA estratto da alcuni campioni di zecca.

### 10.2. Presenza di *B. burgdorferi* nelle zecche raccolte nel 2005

La ricerca di *B. burgdorferi* s. l. nelle zecche raccolte in regione FVG e area transfrontaliera durante l'anno 2005 ha rilevato la presenza del microorganismo in 13 delle 15 stazioni campionate. La prevalenza di infezione si è dimostrata altamente variabile in relazione alle diverse località, con valori compresi tra 0% e 84.2%. (Tabella 10.1 e Figura 10.2). La media annuale di infezione calcolata sull'intera area di studio è stata del 23.3%.

Stazioni			Zecche infette/zecche raccolte, n		Prevalenza d'infezione per zecca singola (ninfe + adulti)*, %				
Zo na	ID	Località (m a. s. l.)	Pools di 3 ninfe	Adulti singoli	Primavera	Estate	Autunno	Annuale	Per zona
1	1	Kranjska Gora (947)	11/28	5/10	17,2	37,3	0	18,4	13.0
	2	Valbruna (836)	0/12	4/19	0	18,2	33,3	7,5	
	3	Val Pesarina (558)	0/11	0/13	0	0	0	0	
	4	Saletto (558)	0/9	0/2	0	0	0	0	
	5	Socchieve (450)	0/3	23/62	36,0	28,6	16,7	32,9	
2	6	Kobarid (293)	10/28	9/35	24,2	15,8	0	20,0	18.1
	7	Mersino (842)	1/15	0/15	1,9	0	0	1,7	
	8	Tridis (425)	1/6	7/27	30,8	0	20,0	22,0	
	9	Faedis (242)	0/1	17/81	20,8	33,3	0	20,7	
	10	Costa (346)	6/16	14/32	33,3	0	0	28,1	
3	12	Selva d'Arvonchi (3)	0/14	11/26	20,8	19,4	0	16,9	16.9
4	11	Colle di Medea (101)	10/12	2/5	100,0	0	20,0	84,2	45.5
	13	Marcottini (89)	29/35	2/9	65,7	6,7	0,0	55,9	
	14	Komen (264)	8/20	2/3	25,2	0	0	20,1	
	15	Borgo Grotta Gigante (212)	38/85	9/16	24,4	9,5	43,3	21,6	
Totale nell'area di studio			114/295	105/355					23.3

**Tabella 10.1.** Prevalenza di *B. burgdorferi* nelle zecche *I. ricinus* raccolte nelle quattro zone fitoclimatiche del territorio regionale del FVG e area transfrontaliera slovena durante l'anno 2005.

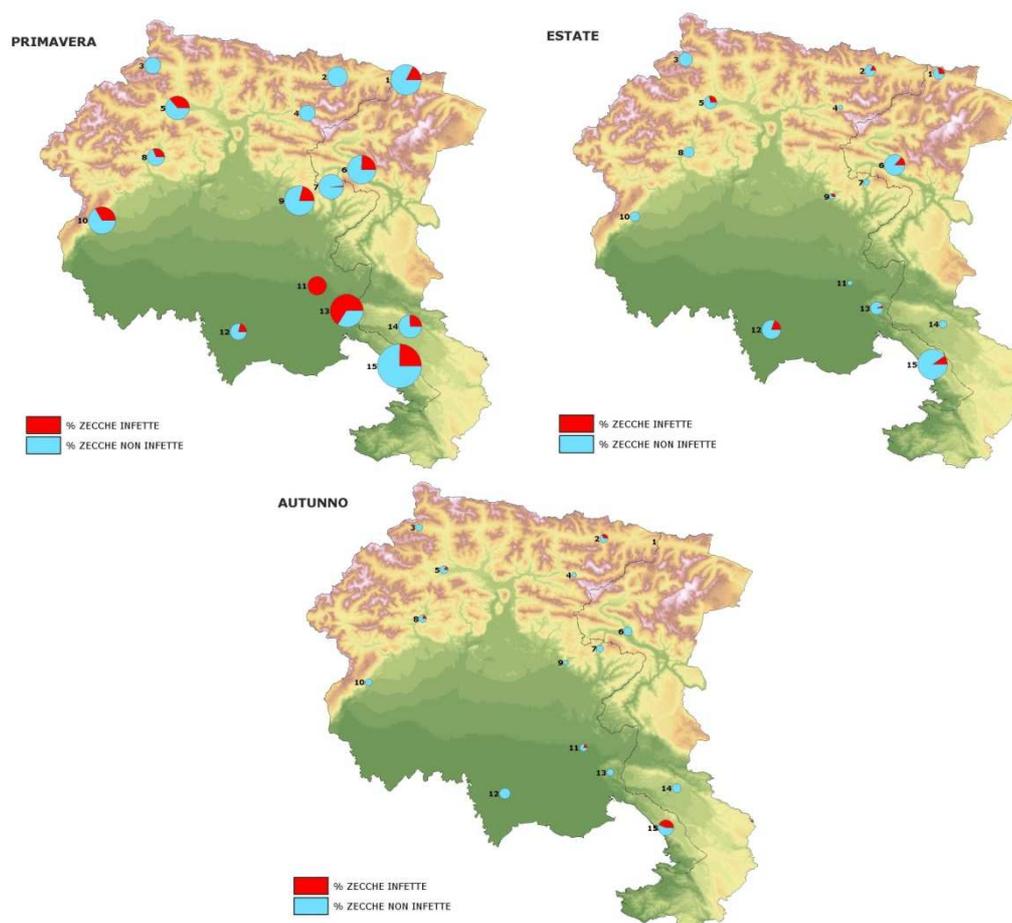


**Figura 10.2.** Prevalenza annuale (%) di *Borrelia* nel territorio regionale del FVG e area transfrontaliera slovena durante l'anno 2005.

I dati relativi alla positività riportati in Tabella 10.1 indicano la stazione di Colle di Medea (ID 11) e la stazione di Marcottini (ID 13), entrambe rappresentanti l'area carsica, come le stazioni con i più alti livelli di infezione, rispettivamente 84.2% e 55.9%. Considerando i risultati in relazione alle raccolte stagionali, si nota che in 13 delle 15 stazioni di raccolta, l'infezione delle zecche era più elevata nella stagione primaverile.

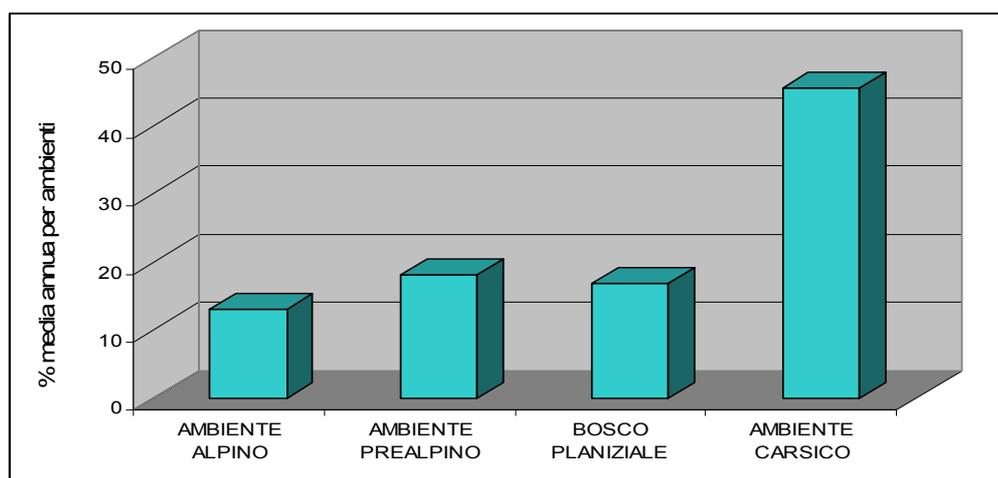
In particolare, nella stazione di Colle di Medea (ID 11), l'infezione coinvolgeva la totalità degli esemplari; nella stazione di Marcottini (ID 13) si è sfiorato il 66% di prevalenza. Le uniche 2 stazioni in controtendenza sono state la stazione di Valbruna (ID 2) e di Borgo Grotta Gigante (ID 15), nelle quali la prevalenza di zecche infette si è dimostrata maggiore in autunno.

Nei grafici a torta riportati in Figura 10.3 sono stati messi a confronto la percentuale di zecche infette (in rosso) e la percentuale di zecche non infette (in blu); inoltre, la grandezza delle torte è in rapporto all'abbondanza di zecche raccolte nei vari siti. Questi grafici dimostra chiaramente che la primavera è la stagione con il maggior rischio per contrarre il morbo di Lyme, dal momento che sia l'abbondanza delle zecche che la loro prevalenza d'infezione è maggiore in questa stagione.



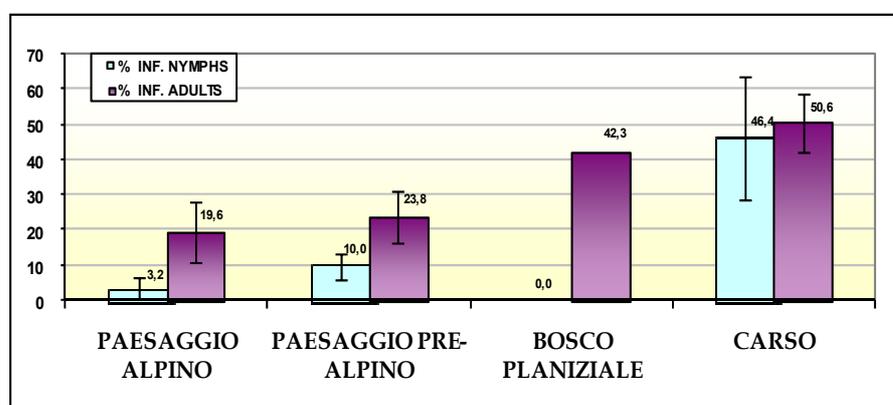
**Figura 10.3.** Prevalenza d'infezione per *B. burgdorferi* e abbondanza delle zecche presenti sul territorio nelle tre stagioni di raccolta durante l'anno 2005.

Analizzando i valori di positività per *B. burgdorferi* in base alle principali aree biogeografiche a cui le stazioni appartengono, si può osservare che la percentuale di infezione più elevata si trova sul Carso (45.5%) e che diminuisce man mano che ci si sposta verso l'arco alpino (Figura 10.4). La prevalenza di infezione è piuttosto alta anche nel bosco planiziale (16.9%), ma va considerato che questo è un dato che deriva da un'unica stazione di raccolta (ID 12-Selva d'Avronchi) per cui va trattato con riserva.



**Figura 10.4.** Percentuale di infezione media annua per *B. burgdorferi* nei quattro ambienti biogeografici nel 2005.

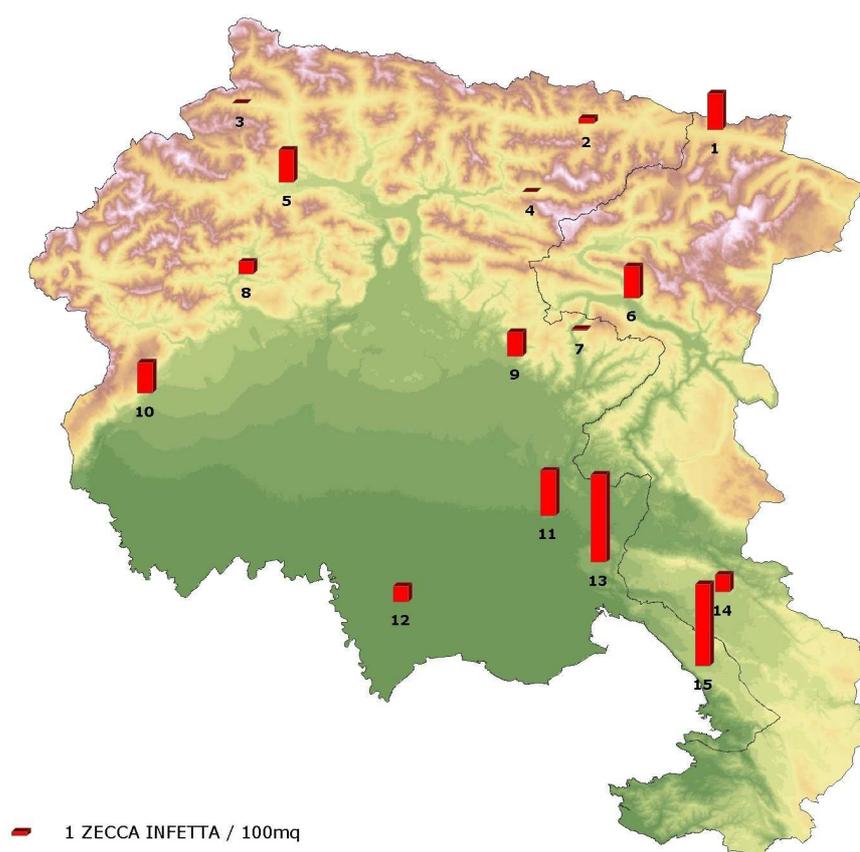
In base allo stadio di sviluppo, il numero di adulti infetti da *B. burgdorferi* è risultato maggiore rispetto a quello delle ninfe in ogni area biogeografia. La differenza tra adulti e ninfe infette era molto evidente soprattutto nell'area del bosco planiziale (Zona 3), del paesaggio alpino (Zona 1) e pre-alpino (Zona 2), mentre era meno marcata sul Carso (Zona 4) (Figura 10.5).



**Figura 10.5.** Prevalenza di *B. burgdorferi* in ninfe ed adulti, in relazione alle 4 aree biogeografiche nel 2005.

## Indice di Rischio per l'infezione da *B. burgdorferi*

I valori di prevalenza di *B. burgdorferi* nelle zecche sono stati espressi come **Indice di Rischio (IR)**, ovvero il numero di zecche infette su un'area di 100 m<sup>2</sup>, che rappresenta il rischio di essere morsi da una zecca infetta in quell'area. In generale, il rischio potenziale dipende non solo dall'infettività di *I. ricinus*, ma anche dall'abbondanza degli esemplari nella stazione considerata. Tale valore è stato proiettato sul territorio della regione Friuli Venezia Giulia, come riportato in Figura 10.6. Per quanto riguarda la distribuzione geografica, il rischio risulta maggiore sul Carso dove sono elevati sia l'abbondanza di zecche che il loro grado d'infezione con *B. burgdorferi* (Tabella 10.1 e Figura 10.4). Come si può osservare nelle stazioni ubicate nella zona carsica (Zona 4) il rischio è elevato, meno rischioso nelle stazioni situate nell'area pre-alpina (Zona 2) mentre è scarso o nullo nelle stazioni dell'area alpina (Zona 1).



**Figura 10.6.** Distribuzione del rischio (IR) sul territorio della regione FVG e area transfrontaliera slovena durante l'anno 2005.

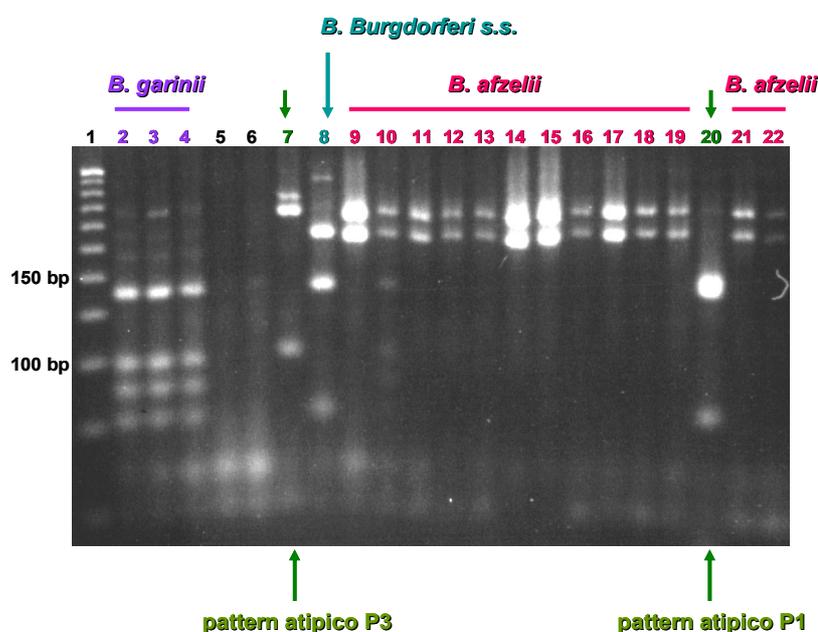
In Tabella 10.2 vengono riportati gli indici di rischio sotto forma di dato numerico, evidenziando gli IR più elevati tra le stazioni campionate nel 2005. L'indice di rischio in assoluto più alto è stato riscontrato nella stazione Marcottini (ID 13), con 20.7 zecche infette per 100 m<sup>2</sup>; seguono Borgo Grotta Gigante (ID 15) e Monte di Medea (ID 11) con valori di 18.4 e 10.7 rispettivamente. L'indice di rischio è risultato negativo in 2 delle 5 stazioni appartenenti all'area alpina: Val Pesarina (ID 3) e Saletto (ID 4), mentre un valore medio-basso si evidenzia nelle stazioni alpine di Kranjska Gora (ID 1) e Socchieve (ID 5) con rispettivamente 8.5 e 6.0 di IR. Per quanto riguarda il paesaggio pre-alpino, gli indici variano tra 0.3 riscontrabile nella stazione Mersino (ID7) e 15.5 di Costa d'Aviano (ID 10).

Zona	ID	Località	IR
1	1	Kranjska gora	8.5
	2	Valbruna	1.0
	3	Val Pesarina	0.0
	4	Saletto	0.0
	5	Socchieve	6.0
2	6	Kobarid	7.5
	7	Mersino	0.3
	8	Tramonti di Sotto	2.0
	9	Faedis	8.0
	10	Costa d'Alviano	26.8
3	12	Selva d'Arvonchi	2.7
4	11	Monte di Medea	10.7
	13	Marcottini	20.7
	14	Komen	3.6
	15	Borgo Grotta Gigante	18.4

**Tabella 10.2.** Indice di rischio (IR) annuale per *B. burgdorferi* nelle 15 stazioni campionate in regione FVG e area transfrontaliera slovena nel 2005.

### 10.3. Genospecie di *B. burgdorferi* negli esemplari di *I. ricinus* raccolti durante l'anno 2005

I campioni di zecca positivi per *B. burgdorferi* sono stati sottoposti a genotipizzazione con tecnica RFLP specifica per il gene plasmidico *ospA* (Floris et al., 2007) allo scopo di valutare la diffusione delle varie genospecie di *Borrelia* nell'area di studio (Figura 10.7).



**Figura 10.7.** Visualizzazione su gel di agarosio delle bande ottenute dopo la restrizione enzimatica con la tecnica RFLP sull'amplificato da 391 bp del gene plasmidico *ospA* di *Borrelia*.

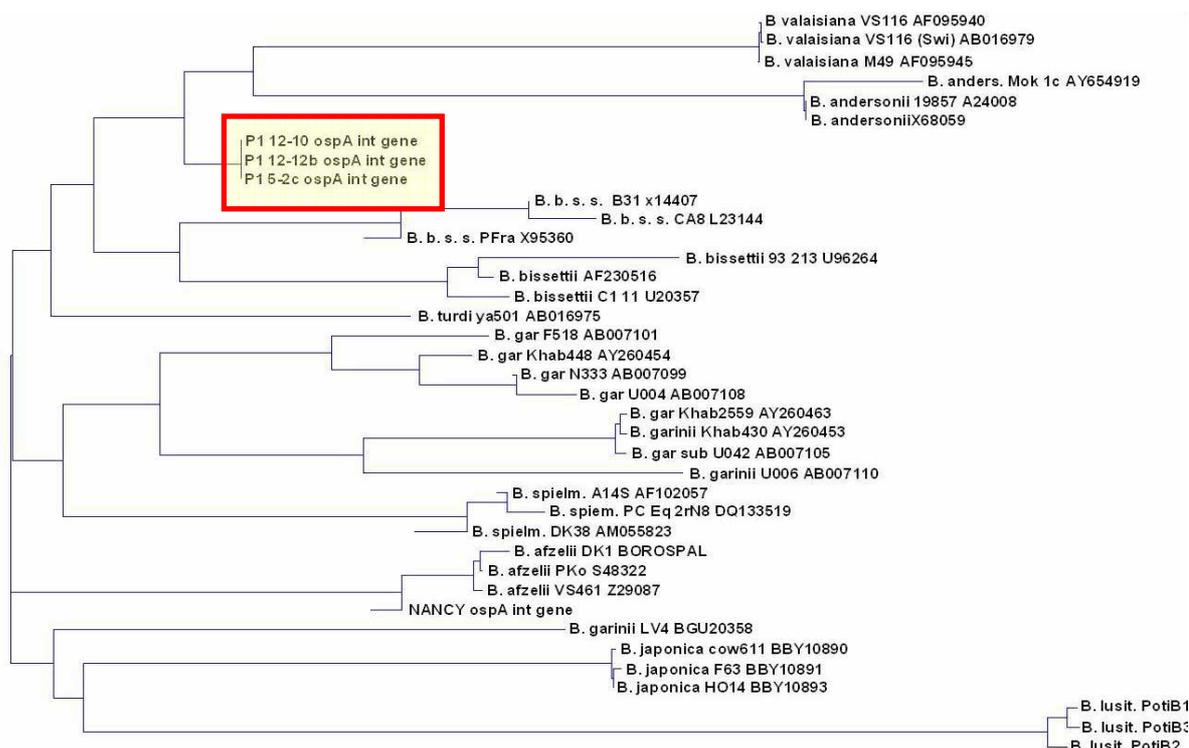
Nel 2.4% dei campioni sono state rilevate co-infezioni tra *B.afzelii* e *B.burgdorferi* s.s. oppure tra *B.afzelii* e *B. garinii*.

L'analisi di genotipizzazione ha evidenziato alcuni *pattern* atipici nel 4.9% dei campioni, per i quali è stato necessario eseguire il sequenziamento. L'analisi di omologia ha evidenziato l'appartenenza dei pattern denominati P2, P4, P6 alla specie *B. garinii*, mentre il pattern P4 si è dimostrato altamente simile alla specie *B. afzelii* (Tabella 10.3).

Pattern atipici	Specie omologa	GenBank (gi)	omologia
P1	<i>B. burgdorferi</i> s.s. <i>B. bissettii</i>	984061 Prof. Baranton	94% cluster
P2	<i>B. garinii</i>	984079	99%
P4	<i>B. garinii</i>	984079	98%
P5	<i>B. afzelii</i>	77702643	99%
P6	<i>B. garinii</i>	144004	99%

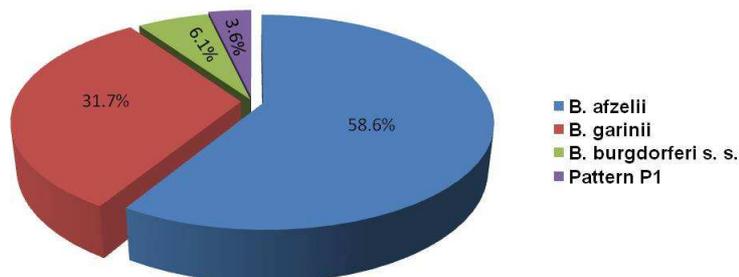
**Tabella 10.3:** Identificazione tramite analisi di omologia delle sequenze dei pattern atipici ottenuti con la genotipizzazione RFLP sul gene plasmidico *ospA* di *Borrelia*.

L'analisi di sequenza per il profilo elettroforetico denominato P1 ha dimostrato un'omologia del 94% con la specie *B. burgdorferi s.s.*. Una seconda analisi di omologia effettuata dal Prof. Baranton ha indicato questo campione come appartenente alla specie *B. bissettii*. A questo punto è stato necessario eseguire l'analisi filogenetica (Figura 10.8) che dimostra come la sequenza P1 formi un *cluster* (gruppo) a se stante, filogeneticamente vicino sia a *B. burgdorferi s.s.* che *B. bissettii*.



**Figura 10.8.** Analisi filogenetica dei campioni di *B. burgdorferi* con *pattern* atipico P1. (Vector-Invitrogen).

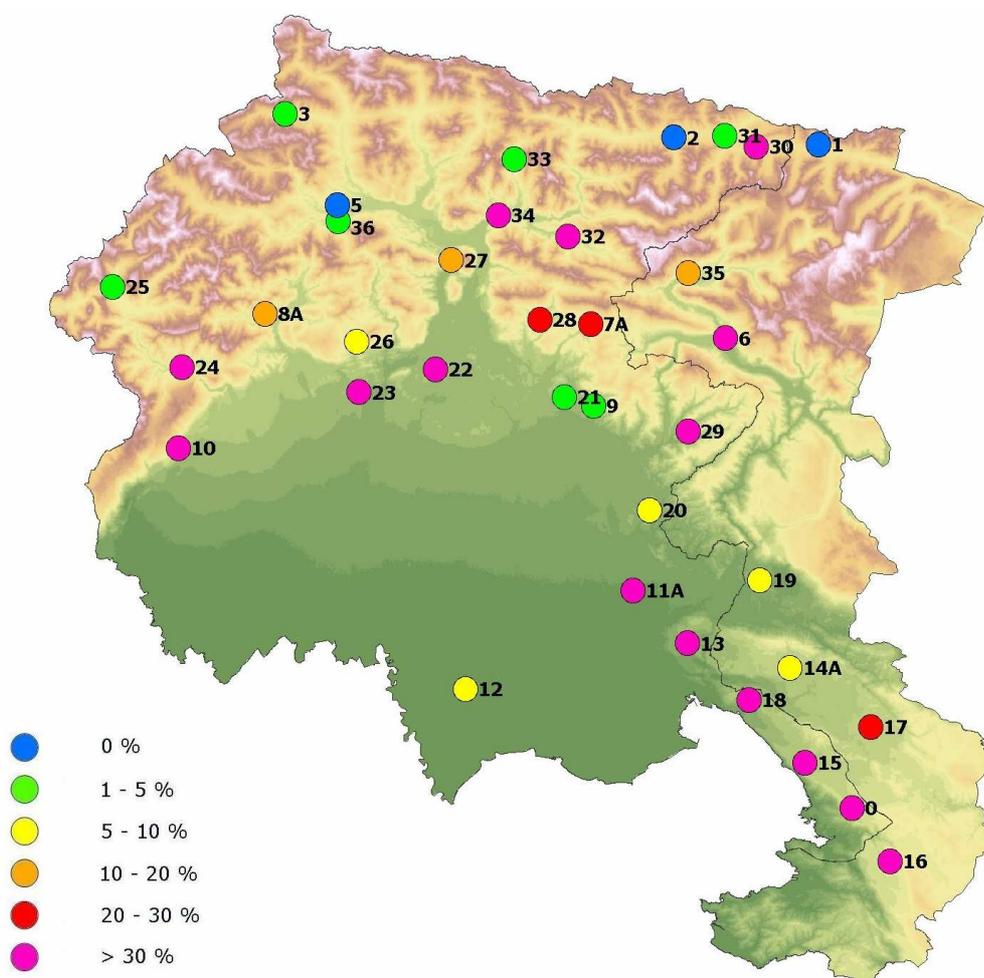
I risultati ottenuti dalla genotipizzazione hanno dimostrato una netta prevalenza di *B. afzelii* (58.6%), seguita da *B. garinii* (31.7%) e *B. burgdorferi sensu stricto* (6.1%), mentre il *pattern* P1 era presente nel 3.6% dei campioni (Figura 10.9).



**Figura 10.9.** Rapporto tra le specie di *B. burgdorferi* nei campioni di zecca (analisi RFLP sul gene *ospA*).

## 10.4. Presenza di *B. burgdorferi* nelle zecche raccolte nel 2006

Le analisi per la presenza di *Borrelia* effettuate sulle zecche raccolte nell'anno 2006 hanno evidenziato un aumento della prevalenza di *Borrelia* lungo l'arco alpino: le stazioni di Fusine, Val Resia e Campiolo (ID 30, ID 32, ID 34) aggiunte nel 2006 presentano alti valori di prevalenza (>30%) e sono quindi possibili focolai a rilevante rischio di infezione. Per contro, alcune stazioni come le stazioni 1, 2 e 5, mediamente infette nel 2005, hanno visto un azzeramento della presenza di *Borrelia*. Un aumento di prevalenza è pure riscontrabile a cavallo del fronte prealpino/alpino, dove sono situate le stazioni di Costa, Majano, Valeriano e Barcis (ID 10, ID 22, ID 23, ID 24). Le prevalenze rimangono e si confermano elevate nelle stazioni carsiche, soprattutto lungo il versante italiano (Figura 10.10).

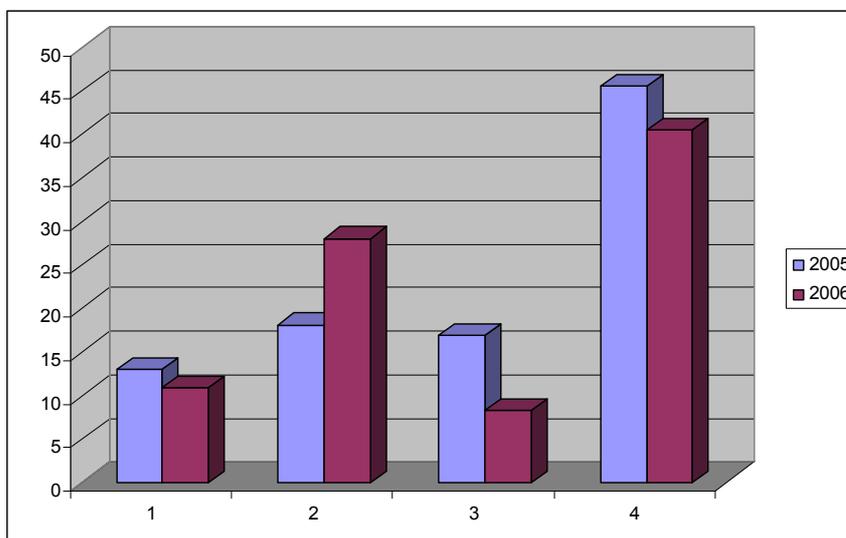


**Figura 10.10.** Prevalenza annuale (%) di *Borrelia* nel territorio regionale del FVG e area transfrontaliera slovena durante l'anno 2006.

Stazioni			Zecche		Prevalenza d'infezione, %			
			infette/zecche raccolte, n		Ninfe singole	Adulti singoli	Zecca singola (ninfe + adulti)*	Infezione media per zona, %
Zona	ID	Località (m a. s. l.)	Pool di 3 ninfe	Adulti singoli				
1	1	Kranjska gora (947)	0/3	0/22	0.0	0.0	0.0	10.9
	2	Valbruna (836)	0/5	0/20	0.0	0.0	0.0	
	3	Val Pesarina (558)	1/8	0/7	1.1	0.0	3.4	
	5	Socchieve (450)	0/4	0/17	0.0	0.0	0.0	
	30	Fusine in Val Romana (792)	1/1	13/29	3.0	44.8	50.0	
	31	Tarvisio (805)	0/6	1/12	0.0	8.3	3.3	
	33	Val Aupa (599)	0/9	1/5	0.0	20.0	3.1	
	34	Campiolò (370)	7/10	1/2	10.3	50.0	34.1	
	35	Pluzna (371)	3/6	0/13	3.7	0.0	12.0	
	36	Preone (540)	0/7	1/13	0.0	7.7	2.9	
2	6	Kobarid (293)	0/7	11/15	0.0	73.3	30.6	28.0
	7A	Taipana (722)	2/8	7/8	2.2	87.5	28.7	
	8A	Inglagna (368)	3/7	3/12	3.6	25.0	19.9	
	9	Faedis (242)	0/1	2/39	0.0	5.1	4.8	
	10	Costa (346)	4/11	11/12	4.6	91.7	34.7	
	20	Bosco Romagno (105)	0/2	3/25	0.0	12.0	9.7	
	21	Savorgnano del Torre (168)	0/2	1/24	0.0	4.2	3.3	
	22	Majano (167)	1/4	10/18	1.1	55.6	37.0	
	23	Valeriano (180)	8/10	4/10	12.5	40.0	41.1	
	24	Barcis (475)	1/8	17/24	1.1	70.8	37.6	
	25	Cimolais (680)	1/10	1/11	1.1	9.1	5.0	
	26	Clauzetto (559)	2/10	0/4	2.2	0.0	6.4	
	27	Lago Di Cavazzo (202)	5/12	1/5	5.9	20.0	16.8	
	28	Vedronza (334)	2/6	7/15	2.3	46.7	28.1	
29	Osgnetto (177)	1/2	12/26	1.2	46.2	41.4		
32	S.Giorgio (464)	9/9	1/5	27.0	20.0	87.5		
3	12	Selva d'Arvonchi (3)	0/9	4/21	0.0	19.0	8.3	8.3
4	0	Padriciano (348)	6/9	5/6	8.3	83.3	40.3	40.5
	11	Colle di Medea (101)	5/6	9/13	8.1	69.2	55.2	
	13	Marcottini (89)	19/22	2/3	32.0	66.7	49.3	
	14A	Sveto (319)	14/72	5/11	15.1	45.5	8.9	
	15	Borgo Grotta Gigante (212)	14/18	3/4	20.5	75.0	41.9	
	16	Ocizla (440)	21/23	3/4	37.9	75.0	56.8	
	17	Dobravljje (337)	12/21	5/9	15.0	55.6	28.6	
	18	Malchina (163)	32/40	4/5	49.8	80.0	43.0	
	19	Panovec (116)	4/14	0/10	4.5	0.0	8.6	
Totale nell'area di studio			178/402	148/479				22.9

**Tabella 10.4.** Prevalenza di *B. burgdorferi* nelle zecche *I. ricinus* raccolte nelle quattro zone fitoclimatiche del territorio regionale del FVG e area transfrontaliera slovena durante l'anno 2006.

Osservando la Figura 10.11 che rappresenta i valori di prevalenza di *Borrelia* in base all'area biogeografica, si nota un aumento nell'area prealpina (Zona 2), mentre sono pressoché costanti le prevalenze negli altri ambienti (Figura 10.11).



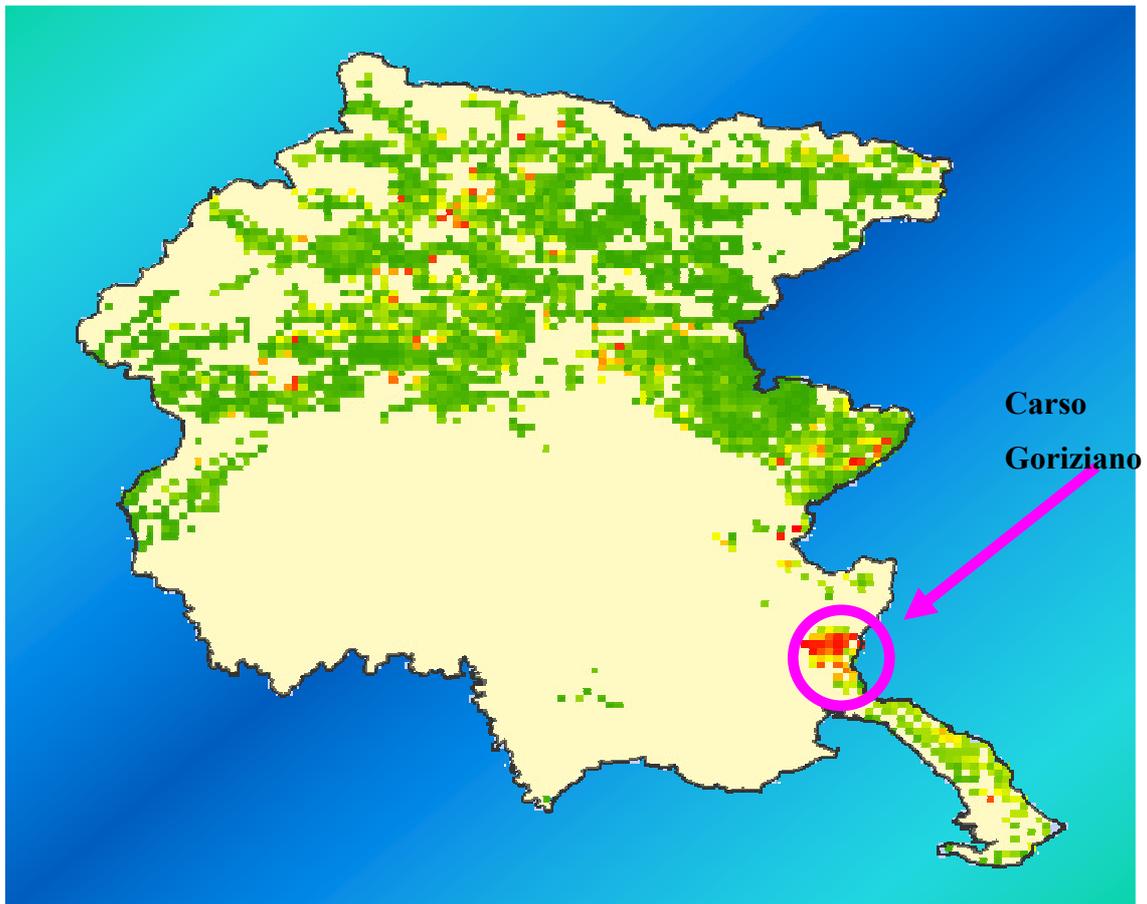
**Figura 10.11.** Prevalenza media annua di *B. burgdorferi*: confronto per ambienti tra le raccolte 2005 e 2006.

## 10.5. Sviluppo del rischio spaziale per la borreliosi di Lyme in regione FVG

I risultati di prevalenza per *B. burgdorferi* raccolti nel 2005 sono stati confrontati con quelli ottenuti dai campionamenti effettuati nel 2006. I dati relativi alle due annate di raccolta sono stati integrati a misurazioni satellitari e parametri ecologici quali masse verdi, umidità relativa, abbondanza di ospiti serbatoio, temperatura dell'aria, applicando la formula riportata a pag. 74. In questo modo è stato sviluppato un modello derivato che ha permesso di tracciare la **mappa di rischio spaziale per la borreliosi di Lyme in regione FVG** riportata in Figura 10.12.

I parametri che sono risultati maggiormente significativi nell'influenzare il rischio d'infezione sono stati: l'abbondanza di ospiti serbatoio (in particolare più di 10 capi per 100 h), seguito dal clima, dalla vegetazione e dall'altitudine.

Da questa elaborazione finale si può concludere che effettivamente le zone a più alto rischio sono il **Carso Goriziano** e alcune altre **Spot** distribuite sia a cavallo del confine che nella fascia pre-alpina.

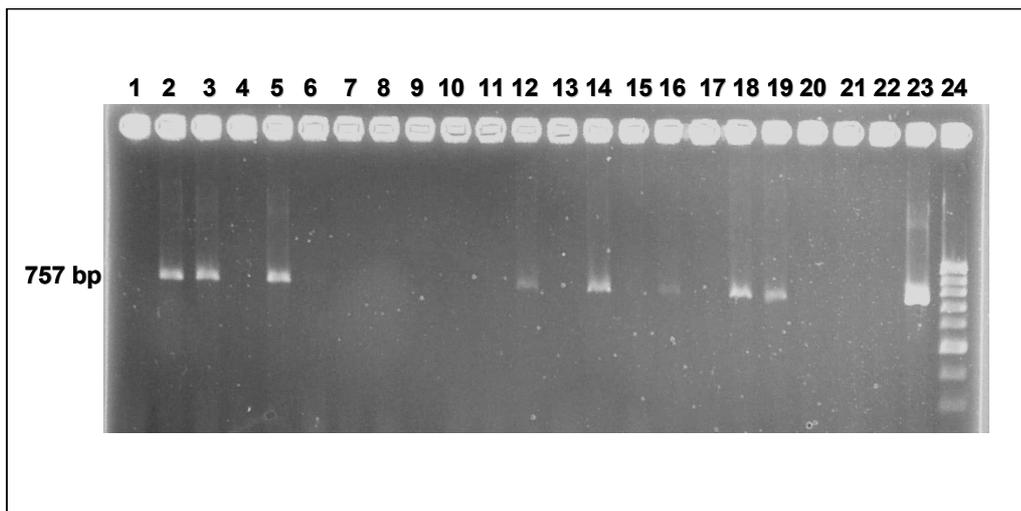


**Figura 10.12.** Mappa del Rischio di infezione da *B. burgdorferi*; le zone colorate in rosso sono quelle risultanti a maggior rischio, seguite dalle aree a colorazione gialla e verde.

## 11. RICKETTSIA NELLE ZECCHE *I. RICINUS*

### 11.1. Identificazione di *Rickettsia* spp.

L'analisi di PCR con *primer* specifici per il gene 16S rRNA di *Rickettsia* ha permesso di individuare i campioni di zecca positivi per il patogeno. La Figura 11.1 mostra gli amplificati da 757 bp ottenuti dopo l'amplificazione di alcuni campioni positivi di *I. ricinus*, visualizzati su gel di agarosio.



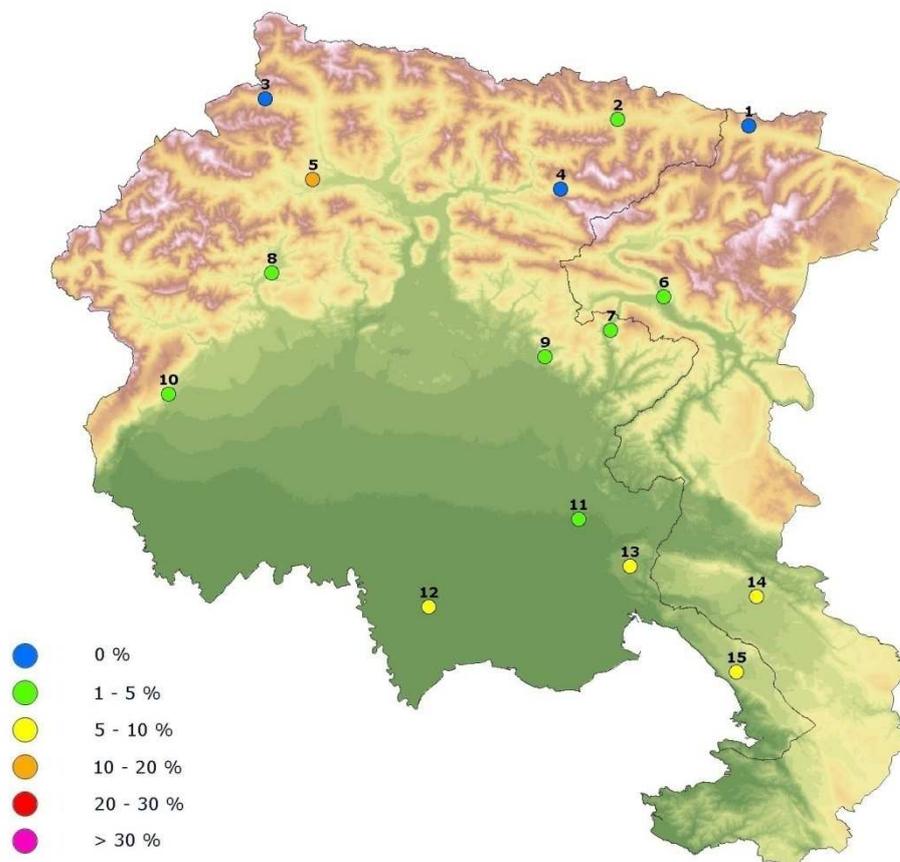
**Figura 11.1.** Visualizzazione su gel di agarosio delle bande da 757 bp di alcuni campioni di *I. ricinus* risultati positivi all'amplificazione con *primer* specifici per il gene 16S rRNA di *Rickettsia*: corsie 1, 15, 22: controllo negativo; corsia 2-14, 16-21: DNA estratto da alcuni campioni di zecca; corsia 23: controllo positivo, corsia 24: PM 100 bp.

### 11.2. Presenza di *Rickettsia* nei campioni di zecca raccolti nel 2005

La presenza di *Rickettsia* è stata riscontrata in 27 pool di 3 ninfe (9.2%) e in 26 (7.3%) adulti di cui 12 maschi e 14 femmine. *Rickettsia* era presente in tutta l'area di studio ad eccezione di un lembo nell'area alpina in prossimità del confine regionale con il Veneto. I picchi di prevalenza sono stati osservati nella parte centrale della regione FVG, a cavallo delle aree alpina e prealpina; il valore più alto, 13.2%, è stato registrato nella località di Socchieve (ID 5). Il tasso di infezione era maggiore nella zona 3 (7.8%), seguito dalla zona 4 (5.8%), zona 1 (4.0%) e zona 2 (2.7%). La prevalenza di infezione nell'intera area di studio è risultata del 4.5% (Tabella 11.1 e Figura 11.1).

Stazioni			Zecche infette/zecche raccolte, n		Prevalenza d'infezione, %			
Zona	ID	Località (m a. s. l.)	Pools di 3 ninfe	Adulti singoli	Ninfe singole	Adulti singoli	Zecca singola (ninfe + adulti)*	Infezione media per zona,
1	1	Kranjska Gora (947)	0/28	0/10	0.0	0.0	0.0	4.0
	2	Valbruna (836)	0/12	2/19	0.0	10.5	3.8	
	3	Val Pesarina (558)	0/11	0/13	0.0	0.0	0.0	
	4	Saletto (558)	0/9	0/2	0.0	0.0	0.0	
	5	Socchieve (450)	1/3	8/62	12.6	12.9	13.2	
2	6	Kobarid (293)	2/28	0/35	2.4	0.0	1.8	2.7
	7	Mersino (842)	0/15	1/15	0.0	6.7	1.6	
	8	Tridis (425)	0/6	1/27	0.0	3.7	2.4	
	9	Faedis (242)	0/1	4/81	0.0	4.9	4.9	
	10	Costa (346)	0/16	2/32	0.0	6.3	2.6	
3	12	Selva D'arvonchi (3)	1/14	4/26	2.4	16.0	7.8	7.8
4	11	Colle di Medea (101)	1/12	0/5	2.9	0.0	2.8	5.8
	13	Marcottini (89)	7/35	2/9	7.2	22.2	8.4	
	14	Komen (264)	3/20	1/3	4.6	33.3	5.8	
	15	Borgo Grotta Gigante (212)	12/85	1/16	4.9	6.7	5.1	
Totale nell'area di studio			27/295	26/355	3.2	7.4	4.5	4.5

**Tabella 11.1.** Prevalenza di *Rickettsia* spp. nelle zecche *I. ricinus* raccolte nelle quattro zone fitoclimatiche della regione FVG e area transfrontaliera slovena nell'anno 2005.



**Figura 11.2.** Prevalenza annuale (%) di *Rickettsia* spp nel territorio regionale del FVG e area transfrontaliera slovena durante l'anno 2005.

Sono state riscontrate coinfezioni tra *Rickettsia* e *Borrelia* nel 2.3% dei campioni di zecche adulte, in prevalenza femmine (87% delle coinfezioni).

### Identificazione della specie infettante

I campioni positivi sono stati sequenziati per identificare le specie di *Rickettsia* presenti. Il 58.5% dei campioni positivi è stato identificato come *R. helvetica* in base alla completa omologia con le sequenze del gene 16S rRNA di questa specie depositate in banca dati GenBank (accession n° L36212), mentre il 41.1% ha mostrato una omologia totale con le sequenze del gene 16S rRNA della specie *R. monacensis* depositate in banca dati GenBank (accession n° DQ100164). Come si può vedere dalla Tabella 11.2, in alcune località, in particolare quelle appartenenti dell'area del Carso erano presenti entrambe le specie.

ID	Località	Specie <i>Rickettsia</i>
1	Kranjska gora (SLO)	/
2	Valbruna (Tarvisio)	<i>R. monacensis</i>
3	Pesariis, Val Pesarina	/
4	Saletto / Chiusaforte	/
5	Socchieve	<i>R. helvetica</i>
6	Caporetto / Tolmino (SLO)	<i>R. monacensis</i>
7	Mersino alta / San Lorenzo	<i>R. monacensis</i>
8	Tramonti di sotto	<i>R. monacensis</i>
9	Castelli Faedis	<i>R. helvetica</i>
10	Costa di Aviano	<i>R. monacensis</i>
11	Colle di Medea (GO)	<i>R. helvetica</i>
12	Muzzana (UD)	<i>R. monacensis</i> + <i>R. helvetica</i>
13	dolina Marcottini / carso GO	<i>R. monacensis</i> + <i>R. helvetica</i>
14	Sezana dolina (Komen-SLO)	<i>R. helvetica</i>
15	Borgo grotta gigante/carso TS	<i>R. monacensis</i> + <i>R. helvetica</i>

**Tabella 11.2.** Specie di *Rickettsia* evidenziate nelle zecche raccolte durante l'anno 2005 in regione FVG e area transfrontaliera slovena mediante sequenziamento dei positivi e analisi di omologia.