



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθυντής: Καθηγητής Αθανάσιος Τσακρής

Διερεύνηση παθογόνων σε εκτοπαρασίτα στην περιοχή της Αττικής

ΜΑΡΙΑ ΛΙΟΔΑΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΥ ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ



ΑΘΗΝΑ 2023

Ημερομηνία κατάθεσης αίτησης διδακτορικής διατριβής: 20/7/2016

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 29/11/2016

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 27/1/2017

Επιβλέπουσα

Ευαγγελία-Θεοφανώ Πιπεράκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής
Ε.Κ.Π.Α.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- Ευαγγελία-Θεοφανώ Πιπεράκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.
- Μιχαήλ Σαμάρκος, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.
- Γεώργιος Λ. Δαΐκος, Ομότιμος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής

Γεράσιμος Σιάσος, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- Ευαγγελία-Θεοφανώ Πιπεράκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.
- Μιχαήλ Σαμάρκος, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.
- Γεώργιος Λ. Δαΐκος, Ομότιμος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.
- Ιωσήφ Παπαπααρασκευάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.
- Μήνα Ψυχογιού, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.
- Βασιλική Πιτυρίγκα, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.
- Ευαγγελία Δημητρούλια, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 19/7/2023

Αυτή η σελίδα σκοπίμως είναι λευκή.

Αφιερώνεται

Στην οικογένειά μου
Θανάση, Γιώργο και Αγγελική

Στη μητέρα μου
και
Στη μνήμη του πατέρα μου

Αυτή η σελίδα σκοπίμως είναι λευκή.

Ἀριστοτέλους, Περί ζώων μορίων, 645a15-16

«Διὸ δεῖ μὴ δυσχεραίνειν παιδικῶς τὴν περὶ τῶν ἀτιμωτέρων ζώων ἐπίσκεψιν·
ἐν πᾶσι γὰρ τοῖς φυσικοῖς ἔνεστί τι θαυμαστόν.»

Ἀριστοτέλους, Περί ζώων μορίων

Δεν πρέπει να κουραζόμαστε σαν τα παιδιά, να μελετούμε και το πιο ασήμαντο ζώο. Γιατί σε κάθε δημιούργημα της φύσης υπάρχει κάτι το θαυμάσιο.

(Μτφρ. Δ. Λυπουρλής)

Αυτή η σελίδα σκοπίμως είναι λευκή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ζωνοφόροι οφείλονται σε παθογόνους μικροοργανισμούς που προέρχονται από τα ζώα. Η μετάδοση διαμέσου αιμοδιατρεφόμενων διαβιβαστών αποτελεί έναν από τους συνηθέστερους τρόπους μετάδοσης και ειδικότερα διαμέσου κροτώνων αλλά και εντόμων όπως είναι οι ψύλλοι. Στην Ελλάδα, υπάρχουν αναφορές νοσημάτων σε ανθρώπους αλλά και σε ζώα που σχετίζονται με αρκετούς από αυτούς τους μικροοργανισμούς. Οι αναφορές ύπαρξης παθογόνων μικροοργανισμών στους ίδιους τους διαβιβαστές είναι περιορισμένες στη χώρα μας, κυρίως σε ό,τι αφορά την περιοχή της Αττικής που περιλαμβάνει την πρωτεύουσα Αθήνα και αποτελεί την πιο πυκνοκατοικημένη περιφέρειά της. Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η διερεύνηση της ύπαρξης παθογόνων μικροοργανισμών σε κρότωνες και ψύλλους από σκύλους και γάτες στην περιοχή της Αττικής, η ταυτοποίηση των ειδών και η συνακόλουθη συμβολή στη μελέτη της μοριακή επιδημιολογίας τους στη χώρα μας με τη σύγκριση ήδη καταγεγραμμένων ειδών εφόσον υπάρχουν αλλά και με αυτά που έχουν καταγραφεί σε άλλες χώρες.

Πιο συγκεκριμένα, διερευνήθηκε με μοριακές μεθόδους η ύπαρξη των παθογόνων μικροοργανισμών των γενών *Bartonella*, *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Coxiella*, *Francisella*, *Borrelia* και *Babesia* σε κρότωνες και ψύλλους που συλλέχθηκαν από σκύλους και γάτες. Το υλικό της μελέτης περιλάμβανε 41 κρότωνες *Rhipicephalus sanguineus* s.l., *Rhipicephalus* sp. και *Ixodes* sp. και 104 ψύλλους *Ctenocephalides felis* που συλλέχθηκαν από 53 σκύλους και 92 γάτες από 39 περιοχές της Περιφέρειας Αττικής. Από κάθε ζώο ξενιστή συλλέχθηκε μια κατηγορία εκτοπαρασίτου και επιλέχθηκε ένα μόνο εκτοπαρασίτο σε περίπτωση που είχαν συλλεχθεί περισσότερα του ενός. Από αυτό απομονώθηκε το ολικό γονιδιωματικό DNA και εφαρμόστηκαν μοριακές μέθοδοι που περιλάμβαναν 14 πρωτόκολλα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) συμπεριλαμβανομένης συμβατικής, εμφωλεασμένης και πραγματικού χρόνου. Σε ό,τι αφορά τους ψύλλους, βρέθηκε *Bartonella henselae* (3/104) και *Bartonella clarridgeiae* (11/104) καθώς και *Rickettsia felis* (5/104), κυρίως στον Κεντρικό αλλά και στο Βόρειο Τομέα της Αθήνας. Σε μεγάλο αριθμό ψύλλων (64/104) ανιχνεύθηκε επίσης ο ενδοσυμβιώτης *Wolbachia pipientis* (οικ. Anaplasmataceae). Σε ό,τι αφορά τους κρότωνες *R. sanguineus* s.l., ανιχνεύθηκαν τα παθογόνα *Rickettsia conorii* (3/41) στο Νότιο Τομέα της Αθήνας και στον Πειραιά και *Ehrlichia canis* (1/41) στην Ανατολική Αττική. Στον μοναδικό κρότωνα *Ixodes* sp. βρέθηκε ο ενδοσυμβιώτης *Candidatus Midichloria mitochondrii*. Οι αλληλουχίες των παθογόνων που προέκυψαν από τα πειραματικά πρωτόκολλα συμβατικής PCR κατατέθηκαν στην βάση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών GenBank.

Ειδικότερα για την *B. clarridgeiae* κατατέθηκε μία νέα αλληλουχία που αφορούσε το ριβοσωμικό γονιδιακό τόπο 16S-23S rRNA ITS.

Τα αποτελέσματα συνιστούν την πρώτη αναφορά στην Ελλάδα για την παρουσία *E. canis* σε κρότωνες *R. sanguineus* s.l., για την παρουσία *R. conorii* σε κρότωνες *R. sanguineus* s.l. προερχόμενους από γάτες, καθώς επίσης και για την παρουσία *B. henselae* και *B. clarridgeiae* σε ψύλλους *C. felis* προερχόμενους από σκύλους. Κατά συνέπεια αποτελούν συμβολή στη μελέτη της επιδημιολογίας των ρικετσιών της ομάδας του κηλιδοβλατιδώδους πυρετού, των μπαρτονελλών και των ερλιχιών που έως τώρα έχουν αναφερθεί στην Ελλάδα.

Στο ευρύτερο πλαίσιο της Ενιαίας Υγείας, η επιτήρηση των παθογόνων μικροοργανισμών περιλαμβάνει όχι μόνο ανθρώπους και ζώα αλλά και αρθρόποδα υγειονομικής σημασίας. Το γεγονός ότι τα ευρήματα αυτά αφορούν την περιοχή της Αττικής -συμπεριλαμβανομένου του μητροπολιτικού κέντρου της Αθήνας- που αποτελεί την πιο πυκνοκατοικημένη περιοχή του ελλαδικού χώρου με μεγάλο αριθμό αδέσποτων ζώων κυρίως γατιών, ενισχύει ακόμα περισσότερο την ανάγκη αυτής της επιτήρησης και την περαιτέρω έρευνα σε ό,τι αφορά τον γονοτυπικό χαρακτηρισμό ζωνοτικών παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και τη διερεύνηση των δυνητικών αρθροπόδων διαβιβαστών τους.

ABSTRACT

Zoonoses are caused by pathogenic microorganisms originating from animals. Transmission through blood-sucking arthropod vectors is one of the most common routes of transmission, particularly via arachnids such as ticks but also via insects such as fleas. In Greece, several reports of human as well as animal diseases are related to arthropod borne diseases. Reports of the existence of pathogenic microorganisms are scarce, especially in the region of Attica, including the densely populated capital of Athens. The aim of this work was the investigation of pathogenic microorganisms in ticks and fleas from dogs and cats from Attica region, the identification of species and consequently the contribution to the study of their molecular epidemiology in our country by comparing them with already recorded species from Greece and other countries.

More specifically, the existence of pathogenic microorganisms of the genera *Bartonella*, *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Coxiella*, *Francisella*, *Borrelia* and *Babesia* in ticks and fleas collected from mainly stray dogs and cats was investigated by molecular methods. The study material included 41 ticks, *Rhipicephalus sanguineus* s.l., *Rhipicephalus* sp. and *Ixodes* sp. and 104 *Ctenocephalides felis* fleas collected from 53 dogs and 92 cats from 39 areas of the Attica region. One category of ectoparasite was collected from each host animal and a single ectoparasite was selected if more than one were collected. After DNA extraction, molecular assays were applied, including 14 PCR protocols (conventional, nested and real-time). As far as fleas are concerned, *Bartonella henselae* (3/104) and *Bartonella clarridgeiae* (11/104) as well as *Rickettsia felis* (5/104) were found mainly in the central but also in the northern sector of Athens. In a large number of fleas (64/104), the endosymbiont *Wolbachia pipientis* (family Anaplasmataceae) was detected. Regarding *R. sanguineus* s.l. ticks, the pathogens *Rickettsia conorii* (3/41) were detected in the south sector of Athens and Piraeus and *Ehrlichia canis* (1/41) in the East Attica. The endosymbiont *Candidatus* Midichloria mitochondrii was detected in the unique sample of *Ixodes* sp. tick. Sequences obtained from conventional PCRs were deposited in the GenBank nucleotide sequence database. In particular, for *B. clarridgeiae* a novel sequence was deposited concerning the 16S-23S rRNA ITS ribosomal gene locus.

The results of this study constitute the first report in Greece of the presence of *E. canis* in *R. sanguineus* s.l. ticks and of *R. conorii* presence in *R. sanguineus* s.l. ticks from cats. This is also the first report of *B. henselae* and *B. clarridgeiae* detection in *C. felis* fleas from dogs. Consequently, they contribute to the epidemiology study of

the spotted fever group rickettsiae and also *Bartonella* and *Ehrlichia* bacteria reported in Greece so far.

In the broader One Health context, the surveillance of pathogenic microorganisms includes not only humans and animals but also arthropods of sanitary importance. The fact that these findings concern the region of Attica - including the metropolitan center of Athens - which is the most densely populated region of Greece with a large number of stray animals, mainly cats, further supports the need for surveillance and research on the genotypic characterization of zoonotic pathogenic microorganisms as well as the investigation of their potential arthropod vectors.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Αυτό το εγχείρημα, που θα μπορούσε να χαρακτηριστεί και ως η Ιθάκη της προσωπικής μου Οδύσσειας, μου επιβεβαίωσε ότι πράγματι μπορούμε να ανακαλύπτουμε καινούργια πράγματα ακόμα κι όταν αυτό φαντάζει ακατόρθωτο. Σημαντικοί αρωγοί σε αυτό το «ταξίδι» μου στάθηκαν άτομα, τα οποία ευχαριστώ από καρδιάς.

Ευχαριστώ την επιβλέπουσα Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ευαγγελία-Θεοφανώ Πιπεράκη μαζί με τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής τον Καθηγητή κ. Μιχαήλ Σαμάρκο και τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Γεώργιο Λ. Δαΐκο, τόσο γιατί με τίμησαν με τη συμμετοχή τους στην Τριμελή όσο και για την καθοριστική και συνεχή τους υποστήριξη ως προς την διεκπεραίωση της εργασίας αυτής, ειδικά σε στιγμές που οι δυσκολίες φάνταζαν αξεπέραστες. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την κ. Πιπεράκη για την καθοδήγησή της, την κατανόησή της αλλά και την εμπιστοσύνη της απέναντι στο πρόσωπό μου με την ανάθεση αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ το βιολόγο Γρηγόρη Σπανάκο για την σημαντική του συμβολή σε πολλά και σημαντικά πρακτικά ζητήματα και όχι μόνο. Οι γόνιμες συζητήσεις μας προωθούσαν τον τρόπο σκέψης μου και με ωθούσαν πάντα ένα βήμα παραπέρα.

Ευχαριστώ επίσης τον ερευνητή του Ινστιτούτου Παστέρ Δρ. Μανώλη Αγγελάκη για τις χρήσιμες υποδείξεις και την έμπρακτη υποστήριξή του στην πειραματική διαδικασία καθώς και την κτηνίατρο Ιωάννα Παπαδογιαννάκη για την συμβολή της.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια Ιατρ. Σχολής ΕΚΠΑ Αριστέα Βελεγράκη για την ευγενική διάθεση της τράπεζας υπεριώδους ακτινοβολίας στο εργαστήριο της.

Ευχαριστώ την εργαστηριακή βοηθό Βαρβάρα Χριστοπούλου για την πολύτιμη συνεισφορά στην πειραματική διαδικασία ειδικά σε πρακτικά ζητήματα που αφορούσαν στις εργαστηριακές τεχνικές.

Ευχαριστώ όλους τους κτηνιάτρους που συνέβαλαν καθοριστικά στη συλλογή των δειγμάτων.

Ευχαριστώ την αδελφή μου Ιωάννα Λιοδάκη για την υποστήριξη και αμέριστη συμπαράσταση, καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Τέλος, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, στο σύζυγό μου Θανάση Παπαδημητρίου και στα παιδιά μου Γιώργο και Αγγελική, οι οποίοι μου συμπαραστάθηκαν αλλά και με εμπύχωσαν σε όλα τα στάδια εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Αυτή η σελίδα σκοπίμως είναι λευκή.

Πίνακας περιεχομένων

| | |
|--|------|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | ix |
| ABSTRACT..... | xi |
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ | xiii |
| A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 3 |
| 1. Εισαγωγικά στοιχεία | 3 |
| 1.1. Τα αιμοδιατρεφόμενα αρθρόποδα ως διαβιβαστές παθογόνων | 3 |
| 1.2. Μορφολογικές προσαρμογές αιμοδιατρεφόμενων αρθροπόδων..... | 6 |
| 2. Εκτοπαράσιτα ζώων συντροφιάς | 8 |
| 2.1. Ψύλλοι | 8 |
| 2.1.1. Ταξινόμηση και Μορφολογία | 8 |
| 2.1.2. Βιολογικός κύκλος..... | 9 |
| 2.1.3. Επιδημιολογία και Υγειονομική σημασία | 11 |
| Οι Ψύλλοι ως εκτοπαράσιτα..... | 11 |
| Οι Ψύλλοι ως ενδιάμεσοι ξενιστές..... | 11 |
| Οι Ψύλλοι ως διαβιβαστές παθογόνων | 12 |
| 2.1.4. Αντιμετώπιση των Ψύλλων..... | 14 |
| 2.2. Κρότωναες | 15 |
| 2.2.1. Ταξινόμηση και μορφολογία των κροτώνων | 15 |
| 2.2.2. Βιολογικός κύκλος των Κροτώνων | 19 |
| 2.2.3. Επιδημιολογία και Υγειονομική σημασία των κροτώνων | 20 |
| Οι κρότωναες ως εκτοπαράσιτα | 21 |
| Οι κρότωναες ως διαβιβαστές παθογόνων..... | 23 |
| 2.2.4. Αντιμετώπιση των κροτώνων | 24 |
| 3. Παθογόνοι μικροοργανισμοί που διαβιβάζονται από κρότωναες και ψύλλους στους ανθρώπους | 24 |
| 3.1. Rickettsia..... | 24 |
| 3.1.1. Διαβιβαστές-Υποδόχα ρικετσιών | 24 |
| 3.1.2. Παθογένεια | 30 |
| 3.1.3. Κλινικές μορφές ρικετσιώσεων..... | 30 |
| Επιδημικός τύφος | 30 |
| Ενδημικός τύφος..... | 31 |
| Κηλιδώδης πυρετός από τον ψύλλο της γάτας | 32 |
| Κηλιδώδης πυρετός των Βραχωδών ορέων..... | 33 |
| Μεσογειακός Κηλιδοβλατιδώδης Πυρετός | 33 |
| Άλλες Ρικετσιώσεις της ομάδας του κηλιδώδους πυρετού..... | 35 |

| | |
|--|----|
| 3.1.4. Διάγνωση και θεραπεία των ρικετσιώσεων | 37 |
| 3.2. Ehrlichia/Anaplasma..... | 38 |
| 3.3. Coxiella..... | 41 |
| 3.4. Bartonella..... | 45 |
| 3.4.1. Διαβιβαστές-Υποδόχα μπαρτονελλών..... | 45 |
| 3.4.2. Παθογένεια | 47 |
| 3.4.3. Κλινικές μορφές μπαρτονελλώσεων | 49 |
| Νόσος εξ' ονύχων γαλής | 49 |
| Πυρετός των χαρακωμάτων..... | 50 |
| Πυρετός Ορόγια ή Νόσος του Carrion..... | 50 |
| 3.4.4. Διάγνωση και θεραπεία των μπαρτονελλώσεων..... | 51 |
| 3.5. Francisella..... | 52 |
| 3.6. Borrelia | 56 |
| 3.6.1. Μπορρελίωση Lyme | 56 |
| Διαβιβαστές και Υποδόχα..... | 56 |
| Στοιχεία Βακτηριολογίας | 58 |
| Κλινικές εκδηλώσεις, διάγνωση και θεραπεία | 58 |
| 3.6.2. Υπόστροφος Πυρετός..... | 59 |
| 3.7. Babesia..... | 61 |
| B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 67 |
| 1. Υλικό και Μέθοδοι..... | 67 |
| 1.1. Δειγματοληψία..... | 67 |
| 1.2. Συστηματική Ταξινόμηση Εκτοπαρασίτων..... | 70 |
| 1.2.1. Συστηματική ταξινόμηση των ψύλλων | 70 |
| 1.2.2. Συστηματική ταξινόμηση των κροτώνων | 70 |
| 1.3. Μοριακές μέθοδοι | 71 |
| 1.3.1. Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA | 74 |
| 1.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης | 75 |
| Babesia: Ενίσχυση τμήματος γονιδίου 18S rRNA | 78 |
| Bartonella: Ενίσχυση τμήματος γονιδιακού τόπου 16S-23S rRNA ITS..... | 78 |
| Bartonella: Ενίσχυση τμήματος γονιδίου glt(A)..... | 78 |
| Borellia: Ενίσχυση τμήματος γονιδίου hbb..... | 78 |
| Coxiella: Ενίσχυση τμήματος γονιδίου htpB | 78 |
| Ehrlichia/Anaplasma: Ενίσχυση τμήματος γονιδίου 16S rRNA | 79 |
| Francisella: Ενίσχυση τμήματος γονιδίου lrpA | 79 |
| Rickettsia: Ενίσχυση τμήματος γονιδίου gltA | 79 |

| | |
|---|-----|
| 1.3.3. Ηλεκτροφόρηση..... | 79 |
| 1.3.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου | 80 |
| 1.3.5. Αλληλούχιση (Εύρεση Πρωτοδιάταξης)..... | 83 |
| 1.3.6. Βιοπληροφορική ανάλυση αλληλουχιών | 84 |
| 1.3.7. Φυλογενετική ανάλυση..... | 85 |
| 2. Αποτελέσματα | 93 |
| 2.1. Δειγματοληψία | 93 |
| 2.2. Συστηματική Ταξινόμηση Εκτοπαρασίτων..... | 96 |
| 2.3. Μοριακές δοκιμασίες | 97 |
| 2.3.1. Αποτελέσματα ανίχνευσης βακτηρίων <i>Bartonella</i> spp. | 98 |
| 2.3.2. Αποτελέσματα ανίχνευσης βακτηρίων <i>Rickettsia</i> spp. | 103 |
| 2.3.3. Αποτελέσματα ανίχνευσης βακτηρίων <i>Ehrlichia</i> spp. / <i>Anaplasma</i> spp. | 104 |
| 2.3.4. Αποτελέσματα ανίχνευσης βακτηρίων <i>Coxiella</i> spp. | 110 |
| 2.3.5. Αποτελέσματα ανίχνευσης βακτηρίων <i>Francisella</i> spp. | 110 |
| 2.3.6. Αποτελέσματα ανίχνευσης βακτηρίων <i>Borrelia</i> spp..... | 110 |
| 2.3.7. Αποτελέσματα ανίχνευσης παρασίτων <i>Babesia</i> spp..... | 110 |
| 3. Συζήτηση..... | 113 |
| 4. Συμπεράσματα | 127 |
| 5. Βιβλιογραφία..... | 131 |
| 6. Παραρτήματα..... | 157 |
| 6.1. Πίνακας εξετασθέντων δειγμάτων..... | 157 |
| 6.2. Ευθυγράμμιση των ακολουθιών 16S-23S rRNA ITS που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου <i>Bartonella</i> | 163 |
| 6.3. Ευθυγράμμιση των ακολουθιών τμήματος γονιδίου 16S rRNA που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου <i>Ehrlichia</i> | 171 |
| 6.4. Ευθυγράμμιση των ακολουθιών τμήματος γονιδίου 16S rRNA που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου <i>Wolbachia</i> | 177 |
| 6.5. Ευθυγράμμιση των ακολουθιών τμήματος γονιδίου 16S rRNA που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου <i>Candidatus Midichloria mitochondrii</i> | 183 |
| 6.6. Δημοσιεύσεις των αποτελεσμάτων της διατριβής σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά με κριτές..... | 189 |

Αυτή η σελίδα σκοπίμως είναι λευκή.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αυτή η σελίδα σκοπίμως είναι λευκή.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγικά στοιχεία

1.1. Τα αιμοδιατρεφόμενα αρθρόποδα ως διαβιβαστές παθογόνων

Διαβιβαστές ονομάζονται τα αρθρόποδα που μπορούν να μεταδώσουν παθογόνους οργανισμούς ανάμεσα σε σπονδυλωτούς ξενιστές. Ανάλογα με την πηγή προέλευσης του παθογόνου παράγοντα οι μολυσματικές νόσοι διακρίνονται σε ανθρωπονόσους (όταν οι άνθρωποι αποτελούν την αποκλειστική δεξαμενή του παθογόνου παράγοντα) και ζωνόσους (όταν τα ζώα αποτελούν την κύρια δεξαμενή του παθογόνου παράγοντα) (1). Η διασπορά των παθογόνων είναι μια ιδιαίτερα σύνθετη διαδικασία όχι μόνο γιατί το αρθρόποδο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μετάδοση αλλά και γιατί σημαντική είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ του σπονδυλωτού ξενιστή και του παρασιτικού-παθογόνου παράγοντα. Η ασθένεια ως εκ τούτου προκύπτει από την ανταπόκριση του ξενιστή στην μόλυνση με τον παρασιτικό παράγοντα (2).

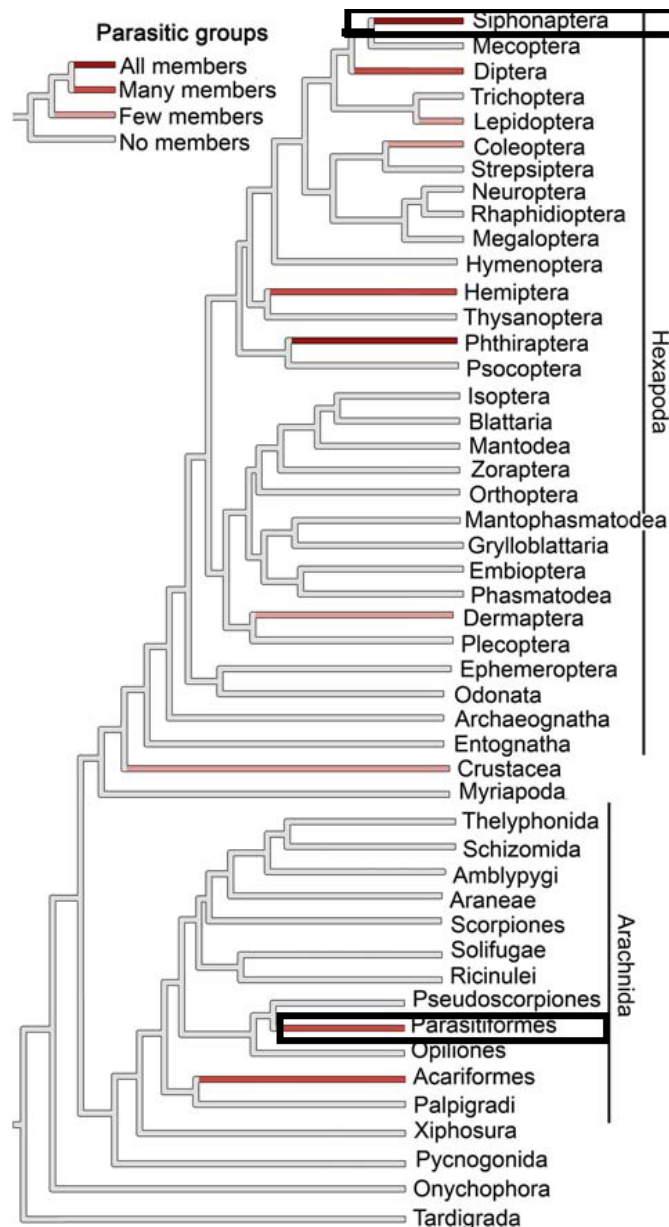
Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.), πάνω από 17% των λοιμώξεων και πάνω από 700.000 θανάτων παγκοσμίως, οφείλονται σε νόσους που προκαλούνται από διαβιβαστές. Ενδεικτική της σημασίας που προσδίδει σε αυτές ο Π.Ο.Υ, είναι η απόφαση WHA70.16 «Παγκόσμια ανταπόκριση για τον έλεγχο των διαβιβαστών 2017-2030» που υιοθετήθηκε στην Παγκόσμια Γενική Συνέλευση του 2017, σε μια προσπάθεια του Οργανισμού να ανταποκριθεί στις μεταβαλλόμενες υγειονομικές συνθήκες και στις ανάγκες που προκύπτουν σε παγκόσμια κλίμακα (3). Σε αρκετές περιπτώσεις τα υγειονομικά ζητήματα που προκύπτουν από τα αρθρόποδα σχετίζονται με τη διαχείριση του περιβάλλοντος που ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των διαβιβαστών και την επαφή τους τόσο με τους παθογόνους μικροοργανισμούς αλλά και με τους ανθρώπινους πληθυσμούς (4). Επίπλέον, οι ζωνόσοι αναδεικνύονται τα τελευταία χρόνια όλο και συχνότερα μέσα από τη στενή σχέση που έχει αναπτύξει ο άνθρωπος με τα κατοικίδια ζώα, ανεξαρτήτως κοινωνικο-οικονομικού πλαισίου (5).

Η αιματοφαγία αποτελεί κοινό γνώρισμα των αιμοδιατρεφόμενων αρθροπόδων, στα οποία περιλαμβάνονται πολλά είδη εντόμων, κρότωνες και ακάρεα. Τα γεύματα αίματος παρέχουν στα αρθρόποδα θρεπτικά στοιχεία απαραίτητα για τον μεταβολισμό τους, την μεταμόρφωση και/ή την αναπαραγωγή τους (2). Κατά τη λήψη του γεύματος μπορούν να δημιουργηθούν προβλήματα στους ξενιστές, είτε άμεσα

λόγω των επιπτώσεων των νυγμάτων, είτε λόγω της μεταφοράς παθογόνων οργανισμών όπως ιοί, βακτηρία, πρωτόζωα και έλμινθες (4).

Η μετάδοση των παθογόνων μικροοργανισμών μπορεί να είναι είτε βιολογική είτε μηχανική (6). Στην πρώτη περίπτωση που είναι και η πιο συνήθης, τα παθογόνα αναπτύσσονται και εξελίσσονται εντός του ξενιστή. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Σύμφωνα με τον πρώτο, τον κυκλο-αναπαραγωγικό, ο μικροοργανισμός μεταβάλλει τη μορφή του και ταυτόχρονα πολλαπλασιάζεται, όπως συμβαίνει στην ελονοσία και στην λειψμανίαση. Κατά τον δεύτερο, τον κυκλο-αναπτυξιακό, ο μικροοργανισμός μεταβάλλει τη μορφή του χωρίς να πολλαπλασιάζεται, όπως συμβαίνει στη λυμφοτική φιλαρίαση. Κατά τον τρίτο τρόπο, τον αναπαραγωγικό, ο μικροοργανισμός πολλαπλασιάζεται χωρίς να μεταβάλλει τη μορφή του, όπως συμβαίνει με τους ιούς και τα βακτήρια (7). Στη μηχανική μετάδοση, παθογόνα μεταδίδονται από τα αρθρόποδα μέσω επαφής με εκκρίσεις ή μολυσμένα τμήματα σώματος του αρθροπόδου (συνήθως στοματικά μέρη) ή παλινδρόμηση του μολυσματικού γεύματος αίματος. Τέτοιες περιπτώσεις αποτελούν η μυξωμάτωση και η μολυσματική αναιμία των ιπποειδών (8).

Τα αρθρόποδα αποτελούν την πιο πολυπληθή και πολυποίκιλη ομάδα του ζωικού βασιλείου. Τα μέλη αυτού του φύλου έχουν αποικίσει όλους τους βιοτόπους, γεγονός που δικαιολογεί την ποικιλότητα στην μορφολογία και τη βιολογία τους. Είναι οργανισμοί με κοινά χαρακτηριστικά τον χιτινώδη εξωσκελετό, το σώμα που αποτελείται από όμοια ή ανόμοια μεταμερή και τα αρθρωτά εξαρτήματα που είναι προσαρμοσμένα για διατροφή, κίνηση, πτήση, αναπαραγωγή και άμυνα. Ταξινομούνται σε δύο μεγάλες ομάδες τα γναθώτα και τα χηληκεραιωτά. Στην πρώτη ομάδα ανήκει η κλάση των Εντόμων που περιλαμβάνει πάνω από το 90% των έως τώρα γνωστών αρθροπόδων με πολλά είδη υγειονομικής σημασίας. Στη δεύτερη ομάδα ανήκει η κλάση των Αραχνιδίων και περιλαμβάνονται αρκετά είδη οικονομικής και υγειονομικής σημασίας για τον άνθρωπο. Στην εικόνα 1 όπου αποτυπώνονται οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των παρασιτικών ομάδων αρθροπόδων διακρίνονται τα Siphonaptera (Εξάποδα) στα οποία ανήκουν οι ψύλλοι που περιλαμβάνουν αποκλειστικά παρασιτικά είδη και τα Parasitiformes (Αραχνίδια) με πολλά παρασιτικά είδη μεταξύ των οποίων και οι κρότωνες. Ανάμεσα στους διαβιβαστές, τα κουνούπια αποτελούν την πιο σημαντική ομάδα, με δεύτερη σημαντικότερη τους κρότωνες (9,10) .



Εικόνα 1 Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των παρασιτικών ομάδων αρθροπόδων (11)

Οι κρότωνες και οι ψύλλοι αποτελούν εκτοπαράσιτα πολλών σπονδυλωτών ζωικών οργανισμών, μεταξύ των οποίων τα ζώα συντροφιάς οι σκύλοι και οι γάτες αλλά ευκαιριακά και των ανθρώπων. Και οι δύο αυτές ομάδες εκτοπαρασίτων αναφέρονται ως διαβιβαστές ζωνόσων, των οποίων η δυνατότητα να διασπείρουν παθογόνους μικροοργανισμούς ενδέχεται να ενισχυθεί τα επόμενα χρόνια (12). Αυτό θα μπορούσε να συμβεί μέσα σε ένα γενικότερο πλαίσιο περιβαλλοντικών μεταβολών σε μικρότερη ή μεγαλύτερη κλίμακα όπως μεταβολές που έχουν συντελεστεί τα τελευταία χρόνια σε κλίμα, ανθρώπινη συμπεριφορά, δημογραφική κατάσταση και χρήση γης (13).

1.2. Μορφολογικές προσαρμογές αιμοδιατρεφόμενων αρθροπόδων

Η απομύζηση του αίματος από τα αρθρόποδα γίνεται με κατάλληλα διαμορφωμένα στοματικά εξαρτήματα. Σε ό,τι αφορά τα έντομα συχνά διαθέτουν νύσσοντα αιματομυζητικά στοματικά εξαρτήματα (piercing-sucking mouth parts) που έχουν προκύψει από τροποποίηση των γνάθων. Έτσι διαμορφώνεται μια επιμήκης σωληνωτή στοματική κατασκευή που περιλαμβάνει τα στιλέτα (stylets) που λειτουργούν ως ανεξάρτητες λεπίδες και διαμέσου των οποίων απομυζάται το αίμα (Εικόνα 4) (6). Αναφορικά με τον τρόπο απομύζησης χρησιμοποιήθηκαν οι όροι σωληνοφαγία και τελμοφαγία από τον Lavoipierre (14) για να δηλώσουν τη διαφοροποίηση που παρατηρείται στους αρθρόποδους διαβιβαστές. Στη σωληνοφαγία, το αίμα λαμβάνεται απευθείας από τα τριχοειδή και τις μικρές αρτηρίες, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των κουνουπιών και των ψύλλων. Στην τελμοφαγία, το αίμα λαμβάνεται από μία μικρή «λίμνη» αίματος που δημιουργείται στους ιστούς μετά από τη διάρρηξή τους, όπως συμβαίνει με τους κρότωνες (Εικόνα 2) (6).

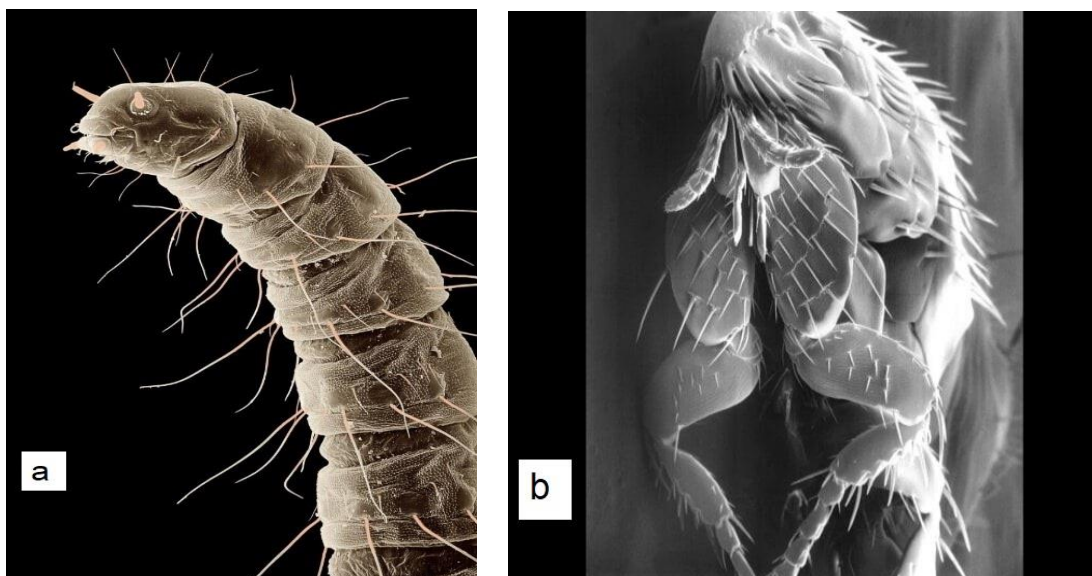


Εικόνα 2 Υπόστομα κρότωννα που έχει εισέλθει στο δέρμα (Φωτο. Pr. A. Aeschlimann, Institut de Zoologie, Neuchatel, France).

Διάφοροι παράγοντες πρωτεϊνικής φύσης που βρίσκονται στον σίελο των αρθροπόδων διευκολύνουν την διαδικασία της αιματοφαγίας. Αυτοί περιλαμβάνουν πρωτεΐνες με αναισθητικό ρόλο, αγγειοδιασταλτικούς και αντιπηκτικούς παράγοντες, αναστολείς της πήξης του αίματος και της συσσώρευσης αιμοπεταλίων (platelet aggregation) (15). Σε γενικές γραμμές οι αντιδράσεις μετά από νύγμα αρθροπόδου

δεν είναι ειδικές και διαφέρουν ανάμεσα στα άτομα. Οι αντιδράσεις οφείλονται οφείλονται κυρίως στην παραγωγή IgE και IgG έναντι των πρωτεϊνών του σιέλου του αρθροπόδου (16). Εκτός αυτών, και παράγοντες όπως ο τρόπος απομύζησης του αίματος, ο όγκος του ληφθέντος αίματος, ο αριθμός των νυγμάτων (ένα ή περισσότερα) καθώς και η περιβαλλοντική θερμοκρασία παίζουν επίσης ρόλο στις όποιες κλινικές εκδηλώσεις (15).

Οι διατροφικές συνήθειες των αρθροπόδων σε όλα τα στάδια ανάπτυξής τους είναι σημαντικές, αφού η πλήρης μεταμόρφωση ορισμένων εντόμων τους προσδίδει και διαφορετικές ιδιότητες σε ό,τι αφορά την ικανότητά τους να διαβιβάζουν παθογόνους οργανισμούς. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί ο ψύλλος. Τα στοματικά εξαρτήματα της προνύμφης των ψύλλων της γάτας *Ctenocephalides felis* που είναι μασητικού τύπου, διαφέρουν από αυτά των ενήλικων και τους επιτρέπουν να καταναλώνουν οργανική ύλη στην οποία μπορεί να περιέχονται τα ωάρια του κεστώδους πλατυέλμινθα *Dipilidium caninum* (Εικόνα 3). Τα ωάρια προσλαμβάνονται από την προνύμφη και μεταβιβάζονται στον ενήλικο ψύλλο και με αυτόν τον τρόπο ο ψύλλος της γάτας αποτελεί ενδιάμεσο ξενιστή αυτού του έλμινθα (6). Η αιματοφαγία μπορεί επίσης να περιορίζεται σε ένα μόνο φύλο (πχ. θηλυκά κουνούπια) ή σε ένα συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο (πχ. στις νύμφες των κοριών, ενήλικες ψύλλοι) ή και στα δύο φύλλα και σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια (π.χ. κρότωνες) (10).



Εικόνα 3 Κεφαλή προνύμφης ψύλλου (a) (Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)) (17) και κεφαλή ενήλικου ψύλλου γάτας (b) (18) (Photo by Janice Carr, USDCDCP on Pixnio)

2. Εκτοπαράσιτα ζώων συντροφιάς

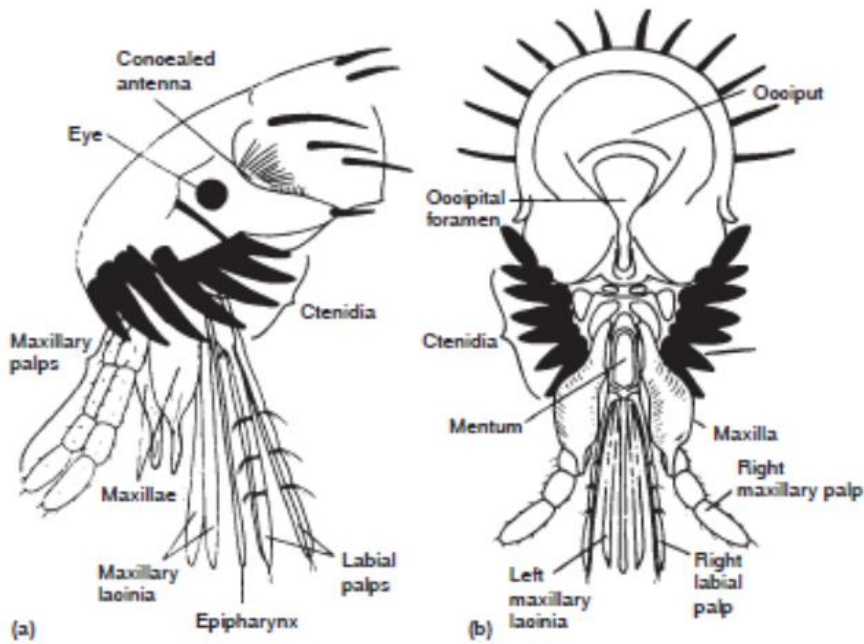
2.1. Ψύλλοι

2.1.1. Ταξινόμηση και Μορφολογία

Ταξινόμηση: Οι ψύλλοι είναι έντομα και ανήκουν στην τάξη Shiphonaptera. Η τάξη αυτή περιλαμβάνει περίπου 2500 είδη που αποτελούν αποκλειστικά εκτοπαράσιτα των σπονδυλωτών κυρίως θηλαστικών και πτηνών, πολλά εκ των οποίων έχουν παγκόσμια εξάπλωση (19).

Μορφολογία: Τα ενήλικα άτομα έχουν μέγεθος 0,8-6mm, είναι άπτερα, πλευρικά αποπλατυσμένα και έχουν χρώμα σκούρο καφέ. Βασικά τους χαρακτηριστικά είναι η τριγωνική κεφαλή με νύσσοντα μυζητικά στοματικά μόρια που περιλαμβάνουν γναθικές και χηληκές προσακτρίδες και το ιδιαίτερα ανεπτυγμένο τρίτο ζεύγος ποδιών που τους επιτρέπει να εκτελούν μεγάλα άλματα σε σχέση με το μέγεθος τους. Φέρουν κοντές κεραίες τοποθετημένες σε εγκοπές στα πλάγια της κεφαλής. Ορισμένα φέρουν βελονοειδείς αποφύσεις στο κατώτερο μέρος της κраниακής κάψας, που συνιστούν το παρειακό κτενίδιο. Ο θώρακας τους αποτελείται από τρία διακριτά τμήματα: τον προθώρακα, τον μεσοθώρακα και το μεταθώρακα. Σε κάποια είδη συναντώνται στο οπίσθιο περιθώριο του προθώρακα, βελονοειδείς αποφύσεις που συνιστούν το προθωρακικό κτενίδιο. Τα αρσενικά άτομα ξεχωρίζουν από τα θηλυκά από το ανασηκωμένο άκρο της κοιλίας. Η προνύμφη έχει σκωληκόμορφο σχήμα και δεν φέρει πόδια (Εικόνα 3). Η νύμφη κινείται ελάχιστα έως καθόλου και περιβάλλεται από κουκούλι (20).

Οι ψύλλοι διαθέτουν στοματικά μόρια που ανήκουν στο νύσσοντα μυζητικό τύπο που προέρχονται από μετατροπή στοματικών άρθρων σε οξύληκτα σπιλέτα. Πιο συγκεκριμένα οι δύο επιμηκυμένοι λοβοί της κάτω γνάθου και ο επιμηκυμένος επιφάρυγγας δημιουργούν μία κατασκευή μοναδική γι' αυτή την τάξη εντόμων με την οποία επιτυγχάνεται η διάτρηση του δέρματος με τρόπο, ώστε να μην δημιουργείται αιμορραγία (21). Αυτή η κατασκευή περιβάλλεται από επιμηκυμένες χηληκές προσακτρίδες όπως φαίνεται σε κάτοψη στην Εικόνα 4.



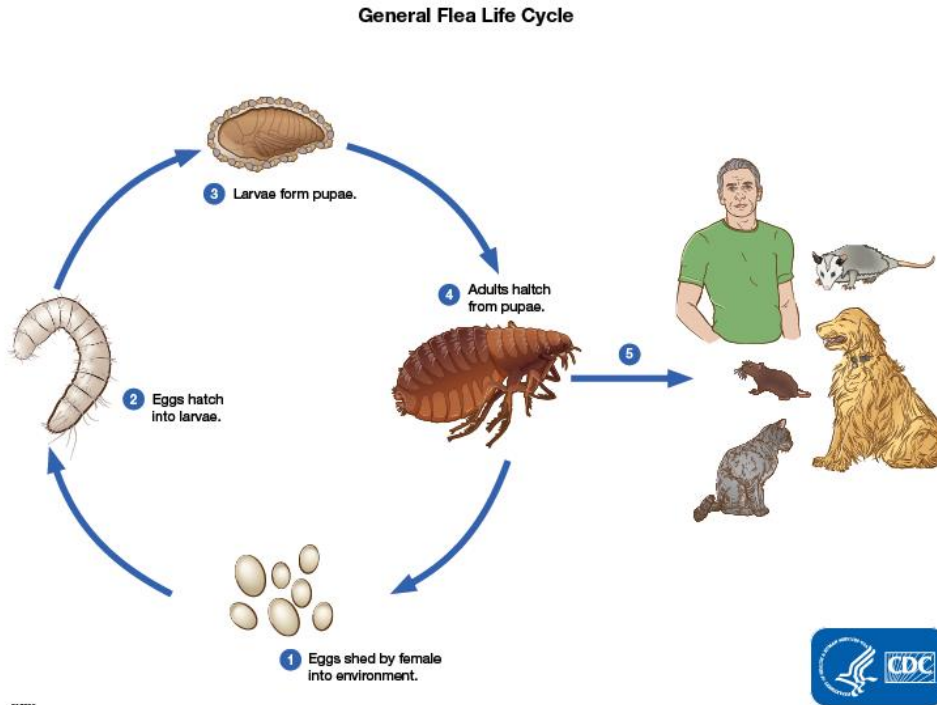
Εικόνα 4 Κεφαλή και στοματικά εξαρτήματα ψύλλου (6)

2.1.2. Βιολογικός κύκλος

Οι ψύλλοι ανήκουν στα ολομετάβολα έντομα, δηλαδή τα ενήλικα άτομα προκύπτουν μετά από τη διαδικασία της μεταμόρφωσης μέσα από τα στάδια του ωού, της προνύμφης και της νύμφης (Εικόνα 5). Ο κύκλος αυτός διαρκεί από 18 μέρες έως και πάνω από 20 μήνες ανάλογα με τις επικρατούσες θερμοκρασίες και υγρασία και ολοκληρώνεται συνήθως στο περιβάλλον του ξενιστή. Τα ωά που είναι σχετικά μεγάλα (0,5 mm σε μήκος), αποτίθενται στο τρίχωμα του ξενιστή από τον οποίο αποκολλώνται και καταλήγουν στον περιβάλλοντα χώρο. Θερμοκρασίες 18 έως 27°C με υγρασία 70% ευνοούν την ωοπαράγωγή. Από την εκκόλαψη προκύπτουν σκωληκόμορφες προνύμφες οι οποίες είναι πολύ ευαίσθητες στη χαμηλή υγρασία και τρέφονται από τα οργανικά υπολείμματα και τα περιττώματα των ψύλλων. Οι ώριμες προνύμφες δημιουργούν κουκούλι από τις εκκρίσεις των σιελογόνων αδένων ενσωματώνοντας σε αυτό απορρίμματα του περιβάλλοντος και μέσα σε αυτό μεταμορφώνονται σε νύμφη (6). Η περίοδος εκκόλαψης μπορεί να παραταθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα (ακόμα και ένα χρόνο) σε περίπτωση που δεν επικρατούν κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας στο άμεσο περιβάλλον. Η ολοκλήρωση του κύκλου προκύπτει εφόσον υπάρχει το κατάλληλο ερέθισμα που μπορεί να είναι δόνηση, ζέστη και ύπαρξη διοξειδίου του άνθρακα. Αυτό μπορεί να δικαιολογήσει το ότι προσβολή ανθρώπων / ζώων από ψύλλους παρατηρείται ακόμα και σε χώρους

που έχουν μείνει ακατοίκητοι επί μακρόν (22). Τα περισσότερα είδη ψύλλων δεν περιορίζονται αυστηρά σε ένα ξενιστή και εξαρτώνται σημαντικά από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία και υγρασία) που επικρατούν (22). Κατά συνέπεια οι κοινές τους ονομασίες: ψύλλος της γάτας, του σκύλου, του ανθρώπου κ.α. αναφέρονται στον προτιμώμενο ξενιστή και όχι στον αποκλειστικό ξενιστή τους (21). Ανάλογα με τον βαθμό προσκόλλησής τους στους ξενιστές διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες:

1. Ψύλλοι τρωκτικών που βρίσκονται σπάνια στον ξενιστή αλλά συχνά στη φωλιά του,
2. Ψύλλοι που βρίσκονται για το μεγαλύτερο διάστημα ως ενήλικα άτομα επί του ξενιστή,
3. Το είδος *Echidnophaga gallinacea* του οποίου το θηλυκό ανευρίσκεται μόνιμα προσκολλημένο στο δέρμα του ξενιστή,
4. Το είδος *Tunga penetrans* του οποίου το θηλυκό διεισδύει κάτω από το δέρμα, όπου και εγκαθίσταται προκαλώντας οζίδια. Το συγκεκριμένο είδος προσβάλλει μεγαλόσωμα θηλαστικά και τον άνθρωπο ως υποδερμικό παράσιτο (21,23).



Εικόνα 5 Βιολογικός κύκλος του ψύλλου (24)

2.1.3. Επιδημιολογία και Υγειονομική σημασία

Η υγειονομική τους σημασία για την ανθρώπινη υγεία είναι ευρέως καταγεγραμμένη. Οι ψύλλοι αποτελούν εκτοπαράσιτα των κατοικίδιων αλλά και των παραγωγικών ζώων και κατά συνέπεια έχουν τη δυνατότητα πρόσβασης και στους ανθρώπους (25). Επιπλέον, οι ενήλικες ψύλλοι μπορούν να επιβιώσουν επί μακρόν χωρίς την ύπαρξη τροφής, γεγονός που τους επιτρέπει να μεταφέρουν παθογόνους μικροοργανισμούς ακόμα και χωρίς τη διαμεσολάβηση των σπονδυλωτών ξενιστών.

Οι Ψύλλοι ως εκτοπαράσιτα

Τα νύγματα των ψύλλων μπορούν να προκαλέσουν αντίδραση του δέρματος λόγω ένεσης του σιέλου τους στο σημείο του νυγμού και να εκδηλωθεί ερύθημα και έντονος κνησμός (τοπική αλλεργική δερματίτιδα) διάρκειας αρκετών ημερών. Σε αυτή την περίπτωση μπορεί να σχηματιστεί στο δέρμα μια χαρακτηριστική κηλίδα (purpura ruficosa) που περιβάλλεται από διογκωμένη ερεθισμένη περιοχή (roseola ruficosa) (23) (Εικόνα 6). Ειδικότερα ο ψύλλος *Tunga penetrans*, που απαντάται κυρίως σε χώρες της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής προκαλεί την τουνγκίαση. Η νόσος οφείλεται στη διείσδυση και εγκατάσταση των θηλυκών ατόμων στο δέρμα, συνήθως ανάμεσα στα δάκτυλα των ποδιών όπου εγκυστώνονται, ωτοκοούν και ολοκληρώνουν τον κύκλο ζωής μολύνοντας το περιβάλλον. Η διείσδυσή τους στον υποδόριο ιστό έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση φλεγμονώδους απόκρισης, ενώ ενδέχεται να επισυμβεί δευτερογενής βακτηριακή επιλοίμωξη (26).



Εικόνα 6 Νύγμα ψύλλου σε άνθρωπο (CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=140922>)

Οι Ψύλλοι ως ενδιάμεσοι ξενιστές

Ορισμένα είδη ψύλλων αποτελούν ενδιάμεσους ξενιστές για κεστώδεις έλμινθες οι οποίοι μολύνουν ευκαιριακά τον άνθρωπο. Ο σημαντικότερος είναι το *Dipylidium caninum*, ένα είδος που παρασιτεί στο έντερο σπονδυλωτών ξενιστών (γάτας/σκύλου). Ο σπονδυλωτός ξενιστής μολύνεται από τυχαία κατάποση του

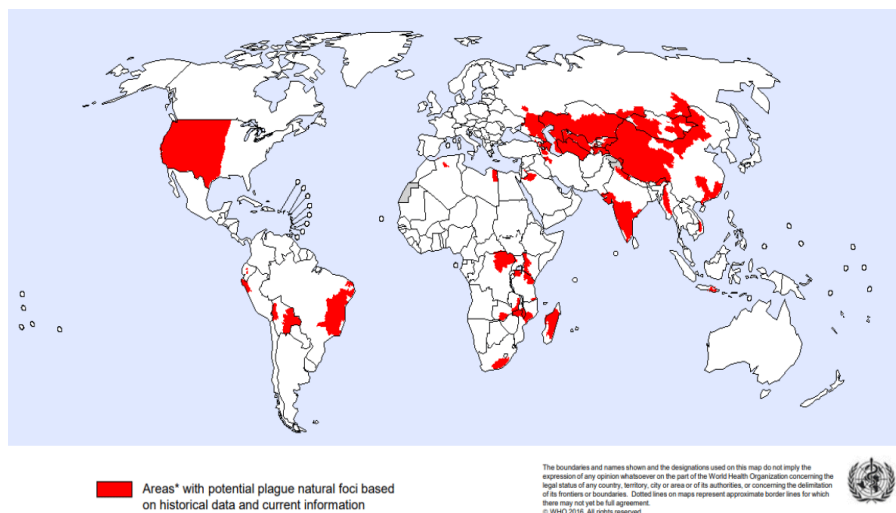
ψύλλου και μέσα σε αυτόν η προνυμφική μορφή του σκώληκα (το κυστικερκοειδές) εξελίσσεται σε ώριμο σκώληκα. Οι ωοφόροι προγλωττίδες του *D. caninum* αποκόπτονται από το σώμα του σκώληκα μέσα στο έντερο του ζώου και τα ωάρια που περιέχουν διασπείρονται με τα κόπρανα στο περιβάλλον. Τα ωάρια καταπίνονται από τις προνύμφες του ψύλλου *Ctenocephalides felis*, όπου εκκολάπτονται και εξελίσσονται σε κυστικερκοειδή, κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσής τους σε ενήλικους ψύλλους (27). Ένας από τους σπονδυλωτούς ξενιστές μπορεί να είναι και ο άνθρωπος, συνήθως τα πολύ μικρά παιδιά (28).

Τα δύο άλλα είδη κεστωδών για τα οποία οι ψύλλοι αποτελούν ενδιάμεσους ξενιστές είναι το *Hymenolepis diminuta* και το *Hymenolepis nana*. Η ανάπτυξη και μετάδοσή τους είναι παρόμοια με του *D. caninum*. Για αυτούς του κεστώδεις, ενδιάμεσοι ξενιστές είναι τα είδη των ψύλλων *Nosopsyllus fasciatus* και *Xenopsylla cheopis* που παρασιτούν κυρίως σε ποντίκια (27).

Οι Ψύλλοι ως διαβιβαστές παθογόνων

Βακτήρια που μπορούν να προκαλέσουν νόσο στον άνθρωπο, όπως το αίτιο της τουλαραιμίας (*Francisella tularensis*), της βρουκέλλωσης (*Brucella melitensis*), της σαλμονέλλωσης (*Salmonella enteritidis*) της λιστερίωσης (*Listeria monocytogenes*) και της ψευδοφυματίωσης (*Yersinia pseudotuberculosis*) έχουν απομονωθεί από ψύλλους. Ωστόσο, η δυνατότητα μετάδοσής τους στον άνθρωπο δεν έχει επιβεβαιωθεί (23).

Η σημαντικότερη νόσος που μεταδίδουν οι ψύλλοι είναι η **πανώλις**, που προκαλείται από το βακτηρίδιο *Yersinia pestis*. Η λοίμωξη αυτή, που στο παρελθόν προκάλεσε πανδημίες με αποτέλεσμα εκατομμύρια θανάτους, έχει πλέον περιορισμένη γεωγραφική κατανομή και αντιμετωπίζεται με κατάλληλα αντιβιοτικά (*Εικόνα 7*). Μεταδίδεται με τον ψύλλο των ποντικών *Xenopsylla cheopis* και δεξαμενή της αποτελούν τα μολυσμένα τρωκτικά. Οι ψύλλοι εγκαταλείπουν τα τρωκτικά μετά από το θάνατό τους και αναζητούν νέους ξενιστές. Τα βακτήρια που πολλαπλασιάζονται σχηματίζοντας ένα βύσμα που αποφράσσει τον προστόμαχο των ψύλλων, μεταφέρονται στο ξενιστή κατά την προσπάθεια των ψύλλων να τραφούν. Συγκεκριμένα το αίμα φθάνει στον οισοφάγο του εντόμου, αναμειγνύεται με τα βακτήρια και παλινδρομεί προς τον ξενιστή, μεταφέροντάς τα σε αυτόν (23). Μόλυνση μπορεί επίσης να προκύψει από επαφή με τα περιττώματα των ψύλλων που έχει βρεθεί ότι διατηρούν τη μολυσματικότητά τους μέχρι και 3 χρόνια.



Εικόνα 7 Περιοχές με εστίες πανώλης βασισμένες σε ιστορικά στοιχεία και τρέχουσα πληροφόρηση σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. (29)

Διαμέσου του φύλλου μεταδίδεται επίσης ο **ενδημικός τύφος** που οφείλεται στο παθογόνο βακτήριο *Rickettsia typhi*. Ως διαβιβαστές έχουν χαρακτηριστεί ο ψύλλος των ποντικών *Xenopsylla cheopis* και ο ψύλλος της γάτας *Ctenocephalides felis* σε ορισμένες πολιτείες των Η.Π.Α., αλλά και ως πιθανοί διαβιβαστές οι ψύλλοι *Nosopsyllus fasciatus* και *Leptopsylla segnis*. Το παθογόνο αυτό είναι υποχρεωτικώς ενδοκυττάριο και η μετάδοση γίνεται με είσοδο περιττωμάτων ψύλλου διαμέσου του αναπνευστικού, και από λύσεις της συνεχείας του δέρματος ή των βλεννογόνων (6,30).

Ο **κηλιδώδης πυρετός που μεταδίδεται από ψύλλους** που οφείλεται στο παθογόνο *Rickettsia felis* έχει εντοπιστεί πρόσφατα και εμφανίζει παρόμοια συμπτώματα με τον ενδημικό τύφο. Έχει περιγραφεί σε διάφορες χώρες παγκοσμίως ανάμεσα στις οποίες και στην Ευρώπη (31). Ο κύριος διαβιβαστής είναι ο ψύλλος της γάτας *Ctenocephalides felis* στον οποίο μεταφέρεται με κάθετη μετάδοση και στον οποίο μπορεί να διατηρηθεί για πολλές γενιές (32).

Η **«νόσος εξ' ονύχων γαλής»** οφείλεται στο ενδοκυττάριο βακτήριο *Bartonella henselae* και θεωρείται ζωνόσος με υποδόχο την οικιακή γάτα και ενδιάμεσο ξενιστή τον ψύλλο *Ctenocephalides felis*. Το ίδιο παθογόνο ευθύνεται και για την βακτηριακή αγγειομάτωση που εκδηλώνεται συνήθως σε ανοσοανεπαρκή άτομα. Μεταδίδεται με τα γρατζουνίσματα της γάτας και σπάνια από το δήγμα της μολυσμένης γάτας και από τα μολυσμένα περιττώματα του ψύλλου (23). Το γεγονός ότι οι ψύλλοι συνήθως αφοδεύουν κατά τη διάρκεια της πρόσληψης αίματος και το γεγονός ότι το νύγμα του ψύλλου προκαλεί κνησμό λόγω φλεγμονώδους αντίδρασης, εξηγεί πώς μπορεί να

συντελέσει στη μετάδοση της *Bartonella henselae*. Με νόσο εξ ονύχων γαλής έχει συσχετιστεί και το είδος *Bartonella clarridgeiae* (33,34).

Η **τουλαραιμία** είναι ζωνόσος που οφείλεται στο βακτήριο *Francisella tularensis*. Είναι ενδημική του βορείου ημισφαιρίου, συμπεριλαμβανομένης της Ευρώπης. Θεωρείται υδατογενής νόσος αλλά μπορεί να προκύψει μετά από νύγμα κρότωνα, ψύλλου και μετά από άμεση επαφή με μολυσμένους ζωικούς ιστούς. Ως πιθανοί διαβιβαστές του παθογόνου αυτού έχουν καταδειχθεί τα είδη ψύλλου *Xenopsylla cheopis*, *Ceratophyllus acutus* και, *Ceratophyllus fasciatus* (30,35).

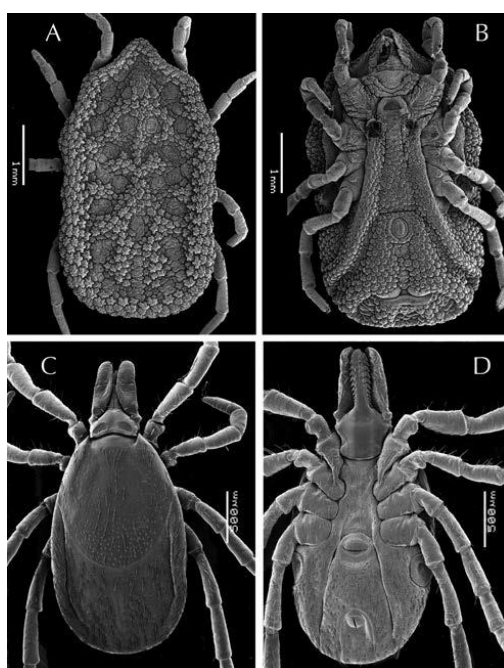
2.1.4. Αντιμετώπιση των Ψύλλων

Η αντιμετώπιση των ψύλλων αποτελεί ένα ζήτημα που θα πρέπει να συνδυάζει μέτρα εξυγίανσης του περιβάλλοντος μαζί με εντομοκτονία. Η καθαριότητα των χώρων που έχουν προσβληθεί συμβάλλει στη μείωση των προνυμφικών μορφών και επιτρέπει την καλύτερη δράση των εντομοκτόνων. Στα προγράμματα ελέγχου κρουσμάτων πανώλης και ενδημικού τύφου, ο έλεγχος και περιορισμός των τρωκτικών είναι επίσης απαραίτητος για τον έλεγχο και των ψύλλων των ποντικών (6). Στο οικιακό περιβάλλον οι ψύλλοι μπορούν να καταπολεμηθούν με χρήση υπολειμματικών εντομοκτόνων που θα πρέπει να εφαρμοστούν με την κατάλληλη συχνότητα και σε όλους τους χώρους της οικίας, εσωτερικούς και εξωτερικούς (23). Εστίες ανάπτυξης ψύλλων έχουν παρατηρηθεί ακόμα και σε οικήματα στα οποία μπορούν να καταφύγουν αδέσποτα ζώα, γεγονός που καταδεικνύει ότι ο πληθυσμός των αδέσποτων ζώων στα αστικά κέντρα αποτελεί μια από τις παραμέτρους που θα πρέπει να ληφθούν υπόψη στον έλεγχο των εκτοπαρασίτων (36). Σημαντική είναι επίσης η φροντίδα των ζώων συντροφιάς με χρήση των κατάλληλων σκευασμάτων, για τον περιορισμό της προσβολής τους από εκτοπαρασίτα (37). Σχετικά με τους τρόπους καταπολέμησης, στην πρόσφατη βιβλιογραφία εκτός από τα πυρεθροειδή, αναφέρονται και ουσίες όπως αμινογλυκοσίδες, ρυθμιστές ανάπτυξης και ισοξαζολίνες: φλουραλανέρη (fluralaner), λοτιλανέρη (lotilaner) και σαρολανέρη (sarolaner) (38). Οι ψύλλοι έχουν βρεθεί ανθεκτικοί σε καρβαμιδικές, οργανοφωσφορικές και πυρεθροειδείς ενώσεις (39).

2.2. Κρότνες

2.2.1. Ταξινόμηση και μορφολογία των κροτώνων

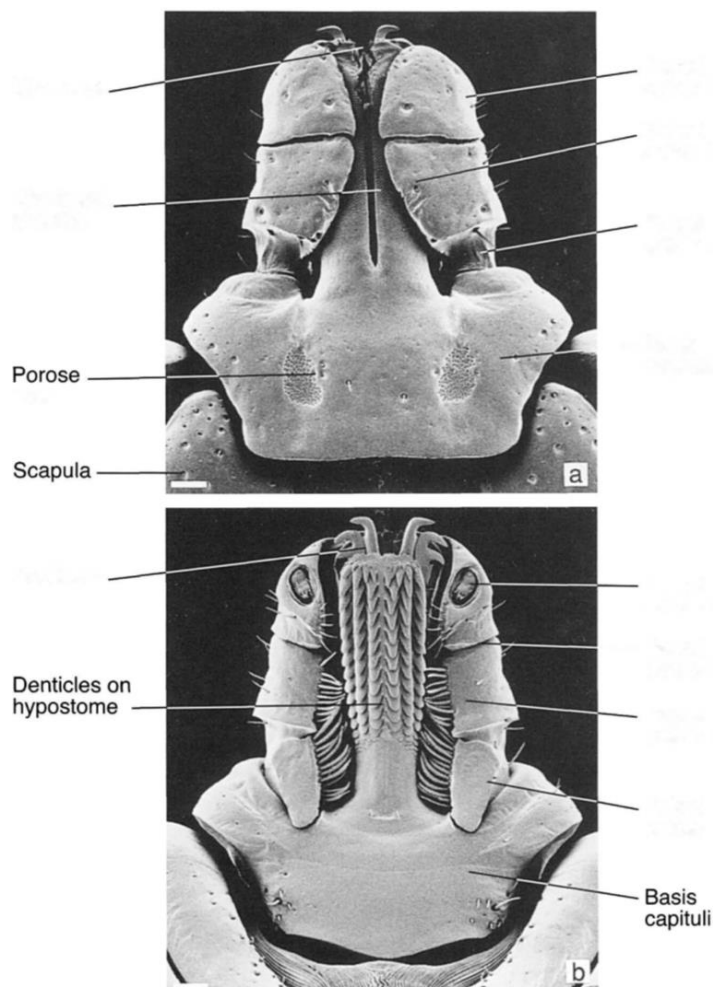
Οι κρότνες ανήκουν στην κλάση των Αραχνιδίων (Υπεροικογένεια: Ixodoideae), αριθμούν περίπου 900 είδη και διακρίνονται σε δύο βασικές ομάδες: τους σκληρούς κρότνες που ανήκουν στην οικογένεια *Ixodidae* και τους μαλακούς κρότνες που ανήκουν στην οικογένεια *Argasidae* (40,41) (Εικόνα 8). Μία τρίτη οικογένεια που ονομάζεται *Nuttalliellidae* αποτελείται από ένα μόνο είδος με ορισμένα χαρακτηριστικά που απαντούν στις δύο προαναφερθείσες ομάδες. Το είδος αυτό είναι το *Nuttalliella namaqua* (41).



Εικόνα 8 Οι οικογένειες *Argasidae* (Α ραχιαία όψη-Β κοιλιακή όψη) και *Ixodidae* (C ραχιαία όψη-D κοιλιακή όψη) (41)

Κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η κεφαλοθωρακοκοιλία που περιλαμβάνει σε μία ενιαία δομή κεφαλή, θώρακα και κοιλία και περιγράφεται ως **ιδιόσωμα** και το **γναθόσωμα** ή ψευδοκεφαλή (Εικόνα 9). Η ψευδοκεφαλή αποτελείται από: τη βάση που αρθρώνεται επί της κεφαλοθωρακοκοιλίας, ένα ζεύγος προσακτριδών, ένα ζεύγος χηληκεραίων και από το υπόστομα. Οι προσακτρίδες περιβάλλουν τις χηληκεραίες και το υπόστομα και αποτελούνται από 4 τμήματα. Οι χηληκεραίες που φέρουν στην άκρη ανεστραμμένα προς τα έξω πριονωτά δόντια προβάλλουν κατά τη στιγμή λήψεως της τροφής και διαπερνούν το δέρμα του ξενιστή. Με αυτόν τον τρόπο επιτρέπουν στο υπόστομα να εισέλθει εντός του δέρματός του. Το υπόστομα φέρει σε σειρές δόντια στραμμένα προς τα πίσω γεγονός που δεν επιτρέπει την

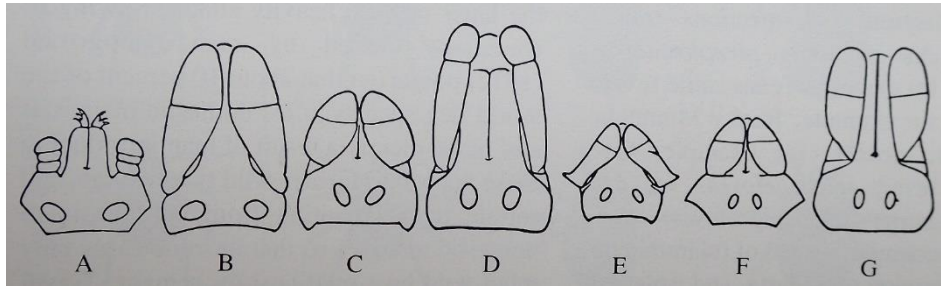
εύκολη αποκόλληση του κρότωνα. Γι' αυτό το λόγο, σε περίπτωση βίαιης απομάκρυνσης μπορεί να αποσπαστεί και τμήμα δέρματος του ξενιστή (40).



Εικόνα 9 Στοματικά εξαρτήματα κρότωνα *Rhipicephalus longicoxatus*: γναθόσωμα ή ψευδοκεφαλή *a.*ραχιαία πλευρά και *b.*κοιλιακή πλευρά (42)

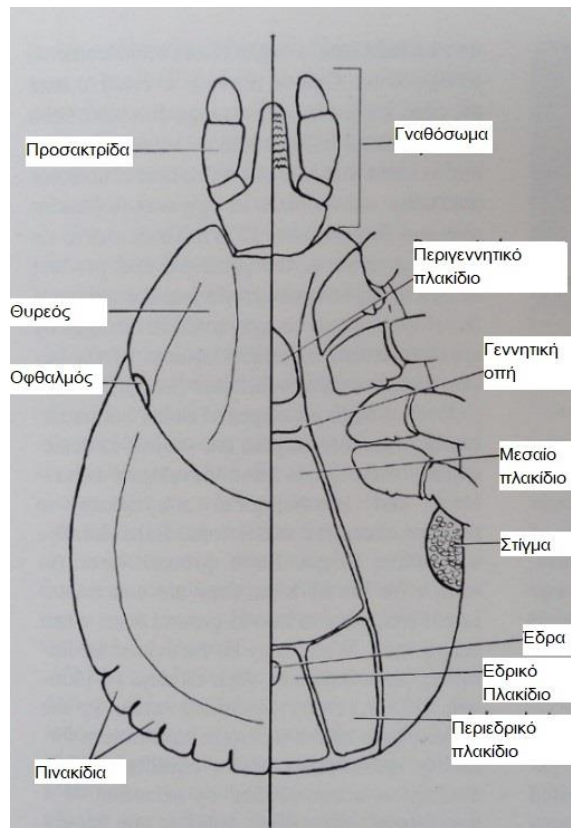
Στην κοιλιακή επιφάνεια διακρίνονται ο γεννητικός πόρος και η έδρα, ενώ προς τα πλάγια και πίσω διακρίνονται τα αναπνευστικά στίγματα που αποτελούν τις απολήξεις των τραχειών. Η τοποθέτηση των σιγμάτων σε οπίσθια θέση αποτελεί χαρακτηριστικό της υποτάξης Μετασίγματα. Οι νύμφες και οι ενήλικες κρότωνα φέρουν τέσσερα ζεύγη των ποδιών, τα οποία αποτελούνται από 6 τμήματα: ισχίο, τροχαντήρα, μηρό, κνήμη, προταρσό και ταρσό (40).

Οικογένεια Ixodidae: Σημαντικό γνώρισμα στη οικογένεια αυτή, αποτελεί η ψευδοκεφαλή, το σχήμα της οποίας διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα γένη (Εικόνα 10). Τα θηλυκά άτομα φέρουν στη ραχιαία επιφάνεια της ψευδοκεφαλής δύο πορώδεις χώρους οι οποίοι επίσης αποτελούν ταξινομικό χαρακτηριστικό. Διαγνωστικά χαρακτηριστικά αποτελούν τα τρία πρώτα τμήματα των προσακτριδών καθώς και η οδόντωση του υποστόματος.



Εικόνα 10 Μορφολογία ψευδοκεφαλής γενών της οικογένειας Ixodidae: A. *Boorophilus* B. *Ixodes* C. *Dermacentor* D. *Amblyomma* E. *Haemaphysalis* F. *Rhipicephalus* G. *Hyalomma* (Harwood 1979)

Στη ραχιαία επιφάνεια υπάρχει χιτινώδης πάχυνση που ονομάζεται θυρεός και επιτρέπει τη διάκριση του φύλου στους σκληρούς κρότωνες, καθώς στα αρσενικά καλύπτει όλη τη ράχη, ενώ στα θηλυκά ένα τμήμα της. Ο θυρεός φέρει σε ορισμένα είδη οφθαλμούς και χαρακτηριστικές αυλακώσεις. Αυλακώσεις συναντώνται και στο υπόλοιπο τμήμα της ράχης το οποίο σε ορισμένα είδη καταλήγει σε ομοιόμορφα πινακίδια που δημιουργούν μια δαντελωτή περιφέρεια στην απόληξη του ιδιοσώματος (Εικόνα 11).



Εικόνα 11 Σχηματική απεικόνιση ραχιαίας όψης (αριστερά) και κοιλιακής όψης (δεξιά), θηλυκού σκληρού κρότωνα

Οι αυλακώσεις που περιβάλλουν τον γεννητικό πόρο και την έδρα ονομάζονται γεννητικές και εδρικές αντίστοιχα και αποτελούν επίσης διακριτικά στοιχεία των γενών και των ειδών. Η εδρική αύλακα μπορεί να περιβάλλει την έδρα από την πρόσθια ή οπίσθια πλευρά της. Σε αρσενικά άτομα ορισμένων γενών γύρω από την έδρα υπάρχουν τα εδρικά και παραεδρικά πλακίδια. Στην κοιλιακή επιφάνεια στα πλάγια και πίσω από το τέταρτο ισχίο διακρίνεται το αναπνευστικό στίγμα. Το σχήμα και η κατασκευή του αναπνευστικού στίγματος όπως επίσης το ισχίο, ο τροχαντήρας και ο ταρσός των ποδιών αποτελούν ταξινομικά χαρακτηριστικά. Στον ταρσό των *Ixodidae* υπάρχει χαρακτηριστικό σικυοειδές εξάρτημα και ένα ζεύγος αγκίστρων.

Οι προνύμφες των σκληρών κροτώνων είναι εξάποδες, φέρουν θυρεό που καλύπτουν την μισή ραχιαία επιφάνειά τους και στερούνται γεννητικού πόρου και στιγμάτων. Οι νύμφες τους είναι οκτάποδες και στερούνται γεννητικού πόρου (40).

Οικογένεια Argasidae: Οι κρότωσης αυτής της οικογένειας δεν φέρουν θυρεό και στην επιφάνεια τους υπάρχουν πολυάριθμες ρικνώσεις και στρογγυλά βαθουλώματα τα οποία ονομάζονται βοθρίδια. Η βασικότερη μορφολογική τους διαφορά με τους σκληρούς κρότωσης είναι η θέση της ψευδοκεφαλής. Η ψευδοκεφαλή δεν είναι ορατή από την ραχιαία πλευρά στους ενήλικες και στις νύμφες. Αυτή βρίσκεται εξ' ολοκλήρου στην κοιλιακή πλευρά και αρθρώνεται σε μία εγκόλπωση του εμπροσθίου τμήματος της κοιλιακής επιφανείας που ονομάζεται καμαρόστομα (40).

Οι επιπλέον μορφολογικές διαφορές τους με τους σκληρούς κρότωσης είναι οι ακόλουθες:

1. Ο σεξουαλικός διμορφισμός είναι αδρός. Η διάκριση του φύλου γίνεται δυνατή από το σχήμα του γεννητικού πόρου,
2. Δεν φέρουν πινακίδια στην απόληξη του σώματός τους,
3. Οι προσακτρίδες αρθρώνονται ελεύθερα στο σώμα και μοιάζουν με πόδια,
4. Δεν υπάρχουν πορώδεις περιοχές στην ραχιαία πλευρά,
5. Τα μάτια βρίσκονται σε εσοχή υπεράνω του ισχίου,
6. Τα ισχία δεν φέρουν προεξοχή,
7. Στον ταρσό τους δεν υπάρχει σικυοειδές εξάρτημα,
8. Τα στίγματα είναι μικρά και βρίσκονται σχεδόν στο ύψος του τέταρτου ζεύγους ποδιών,
9. Μπορούν να υπάρχουν έως και 8 νυμφικά στάδια (21)

Οι ταρσοί των ενηλίκων μαλακών κροτώνων και των νυμφών τους δεν διαθέτουν τα σικυοειδή εξαρτήματα. Οι προνύμφες των *Argasidae* φέρουν ψευδοκεφαλή που

προβάλλει στο μπροστινό τμήμα του σώματος και διαθέτουν επίσης σικυοειδή εξαρτήματα (40).

2.2.2. Βιολογικός κύκλος των Κροτώνων

Σε ό,τι αφορά τον κύκλο ζωής και την οικολογία υπάρχουν διαφοροποιήσεις μεταξύ των σκληρών και μαλακών κροτώνων.

Στους **σκληρούς** η γονιμοποίηση του θηλυκού γίνεται επί του ξενιστή ή εντός της φωλιάς του. Το θηλυκό στη συνέχεια πέφτει στο έδαφος ή στη φωλιά του ξενιστή και αφού ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των ωών, ωοτοκεί και στη συνέχεια πεθαίνει. Ο αριθμός των ωών είναι πολύ μεγάλος (αρκετές χιλιάδες) και από αυτά εκκολάπτονται οι προνύμφες. Η κάθε προνύμφη είναι εξάποδη, στερείται γεννητικού πόρου και φέρει θυρεό που καλύπτει την μισή ραχιαία επιφάνειά της. Με την κίνηση του πρώτου ζεύγους ποδιών σαν κεραίες εντοπίζει τον κατάλληλο ξενιστή. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω του οργάνου του Haller που βρίσκεται στον τارسό του πρώτου ζεύγους ποδιών. Αφού τον εντοπίσει, προσκολλάται σε αυτόν και λαμβάνει γεύμα αίματος. Στη συνέχεια τον εγκαταλείπει και μετατρέπεται μέσω έκδυσης σε οκτάποδη νύμφη. Η νύμφη διαφέρει επίσης με τους ενήλικες κρότωνες ως προς την απουσία γεννητικού πόρου και εδρικών πλακιδίων. Και αυτή με τη σειρά της αναζητά ξενιστή κατά τον ίδιο τρόπο ώστε να λάβει γεύμα αίματος και να μετατραπεί σε ενήλικο αρσενικό ή θηλυκό κρότωννα. Το ενήλικο αναζητά επίσης τον κατάλληλο ξενιστή ώστε να ολοκληρωθεί ο κύκλος της αναπαραγωγής. Συμπερασματικά, ο κύκλος ζωής των σκληρών κροτώνων περιλαμβάνει συνήθως τρεις ξενιστές (όπως περιγράφεται στην Εικόνα 12), χωρίς όμως να αποκλείεται σε κάποια είδη συντομότερος κύκλος που περιλαμβάνει δύο (έναν για την προνύμφη και νύμφη και έναν για τον ενήλικα) ή και έναν μόνο ξενιστή, τον ίδιο για όλα τα στάδια. (Εικόνα 12). Το γεύμα αίματος σε κάθε στάδιο διαρκεί αρκετές ημέρες (40).

Οι **μαλακοί** κρότωνες είναι νυκτόβια παράσιτα που παρασιτούν κυρίως πτηνά. Διαβιούν σε χώρους με χαμηλή σχετικά υγρασία και αναζητούν θέσεις ανάπαυσης μακριά από τον ξενιστή. Έτσι κατά τη διάρκεια της ημέρας κρύβονται στο έδαφος, σε σχισμές, κάτω από τον φλοιό των δέντρων και σε φωλιές πτηνών και άλλων ζώων, γεγονός που καθιστά δύσκολη την εύρεσή τους (21). Σε αντίθεση με τους σκληρούς, στους μαλακούς κρότωνες η διάρκεια γεύματος είναι βραχεία, η γονιμοποίηση του θηλυκού γίνεται τμηματικά και παράγεται μικρότερος αριθμός ωών σε σχέση με τους σκληρούς. Σε αντίθεση επίσης με τους σκληρούς κρότωνες το θηλυκό δεν πεθαίνει μετά την ωοτοκία. Από το ωό εκκολάπτεται η εξάποδη προνύμφη η οποία διαφέρει

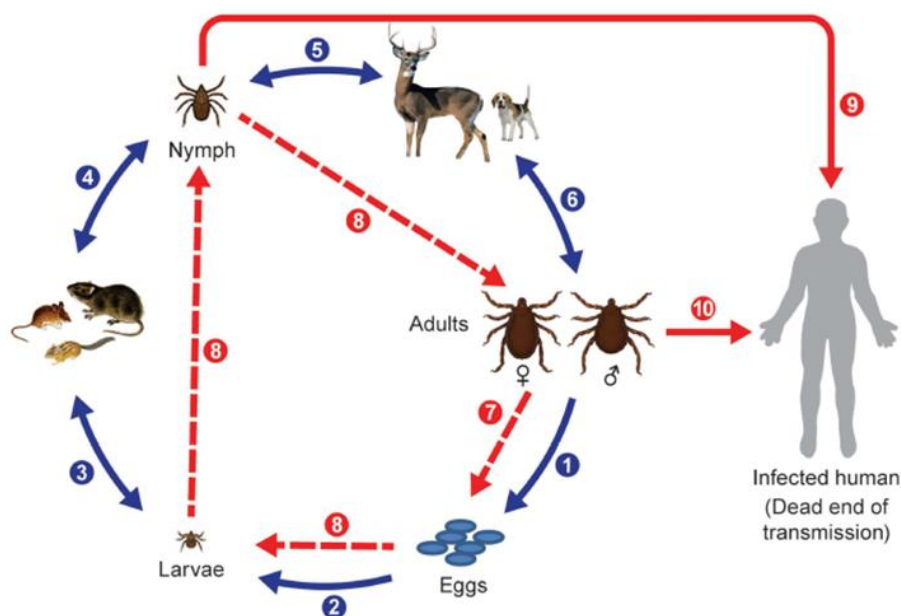
από τους ενήλικες κρότωνα ως προς την απουσία γεννητικού πόρου, την προβολή της ψευδοκεφαλής και την παρουσία σικυοειδών εξαρτημάτων στους ταρσούς. Εξελίσσεται μέσω έκδυσης σε νύμφη. Η νύμφη διαφέρει από τους ενήλικες από την απουσία γεννητικού πόρου και από τον μικρό αριθμό βοθρίων στην επιφάνεια του σώματος. Από αυτήν προκύπτουν μέσα από διαδοχικές εκδύσεις νύμφες διαφορετικών σταδίων από τις οποίες προκύπτει τελικά ο ενήλικος κρότωνα. Η ύπαρξη των πολλαπλών νυμφικών σταδίων τους διαφοροποιεί επίσης από τους σκληρούς κρότωνα (21).

2.2.3. Επιδημιολογία και Υγειονομική σημασία των κροτώνων

Οι κρότωνα, ως διαβιβαστές παθογόνων μικροοργανισμών, αποτελούν μετά τα κουνούπια τα πιο σημαντικά από υγειονομικής άποψης αρθρόποδα (9). Στο βιολογικό τους κύκλο στον οποίο παρασιτούν άγρια, παραγωγικά και κατοικίδια ζώα, ο άνθρωπος αποτελεί τυχαίο ξενιστή. Εφόσον δεν περιοριστούν σε έναν ξενιστή κατά τον κύκλο της ζωής τους, αυξάνονται και οι πιθανότητες να μεταφερθούν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί σε διαφορετικά είδη μεταξύ των οποίων και ο άνθρωπος (20). Ειδικότερα για τους σκληρούς κρότωνα, η αργή αιματοφαγία τους δίνει τη δυνατότητα να προσλάβουν μεγάλο αριθμό παθογόνων μικροοργανισμών αλλά και να μεταφερθούν σε νέες περιοχές, όντες προσκολλημένοι στον ξενιστή τους. Η δυνατότητα επιβίωσης τους για μεγάλο χρονικό διάστημα ακόμα και χωρίς λήψη γεύματος, η μεταφορά των παθογόνων από την προνύμφη στη νύμφη και από αυτή στο ενήλικο (διασταδιακή μετάδοση, *transtadial transmission*) και από το ενήλικο στα σπέρμα (διωθητική μετάδοση, *transovarial transmission*), τους δίνει τη δυνατότητα να διατηρήσουν τους παθογόνους παράγοντες. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί και η μεταφορά παθογόνων μικροοργανισμών από μολυσμένους κρότωνα σε μη μολυσμένους κατά την ταυτόχρονη λήψη γεύματος από τον ίδιο ξενιστή (*co-feeding transmission*) γεγονός που επίσης συμβάλλει στη διατήρηση των παθογόνων (43,44).

Σε γενικές γραμμές οι κρότωνα συντηρούνται μέσω της άγριας πανίδας, σε ισορροπία τόσο με τα παθογόνα όσο και με τους σπονδυλωτούς ξενιστές. Η αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού, οι ανθρώπινες δραστηριότητες και οι οικολογικές μεταβολές που προέρχονται από την αποψίλωση των δασών, την επέκταση των καλλιεργειών και την εισβολή του ανθρώπου σε νέες περιοχές μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα την συχνότερη επαφή του με τους κρότωνα και συνακόλουθη εμφάνιση νόσων. Τα τελευταία χρόνια για τους ανθρώπους των αστικών κέντρων η επαφή με τη φύση αναζητείται ως απόδραση και ως αναψυχή και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να

προσεγγίζονται περιοχές που μπορεί να αποτελούν εστίες ανάπτυξης κροτώνων. Κατά συνέπεια δημιουργούνται περισσότερες πιθανότητες για προσβολή από κρότωνες και τους παθογόνους μικροοργανισμούς που αυτοί μεταφέρουν. Σε κάθε περίπτωση όμως ο άνθρωπος αποτελεί τυχαίο ξενιστή για τον κρότωνα και αδιέξοδο σε ό,τι αφορά τη μετάδοση των παθογόνων μικροοργανισμών (45,46) (εικόνα 12).



Εικόνα 12 Βιολογικός κύκλος των σκληρών κροτώνων και η μετάδοση των ρικεττσιών. Με το μπλε χρώμα αποτυπώνονται τα κυρία βήματα του κύκλου ζωής των κροτώνων και με τα κόκκινα διακεκομμένα βέλη η διαωθητική μετάδοση και η διασταδιακή μετάδοση των ρικεττσιών. Με τα κόκκινα βέλη αποτυπώνεται η μεταφορά των ρικεττσιών στον άνθρωπο μέσω νύμφατος ή ενήλικου κρότωνα (46).

Οι κρότωνες ως εκτοπαράσιτα

Στους ανθρώπους τα νύγματα των κροτώνων -ανεξαρτήτως του νύσσοντος είδους - μπορούν να δημιουργήσουν εντοπισμένες δερματικές αντιδράσεις διαμέτρου μικρότερης των 5 cm, συνοδευόμενες από κνησμό, τις πρώτες 48 ώρες από την προσκόλληση του κρότωνα (47). Μπορεί επίσης να οδηγήσουν σε σχηματισμό κοκκιωματωδών βλαβών, αναφυλαξία ακόμα και τοξική παράλυση (23). Η τελευταία προκαλείται από μια νευροτοξίνη που περιέχεται στον σίελο των θηλυκών κροτώνων. Τα είδη που σχετίζονται με την ανθρώπινη κροτωνογενή παράλυση εντοπίζονται στη Β. Αμερική (*Dermacentor andersoni*, *D. Variabilis*, *Amblyomma americanum*), την Αυστραλία (*Ixodes holocyclus*) και τη Ν. Αφρική (*Ixodes rubicundus*). Συμπτώματα όπως κόπωση, αιμωδίες των κάτω άκρων και μυϊκά άλγη μπορούν να εμφανιστούν σε διάστημα πέντε περίπου ημερών και συνακόλουθη ανιούσα χαλαρή παράλυση.

Ακολουθούν δυσκαταποσία, παράλυση του προσωπικού νεύρου, σπασμοί και θάνατος λόγω αναπνευστικής ανεπάρκειας. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η έγκαιρη και προσεκτική απομάκρυνση του κρότωνα μπορεί να συμβάλλει στη βελτίωση της κατάστασης του ασθενούς (20).

Έχει αναφερθεί επίσης εμφάνιση τροφικής αλλεργίας/αναφυλαξίας 3-6 ώρες μετά από την κατανάλωση κόκκινου κρέατος (βόειου, χοιρινού, αρνιού) που οφείλεται στην παρουσία IgE αντισωμάτων έναντι της γαλακτόζης-α-1,3-γαλακτόζης (α-gal). Ο ολιγοσακχαρίτης αυτός βρίσκεται στις γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια θηλαστικών (εξαιρουμένων των πρωτευόντων θηλαστικών) και η παρουσία των IgE αντισωμάτων έναντι αυτού φαίνεται να σχετίζεται με την έκθεση σε νύγματα κροτώνων (48).



Εικόνα 13 Προνύμφες κρότωνα (a,b) και ενήλικας κρότωνα (c) κατά τη λήψη γέυματος αίματος από άνθρωπο (Φωτο: Μ. Λιοδάκη, Γ. Παπαδημητρίου)

Οι κρότωνα ως διαβιβαστές παθογόνων

Οι κρότωνα μπορούν να προκαλέσουν έναν μεγάλο αριθμό νόσων στους ανθρώπους. Αυτές μπορεί να οφείλονται σε ιούς όπως ο αιμορραγικός πυρετός Κριμαίας-Κονγκό, ο πυρετός του Κολοράντο, σε βακτήρια όπως μπορρελιώσεις, ρικετσιώσεις, αναπλάσμοι, τουλαραιμία αλλά και σε πρωτόζωα όπως η πιροπλάσμωση (μπαμπεσίωση). Ορισμένες από αυτές τις νόσους έχουν αναδειχθεί ως ζητήματα δημόσιας υγείας, όπως η μπορρελίωση σε Ευρώπη και Αμερική και η έγκαιρη αναγνώριση και αντιμετώπισή τους μπορεί να συμβάλει στην αποτροπή σοβαρών επιπλοκών (23). Οι συχνότερα καταγραφόμενες κροτωνογενείς λοιμώξεις στην Ευρώπη, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί στους οποίους οφείλονται και οι διαβιβαστές τους περιγράφονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1 Κροτωνογενή νοσήματα στην Ευρώπη, παθογόνοι μικροοργανισμοί και διαβιβαστές

| Νόσοι | Παθογόνα | Διαβιβαστές |
|----------------------------------|---|--|
| Βακτηριακές | | |
| Κηλιδοβλατιδώδης Πυρετός | <i>Rickettsia conorii</i> <i>Rickettsia monacensis</i> <i>Rickettsia massilliae</i> <i>Rickettsia sibirica</i> <i>Rickettsia mongolotimonae</i> | <i>Rhipicephalus sanguineus</i> |
| Νόσος Lyme | <i>Borrelia burgdorferi</i> | <i>Ixodes ricinus</i> |
| Debonel/Tibola | <i>Rickettsia slovaca</i> <i>Rickettsia raoulti</i> | <i>Dermacentor marginatus</i> |
| Αναπλάσμωση/Ερλιχίωση | <i>Anaplasma phagocytophylum</i> <i>Ehrlichia chaffeensis</i> | <i>Ixodes ricinus</i> |
| Τουλαραιμία | <i>Francisella tularensis</i> | <i>Dermacentor marginatus</i> |
| Παρασιτικές | | |
| Μπαμπεσίωση | <i>Babesia microti</i> <i>Babesia divergens</i> | <i>Ixodes ricinus</i> |
| Ιογενείς | | |
| Πυρετός Crimea-Congo | Ιός αιμορραγικού πυρετού Crimea-Congo | <i>Hyalomma marginatum</i> |
| Κροτωνογενής εγκεφαλίτιδα | Ιός γένους <i>Flavivirus</i> | <i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> |

Μεμονωμένες αναφορές κροτωνογενών νοσημάτων έχουν υπάρξει και στην Ελλάδα χωρίς όμως αυτό να αντανάκλα την πραγματική επιδημιολογική εικόνα τους, καθώς δεν έχει υπάρξει έως σήμερα με συστηματικό τρόπο η καταγραφή τους σε εθνικό επίπεδο (49). Σύμφωνα με τον ΕΟΔΥ, οι αναφορές αυτές αφορούσαν κυρίως περιστατικά ρικετσιώσεων, αιμορραγικού πυρετού Κριμαίας-Κογκό, αναπλασμών, πυρετού Q και μπορελλιώσεων.

2.2.4. Αντιμετώπιση των κροτώνων

Ο έλεγχος και η καταπολέμηση των κροτώνων αποτελεί δύσκολο έργο και απαιτεί ολοκληρωμένη διαχείριση που μπορεί να περιλαμβάνει διαφορετικές μεθόδους καταπολέμησης ανάλογα με την τοποθεσία ή/και τον ξενιστή (50). Η καλύτερη μέθοδος αποφυγής των νυγμάτων των κροτώνων είναι τα ατομικά μέτρα προστασίας. Τέτοια μέτρα μπορούν να είναι η κάλυψη των κάτω άκρων με κατάλληλα υποδήματα και η εφαρμογή των άκρων του παντελονιού μέσα από τις κάλτσες όπως επίσης και το ψέκασμα των ρούχων με εντομοαπωθητικά (23,51). Συχνή επίσης επιθεώρηση της ενδυμασίας και του σώματος ώστε να μην δοθεί στον κρότωνα η δυνατότητα προσκόλλησης, κρίνεται απαραίτητη μετά από υπαίθριες δραστηριότητες. Σε περίπτωση προσκόλλησης συνιστάται η άμεση και προσεκτική απομάκρυνσή του με τσιμπιδάκι (ή όταν αυτό δεν είναι διαθέσιμο και το μέγεθος του κρότωνα είναι κατάλληλο, ακόμα και με τα δάκτυλα) ώστε τα στοματικά μόρια να μην παραμείνουν εντός του δέρματος (50). Σύμφωνα όμως με άλλους ερευνητές η απομάκρυνση με τα δάκτυλα είναι προτιμότερο να αποφεύγεται, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος παλινδρόμησης από τον κρότωνα και η πιθανή μετάδοση παθογόνων (9).

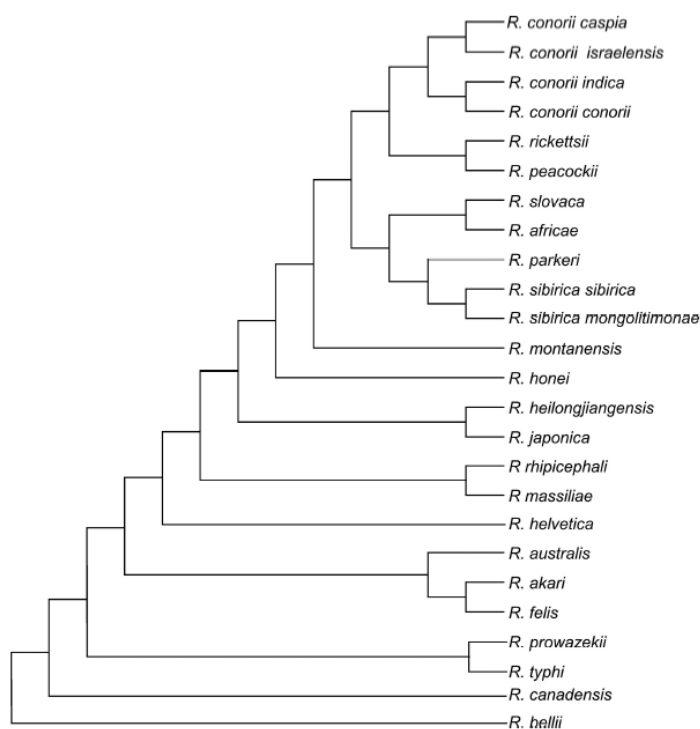
3. Παθογόνοι μικροοργανισμοί που διαβιβάζονται από κρότωνα και ψύλλους στους ανθρώπους

3.1. *Rickettsia*

3.1.1. Διαβιβαστές-Υποδόχα ρικετσιών

Το γένος *Rickettsia* ανήκει μαζί με τα γένη *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Neoehrlichia* and *Orientia* στην τάξη Rickettsiales, οικογένεια Rickettsiaceae. Με βάση την ισχύουσα ονοματολογία των προκαρυωτικών οργανισμών, κάτω από το γένος *Rickettsia* περιλαμβάνονται 29 είδη, <https://www.bacterio.net/genus/rickettsia> (52). Με βάση την κατηγοριοποίηση που περιγράφεται στο σχετικό με την ταξινόμηση, ιστότοπο του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικής Πληροφόρησης των

Η.Π.Α. (NCBI taxonomy database) τα είδη του γένους *Rickettsia* διαφοροποιούνται σε ομάδες μεταξύ των οποίων διακρίνονται η ομάδα του εξανθηματικού τύφου, η ομάδα του κηλιδιβλατιδώδους πυρετού, η ομάδα *belli*, η ομάδα με στελέχη αταξινόμητων ρικετσιών καθώς και η ομάδα με την αβέβαιη ταξινόμηση (*insertae sedis*) (53). Υπάρχουν επίσης αναφορές που βασίζονται σε φυλογενετικές αναλύσεις, σύμφωνα με τις οποίες οι ρικέτσιες ομαδοποιούνται σε πέντε ομάδες: στις ήδη αναφερθείσες ομάδες του εξανθηματικού τύφου και του κηλιδιβλατιδώδους πυρετού καθώς και στην μεταβατική ομάδα (ανάμεσα στις δύο προαναφερθείσες ομάδες), στην ομάδα *belli* και στην ομάδα *canadensis* (54). Η φυλογενετική ανάλυση που απεικονίζεται στην Εικόνα 14 βασίζεται στην ευθυγράμμιση 597 ορθολόγων γονιδίων των αναφερομένων ειδών *Rickettsia* spp. (55).

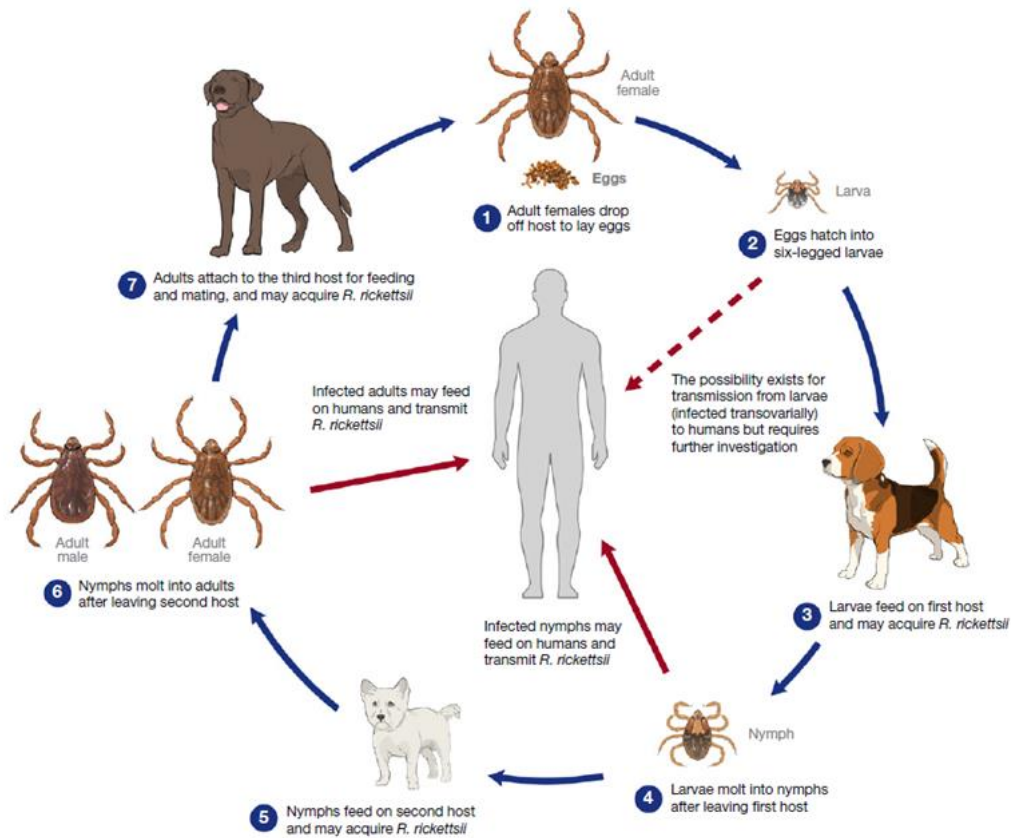


Εικόνα 14 Φυλογενετική ανάλυση *Rickettsia* spp. βασισμένη στην μέθοδο της οικονομίας (*parsimony method*) (55).

Οι ρικέτσιες είναι Gram-, υποχρεωτικά ενδοκυττάρια κοκκοβακτηρίδια που ανήκουν στα α-πρωτεοβακτήρια (οικογένεια: *Rickettsiaceae*, τάξη: *Rickettsiales*) με υποδόχα αλλά και διαβιαστές αρθρόποδα κυρίως κρότωνες, ψύλλους, ψείρες και ακάρεα. Στον κύκλο ζωής τους, ως υποδόχα μπορούν να δράσουν επίσης και μικρά θηλαστικά, με τον άνθρωπο να αποτελεί αδιέξοδο ξενιστή. Εξαίρεση αποτελεί η *Rickettsia prowazekii* (56). Η κάθετη μετάδοση που έχει επιβεβαιωθεί σε διάφορα

αρθρόποδα υποδεικνύει ότι μπορούν να δράσουν και ως υποδόχα. Σε κάποια είδη ρικετσιών υπάρχουν ενδείξεις ότι και οι σπονδυλωτοί ξενιστές είναι απαραίτητοι για την επιβίωση των βακτηρίων αυτών στη φύση (55). Στην περίπτωση νύγματος από κρότωνα στον άνθρωπο, μπορεί να σχηματιστεί στο σημείο ενοφθαλμισμού του βακτηρίου, μία εντοπισμένη φλεγμονώδης και νεκρωτική βλάβη με εφελκίδα που ονομάζεται εσχάρα ενοφθαλμισμού (“tache noire”). Εικάζεται ότι αυτή η εκδήλωση αντιμετώπισης του βακτηρίου αποτρέπει την ακραία μολυσματικότητα του (55). Σύμφωνα με τους Faccini-Marinez et al., η καταγραφή των ρικετσιώσεων θα μπορούσε να γίνει με βάση την πιθανότητα δημιουργίας εσχάρας ενοφθαλμισμού, τον τρόπο εξάπλωσης του εξανθήματος και τα επιμέρους κλινικά συμπτώματα (57).

Αναφορικά με τους διαβιβαστές, τα σημαντικότερα γένη σκληρών κροτώνων (οικ. *Ixodidae*) που σχετίζονται με μετάδοση ρικετσιώσεων είναι τα γένη: *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Haemaphysalis*, όπως αναφέρονται σε διάφορες ανασκοπήσεις (55,57). Ενδεικτικά παρατίθεται ο βιολογικός κύκλος τους κρότωνα *Rhipicephalus sanguineus* σε συνδυασμό με τη μετάδοση της *Rickettsia rickettsii* όπως περιγράφεται από το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των Η.Π.Α (Εικόνα 15) (58). Ο συγκεκριμένος κρότωνας τρέφεται κυρίως από έναν ξενιστή, τον σκύλο και κατά συνέπεια τα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του μπορούν να βρεθούν στον ίδιο ξενιστή. Ο *R. sanguineus* σχετίζεται με τη μετάδοση της *R. conorii* και της *R. massiliae* στην Ευρώπη και έχει σχετιστεί επίσης με αυξημένη τάση προσβολής του ανθρώπου και μετάδοση των ρικετσιώσεων σε περιόδους κατά τις οποίες επικρατούν υψηλότερες θερμοκρασίες (59).



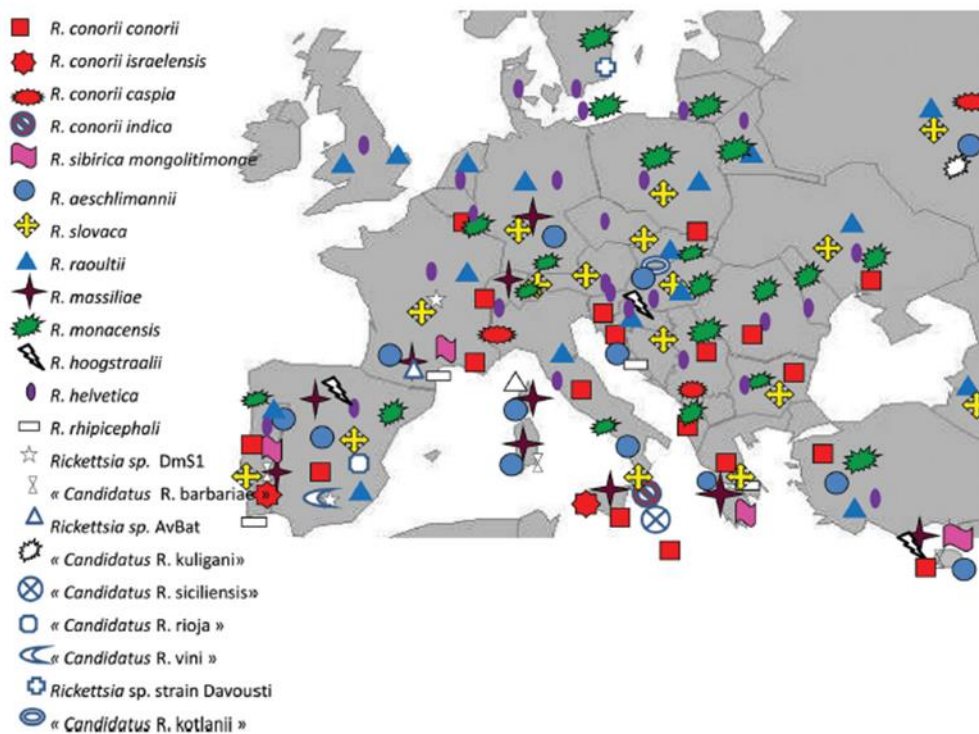
Εικόνα 15 Βιολογικός κύκλος του κρότωνα *Rhipicephalus sanguineus* και μετάδοση της *Rickettsia rickettsii* (58)

Σε ό,τι αφορά τους μαλακούς κρότωνα (οικ. *Argasidae*), δεν υπάρχουν αναφορές μετάδοσης παθογόνων ρικετσιών. Σε ό,τι αφορά τα ακάρεα, το άκαρι *Liponyssoides sanguineus* σχετίζεται με τη μετάδοση της *Rickettsia acari* και ακάρεα του γένους *Leptotrombidium* spp. μεταδίδουν την *Orientia tsutsugamushi* (60,55,61). Σε ό,τι αφορά τους ψύλλους, κυρίως ο ψύλλος των ποντικών *Xenopsylla cheopis* αλλά και ο ψύλλος της γάτας *Ctenocephalides felis* σχετίζονται με τη μετάδοση της *Rickettsia typhi*, ο *C. felis* με τη μετάδοση της *Rickettsia felis* και η ψείρα σώματος *Pediculus humanus humanus* με τη μετάδοση της *Rickettsia prowazekii* (57,61).

Σε κάποια είδη ρικετσιών υπάρχουν ενδείξεις ότι και οι σπονδυλωτοί ξενιστές είναι απαραίτητοι για την επιβίωση των βακτηρίων αυτών στη φύση (55). Έρευνες που έχουν περιλάβει διάφορα είδη σκίουρων στην Αμερική, υποδεικνύουν πολλαπλασιασμό της *R. rickettsii* στους σπονδυλωτούς ξενιστές και μετάδοση της διαμέσου των κροτώνων σε ινδικά χοιρίδια. Άλλες μελέτες στην περιοχή της Ρωσίας, που περιλάμβαναν αρουραίους, ποντικούς και λαγούς έδειξαν ότι τα άγρια τρωκτικά παρουσίαζαν παροδική βακτηριαιμία από ρικέτσιες, η οποία δεν διατηρούνταν κατά

την άνοιξη, περίοδο μετάδοσης της *Rickettsia sibirica*, δηλαδή της επιδημικής περιόδου του Βορειοασιατικού τύφου (46). Σε ό,τι αφορά τη *R. conorii*, μελέτες σε κουνέλια έδειξαν ότι αυτά θα μπορούσαν να αποτελέσουν υποδόχα του παθογόνου. Ο ρόλος επίσης των σκύλων αλλά και των γατών και άλλων περιοικιακών ζώων ως υποδόχων είναι υπό διερεύνηση, με δεδομένο ότι σχετίζονται άμεσα με τον άνθρωπο. Ειδικότερα οι σκύλοι αποτελούν ξενιστές πολλών ειδών κροτώνων (46).

Στον Πίνακα 2 που ακολουθεί, περιγράφονται οι βασικότερες ρικετσιακές λοιμώξεις, οι αιτιολογικοί παράγοντες, η γεωγραφική κατανομή τους και ο τρόπος μετάδοσης όπως προσαρμόστηκε από τους Patola et al., 2013 (55) και Fancini-Martinez et al., 2014 (57). Ειδικότερα σε ό,τι αφορά την Ευρώπη, οι ρικετσιώσεις που έχουν καταγραφεί περιγράφονται αναλυτικά στην ανασκόπηση των Patola et al. του 2013 και τα είδη με τα οποία σχετίζονται απεικονίζονται στην Εικόνα 16.



Εικόνα 16 Είδη ρικετσιών στην Ευρώπη σε ανθρώπους και διαβίβαστες (55)

Πίνακας 2 Ρικετσιακές λοιμώξεις: αιτιολογικός παράγοντας, γεωγραφική κατανομή και τρόπος μετάδοσης

| | Αιτιολογικός Παράγοντας | Ασθένεια | Γεωγραφική Κατανομή | Μετάδοση |
|---------------------------------|-------------------------------|---|--|--|
| Ομάδα Κηλιδοβλαπιδώδους πυρετού | <i>R. rickettsii</i> | Κηλιδώδης πυρετός των Βραχωδών ορέων | Βόρεια, Κεντρική και Νότια Αμερική | Νύγμα κρότωνα |
| | <i>R. conorii</i> | Μεσογειακός Κηλιδοβλατιδώδης πυρετός | Νότια Ευρώπη, Αφρική, Ρωσία, Γεωργία, Μέση Ανατολή, Ινδία | Νύγμα κρότωνα |
| | <i>R. africae</i> | Αφρικανικός πυρετός από νύγμα κρότωνα | Νότια, Δυτική και Ανατολική Αφρική, Καραϊβική | Νύγμα κρότωνα |
| | <i>R. parkeri</i> | Νόσος maculatum | Βόρεια και Νότια Αμερική | Νύγμα κρότωνα |
| | <i>R. sibirica</i> | Βορειοασιατικός τύφος από κρότωνα | Ρωσία, Κίνα, Μογγολία, Πακιστάν, Ευρώπη, Αφρική | Νύγμα κρότωνα |
| | <i>R. japonica</i> | Ιαπωνικός Κηλιδώδης πυρετός | Ιαπωνία, Κορέα, Ταϊλάνδη | Νύγμα κρότωνα |
| | <i>R. honei</i> | Κηλιδώδης πυρετός νήσου Flinders | Αυστραλία, Ασία | Νύγμα κρότωνα |
| | <i>R. slovacae</i> | TIBOLA / DEBONEL / SENLAT | Ευρώπη | Νύγμα κρότωνα |
| | <i>R. aeschlimannii</i> | Κηλιδώδης πυρετός | Υποσαχάρια Αφρική, Ευρώπη | Νύγμα κρότωνα |
| | <i>R. heilongjiangensis</i> | Κηλιδώδης πυρετός της Άπω Ανατολής | Ρωσία, Κίνα, Νότια Κορέα, Ιαπωνία | Νύγμα κρότωνα |
| | <i>R. massiliae</i> | Κηλιδώδης πυρετός | Ευρώπη, Αργεντινή | Νύγμα κρότωνα |
| | <i>R. monacensis</i> | Κηλιδώδης πυρετός | Ευρώπη | Νύγμα κρότωνα |
| | <i>R. raoultii</i> | TIBOLA / DEBONEL / SENLAT | Ευρώπη, Ασία | Νύγμα κρότωνα |
| | <i>Rickettsia strain 364D</i> | Νόσος σχετιζόμενη με εσχάρα (ήπια) | Καλιφόρνια | Νύγμα κρότωνα |
| Ομάδα εξανθηματικού τύφου | <i>R. prowazekii</i> | Επιδημικός εξανθηματικός τύφος | Παγκόσμια, της τελευταίες δεκαετίες Αφρική, Κεντρική Αμερική, Μεξικό, Ασία | Περιπτώματα ψείρας σώματος ανθρώπου |
| | | Νόσος Brill-Zinsser | Παγκόσμια | Αναζωπύρωση λανθάνουσας λοίμωξης |
| | | Σποραδικός τύφος (από τον ιπτάμενο σκίουρο) | Η.Π.Α. | Περιπτώματα ψύλλου ή ψείρας ιπτάμενου σκίουρου |
| <i>R. typhi</i> | Ενδημικός εξανθηματικός τύφος | Παγκόσμια κυρίως τροπικοί και υποτροπικοί | Περιπτώματα ψύλλου | |
| Μεταβατική ομάδα | <i>R. akari</i> | Ευλογία εκ ρικετσιών | Η.Π.Α., Ουκρανία, Κροατία, Κορέα, Τουρκία, Μεξικό | Νύγμα ακάρεος |
| | <i>R. australis</i> | Τύφος Queensland από κρότωνα | Ανατολική Αυστραλία | Νύγμα κρότωνα |
| | <i>R. felis</i> | Κηλιδώδης πυρετός από τον ψύλλο της γάτας | Παγκόσμια | Νύγμα ψύλλου ή περιπτώματα ψύλλου |

3.1.2. Παθογένεια

Οι ρικέτσιες αποτελούν υποχρεωτικά ενδοκυττάρια μικρόβια που εξελίχθηκαν στα αρθρόποδα, στα ζώα και στον άνθρωπο με γονιδιακή συρρίκνωση. Τα στάδια που περιλαμβάνει η παθογένεια των υποχρεωτικώς ενδοκυττάριων βακτηρίων είναι: μετάδοση, είσοδος, διασπορά από το σημείο εισόδου σε άλλα όργανα, επαφή με τα κύτταρα στόχους (προσκόλληση και εισβολή), επιβίωση στα κύτταρα του ξενιστή και διασπορά του παθογόνου (56). Στον άνθρωπο οι ρικέτσιες προσβάλλουν κυρίως το ενδοθήλιο των μικρών αγγείων (56). Η προσκόλληση γίνεται διαμέσου των προσκολλησινών OmpA και OmpB. Και οι δύο αυτές προσκολλησίνες απαντώνται στην ομάδα του κηλιδοβλατιδώδους πυρετού, ενώ στην ομάδα του εξανθηματικού τύπου βρίσκεται μόνο η OmpB (62). Στην πραγματικότητα, η OmpB είναι ο συνδέτης (ligand) για τον υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας Ku70 (πρωτεϊνικής κινάσης) ο οποίος συμμετέχει στο μηχανισμό της ενδοκύτωσης μαζί με την κλαθρίνη και την καβεολίνη (63,64). Μετά την ενδοκύτωση, ακολουθεί η έξοδος από το φαγόσωμα με τη μεσολάβηση πρωτεϊνών με μεμβρανολυτική δράση, των φωσφολιπασών D και A. Έτσι οι ρικέτσιες αποκτούν πρόσβαση στα απαραίτητα για την επιβίωση τους στοιχεία, από το κυτταρόπλασμα του κυττάρου - ξενιστή. Οι ρικέτσιες της ομάδας του κηλιδοβλατιδώδους πυρετού προωθούνται μέσα στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιώντας τον πολυμερισμό της ακτίνης προς τον ένα κυτταρικό πόλο και εισβάλλουν στα γειτονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (65). Οι ρικέτσιες του εξανθηματικού τύπου μην έχοντας αυτή τη δυνατότητα πολυμερισμού της ακτίνης, διασπείρονται μετά από τη λύση του κυττάρου-ξενιστή και προσβάλλουν στη συνέχεια τα γειτονικά κύτταρα (66).

Η αλληλουχία της παθογένειας που περιγράφεται από τους Walker et al. περιλαμβάνει την διασπορά μέσω των λεμφαγγείων της πύλης εισόδου, στους σύστοιχους λεμφαδένες και με την κυκλοφορία του αίματος στα ενδοθήλια των αγγείων των οργάνων, μεταξύ των οποίων ο εγκέφαλος και οι πνεύμονες (67).

3.1.3. Κλινικές μορφές ρικετσιώσεων

Επιδημικός τύπος

Οφείλεται στην *Rickettsia prowazekii* που μεταδίδεται από την ψείρα του σώματος *Pediculus humanus humanus*. Η νόσος αυτή έχει προκαλέσει μεγάλες επιδημίες κατά τη διάρκεια πολέμων, όπως κατά την υποχώρηση του Ναπολέοντα από το Βίλνιους (68) και εκείνη του 1^{ου} Παγκοσμίου Πολέμου με 3 εκατομμύρια θανάτους. Επιπλέον, οι φυσικές καταστροφές που έχουν ως επακόλουθο εκτοπισμούς και μετακινήσεις ανθρώπινων πληθυσμών, συνοδευόμενες με συνθήκες συγχρωτισμού και κακής

υγιεινής, ευνοούν τη μετάδοση των διαβιβαστών της νόσου μεταξύ των ανθρώπων και κατά συνέπεια και της νόσου (69). Αν και η νόσος αυτή είναι πλέον σπάνια, η *R. prowazekii* θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως αναδυόμενο παθογόνο, αφού σε πολλά μέρη του κόσμου η επιδείνωση των κοινωνικοοικονομικών συνθηκών θα μπορούσε να συντελέσει στην επανεμφάνισή της (66). Στις Η.Π.Α., η επιδημιολογία της νόσου έχει σχετιστεί και με τον ιπτάμενο σκίουρο *Glaucomys volans* και τα εκτοπαράσιτά του, χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί πλήρως ο μηχανισμός μετάδοσης (66).

Οι άνθρωποι μολύνονται με ενοφθαλμισμό των περιπτωμάτων ψείρας στο δέρμα διαμέσου εκδορών, και μέσω βιοαερολυμάτων που εισέρχονται από τον επιπεφυκότα ή/και τους βλεννογόνους (70). Μετά από περίοδο επώασης περίπου 10 ημερών εμφανίζεται πυρετός, κακουχία και άλγος που συνοδεύονται από εξάνθημα στο 20-40% των περιπτώσεων. Πιθανές επιπλοκές αποτελούν νευρολογικές εκδηλώσεις και αναπνευστική ανεπάρκεια (69). Το εξάνθημα, εφόσον υπάρχει και μπορεί να γίνει ορατό ανάλογα με τη χροιά του δέρματος (62), έχει χαρακτηριστική **φυγόκεντρο** κατανομή από τον κορμό προς τα άκρα (57). Εάν οι ρικέτσιες παραμείνουν στους λεμφαδένες μπορεί να παρατηρηθεί, ακόμα και μετά από πολλά χρόνια, υποτροπή (recrudescence) της νόσου με ηπιότερες εκδηλώσεις μικρότερης διάρκειας. Ο υποτροπιάζων επιδημικός τύπος ονομάζεται νόσος Brill-Zinsser (69).

Ενδημικός τύπος

Οφείλεται στην *Rickettsia typhi* που μεταδίδεται από τον ψύλλο *Xenopsylla cheopis*, εκτοπαράσιτο των ποντικών *Rattus norvegicus* και *Rattus rattus*, που θεωρούνται ως τα κυριότερα υποδόχα της νόσου. Αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες νόσους μέσω αρθρόποδου διαβιβαστή σε παγκόσμιο επίπεδο (31). Στην Καλιφόρνια των Η.Π.Α., στον κύκλο μετάδοσης φαίνονται να εμπλέκονται επίσης τα μαρσιποφόρα *Didelphis marsupialis* και οι ψύλλοι τους *C. felis* (71,32). Εκτός από Αμερική και Αφρική, στην περιοχή της Ευρώπης έχει αναφερθεί στις Μεσογειακές χώρες Ισπανία, Κροατία, Ελλάδα και Κύπρο (31). Στην Ελλάδα οι αναφορές κρουσμάτων σχετίζονται με τις περιοχές της Κρήτης και της Εύβοιας (72–76). Μέσα στην τελευταία πενταετία έχουν αναφερθεί μεμονωμένα περιστατικά στην Καβάλα (77) και στην Κάσο (78).

Η μόλυνση του ανθρώπου γίνεται διαμέσου του αναπνευστικού και του επιπεφυκότα μέσω βιοαερολυμάτων, του δέρματος μέσω εκδορών και επαφή με τα περιπτώματα των ψύλλων αλλά και από το νύγμα τους. Αναφορές νύγματος ψύλλου έχουν γίνει σε περιπτώσεις ασθενών που έφτασαν και το 40% (62). Η νόσος είναι συνήθως ήπια αλλά δυνητικά μπορεί να έχει θανατηφόρα έκβαση, με θνητότητα έως και 4% σε

περίπτωση μη χορήγησης ή καθυστερημένης θεραπείας (79). Μετά από επώαση περίπου δύο βδομάδων, εμφανίζεται πυρετός συνοδευόμενος από κεφαλαλγία, μυαλγία και ναυτία. Στο 80% των περιπτώσεων εμφανίζεται κηλιδώδες εξάνθημα στον κορμό με **φυγόκεντρο** επέκταση (57,62). Αναφέρονται επίσης βήχας, πνευμονικές διηθήσεις και νευρολογικά συμπτώματα σε βαρέως πάσχοντες. Ιστολογικά παρατηρούνται οίδημα των ενδοθηλίων και περιαγγειακά λεμφοϊστικοκυτταρικά διηθήματα των αγγείων του χορίου, στο ΚΝΣ, πνεύμονες, καρδιά, γαστρεντερικό και νεφρούς (62).

Κηλιδώδης πυρετός από τον ψύλλο της γάτας

Οφείλεται στη *Rickettsia felis* που φαίνεται ότι μεταδίδεται από τον ψύλλο της γάτας *Ctenocephalides felis*, ένα είδος ψύλλου με παγκόσμια εξάπλωση στο οποίο έχει ανιχνευθεί το συγκεκριμένο παθογόνο σε πληθώρα μελετών (57). Έχει βρεθεί επίσης και σε πολλά άλλα είδη αρθροπόδων: ψύλλων, κροτώνων, ακάρεων και κουνουπιών τα οποία περιγράφονται στην ανασκόπηση των Brown και Macaluso (80). Τα ζωικά είδη θηλαστικών που έχουν βρεθεί οροθετικά ή θετικά σε μοριακές δοκιμασίες PCR περιλαμβάνουν γάτες, σκύλους, μαρσιποφόρα και ανθρώπους χωρίς να έχει επιβεβαιωθεί κάποιο από αυτά ως τελικός ξενιστής (80). Η διατήρησή τους στους ψύλλους *C. felis* φαίνεται να βασίζεται στην διαωθητική και διασταδιακή μετάδοση, αλλά και στην μεταφορά τους από μολυσμένους ψύλλους σε μη μολυσμένους κατά την ταυτόχρονη λήψη γεύματος από τον ίδιο ξενιστή (co-feeding) (81,82). Στην Ευρώπη υπάρχουν λιγιστές αναφορές της νόσου και αφορούν την Ισπανία, την Ιταλία, τη Γερμανία και την Σουηδία (83). Ειδικότερα στην Ελλάδα έχουν αναφερθεί 3 περιστατικά προσβολής από *R. felis* στην περιοχή της Χαλκίδας στην Εύβοια (84) και 8 περιστατικά πιθανής έκθεσης σε *R. felis* βασισμένα σε ορολογικές και όχι σε μοριακές δοκιμασίες (85).

Τα κλινικά συμπτώματα της νόσου μοιάζουν με αυτά του ενδημικού τύπου, με εξάνθημα να παρατηρείται στο 75% των περιπτώσεων και αναφερόμενη εσχάρα στο 13%, χωρίς καταγραφή θανατηφόρου περιστατικού (32). Οι μολύνσεις στον άνθρωπο έχουν επιβεβαιωθεί μόνο με μοριακές τεχνικές (PCR και αλληλούχιση) χωρίς έως τώρα να έχει απομονωθεί το παθογόνο από κλινικό δείγμα (32). Αν και έχει συνδεθεί ως αιτιολογικός παράγοντας με εμπύρετες νόσους στην Αφρική (86,87), μελέτες στη Σενεγάλη διαπίστωσαν την ύπαρξη οροθετικών ασυμπτωματικών ατόμων για τη *R. felis* (4%) σε αντίθεση με απύρετα άτομα που διέμεναν στη Γαλλία (88).

Κηλιδώδης πυρετός των Βραχωδών ορέων

Οφείλεται στην *Rickettsia rickettsii* που μεταδίδεται από κρότωνες των γενών *Dermacentor*, *Rhipicephalus* και *Amblyomma*. Απαντάται στην Αμερική και αποτελεί την πιο σοβαρή νόσο λόγω του μεγάλου ποσοστού θνητότητας που παρουσιάζει. Είναι εξανθηματικό νόσημα στο οποίο το εξάνθημα ξεκινά από τους καρπούς και τα σφυρά και επεκτείνεται **κεντρομόλα** προς τα άκρα και τον κορμό. Οι βλάβες είναι κηλιδοβλατιδώδεις, πετεχειιώδεις ή πορφυρικές αλλά υπάρχει πολύ μικρή πιθανότητα σχηματισμού εσχάρας. Η νόσος εισβάλλει συνήθως 2-14 ημέρες μετά το νύγμα του κρότωνα και εκδηλώνεται με πυρετό, κεφαλαλγία και μυαλγία καθώς και με εμέτους, ναυτία και διάρροια τις 3 πρώτες μέρες. Το εξάνθημα παρουσιάζεται μεταξύ τρίτης και πέμπτης μέρας. Πιθανές επιπλοκές σοβαρής νόσου είναι νεφρική ανεπάρκεια και εκδηλώσεις από το κεντρικό νευρικό σύστημα καθώς επίσης και μυοκαρδίτιδα, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη και γάγγραινα (55,62). Στις Η.Π.Α. έχουν αναφερθεί ποσοστά θνητότητας 5-10% και ακόμα υψηλότερα 20-40% στη νότια Αμερική (55).

Μεσογειακός Κηλιδοβλατιδώδης Πυρετός

Οφείλεται στην *Rickettsia conorii*, η οποία στην περιοχή της Μεσογείου έχει ως κύριο διαβιβαστή τον καφέ κρότωνα του σκύλου, *Rhipicephalus sanguineus*. Η νόσος αυτή είναι ενδημική της Μεσογείου αλλά έχει παρατηρηθεί και σε άλλες περιοχές όπως Ινδία, περιοχή του Εύξεινου Πόντου και περιοχή της Κασπίας θάλασσας. Βάσει φυλογενετικής ανάλυσης και με οροτυπικά και κλινικοεπιδημιολογικά κριτήρια οι Zhu et al., πρότειναν τη δημιουργία 4 υποειδών κάτω από το είδος *R. conorii*, με ονόματα που παραπέμπουν στο ανατολικό ημισφαίριο (89). Τα υποείδη αυτά είναι η ***R. conorii conorii***, η ***R. conorii israelensis***, η ***R. conorii caspia*** και η ***R. conorii indica***. Το πρώτο υποείδος: **conorii**, που απαντάται στις Μεσογειακές χώρες και τη Μαύρη θάλασσα, χαρακτηρίζεται από κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα στο 97% των περιπτώσεων, συνήθως μία εσχάρα ενοφθαλμισμού και θνητότητα να φτάνει το 2.5%. Το δεύτερο υποείδος: **israelensis**, εμφανίζει εσχάρα σε μικρότερο ποσοστό σε σχέση με το πρώτο υποείδος και σε ορισμένες περιπτώσεις αρκετά βαριά κλινική εικόνα. Στο τρίτο υποείδος: **caspia**, παρατηρείται εσχάρα στο 23% και κηλιδώδες εξάνθημα στο 94% των περιπτώσεων ενώ στο τέταρτο: **indica**, παρατηρείται πορφυρικό εξάνθημα με σπάνια εμφάνιση εσχάρας. Κοινό χαρακτηριστικό των δύο τελευταίων ειδών είναι το ότι δεν έχουν αναφερθεί θάνατοι (89). Για την ταξινόμηση αυτή εκφράστηκαν επιφυλάξεις με δεδομένο όπως αναφέρεται από τους Walker και de Sousa, τα κλινικά κριτήρια δεν επαρκούν ώστε να μπορούν να υποστηρίξουν

αυτή τη διάκριση και επιπλέον διότι τα υποείδη αυτά έχουν καταγραφεί και σε άλλες γεωγραφικές περιοχές από αυτές στις οποίες αναφέρονται οι ονομασίες (90).

Τα κρούσματα που έχουν αναφερθεί, αφορούν σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, όπως σε Ιταλία, Γαλλία, Ισπανία Πορτογαλία, Ελβετία, Κροατία, Ρουμανία, Βουλγαρία, Τουρκία και Ελλάδα συνοψίζονται σε σχετικές ανασκοπήσεις (31,55) και απεικονίζονται στην Εικόνα 16. Η έξαρση των κρουσμάτων κατά τους θερινούς μήνες έχει αποδοθεί σε αύξηση της θερμοκρασίας και στην αυξημένη επιθετικότητα των κροτώνων *R. sanguineus* (59) καθώς και με χαμηλότερη βροχόπτωση και μείωση των ημερών παγετού ετησίως (91). Στην Ελλάδα, ο μεσογειακός πυρετός καταγράφεται στην βιβλιογραφία της τελευταίας 30ετίας με τα τελευταία χρόνια να επιβεβαιώνεται και με μοριακές μεθόδους (92–99). Ωστόσο, μόλις το 2022, οι ρικετσιώσεις συμπεριλήφθηκαν στον αναδιαμορφωμένο κατάλογο των υποχρεωτικώς δηλουμένων νοσημάτων στην χώρα μας (ΦΕΚ 1665/7-4-2022) (100).

Τα κλινικά συμπτώματα της νόσου εμφανίζονται μετά από περίοδο μίας περίπου εβδομάδας με εμφάνιση κηλιδοβλατιδώδους εξανθήματος κυρίως στα άκρα (παλάμες και πέλματα), συνοδευόμενου από πυρετό. Το παθογνωμονικό κριτήριο είναι η εμφάνιση της εσχάρας στο σημείο ενοφθαλμισμού (“tache noire”) (Εικόνα 17) στη θέση του νύγματος που εντοπίζεται συνήθως στη βουβωνική χώρα, μασχάλη ή κεφαλή (101). Στα παιδιά ενδέχεται να εμφανιστούν πολλαπλές εσχάρες (31). Συνοδά συμπτώματα είναι αδυναμία, κεφαλαγία, μυαλγία, ρίγη και βραδυκαρδία (102). Σε περιπτώσεις με κακή πρόγνωση, το κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα μπορεί να εξελιχθεί σε αιμορραγικό και να εμφανιστούν επιπλοκές από αναπνευστικό και νεφρούς (103). Γενικά η θνητότητα για τη *Rickettsia conorii conorii* κυμαίνεται γύρω στο 2,5% (57). Παράγοντες κινδύνου αποτελούν η αυξημένη ηλικία, η ανοσοκαταστολή, ο αλκοολισμός, η έλλειψη G6PD, ο διαβήτης και η καθυστερημένη ή ακατάλληλη συνταγογράφηση αντιβιοτικών (104). Στα άλλα τρία υποείδη, η εσχάρα παρατηρείται σπανιότερα ενώ για την *Rickettsia conorii israelensis* έχουν αναφερθεί ποσοστά θνητότητας που φθάνουν το 29% (105).



Εικόνα 17 Μεσογειακός Κηλιδοβλατιδώδης Πυρετός: εσχάρα ενοφθαλμισμού (“tache noire”) (57)

Άλλες Ρικετσιώσεις της ομάδας του κηλιδώδους πυρετού

i. *Rickettsia aeschlimanii*

Κρούσματα λοίμωξης του ανθρώπου από *Rickettsia aeschlimanii* έχουν καταγραφεί στην Ευρώπη, Υποσαχάρια Αφρική, Ασία και Β. Αφρική. Η ρικέτσια αυτή ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στο Μαρόκο το 1992 σε κρότωνα *Hyalomma marginatum* και για πρώτη φορά στον άνθρωπο στην Ευρώπη το 2002, σε Γάλλο υπήκοο που επέστρεψε από το Μαρόκο (106). Το πρώτο αυτόχθονο περιστατικό που καταγράφηκε στην Ευρώπη προέρχονταν από την Ελλάδα και ήταν 70χρονος Κρητικός, που νόσησε μετά από νύγμα κρότωνα του είδους *Rhipicephalus turanicus* (107). Στην Ισπανία έχει ανιχνευθεί στο συγκεκριμένο είδος κρότωνα (108) ενώ στην Ελλάδα είχε ανιχνευθεί σε κρότωνα *Hyalomma anatolicum excavatum* που προέρχονταν από πρόβατα το 2006 (109).

Στην περίπτωση του Έλληνα ασθενούς, αναπτύχθηκε βλατίδα διαμέτρου 2 εκ. που περιβαλλόταν από λιγότερο εξέρυθρη διηθημένη περιοχή διαμέτρου 8 εκ., ανώδυνη και μη κνησμώδη (107). Στη περίπτωση του Γάλλου ασθενούς τα συμπτώματα ήταν παρόμοια με εκείνα του μεσογειακού κηλιδοβλατιδώδους πυρετού (55). Έως το 2010 είχαν αναφερθεί περιστατικά από την Τυνησία, Αλγερία και Νότια Αφρική, διεγνωσμένα με ορολογικές και μοριακές μεθόδους ενώ παρουσία εσχάρας αναφέρθηκε σε δύο μόνο ασθενείς (57).

ii. *Rickettsia sibirica mongolotimonae*

Σε αυτή τη ρικετσιώση η λεμφαγγειίτιδα αποτελεί το χαρακτηριστικό κλινικό σύμπτωμα στο οποίο οφείλεται και η ονομασία της, δηλαδή ρικετσιώση σχετιζόμενη με λεμφαγγειίτιδα (lymphangitis-associated rickettsiosis, LAR) (110). Το παθογόνο αυτό πρωτοεντοπίστηκε το 1993 στην Κίνα σε κρότωνα *Hyalomma asiaticum* (111).

Στην Ελλάδα και στην Κύπρο έχει ανιχνευθεί σε κρότωνα *Hyalomma anatolicum excavatum* (112,113), ενώ στην Γαλλία, Πορτογαλία, Ισπανία σε κρότωνα *Rhipicephalus pusillus* (114–117). Σε ανασκόπηση του 2013 αναφέρονται 30 περιστατικά παγκοσμίως (110) με τον αριθμό αυτό να έχει φτάσει πλέον τα 50 περιστατικά, όπως καταγράφεται σε πρόσφατη δημοσίευση από τη Βόρεια Μακεδονία (118). Στην Ελλάδα έχει καταγραφεί περιστατικό 76χρονου άνδρα από την περιοχή της Σητείας (Κρήτη) το 2005 (112).

Το βασικό σύμπτωμα της νόσου είναι η λεμφαγγειίτιδα η οποία έχει χαρακτηριστική επιμήκη μορφολογία που μοιάζει με κορδόνι (en corde) και που σύμφωνα με τους Foissac et al. «συνδέει την εσχάρα του ενοφθαλμισμού με την περιοχή της λεμφικής παροχέτευσης» (110). Στις κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνονται επίσης εσχάρα ενοφθαλμισμού ή/και τοπική αδενοπάθεια, που σχετίζεται με ήπιο εξάνθημα και γριππώδη συνδρομή που ακολουθεί το νύγμα του κρότωνα. Εσχάρα στο σημείο ενοφθαλμισμού, συνήθως μονήρης, παρατηρείται στο 90% των περιπτώσεων και μπορεί να εντοπιστεί σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος σε αντίθεση με το σύνδρομο SENLAT (Scalp Eschar and Neck Lymphadenopathy After Tick Bite) όπου η εσχάρα ενοφθαλμισμού εντοπίζεται στην κεφαλή (110). Το εξάνθημα είναι διακριτό και παρατηρείται συνήθως στα άκρα, παλάμες και πέλματα (117). Στην περίπτωση που καταγράφηκε στην Ελλάδα, ο ασθενής εμφάνισε διακριτό κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα κυρίως στον κορμό και κοντά στα άκρα, χωρίς εσχάρα στο σημείο ενοφθαλμισμού και τη δεύτερη μέρα της νοσηλείας του εμφάνισε κοιλιακή μαρμαρυγή (112). Αν και η νόσος συνήθως είναι ήπια, επιπλοκές που έχουν αναφερθεί, εκτός από την προαναφερθείσα κοιλιακή μαρμαρυγή, είναι αγγειίτιδα των αγγείων του αμφιβληστροειδούς, σηπτικό σοκ και σύγχυση λόγω υπονατριαιμίας (110).

iii. *Rickettsia massiliae*

Η ρικέτσια *Rickettsia massiliae* απομονώθηκε από κρότωνα *R. sanguineus* στην Γαλλία το 1990 και έως το 2013 ανιχνεύθηκε σε άλλα τρία είδη του ίδιου γένους (*Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus pusillus*, *Rhipicephalus bursa*) καθώς και στο είδος *Ixodes ricinus*, σε 7 ευρωπαϊκά κράτη μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα (55). Το 2004 και το 2006 ανιχνεύθηκε σε κρότωνα *R. sanguineus* στην Νότια και Βόρεια Αμερική αντίστοιχα. Έχει επίσης καταγραφεί στην Αφρική, σε Αλγερία και Μαρόκο, σε κρότωνα *R. sanguineus*, *R. turanicus* και *R. bursa* (55). Η ανίχνευση της *R. massiliae*, κυρίως σε είδη του γένους *Rhipicephalus*, σχετίζεται και με άλλες 8 αφρικανικές χώρες, σύμφωνα με μελέτες της τελευταίας δεκαετίας (119–121,121–125). Πρόσφατα ανιχνεύθηκε και στο Πακιστάν (126).

Τα έως σήμερα περιγεγραμμένα περιστατικά σε ανθρώπους είναι 8 και αφορούν στις Μεσογειακές χώρες με εξαίρεση έναν Ισπανό ταξιδιώτη που επισκέφθηκε την Αργεντινή (127). Στην Ελλάδα έχει περιγραφεί περιστατικό που αφορούσε Άγγλο υπήκοο διαμένοντα στα Χανιά, ο οποίος ανέφερε νύγμα κρότωνα στη χώρα καταγωγής του (128). Ο ασθενής εμφάνιζε εσχάρα ενοφθαλμισμού διαμέτρου 5 mm στο βραχίονα και κηλιδώδες εξάνθημα στα άνω άκρα. Η διάγνωση βασίστηκε σε ορολογικές μεθόδους ενώ δεν κατέστη δυνατή επιβεβαίωση με μοριακές τεχνικές. Όπως αναφέρεται στην συγκεκριμένη εργασία, δεν μπορούν να αποκλειστούν διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα είδη ρικετσιών (128).

iv. *Rickettsia slovaca*

Η *Rickettsia slovaca* απομονώθηκε από κρότωνα *Dermacentor marginatus* ήδη από το 1968 στην Τσεχοσλοβακία και η πρώτη λοίμωξη διαγνώστηκε σε ασθενή το 1997 (129). Σχετίζεται με τα σύνδρομα: TIBOLA - κροτωνογενούς λεμφαδενοπάθειας (Tick Borne Lemphadenopathy), DEBONEL - νεκρωτικού ερυθήματος και λεμφαδενοπάθειας από νύγμα κρότωνα *Dermacentor* (*Dermacentor Borne Necrosis Erythema and Lemphadenopathy*) και SENLAT - εσχάρας τριχωτού της κεφαλής και τραχηλικής λεμφαδενοπάθειας από νύγμα κρότωνα (*Scalp Eschar and Neck Lemphadenopathy after tick bite*). Έχει απομονωθεί από κρότωνα *D. marginatus* και *Dermacentor reticulatus* σε ευρωπαϊκές χώρες συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας (55). Απομονώθηκε από άνθρωπο για πρώτη φορά το 2003 σε ασθενή στη Γαλλία (130). Παρόμοιες αναφορές προέρχονται επίσης από Σλοβακία, Ιταλία, Γερμανία Ουγγαρία, Πολωνία και Ισπανία (55). Έχει αναφερθεί και στην Ελλάδα σε γυναίκα 42 ετών από την Κέρκυρα (131).

Στις κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνονται η εσχάρα στην περιοχή ενοφθαλμισμού που περιβάλλεται από ερύθημα και εντοπισμένη επώδυνη λεμφαδενοπάθεια (31). Ενδέχεται να παρατηρηθούν κεφαλαλγία, εξάνθημα, πυρετός και οίδημα προσώπου (55). Στην περίπτωση της ασθενούς από την Ελλάδα τόσο η εσχάρα όσο και η λεμφαδενοπάθεια απουσίαζαν, ενώ υπήρχε πυρετός και εξάνθημα (131).

Ρικέτσιες που σχετίζονται με νόσο στον άνθρωπο είναι τα είδη *R. monacensis*, *R. helvetica*, *R. raoultii*, *R. heilongjiangensis*, *Rickettsia* strain 364D και η *R. tamurae* (55). Οι τρεις πρώτες έχουν αναφερθεί και σε ευρωπαϊκές χώρες (31).

3.1.4. Διάγνωση και θεραπεία των ρικετσιώσεων

Η διάγνωση βασίζεται σε ορολογικές μεθόδους και ως μέθοδος αναφοράς εφαρμόζεται ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (Immunofluorescent antibody test, IFAT).

Στην περίπτωση αυτή λαμβάνονται δύο δείγματα ορού με μεσοδιάστημα 3 εβδομάδων. Ο τετραπλασιασμός του τίτλου των αντισωμάτων IgG μεταξύ δύο δειγμάτων, του πρώτου στην οξεία φάση και του δεύτερου στη φάση ανάρρωσης, είναι διαγνωστικός λοίμωξης. Ο υψηλός τίτλος IgM αντισωμάτων σε ένα μόνο δείγμα υποδεικνύει πρόσφατη λοίμωξη. Η ευαισθησία του IFAT για τους κηλιδοβλατιδώδεις πυρετούς κυμαίνεται μεταξύ 85-100% και η ειδικότητα 99-100% κατά την ανίχνευση των IgG αντισωμάτων (62). Σε ασθενείς με ενδημικό τύφο αναφέρεται ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της *R. typhi* σε ποσοστό μικρότερο του 20% την έβδομη μέρα από την έναρξη της νόσου (132). Διασταυρούμενες αντιδράσεις έχουν αναφερθεί μεταξύ *R. conorii* και *R. rickettsii*, καθώς επίσης με *Proteus* spp. και *Legionella* spp. (133). Ορολογικές δοκιμασίες που εφαρμόζονται είναι ο μικροανοσοφθορισμός (MIF) και η ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA). Οι μοριακές τεχνικές PCR (συμβατική, εμφωλεασμένη ή πραγματικού χρόνου) επιτρέπουν την άμεση ανίχνευση με τον πολυμερισμό αλληλουχιών διαφόρων γονιδίων 16S rRNA, *rOmpA*, *rOmpB*, *gltA* και γονιδίου D από το αίμα του ασθενούς και από υλικό εσχάρας ή φυσαλιδώδων δερματικών βλαβών (61). Σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει το δείγμα να έχει ληφθεί στην οξεία φάση της νόσου και πριν την έναρξη της θεραπείας. Οι μοριακές μέθοδοι πλεονεκτούν ως προς την ταχύτητα της εξέτασης και τη δυνατότητα να διάγνωσης στο αρχικό στάδιο της νόσου.

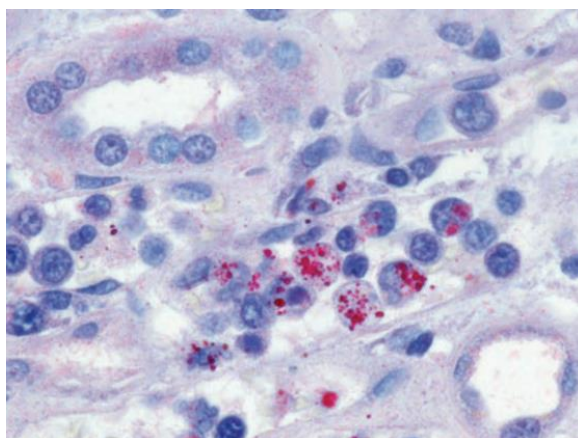
Οι τετρακυκλίνες αποτελούν τη θεραπεία εκλογής. Η δοξυκυκλίνη αποτελεί τη θεραπεία εκλογής για τις ρικετσιώσεις του Μεσογειακού κηλιδοβλατιδώδους πυρετού καθώς και για παιδιά και για τους βαρέως πάσχοντες από ρικέτσια (134).

3.2. Ehrlichia/Anaplasma

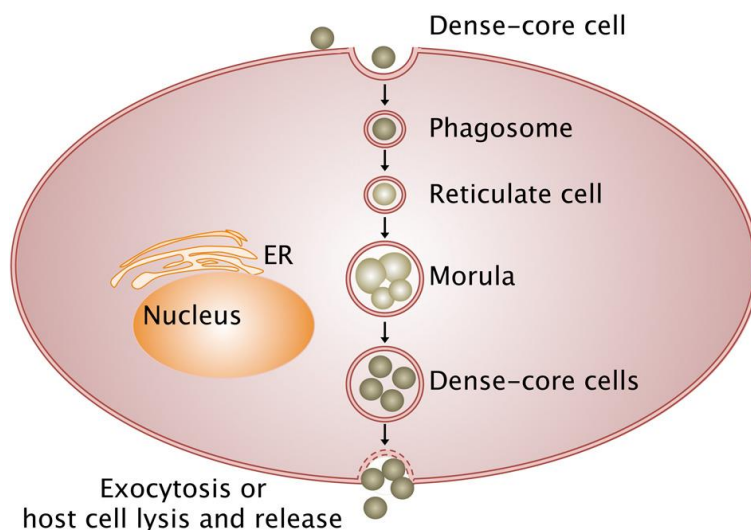
Τα γένη *Ehrlichia* και *Anaplasma* ανήκουν στην οικογένεια *Anaplasmataceae* (τάξη: Rickettsiales) μαζί με το γένος *Neorickettsia* που παρασιτεί τους τρηματώδεις σκώληκες και το γένος *Wolbachia* που χαρακτηρίζεται ως ενδοσυμβιώτης αρθροπόδων και νηματωδών σκωλήκων (135). Είδη των γενών *Ehrlichia* και *Anaplasma* χαρακτηρίζονται ως αναδυόμενα παθογόνα με δεδομένο ότι πλέον συνδέονται με νόσηση στους ανθρώπους. Το είδος *Ehrlichia chaffeensis* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της ανθρώπινης μονοκυτταρικής ερλιχίωσης σε Ηνωμένες Πολιτείες, Αφρική και Ασία. Το είδος *Ehrlichia ewingii* σχετίζεται με ερλιχίωση στον άνθρωπο σε Ηνωμένες Πολιτείες, Αφρική και Νότια Αμερική. Το είδος *Anaplasma phagocytophilum* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της ανθρώπινης κοκκιοκυτταρικής

αναπλάσματος σε Ηνωμένες Πολιτείες και Ευρασία (62). Εκτός από τα προαναφερθέντα, με ανθρώπινη νόσο έχει συσχετιστεί και το είδος *Ehrlichia canis*, αίτιο της μονοκυτταρικής ερλιχίωσης του σκύλου (136–139). Σε δημοσίευση του 2017 αναφέρεται ότι γονότυπος *E. canis*, συγγενής με βραζιλιάνικο γονότυπο που σχετίζονταν με σκύλους, ανιχνεύθηκε σε υγιείς ενήλικες αιμοδότες στην Κόστα Ρίκα (140). Στην Ευρώπη, η κοκκιοκυτταρική αναπλάσματος είναι μια από τις πλέον διαδεδομένες νόσους στα ζώα, με κύριους διαβιβαστές τον *Ixodes ricinus* και τον *Ixodes persulcatus* (141). Τα κρούσματα στους ανθρώπους δεν είναι συχνά, γεγονός που ενδεχομένως οφείλεται στην υποδιάγνωση, λόγω των μη ειδικών συμπτωμάτων τύπου γριπώδους συνδρομής (142).

Τα βακτήρια αυτών των γενών ανήκουν στα α-πρωτεοβακτήρια και αποτελούν υποχρεωτικά Gram- κοκκοβακτηρίδια, που εντοπίζονται στο κυτταροπλασματικό κενοτόπιο των λευκοκυττάρων (Εικόνα.18). Στον κύκλο ζωής τους διακρίνονται δύο μορφές: μία συμπαγής (dense-core) που αποτελεί τη μολυσματική μορφή, και μία δικτυωτή (reticulate), που είναι η διαιρούμενη μορφή. Η διαίρεση γίνεται με διχοτόμηση και από αυτή προκύπτει μοροειδής μορφή, εξ' ου και ο χαρακτηρισμός της με τη λατινική λέξη morula (143,144). Αυτή εξελίσσεται σε συμπαγή μορφή πριν την εξωκυττάρωση (144) (Εικόνα 19). Στους κρότωνες, η μετάδοση είναι διασταδιακή και όχι διαωθητική, γεγονός που σημαίνει ότι οι κρότωνες μολύνονται μέσω της λήψης γεύματος αίματος από το σπονδυλωτό υποδόχο (145). Και τα δύο γένη έχουν σχετικά μικρά γονιδιώματα από τα οποία απουσιάζουν τα γονίδια σύνθεσης των λιποπολυσακχαριτών και των πεπτιδογλυκανών τα οποία θα μπορούσαν να ενεργοποιήσουν τα λευκοκύτταρα του ξενιστή (143).



Εικόνα 18 *Ehrlichia chaffeensis* στα μονοκύτταρα νεφρού από ασθενή με ερλιχίωση (CDC) από δημοσίευση (146)



Εικόνα 19 Ο ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής των *Anaplasmatocae* από δημοσίευση (144)

Τα βακτήρια και των δύο αυτών γενών εισέρχονται στον ξενιστή διαμέσου του νύγματος κρότωνα. Τα βακτήρια *Ehrlichia* spp. προσβάλλουν τα μονοκύτταρα (μονοπύρηνα λευκοκύτταρα) ενώ τα βακτήρια *Anaplasma* spp. προσβάλλουν τα κοκκιοκύτταρα (πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα). Με ενδοκύτωση εισέρχονται στα ενδοσώματα, μέσα στα οποία και πολλαπλασιάζονται, ξεφεύγοντας από τα φαγολυσοσώματα. Φαίνεται ότι επιτυγχάνεται επαναπρογραμματισμός της άμυνας των κυττάρων του ξενιστή, ώστε να διευκολυνθεί η επιβίωσή τους (147).

Τα συμπτώματα των ερλιχιώσεων και των αναπλάσμων είναι παρεμφερή. Περιλαμβάνουν πυρετό με ρίγος, μυαλγία, αδυναμία, ναυτία, βήχα, πονοκέφαλο και κακουχία. Εξάνθημα μπορεί να εκδηλωθεί σε κορμό, χέρια και πόδια στην ερλιχιώση αλλά σπάνια στην αναπλάσωση. Αρκετοί ασθενείς παραμένουν ασυμπτωματικοί. Στις πιθανές επιπλοκές της λοίμωξης περιλαμβάνονται διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη, ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων, επιληπτικές κρίσεις και κώμα. Σε αμφότερες λοιμώξεις τα συμπτώματα είναι βαρύτερα σε ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς (HIV ή λήψη0 κορτικοστεροειδών). Οι λοιμώξεις σε ανοσοκατασταλαμένους ή σε περιπτώσεις καθυστερημένης έναρξης φαρμακευτικής αγωγής μπορεί αποβούν θανατηφόρες, αν και όχι συχνά (146,148).

Η εργαστηριακή διάγνωση των ανθρώπινων ερλιχιώσεων γίνεται κυρίως ορολογικά με έμμεσο ανοσοφθορισμό (IFAT). Ο έλεγχος γίνεται σε 2 δείγματα εκ των οποίων το πρώτο συλλέγεται στην οξεία φάση και συνήθως είναι αρνητικό και το δεύτερο ακολουθεί μετά από 2-4 εβδομάδες. Ο τετραπλασιασμός του τίτλου είναι διαγνωστικός (62). Σύμφωνα με το ECDC, λόγω του ότι τα IgM αντισώματα είναι λιγότερο ειδικά σε σχέση με τα IgG, μπορούν να προκύψουν ψευδώς θετικά

αποτελέσματα. Κατά συνέπεια η εργαστηριακή διάγνωση δεν θα πρέπει να στηρίζεται αποκλειστικά σε αυτά (142). Στο 20% των περιπτώσεων παρατηρούνται διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ *A. phagocytophylum* και *E. chaffeensis* σε ασθενείς με κοκκιοκυταρική αναπλάσμωση και μονοκυτταρική ερλιχίωση αντίστοιχα. Συνεπώς σε περιοχές που ανευρίσκονται και τα δύο αυτά παθογόνα θα πρέπει να γίνεται προσδιορισμός τίτλων αντισωμάτων και για τα δύο (62). Όσον αφορά την κοκκιοκυταρική αναπλάσμωση, κατά την οξεία φάση της μπορεί επίσης να γίνει έλεγχος με PCR. Οι δείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι τα γονίδια *rrs*, *ank-1*, *msh2*, *ftsZ* (62). Την πρώτη εβδομάδα της νόσου, σε εξέταση επιχρίσματος αίματος μπορεί να γίνει ανίχνευση των χαρακτηριστικών μοριδίων (*morulae*) του αναπλάσματος στα λευκοκύτταρα (142).

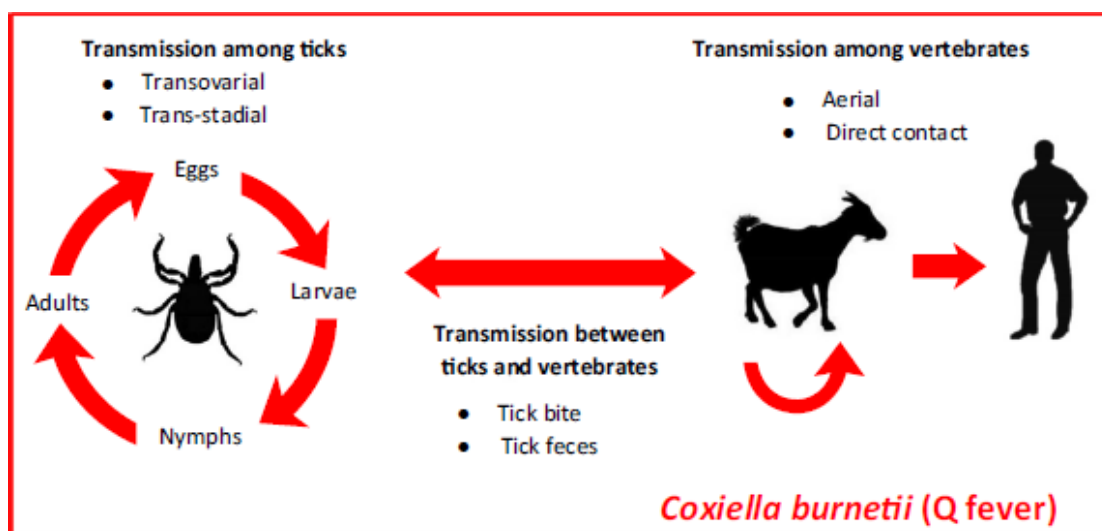
Δεδομένου ότι η εργαστηριακή διάγνωση δεν είναι πάντα εφικτή, οι ασθενείς θα πρέπει να λαμβάνουν θεραπεία βάσει της κλινικής υποψίας. Ως θεραπεία εκλογής προτείνεται η δοξυκυκλίνη. Εάν δεν εμφανιστεί άμεση βελτίωση της κλινικής εικόνας, θα πρέπει να αξιολογηθεί η περίπτωση άλλης λοίμωξης ή συλλοίμωξης. Για την μονοκυτταρική ερλιχίωση αναφέρονται ως εναλλακτικές θεραπείες και οι τετρακυκλίνες (62).

3.3. Coxiella

Το βακτήριο *Coxiella burnetii* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας του πυρετού Q (*query fever*), μίας νόσου με παγκόσμια κατανομή που προσβάλλει τον άνθρωπο αλλά και αρκετά είδη ζώων. Η ονομασία της νόσου προέρχεται από το αρχικό γράμμα Q της λέξης *query*, που δόθηκε στη συρροή κρουσμάτων εμπύρετου συνδρόμου που παρατηρήθηκε σε σφαγεία στην Αυστραλία, το 1935. Η ασθένεια έχει καταγραφεί σε όλες τις χώρες εκτός από τη Νέα Ζηλανδία. Προσβάλλει κυρίως άνδρες μέσης ηλικίας κατοίκους αγροτικών περιοχών που έρχονται σε επαφή με ζώα. Αποτελεί επαγγελματική νόσο εργαζομένων που έρχονται σε επαφή ή/και χειρίζονται μολυσμένα ζώα όπως κτηνοτρόφων, εκδοροσφαγέων, εργατών εριουργίας, κτηνιάτρων και εργαστηριακού προσωπικού. Οι δεξαμενές του συγκεκριμένου παθογόνου είναι τρωκτικά, μικρά θηλαστικά και σε μικρότερο βαθμό πτηνά, ερπετά, αιγοπρόβατα, βοοειδή και κρότνες. Οι κρότνες παίζουν και το ρόλο διαβιβαστή μεταξύ αγρίων ζώων και μεταξύ αγρίων ζώων και οικόσιτων όπως αιγοπρόβατα και βοοειδή (149). Το ποσοστό κροτώνων θετικών για το βακτήριο είναι γενικά χαμηλό (<5%). Ωστόσο, παρόμοια ποσοστά θετικότητας κροτώνων παρατηρούνται και για

βακτήρια που θεωρούνται ως αποκλειστικώς κροτωνογενώς μεταδιδόμενα, π.χ. εκείνα του γένους *Anaplasma*. Το ενδεχομένο οι κρότωνες να λειτουργούν ως αποτελεσματικοί διαβιβαστές της *Coxiella burnetii* χρήζει περαιτέρω διερεύνησης (150). Σε ανασκόπηση του 2017, αναφέρεται ότι οι ελευθέρως διαβιούσες αμοιβάδες (free-living amoeba) ενδέχεται να συμβάλλουν στη διατήρηση του βακτηρίου αυτού στη φύση, κατά τρόπο ανάλογο με τη δυνατότητα επιβίωσης της *Legionella pneumophila* μέσα σε κύστεις αμοιβάδων σε υδάτινα περιβάλλοντα και στο έδαφος (151).

Η νόσος μεταδίδεται στον άνθρωπο κυρίως με εισπνοή αερολυμάτων που περιέχουν το παθογόνο και προέρχονται από εκκρίσεις που συνοδεύουν τον τοκετό/αποβολή, ούρα και κόπρανα των μολυσμένων ζώων (Εικόνα 20). Ως τρόποι μετάδοσης αναφέρονται επίσης η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων, η μετάγγιση αίματος και η σεξουαλική επαφή (151).



Εικόνα 20 Οδοί μετάδοσης της *Coxiella burnetii* (150)

Το βακτήριο *Coxiella burnetii* είναι ένα ενδοκυττάριο βακτήριο που ανήκει στα γ-*Proteobacteria* (τάξη: *Legionellales*, οικογένεια: *Coxiellaceae*) με συγγενικά τα γένη *Legionella* και *Francisella*. Έχει κυτταρικό τοίχωμα παρόμοιο με αυτό των Gram-βακτηρίων το οποίο δεν χρωματίζεται με την χρώση Gram. Αντ'αυτής χρησιμοποιείται η μέθοδος Gimenez. Εμφανίζει μεγάλη ανθεκτικότητα σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες και παρ' όλων ότι καταστρέφεται από φορμαλδεΰδη 2%, έχει απομονωθεί από ιστούς συντηρημένους σε φορμαλδεΰδη για 4-5 μήνες (151). Η μεγάλη του μολυσματικότητα, η δυνατότητα μεταφοράς με αερόλυμα και η περιβαλλοντική του σταθερότητα οδήγησαν στον χαρακτηρισμό του ως παράγοντα βιολογικού κινδύνου κατηγορίας B (152).

Με ηλεκτρονική μικροσκόπηση διακρίνονται τρεις μορφές: η μεγαλοκυτταρική παραλλαγή (large cell variant (LCV)), η μικροκυτταρική παραλλαγή (small cell variant (SCV)) και η πυκνή μικροκυτταρική παραλλαγή (small dense cell variant (SDC)). Η είσοδος του βακτηρίου στα μακροφάγα γίνεται με φαγοκυττάρωση κατόπιν αλληλεπίδρασης με την α5/β3 ιντεγκρίνη. Από τη σύντηξη του φαγοσώματος με το λυσόσωμα προκύπτει το φαγολυσόσωμα, στο όξινο περιβάλλον του οποίου λαμβάνει χώρα η κυτταρική διαίρεση του SCV και η διαφοροποίησή του σε LCV. Από την LCV μορφή δημιουργείται μια «σπορογονική» διαφοροποίηση στο ένα από τα δύο άκρα που οδηγεί στη δημιουργία της παραλλαγής SDC και την απελευθέρωσή της στο περιβάλλον όπου και μπορεί να διατηρηθεί επί μακρόν (149). Η αντοχή του στο ωσμωτικό και οξειδωτικό στρες αποδίδεται στο ότι κωδικοποιεί τέσσερις μεταφορείς ανταλλαγής νατρίου-πρωτονίων (sodium-proton exchangers) (153).

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του βακτηρίου είναι η «αντιγονική διαφοροποίηση φάσης» κατά την οποία η μολυσματική φάση I απομονώνεται από φυσικές μολύνσεις ενώ η μη μολυσματική φάση II απομονώνεται από διαδοχικές κυτταροκαλλιέργειες σε αυγά όρνιθας ή κύτταρα (154). Αυτό το φαινόμενο σχετίζεται με την δυνατότητα του βακτηρίου να συνθέτει μία ατελή μορφή του πολυσακχαρίτη ανάλογη με την μετατροπή από την λεία (smooth) σε τραχιά μορφή (rough) των εντερικών βακτηρίων (154) και του προσδίδει αυτή την αντιγονική διαφοροποίηση.

Ο πυρετός Q εκδηλώνεται ως **οξεία λοίμωξη** και ως **χρόνια λοίμωξη**. Η πλειοψηφία των λοιμώξεων είναι ασυμπτωματικές. Οι συμπτωματικές λοιμώξεις είναι γενικά ήπιες και εκδηλώνονται ως γριππώδης συνδρομή που εισβάλλει αιφνιδίως με υψηλό πυρετό διάρκειας πάνω από 10 ημέρες σε συνδυασμό με μυαλγίες και κεφαλαλγία. Η λοίμωξη ενδέχεται να εκδηλωθεί ως ήπια πνευμονία σε μεσήλικες άνδρες με πυρετό, βήχα και δύσπνοια αλλά και εξωπνευμονικές εκδηλώσεις όπως αρθραλγίες, δερματικό εξάνθημα, διάρροια και σπανίως νευρολογικά συμπτώματα (σύγχυση, σύνδρομο Guillain-Barre). Ο πυρετός Q μπορεί επίσης να εκδηλωθεί ως ηπατίτιδα είτε ασυμπτωματική είτε με πυρετό, ρίγος, κεφαλαλγία και αυξημένα ηπατικά ένζυμα, ή ως εμπύρετο χωρίς άλλα ευρήματα. Ιστολογικά, στα προσβεβλημένα όργανα, κυρίως ήπαρ και μυελό των οστών, παρατηρούνται κοκκιώματα τύπου «ντόνατ» (dough-nut granuloma) τα οποία περιλαμβάνουν ένα κεντρικό λιπιδικό κενοτόπιο (lipidic vacuole) περιβαλλόμενο από ινώδη δακτύλιο (fibrinoid ring), τα οποία ωστόσο δεν είναι παθογνωμονικά της λοίμωξης. Σε μικρό αριθμό ασθενών έχει περιγραφεί ενδοκαρδίτιδα στην οξεία φάση της νόσου, σε έδαφος ανοσοκαταστολής ή παρουσίας αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων (149). Οι εκβλαστήσεις είναι μικρές ενώ ιστολογικά παρατηρείται ίνωση, αγγείωση και δυστροφική ασβεστοποίηση (62).

Στην οξεία λοίμωξη ενδέχεται να προσβληθούν οι λεμφαδένες, το περικάρδιο και το μυοκάρδιο και σπανιότερα το νευρικό σύστημα, το δέρμα και ο μυελός των οστών με παρουσία κοκκιωμάτων τύπου «ντόνατ» (151).

Χρόνια λοίμωξη, με συμπτώματα διάρκειας μεγαλύτερης των 6 μηνών μπορεί να αναπτυχθεί μήνες ή έτη μετά την αρχική έκθεση, σε ποσοστό <5% των ασθενών με οξεία νόσο. Η συχνότερη κλινική εκδήλωση είναι υποξεία ενδοκαρδίτιδα, δύσκολο να διαγνωσθεί λόγω του ότι τα συμπτώματα και τα σημεία (πυρετός, απώλεια βάρους, ηπατοσπληνομεγαλία) είναι μη ειδικά. Οι σημαντικότεροι προδιαθεσικοί παράγοντες είναι ανοσοκαταστολή και προϋπάρχουσες βαλβιδοπάθειες ή παρουσία προσθετικής βαλβίδας. (149). Σε έδαφος προϋπάρχουσας αγγειακής βλάβης (ανεύρυσμα ή αγγειακή πρόθεση), μπορεί να αναπτυχθεί ενδαρτηρίτιδα, συνηθέστερα στη θωρακική αορτή (155). Έχουν παρατηρηθεί επίσης λοιμώξεις οστών και προσθετικών ή μη αρθρώσεων καθώς και επίμονη λεμφαδενίτιδα. Σε εγκύους, ειδικά στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, έχουν παρατηρηθεί δυσμενείς εκβάσεις, όπως πρόωρος τοκετός, αποβολή και θνησιγένεια. Ένα επιπλέον σύνδρομο που έχει παρατηρηθεί είναι χρόνια κόπωση μετά από πρωτοπαθή πυρετό Q χωρίς τεκμηρίωση χρόνιας λοίμωξης (149).

Η διάγνωση βασίζεται σε κυτταροκαλλιέργεια, αντιδράσεις PCR συμβατικές και πραγματικού χρόνου, ανοσοϊστοχημικές και ορολογικές μεθόδους (149) ανάλογα με το σημείο εντοπισμού της λοίμωξης. Οι ορολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στηρίζονται στα αντιγόνα φάσης I και φάσης II. Στην οξεία λοίμωξη τα αντισώματα της φάσης II εμφανίζονται νωρίτερα και τα αντισώματα της φάσης I ανιχνεύονται 7-15 ημέρες από την έναρξη της νόσου και μειώνονται μετά από περίοδο 3-6 μηνών. Σε αυτή την περίπτωση τα αντισώματα της φάσης II εμφανίζονται αυξημένα σε σχέση με αυτά της φάσης I. Στην χρόνια λοίμωξη συμβαίνει το αντίστροφο. Τα αντισώματα της φάσης I εμφανίζουν υψηλότερο τίτλο και είναι οι τιμές τους είναι ίσες ή υψηλότερες από εκείνες της φάσης II (62).

Η *Coxiella burnetii* είναι ευαίσθητη σε τετρακυκλίνες, ριφαμπικίνη, κοτριμοξαζόλη και κινολόνες. Η ευαισθησία της στις μακρολίδες ποικίλλει ενώ είναι ανθεκτική στις β-λακτάμες και τις αμινογλυκοσίδες. Τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά χορηγείται δοξυκυκλίνη, ενώ στις εγκύους χορηγείται συνήθως κοτριμοξαζόλη. Επί αλλεργίας στη δοξυκυκλίνη χορηγείται λεβοφλοξασίνη στους ενήλικες και κοτριμοξαζόλη στα παιδιά (149). Εναλλακτικά χορηγείται σιπροφλοξασίνη ή συνδυασμός σιπροφλοξασίνης και ριφαμπικίνης σε ασθενείς που δεν μπορεί να χορηγηθεί τετρακυκλίνη (62).

3.4. Bartonella

3.4.1. Διαβιβαστές-Υποδόχα μπαρτονελλών

Με βάση με την ισχύουσα ονοματολογία των προκαρυωτικών οργανισμών <https://www.bacterio.net/genus/bartonella> (52), το γένος *Bartonella* περιλαμβάνει 38 είδη από τα οποία τα 14 έχουν συσχετισθεί με νόσο στον άνθρωπο (33,156) (Πίνακας 3). Τα βακτήρια του γένους αυτού είναι αερόβια, πλειομορφικά Gram-βακτηρίδια, ανήκουν στα α2-πρωτεοβακτήρια (τάξη Rhizobiales, οικογένεια: *Bartonellaceae*) και σχετίζονται με τα γένη *Brucella*, *Agrobacterium*, και *Rhizobium* (157). Είναι βακτήρια που μπορούν να προκαλέσουν νεοαγγειογένεση και παρατεταμένη βακτηριαιμία (158).

Σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές έχουν ανιχνευθεί πολλά είδη *Bartonella* σε άγρια και κατοικίδια ζώα, σε διαφορετικά υποδόχα και σε αρθρόποδους διαβιβαστές όπως σε φλεβοτόμους, στην ψείρα σώματος του ανθρώπου, στον ψύλλο της γάτας και σε κρότωνες (159–161). Είδη *Bartonella* έχουν συνδεθεί με επιδημικές καταστάσεις στην πρόσφατη ιστορία. Η *Bartonella bacilliformis* προκάλεσε το θάνατο τουλάχιστον 4000 ανθρώπων στις Άνδεις κατά την κατασκευή του σιδηροδρομικού δικτύου στην Ορόγια του Περού (162,163). Ενώ στη *Bartonella quintana* οφείλονται 1.000.000 κρούσματα πυρετού των χαρακωμάτων και χιλιάδες νεκροί κατά τον 1^ο Παγκόσμιο Πόλεμο (164).

Για την *B. bacilliformis* αποκλειστικό υποδόχο θεωρείται ο άνθρωπος και ως διαβιβαστής, ο φλεβοτόμος *Lytzomyia verrucarum*. Για την *B. quintana* υποδόχα θεωρούνται ο άνθρωπος και το μογγολικό χάμστερ και ως διαβιβαστές, η ψείρα του σώματος του ανθρώπου *Pediculus humanus humanus*, ψύλλοι, κοριοί και ακάρεα του περιστεριού (34). Ωστόσο, έχει ανιχνευθεί και σε σκύλους με ενδοκαρδίτιδα καθώς και σε υγιείς σκύλους, σε γάτες και σε πιθήκους *Macaca fascicularis* και *Macaca mulatta* (34). Η *B. henselae* μεταδίδεται από το δάγμα / νύχια της γάτας ενώ ο ψύλλος της γάτας θεωρείται ο κύριος διαβιβαστής μεταξύ των ζώων (Chomel 1996).

Σε οροεπιδημιολογικές μελέτες από διάφορες χώρες της Ευρώπης και της Αμερικής έδειξαν διαπιστώθηκαν ποικίλα ποσοστά οροθετικότητας στη *Bartonella* στον άνθρωπο. Η οροθετικότητα για *B. bacilliformis* ήταν ιδιαίτερα υψηλή στις ενδημικές περιοχές της Ν. Αμερικής. Η οροθετικότητα ως προς την *B. henselae* είχε στενή συσχέτιση με την κατοχή γάτας ή/και τη φροντίδα της. Η οροθετικότητα ως προς την *B. quintana* σχετίζονταν με τους άστεγους, αλκοολικούς και επί έκθεσης σε ζώα. Η *B. henselae* και η *B. vinsonii berkhofii* βρέθηκε σε ανοσοεπαρκή άτομα που είχαν συχνή σχέση με ζώα και επαφή με αρθρόποδο (165). Οι γάτες θεωρούνται σημαντική

δεξαμενή των ειδών *B. henselae*, *B. clarridgeiae* και *B. koehlerae* ως προς τις ανθρώπινες λοιμώξεις. Οι σκύλοι θεωρούνται τυχαίοι ξενιστές αλλά λόγω της λοίμωξης που πολλές φορές αναπτύσσουν, ενδεχομένως να μπορούν να διαδραματίσουν τον ρόλο του δείκτη (sentinel) για τις ανθρώπινες λοιμώξεις (165). Τα κυνοειδή θεωρούνται κύρια υποδόχα για την *B. vinsonii berkhofii* η οποία μπορεί να προκαλέσει ενδοκαρδίτιδα σε ανθρώπους και σκύλους (34).

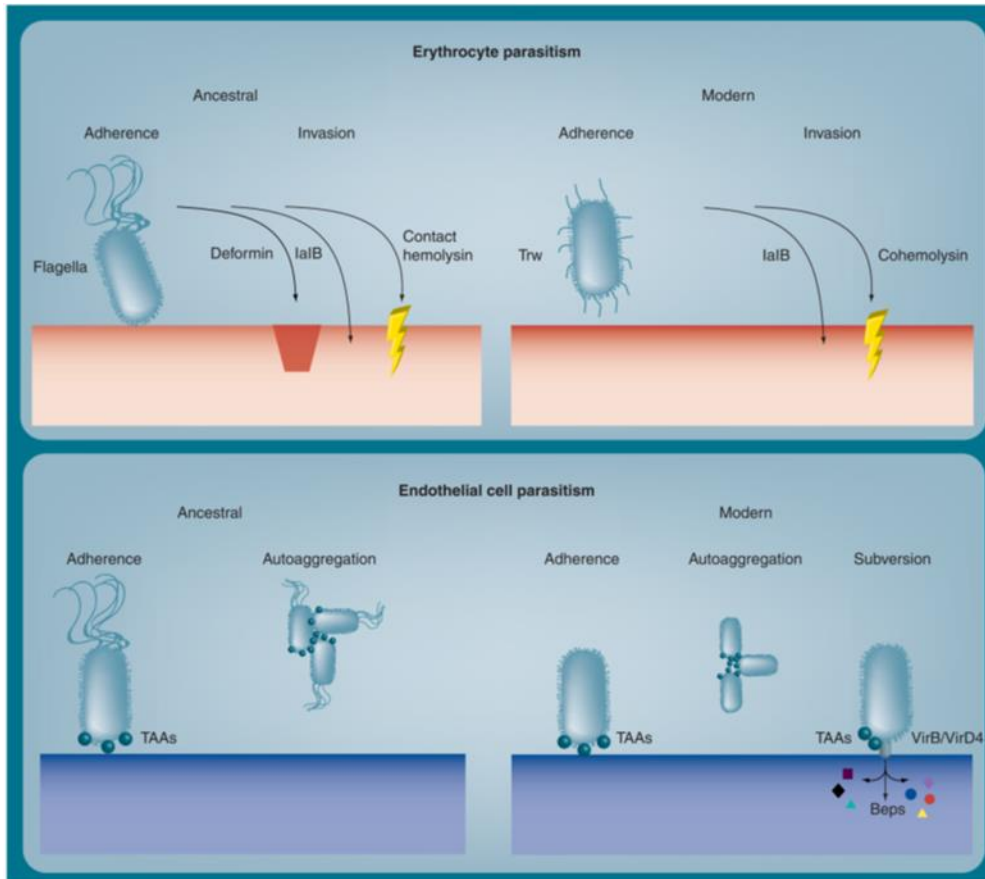
Πίνακας 3 Λοιμώξεις από *Bartonella* spp.: αιτιολογικοί παράγοντες, γεωγραφική κατανομή και διαβιβαστές (προσαρμογή από (165,156))

| Αιτιολογικός Παράγοντας | Ασθένεια | Γεωγραφική Κατανομή | Διαβιβαστής |
|--------------------------|--|--------------------------------|--|
| <i>B. bacilliformis</i> | Πυρετός Oroya, verruga peruana (περουβιανά κονδυλώματα) | Νοτιοδυτική Αμερική | Σκνίπα <i>Lytzomyia verrucarum</i> |
| <i>B. henselae</i> | Νόσος εξ'ονύχων γαλής, λεμφαδενίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, βακτηριακή αγγειομάτωση και πελίωση, ενδοκαρδίτιδα, οστεομυελίτιδα, αμφιβληστροειδίτιδα | Παγκόσμια | Ψύλλος <i>Ctenocephalides felis</i> |
| <i>B. clarridgeiae</i> | Νόσος εξ'ονύχων γαλής | Παγκόσμια | Ψύλλος <i>Ctenocephalides felis</i> |
| <i>B. quintana</i> | Πυρετός των χαρακωμάτων, ενδοκαρδίτιδα, βακτηραιμία, βακτηριακή αγγειομάτωση | Παγκόσμια | Ψείρα <i>Pediculus humanus corporis</i> |
| <i>B. cholerae</i> | Ενδοκαρδίτιδα, λεμφαδενίτιδα | Ηνωμένες Πολιτείες, Καλιφόρνια | Ψύλλοι γάτας, τρωκτικών |
| <i>B. rochalimae</i> | Βακτηραιμία, πυρετός, σπληνομεγαλία | Ηνωμένες Πολιτείες | Άγνωστος |
| <i>B. vinsonii</i> | Βακτηραιμία, ενδοκαρδίτιδα | Ηνωμένες Πολιτείες | Άγνωστος |
| <i>B. washoensis</i> | Μυοκαρδίτιδα, μηνιγγίτιδα | Ηνωμένες Πολιτείες | Άγνωστος |
| <i>B. melophagi</i> | Βακτηραιμία | Ηνωμένες Πολιτείες | Μύγα προβάτου <i>Melophagus ovinus</i> |
| <i>B. grahami</i> | Αμφιβληστροειδίτιδα | Ηνωμένο Βασίλειο | Ψύλλοι ποντικών |
| <i>B. alsatica</i> | Ενδοκαρδίτιδα, λεμφαδενοπάθεια | Γαλλία, Αλσατία | Άγνωστος |
| <i>B. tamiiae</i> | Εμπύρετο | Ταϊλάνδη, Khon Kaen | Άγνωστος |
| <i>B. ancashii</i> | Verruga peruana (περουβιανά κονδυλώματα) | Περού | Άγνωστος |
| <i>B. mayotimonensis</i> | Ενδοκαρδίτιδα | Γαλλία | Άγνωστος |

3.4.2. Παθογένεια

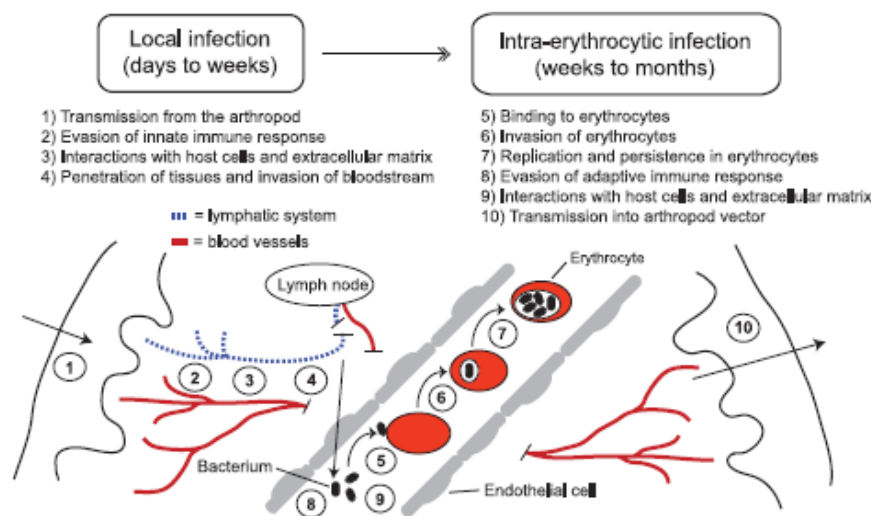
Το βασικό χαρακτηριστικό της λοίμωξης από *Bartonella* spp. είναι η χρόνια ερυθροκυτταρική βακτηριαιμία που αποτελεί προσαρμογή στην μετάδοση μέσω διαβιβαστών και η οποία δεν παρατηρείται στους περιστασιακούς ξενιστές. Τόσο όμως στους περιστασιακούς ξενιστές όσο και στα υποδόχα, και τα ενδοθηλιακά κύτταρα φαίνεται ότι αποτελούν στόχο του παθογόνου. Οι λοιμώξεις των υποδόχων είναι συνήθως ασυμπτωματικές ή δεν καταλήγουν σε σοβαρά συμπτώματα, δείχνοντας την παράκαμψη του ανοσοποιητικού τους συστήματος και την προσαρμοστικότητα του παθογόνου στο περιβάλλον του ξενιστή (166).

Η προσβολή των ερυθροκυττάρων από τα βακτήρια *Bartonella* spp., που τους προσδίδει και τον χαρακτηρισμό αιμοτροπικά βακτήρια, διευκολύνεται από την παρουσία μαστίγιου για κάποια είδη και των επιφανειακών πρωτεϊνών τύπου IV για κάποια άλλα (167). Η είσοδος στα ερυθροκύτταρα φαίνεται να διαφέρει σημαντικά σε σχέση με την είσοδο στα εμπύρνα κύτταρα, καθώς τα ώριμα ερυθροκύτταρα δεν διαθέτουν κυτταροσκελετό. Η είσοδος που έχει μελετηθεί στην περίπτωση της *B. bacilliformis* γίνεται διαμέσου ενός υδροφοβικού μορίου της ντεφορμίνης (deformin) η οποία προκαλεί την δημιουργία εγκολπώσεων και εσοχών στην κυτταρική μεμβράνη, που αποτελούν και τα σημεία εισόδου του βακτηρίου (Εικόνα 21). Παρόμοια δράση έχει περιγραφεί και για την *B. henselae* (166,167). Στην περίπτωση επίσης της *B. bacilliformis* ένας ακόμη μολυσματικός παράγοντας θεωρείται ο γενετικός τόπος *ial* που αποτελείται από τους *ialA* και *ialB* που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες 21-kDa και 18-kDa αντίστοιχα. Στη διαδικασία αυτή ενδέχεται να συμμετέχει και το μαστίγιο που διαθέτει το συγκεκριμένο βακτήριο (168). Όλα τα άλλα βακτήρια διαθέτουν για την είσοδό τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα τους δύο τύπους του εκκριτικού συστήματος τύπου IV, Tpw και VirB/VirD4. Οι πρωτεΐνες αυτού του συστήματος προκαλούν αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού ώστε τα βακτήρια να μπορέσουν να ενσωματωθούν στο ενδοσωμικό κενότοπιο (169). Οι λοιμογόνοι παράγοντες περιλαμβάνουν επίσης τις προσκολλησίνες, μία πρωτεΐνη που διευκολύνει την αγγειογένεση και δύο συστήματα πρόσληψης αίμης: HutA και HbpB-HbpE όπως αναφέρονται σε ανασκόπηση του 2012 (166).



Εικόνα 21 Παράγοντες που διευκολύνουν την είσοδο διαφόρων ειδών *Bartonella* στα ερυθροκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα (167)

Τα κύρια στάδια της παθογένειας περιγράφονται επίσης στη συγκεκριμένη ανασκόπηση των Pulliainen & Dehio (Εικόνα 22) και περιλαμβάνουν 10 στάδια, από την προσβολή του ξενιστή μέσω του διαδερμικού ενοφθαλμισμού των περιττωμάτων του αρθροπόδο διαβιβαστή έως και την πρόσληψη του βακτηρίου από τον αρθρόποδο διαβιβαστή μέσω της αιματοφαγίας.



Εικόνα 22 Σχηματική περιγραφή των κυρίων σταδίων της παθογένεσης στον σπονδυλωτό ξενιστή με τον ενοφθαλμισμό των περιττωμάτων του αρθροπόδου διαβιβαστή μέσω εκδορών του δέρματος (166)

3.4.3. Κλινικές μορφές μπαρτονελλώσεων

Μπαρτονελλώσεις είναι οι λοιμώξεις του ανθρώπου από μέλη του γένους *Bartonella*. Τα είδη που δημιουργούν την πλειονότητα των μπαρτονελλώσεων στον άνθρωπο είναι τα είδη: *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana* και *Bartonella bacilliformis* που προκαλούν αντίστοιχα τη νόσο εξ' ονύχων γαλής, τον πυρετό των χαρακωμάτων και τον πυρετό Ορόγια ή νόσο του Carrion (170).

Νόσος εξ' ονύχων γαλής

Η νόσος εξ' ονύχων γαλής αποτελεί τη συχνότερη κλινική εκδήλωση της λοίμωξης από την *Bartonella henselae* κυρίως σε νέους (171). Η εκδήλωση των συμπτωμάτων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος. Στους ανοεπαρκείς η πλειοψηφία των κρουσμάτων αφορά άτομα κάτω των 21 ετών που εμφανίζουν δερματική βλατίδα ή φλύκταινα στο σημείο ενοφθαλμισμού και αυτοπεριοριζόμενη λεμφαδενοπάθεια. Επιπλοκές είναι σπάνιες και μπορεί να περιλαμβάνουν προσβολή του ήπατος, σπληνός, οστών, πνευμόνων, κεντρικού νευρικού συστήματος, αμφιβληστροειδή, επιπεφυκότα ή δέρματος. Τα είδη *B. clarridgeiae* και *B. grahamii* έχουν σχετισθεί επίσης με τη νόσο αυτή (62). Στις άτυπες μορφές της νόσου περιλαμβάνεται το οφθαλμοαδενικό σύνδρομο Parinaud που

σχετίζεται με μόλυνση του οφθαλμού, χαρακτηριστική διόγκωση των προωτιαίων λεμφαδένων και συνοδή κοκκιωματώδη βλάβη στον ομόπλευρο επιπεφυκότα (165). Η *B. henselae* σχετίζεται επίσης με ενδοκαρδίτιδα μαζί με την *B. quintana* στην οποία προσβάλλεται συνήθως η αορτική βαλβίδα. Οι κλινικές εκδηλώσεις είναι παρόμοιες με εκείνες της οξείας βακτηριακής ενδοκαρδίτιδας, με συμπτώματα πυρετό, κακουχία, απώλεια βάρους, φύσημα και σπληνομεγαλία.

Στους ανοσοκατεσταλμένους, η νόσος εμφανίζεται με πυρετό και βακτηριαιμία με δερματικές ή σπλαχνικές αγγειοϋπερπλαστικές βλάβες που αντιστοιχούν στην βακτηριακή αγγειομάτωση και στην ηπατοσπληνική πελίωση, αντίστοιχα. Συχνά σε αυτές τις περιπτώσεις, οι κλινικές εκδηλώσεις δεν διαφέρουν ιδιαίτερα μεταξύ των τριών ειδών *B. henselae*, *B. quintana* και *B. bacilliformis*. Σε κάποιες περιπτώσεις που παρατηρείται διασπορά στους ιστούς μπορεί να υπάρξει σοβαρή επιδείνωση. Οι περισσότεροι ασθενείς με διάχυτη βακτηριακή αγγειομάτωση παρουσιάζουν βακτηριαιμία (172).

Πυρετός των χαρακωμάτων

Ο πυρετός των χαρακωμάτων οφείλεται στην *Bartonella quintana* που μεταδίδεται από άνθρωπο σε άνθρωπο με την ψείρα του σώματος του ανθρώπου. Το όνομά της προέρχεται από τα χαρακώματα του 1ου Παγκοσμίου Πολέμου στα οποία μολύνθηκαν χιλιάδες ανθρώπων και κατά τον οποίο περιγράφηκαν αναλυτικά τα συμπτώματα της νόσου (173). Μετά από περίπου μία εβδομάδα από τον ενοφθαλμισμό των περιττωμάτων της ψείρας εμφανίζονται κλινικές εκδηλώσεις όπως πυρετός, κεφαλαλγία, μυαλγία και παροδικό εξάνθημα. Υποτροπές του πυρετού εμφανίζονται ανά 4-5 μέρες από τις οποίες προέρχεται και το όνομα quintana (62). Λόγω της βακτηριαιμίας που μπορεί να διατηρηθεί για εβδομάδες, ο άνθρωπος αποτελεί την πηγή μόλυνσης για τις ψείρες. Η νόσος που έχει επανεμφανιστεί τα τελευταία χρόνια αποκαλείται στις ημέρες μας και αστικός πυρετός των χαρακωμάτων “urban trench fever” και προσβάλλει αστέγους και ανθρώπους που διαβιούν σε δυσμενείς κοινωνικοοικονομικές συνθήκες (172).

Πυρετός Ορόγια ή Νόσος του Carrion

Οφείλεται στην *Bartonella bacilliformis* η οποία μεταδίδεται με το φλεβοτόμο *Lytzomyia verrucarum* και εμφανίζεται με δύο μορφές: την οξεία φάση που ονομάζεται πυρετός Ορόγια και τη χρόνια με τις χαρακτηριστικές δερματικές βλάβες που ονομάζονται περουβιανά κονδυλώματα (*verruca peruana* / *peruvian warts*)

(174). Οι ασυμπτωματικοί φορείς αποτελούν τα υποδόχα της νόσου. Μετά από περίοδο επώασης 3 εβδομάδων εμφανίζονται πονοκέφαλος, κακουχία, πυρετός ή/και ρίγη, υψηλός πυρετός, πονοκέφαλος και ψυχολογικές μεταβολές. Σε αυτή τη φάση τα βακτήρια εισέρχονται στα ερυθροκύτταρα με αποτέλεσμα καταστροφή τους και αναιμία. Παρατηρείται μηνιγγοεγκεφαλίτιδα στο 20% των περιπτώσεων. Μετά τον πυρετό ή/και χωρίς πρότερα συμπτώματα, σε διάστημα 1 έως 2 μηνών εμφανίζονται ερυθροϊώδη οζίδια τα οποία μπορούν να παραμείνουν μήνες έως χρόνια. Η θνητότητα φθάνει το 90% κατά την οξεία φάση της νόσου. Ενδέχεται να παρατηρηθούν αυτοάνοσες εκδηλώσεις όπως νεανική αρθρίτιδα, μυοσίτιδα, λευκοπλαστική αγγειίτιδα, ραγοειδίτιδα και αιμολυτική αναιμία (62).

3.4.4. Διάγνωση και θεραπεία των μπαρτονελλώσεων

Οι μπαρτονέλλες είναι μικροοργανισμοί με αυξημένες διατροφικές απαιτήσεις, καλλιεργούνται σε αιματούχο άγαρ και επωάζονται σε συγκέντρωση 5% CO₂ στον αέρα. Η απομόνωση απαιτεί 5 ημέρες έως και 5 εβδομάδες ανάλογα με το αρχικό μικροβιακό φορτίο του υπό εξέταση υλικού. Εάν το κλινικό δείγμα είναι αίμα, λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και επακόλουθη φυγοκέντρηση πριν την καλλιέργεια, αυξάνει τις πιθανότητες για την απομόνωση των βακτηρίων (62).

Η διάγνωση βασίζεται σε ορολογικές μεθόδους παρά το ότι στην οξεία φάση ο τίτλος αντισωμάτων είναι χαμηλός. Η λήψη δειγμάτων ορού κατά την οξεία φάση και τη φάση ανάρρωσης είναι απαραίτητη για την επιβεβαίωση της διάγνωσης (172). Εφαρμόζονται συνήθως έμμεσος ανοσοφθορισμός και ανοσοενζυμικές μέθοδοι. Σε αυτές είναι συνήθεις οι διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ των διαφόρων ειδών *Bartonella*. Έχουν επίσης αναφερθεί διασταυρούμενες αντιδράσεις με *Coxiella* και *Chlamydia* (175,176). Χρήσιμη είναι επίσης η ανοσοαποτύπωση κατά Western που χρησιμοποιείται σε εξειδικευμένα εργαστήρια. Σε μελέτη σειράς κρουσμάτων ενδοκαρδίτιδας στη Γαλλία η ευαισθησία του ανοσοφθορισμού έφτασε το 91% και της ανοσοαποτύπωσης κατά Western το 100% (177).

Οι μοριακές δοκιμασίες περιλαμβάνουν συμβατική και PCR πραγματικού χρόνου. Η ευαισθησία τους εξαρτάται από τον αριθμό των βακτηρίων που βρίσκονται στο δείγμα που μπορεί να είναι αίμα, ιστός από βαλβίδα ή λεμφαδένες. Η ειδικότητά τους εξαρτάται από τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται, είτε πρόκειται για γένος είτε για είδος, με τις μοριακές τεχνικές πραγματικού χρόνου να είναι πιο ευαίσθητες από τις συμβατικές. Οι γενετικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως τμήματα γονιδίων 16S rRNA, mtRNA, *ssrA*, *gltA*, *rpoB*, 16S-23S ITS, *groEL* (178). Στην περίπτωση εφαρμογής PCR σε δείγματα αορτής και αίματος, η ευαισθησία της

συμβατικής άγγιξε το 60% στα δείγματα αορτής και δεν έγινε δυνατή ανίχνευση στο αίμα, ενώ με την PCR πραγματικού χρόνου η ευαισθησία άγγιξε το 92% στα δείγματα αορτικής βαλβίδας, 33% στον ορό και 36% στο αίμα των ασθενών (62)

Η θεραπεία εξαρτάται από τις κλινικές εκδηλώσεις. Στην λεμφαδενίτιδα της νόσου εξ'ονύχων γαλής συνήθως δεν χορηγείται αντιβίωση, καθώς δεν επισπεύδει την ανάρρωση, αν και κάποιους συγγραφείς ισχυρίζονται το αντίθετο (62) και συνιστάται η χρήση γενταμικίνης, αζιθρομυκίνης, ριφαμπικίνης ή σιπροφλοξασίνης. Στην άτυπη νόσο εξ'ονύχων γαλής (με σοβαρές συστηματικές εκδηλώσεις στο 5-14% των ασθενών όπως ηπατοσπληνική ασθένεια και νευροαμφιβληστροειδίτιδα) συνιστάται ριφαμπικίνη αποκλειστικά ή συνδυασμό της με γενταμυκίνη. Στη περίπτωση του πυρετού Ορόγια χρησιμοποιείται χλωραμφενικόλη (170). Οι περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας αντιμετωπίζονται με γενταμικίνη για 2 εβδομάδες και στη συνέχεια με δοξυκυκλίνη. Οι αγγειοϋπερπλαστικές βλάβες αντιμετωπίζονται με ερυθρομυκίνη ή δοξυκυκλίνη για τρίμηνο ή δοξυκυκλίνη και ριφαμπικίνη για τρίμηνο (170).

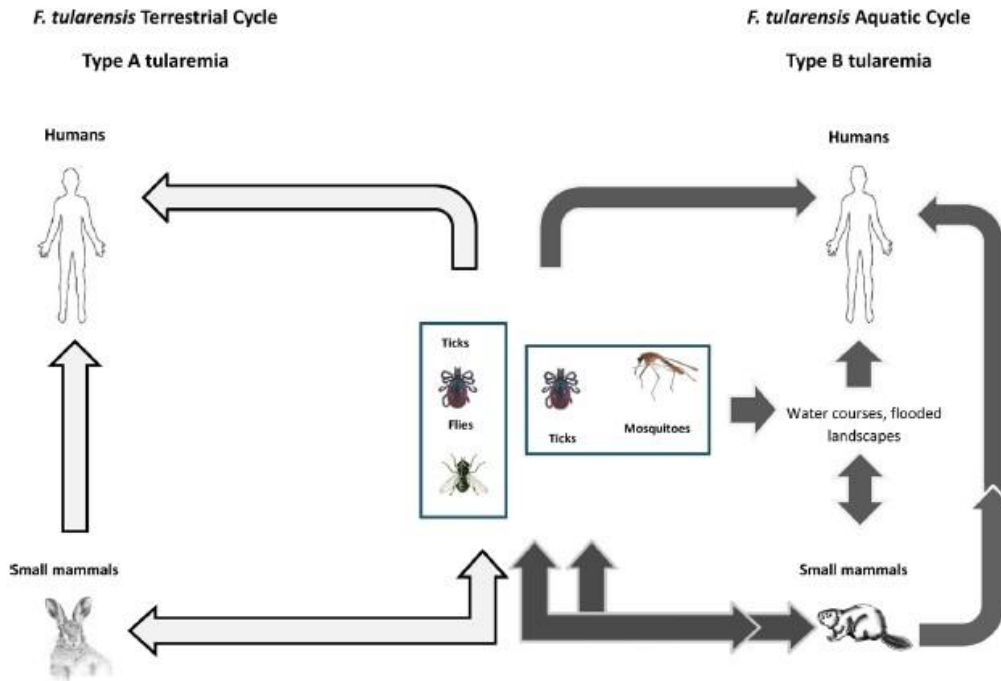
3.5. *Francisella*

Το βακτήριο *Francisella tularensis* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της τουλαραιμίας, και αποτελεί έναν από τους πιο μολυσματικούς μικροοργανισμούς (με ελάχιστη μολυσματική δόση περίπου 10 βακτηρίων). Το CDC την κατατάσσει ως παράγοντα βιοτρομοκρατίας κατηγορίας A (152). Είναι ένα Gram-, αερόβιο, πλειομορφικό και δυνητικά ενδοκυττάριο κοκκοβακτηρίδιο, που δεν αναπτύσσεται σε κοινά θρεπτικά υλικά (9). Ως δυνητικά ενδοκυττάριο μπορεί να προσβάλλει τα μακροφάγα, τα ηπατοκύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα. Ανήκει στα γ-Proteobacteria (τάξη: Thiotrichales, οικογένεια: *Francisellaceae*) και περιλαμβάνει 3 υποείδη: *tularensis*, *holarctica*, *medasiatica*, τα οποία απαντώνται στην Βόρεια Αμερική, στο Βόρειο Ημισφαίριο και στην Κεντρική Ασία αντίστοιχα. Το πρώτο υποείδος αναφέρεται και ως τύπος A είναι το πιο μολυσματικό ενώ το δεύτερο υποείδος αναφέρεται ως τύπος B και προκαλεί ηπιότερες λοιμώξεις. Το είδος *Francisella novicida*, που θεωρούνταν παλαιότερα ως υποείδος, είναι επίσης λιγότερο μολυσματικό και απαντάται στη Β. Αμερική, Αυστραλία και Ταϊλάνδη (179). Ως βασικά υποδόχα του βακτηρίου αυτού θεωρούνται οι λαοί, τα κουνέλια και τα τρωκτικά, αλλά απαντάται επίσης και σε πολλά άλλα είδη σπονδυλωτών: εντομοφάγων, σαρκοφάγων, σπληφόρων, μαρσιποφόρων, πουλιών, αμφίβιων, ψαριών και ασπόνδυλων. Η παρουσία του έχει καταγραφεί επίσης σε αρθρόποδα όπως κρότωνες των γενών *Ixodes*, *Dermacentor*, *Amblyomma* και *Ornithodoros*, μύγες των γενών *Tabanus*, *Chrisops* και *Chrisozona* και κουνούπια των γενών *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*. Από τους κρότωνες το γένος

Dermacentor μπορεί αποδεδειγμένα να δράσει ως βιολογικός διαβιβαστής. Τα κουνούπια συμβάλλουν στην μετάδοση του επίσης ως βιολογικοί διαβιβαστές, αν και θεωρούνταν κυρίως μηχανικοί διαβιβαστές (180,181). Η επιδημιολογία της μετάδοσης μέσω διαβιβαστών διαφοροποιείται ανάλογα με την δεδομένη γεωγραφική τοποθεσία/περιοχή του Βορείου ημισφαιρίου. Στις δυτικές πολιτείες των ΗΠΑ, η μετάδοση γίνεται μέσω κρότωνων και μυγών, ενώ στις ανατολικές πολιτείες μεταδίδεται μόνο με κρότωνα. Στη Σουηδία και στην Φινλανδία, τα κουνούπια θεωρούνται βασικοί διαβιβαστές της νόσου (180).

Η μετάδοση στον άνθρωπο γίνεται επίσης μέσω της άμεσης επαφής του με μολυσμένα ζώα, μέσω της εισπνοής αερολυμάτων και της κατάποσης μολυσμένου νερού ή/και τροφής. Ο τελευταίος τρόπος θεωρείται και ο βασικότερος τρόπος μετάδοσης σε Δυτική και Κεντρική Ευρώπη. Οι σκύλοι και οι γάτες μπορούν επίσης να μεταδώσουν την νόσο στον άνθρωπο μετά από την επαφή τους με μολυσμένους κρότωνα και άλλα μολυσμένα ζώα (182). Η τουλαραιμία έχει αναφερθεί σε όλες τις ηλικιακές ομάδες. Άτομα που λόγω επαγγέλματος έρχονται σε επαφή με τα υποδόχα ή τους διαβιβαστές όπως εργαζόμενοι σε εργαστήρια, κτηνίατροι, γεωργοί, κυνηγοί, εκδοροσφαγείς και άνθρωποι που κατεργάζονται το κρέας των μολυσμένων ζώων έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο λοίμωξης (182).

Ο κύκλος μετάδοσης του βακτηρίου διαφοροποιείται σε χερσαίο (τύπος Α) και υδάτινο (τύπος Β) όπως περιγράφεται στην Εικόνα 23. Στον Τύπο Α παρεμβάλλονται τα λαγόμορφα (κουνέλια, λαγοί) ως υποδόχα και οι κρότωνα και οι μύγες ως διαβιβαστές. Στον Τύπο Β παρεμβάλλονται τα τρωκτικά (κάστορες, αρουραίοι των αγρών και μοσχοποντικοί), το υδάτινο περιβάλλον μέσω των ζώων (κουφαριών και περιπρωμάτων) που το μολύνουν καθώς και οι κρότωνα και τα κουνούπια (183,180,182).



Εικόνα 23 Κύκλοι μετάδοσης του βακτηρίου *Francisella tularensis*: χερσαίος (αριστερά) και υδάτινος (δεξιά) (179)

Οι κλινικές εκδηλώσεις στους ανθρώπους στην έναρξη της νόσου προσομοιάζουν με γριππώδη συνδρομή και περιλαμβάνουν πυρετό, κακουχία, κεφαλαλγία και μυαλγίες. Ανάλογα με την οδό μετάδοσης παρατηρούνται οι ακόλουθες μορφές τουλαραιμίας: **λεμφαδενική**, **ελκωτική-λεμφαδενική**, **οφθαλμολεμφαδενική**, **ρινοφαρυγγική**, **πνευμονική**, **τυφοειδής** και **σηπτική**. Η **λεμφαδενική** που είναι η συχνότερη μορφή, παρουσιάζεται μετά από επαφή με ζώο ή νύγμα αρθροπόδου. Σε περίπτωση επαφής με ζώο, παρατηρείται περιφερική λεμφαδενοπάθεια χωρίς έλκος. Στην περίπτωση νύγματος αρθροπόδου, στο σημείο ενοφθαλμισμού αναπτύσσεται έλκος που μετατρέπεται σε ουλή και ταυτόχρονη φλεγμονή των περιφερικών λεμφαδένων. Η **οφθαλμολεμφαδενική** τουλαραιμία εμφανίζεται με επιπεφυκίτιδα, έλκη ή βλατίδες, φωτοφοβία και επιφορά ή δακρύρροια μετά από μόλυνση των οφθαλμών μέσω των χεριών ή αερολυμάτων. Στην **ρινοφαρυγγική** τουλαραιμία εμφανίζεται ελκώδης και εξιδρωματική στοματίτιδα και φαρυγγίτιδα μετά από κατανάλωση μολυσμένης τροφής/νερού ή εισπνοή αερολύματος. Η **πνευμονική** τουλαραιμία μπορεί να προκύψει ως επιπλοκή των προαναφερόμενων μορφών μέσω αιματογενούς διασποράς είτε λόγω εισπνοής μολυσμένου αερολύματος και συνοδεύεται από πυρετό, ξηρό βήχα, θωρακικό πόνο και δύσπνοια. Η τουλαραιμία τύπου A σχετίζεται με τις βαρύτερες και υπεροξείες/κεραυνοβόλες (fulminant) μορφές πνευμονίας. Η **τυφοειδής** μορφή αναφέρεται σε εμπύρετο, χωρίς προσδιορισμένη οδό μετάδοσης.

Τέλος η **σηπτική** αναφέρεται σε σοβαρή και συχνά θανατηφόρα μορφή, ως επιπλοκή της ελκωτικής-λεμφαδενικής μορφής της τουλαραιμίας τύπου A (179).

Η διάγνωση βασίζεται στην καλλιέργεια δειγμάτων που προέρχονται από ιστούς ή υγρά από την πρωτοπαθή βλάβη, υλικού αναρρόφησης από τους περιφερικούς λεμφαδένες, πτύελα, φαρυγγικά εκπλύματα και γαστρικού υγρού. Εφόσον τίθεται υποψία της νόσου, το προσωπικό πρέπει να ενημερώνεται ώστε να λαμβάνονται τα κατάλληλα μέτρα προστασίας. Λόγω των ιδιαίτερων απαιτήσεων του, η απομόνωσή μπορεί να γίνει σε σοκολατόχρωμο άγαρ, Thayer-Martin άγαρ, BCYE άγαρ (Buffered charcoal yeast extract) και 9% CHAB άγαρ (Cysteine heart agar with blood medium). Η προσθήκη στο CHAB αντιβιοτικού είναι απαραίτητη για την βελτιστοποίηση της ανάπτυξης και αναστολή της χλωρίδας. Η διάγνωση μπορεί επίσης να γίνει με ορολογικές μεθόδους: συγκολλητινοαντιδράσεις σε σωληνάρια (tube agglutination) και επί πλακός (microagglutination) ή ELISA. Ο τετραπλασιασμός του τίτλου Abs έναντι της *F. tularensis* μεταξύ των δειγμάτων οξείας φάσης και ανάρρωσης ή μεμονωμένος τίτλος συγκολλητινών $\geq 1/160$ θεωρείται διαγνωστικός. Η ELISA θεωρείται πιο ευαίσθητη από τις συγκολλητινοαντιδράσεις και ο συνδυασμός ELISA με ανοσοσοαποτύπωση είναι η συνιστώμενη διαγνωστική ορολογική προσέγγιση για την τουλαραιμία (26,179). Μοριακές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν όταν οι καλλιέργειες δεν είναι εφικτές. Η συμβατική PCR σε συνδυασμό με αλληλούχιση, η ανάστροφη υβριδοποίηση μετά από πολυπλεκτική PCR (reverse line blotting) και RLFP (Ανάλυση Πολυμορφισμού Μήκους Περιοριστικών Τμημάτων) καθώς και η PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιούνται για την διάκριση των υποειδών της *F. tularensis* (179).

Η γενταμικίνη θεωρείται αντιβιοτικό εκλογής για την αντιμετώπιση της *F. tularensis*. Μπορούν να χορηγηθούν επίσης τόσο για προφύλαξη όσο και για θεραπεία στρεπτομυκίνη, δοξυκυκλίνη και σιπροφλοξασίνη. Όλα τα στελέχη του βακτηρίου αυτού παράγουν β-λακταμάση γεγονός που καθιστά μη αποτελεσματικές την πενικιλίνη και τις κεφαλοσπορίνες (184).

Έως σήμερα δεν έχει παρασκευαστεί εγκεκριμένο εμβόλιο, παρ' όλων ότων ότι το εμβόλιο που είχε παρασκευαστεί στις ΗΠΑ ήδη από την δεκαετία του 1950 χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό στρατιωτικού και εργαστηριακού προσωπικού. Το εμβόλιο εκείνο με την ονομασία LVS (Live Vaccine Strain), περιείχε τον εξασθενημένο τύπο B του βακτηρίου και δεν κατάφερε να προστατεύσει από την πνευμονική μορφή της νόσου, ενώ χορηγούμενο σε μεγαλύτερη δόση είχε ως παρενέργεια ήπια νόσηση (185,186).

3.6. *Borrelia*

Το γένος *Borrelia* περιλαμβάνει παθογόνα για τον άνθρωπο είδη που ανήκουν σε δύο φυλογενετικούς κλάδους: τον κλάδο της *Borrelia burgdorferi sensu lato* που προκαλεί την νόσο Lyme και τον κλάδο που προκαλεί τον υπόστροφο πυρετό (κροτωνογενή και φθειρογενή). Στον πρώτο κλάδο ανήκουν τα είδη *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* και *Borrelia afzelii*. Τα τελευταία χρόνια ταυτοποιήθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες και το είδος *Borrelia mayoni* ως αίτιο της νόσου Lyme (187). Στον δεύτερο κλάδο ανήκει το είδος *Borrelia miyamotoi* με διαβιαστές τους σκληρούς κρότωνα του γένους *Ixodes* και τα είδη *Borrelia hamsi* και *Borrelia turicatae* με διαβιαστές τους μαλακούς κρότωνα του γένους *Ornithodoros*. Στον κλάδο του υπόστροφου πυρετού ανήκει επίσης και η *Borrelia recurrentis* με διαβιαστή την ψείρα σώματος του ανθρώπου *Pediculus humanus humanus* (188).

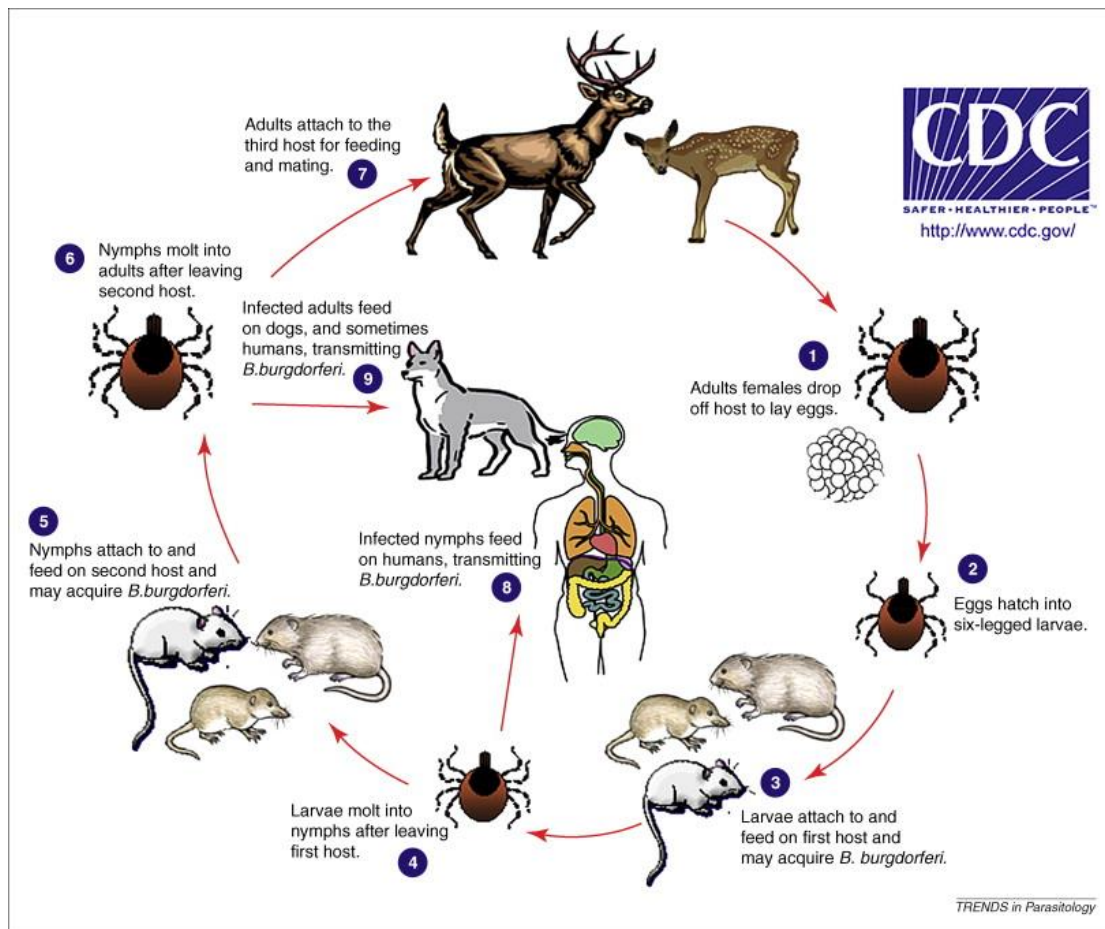
3.6.1. Μπορρελίωση Lyme

Διαβιαστές και Υποδόχα

Η πρώτη περιγραφή της νόσου Lyme έγινε στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής το 1975 στην πόλη Old Lyme ως περιστατικό αρθρίτιδας σε παιδιά (juvenile arthritis) που συνοδεύονταν από ερυθματώδες εξάνθημα. Το 1982 ο ερευνητής Wilhelm Burgdorfer ανακάλυψε τον αιτιολογικό παράγοντα της νόσου, τη σπειροχαίτη *Borrelia burgdorferi*. Η νόσος Lyme θεωρείται το πιο συχνό νόσημα που μεταδίδεται από διαβιαστή στις Ηνωμένες Πολιτείες με 30.000 περιστατικά ετησίως όπως διαπιστώνεται μέσω υποχρεωτικής δήλωσης και με εκτίμηση ότι 476.000 ασθενείς για την περίοδο 2010-2018 έχουν διαγνωσθεί και αντιμετωπισθεί (189). Το παθογόνο αίτιο στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι η *Borrelia burgdorferi sensu stricto* με διαβιαστή τους κρότωνα *Ixodes scapularis* και *Ixodes pacificus* (190,191). Το είδος *Borrelia mayoni* θεωρείται επίσης αιτιολογικός παράγοντας της νόσου στη βόρεια Αμερική στις άνω μεσοδυτικές πολιτείες και μεταβιβάζεται επίσης από τον *Ixodes scapularis* (192). Στην Ευρώπη ο διαβιαστής είναι ο κρότωνα *Ixodes ricinus* και η νόσος αποδίδεται στα είδη *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia bavariensis* και *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Τα είδη *Borrelia spielmanii*, *Borrelia bissetii*, *Borrelia valaisiana* και *Borrelia lusitaniae* έχουν αναφερθεί σποραδικά (193). Στην Ευρώπη χαρακτηρίζεται ως η πιο συχνή ζωνόσος με >200.000 περιστατικά ετησίως, με υψηλότερη επίπτωση στις χώρες της δυτικής Ευρώπης (194). Παρά την αύξηση που διαφαίνεται στον ευρωπαϊκό χώρο, στην Ελλάδα η νόσος είναι εξαιρετικά σπάνια (195). Σε μελέτη του 2009, που εξέτασε δείγματα κροτώνων, δείγματα από τρωκτικά

και δείγματα από ανθρώπους με πάρεση προσωπικού νεύρου, δεν απομονώθηκε γενετικό υλικό *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Ομοίως αρνητικά με PCR ήταν και δείγματα από πληθυσμό με θετικές ανοσοενζυμικές δοκιμασίες αλλά και δείγματα ασθενών με ύποπτη για μπορρελίωση Lyme συμπτωματολογία (195). Σε πρόσφατη δημοσίευση του 2022 που αφορά στην Ελλάδα, γίνεται αναφορά για την παρουσία δύο αυτόχθονων περιστατικών νόσου Lyme –διαγνωσμένων ορολογικά- που σχετίζονται το πιθανότερο με *Borrelia afzelii* (196).

Υποδόχα θεωρούνται διάφορα θηλαστικά και κυρίως είδη τρωκτικών όπως το *Peromyscus leucopus* στην Βορειοανατολική Αμερική και είδη του γένους *Arodemus*, στην Ευρώπη. Ειδικότερα για τα είδη *B. afzelii* και *B. garinii*, υποδόχα θεωρούνται τα τρωκτικά και τα πτηνά αντίστοιχα (9). Μετάδοση από τον ενήλικο κρότωνα στα ωά (κάθετη μετάδοση) δεν έχει παρατηρηθεί και ως εκ τούτου η προνύμφη καθ' αυτή δεν φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο στην μετάδοση της νόσου στον άνθρωπο (197) (Εικόνα 24).



Εικόνα 24 Κύκλος μετάδοσης *Borrelia burgdorferi sensu stricto* σε σκύλο και άνθρωπο της ΗΠΑ

Στοιχεία Βακτηριολογίας

Τα βακτήρια του γένους *Borrelia* ανήκουν στις σπειροχαίτες (τάξη: Spirochaetales οικ. Borreliaceae), είναι σπειροειδή με μήκος από 5-30 μm πλάτος 0.2-0.5 μm, φέρουν 7 έως 12 περιπλαστικά μαστίγια και περιβάλλονται από εξωτερική μεμβράνη (193). Το γονιδίωμά της *B. burgdorferi* έχει μέγεθος 910,725 bp και μέση περιεκτικότητα γουανίνης-κυτοσίνης (G+C) 28.6%, είναι γραμμικό και παρουσιάζει συντηρημένα γονίδια σημαντικά για την επιβίωση, μετάδοση και παθογονικότητα. Σε αυτά περιλαμβάνεται μια ομάδα πλασμιδιακών γονιδίων (Osp A-F) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της εξωτερικής επιφανείας και που εκφράζεται διαφορετικά στο περιβάλλον του διαβιβαστή και στο περιβάλλον του θηλαστικού (198). Επίσης η λιποπρωτεΐνη VlsE (variable major protein like sequence expressed) παρουσιάζει σημαντική αντιγονική ποικιλομορφία, παρόλον ότι ένα συντηρημένο τμήμα της αποτελεί τη βάση για ανοσοδιαγνωστικές δοκιμασίες (199). Το σύστημα VlsE είναι απαραίτητο για την μακροχρόνια επιβίωση στα μολυσμένα θηλαστικά και αποτελεί σημαντικό μηχανισμό διαφυγής από το ανοσολογικό σύστημα. Μετά την εγκατάσταση της λοίμωξης η διαφυγή από τα βακτηριοκτόνα αντισώματα είναι κρίσιμη για την επιβίωση το παθογόνου. Γι' αυτό και η λιποπρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου (OspC) αντικαθίσταται από τη VlsE, η οποία εμφανίζει τεράστια αντιγονική ποικιλομορφία, μέσω της οποίας διαφεύγει από τα βακτηριοκτόνα αντισώματα (200).

Τόσο η φυσική όσο και η επίκτητη ανοσία κινητοποιούνται έναντι του βακτηρίου. Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες παράγονται και απελευθερώνονται στις προσβεβλημένες θέσεις. Η πεπτιδογλυκάνη, βασικό δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος της *B. burgdorferi*, που απελευθερώνεται κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου στο περιβάλλον του, θεωρείται ότι πιθανόν να λειτουργεί ως το ανοσογόνο που επάγει φλεγμονώδη απόκριση στο αρθρικό υγρό, στην αρθρίτιδα της νόσου Lyme (201).

Κλινικές εκδηλώσεις, διάγνωση και θεραπεία

Η νόσος εξελίσσεται σε 3 στάδια. Στο πρώτο στάδιο εμφανίζεται ένα πρώιμο δερματικό εξάνθημα, το μεταναστευτικό ερύθημα, που αποτελεί σήμα κατατεθέν της νόσου. Εμφανίζεται στο 90% των περιπτώσεων περίπου 7 ημέρες μετά το νύγμα του κρότωννα, ως ερυθρό εξάνθημα που εξαπλώνεται σταδιακά γύρω από το σημείο του νύγματος με μορφή στόχου. Στο δεύτερο στάδιο μπορεί να εμφανιστούν δερματικές βλάβες σε άλλα σημεία του σώματος οι οποίες υποχωρούν μαζί με το ερύθημα μετά από 3-4 εβδομάδες, αλλά πιθανόν να εμφανιστούν νευρολογικές, καρδιακές ή

ρευματικές εκδηλώσεις εβδομάδες έως και μήνες μετά τη μόλυνση. Στο τρίτο στάδιο οι εκδηλώσεις της νόσου είναι δερματικές (χρόνια ατροφική δερματίτιδα), μυοσκελετικές (αρθρίτιδα Lyme) ή νευρολογικές (εγκεφαλομυελίτιδα, εγκεφαλοπάθεια) (200).

Η διάγνωση της λοίμωξης βασίζεται σε κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα. Στα αρχικά στάδια της νόσου ο ορολογικός έλεγχος ενδέχεται να είναι αρνητικός δεδομένου ότι τα αντισώματα είναι συνήθως ανιχνεύσιμα 4-8 εβδομάδες μετά τη μόλυνση, συνεπώς συνιστάται ο έλεγχος διαδοχικών δειγμάτων. Για τη διάγνωση της ενεργού λοίμωξης ακολουθείται το πρωτόκολλο των δύο φάσεων σύμφωνα με το οποίο αναζητούνται IgG και IgM αντισώματα με τη μέθοδο ELISA και το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται με ανοσοαποτύπωση Western Blot (100).

Η άμεση ανίχνευση του οργανισμού γίνεται με καλλιέργεια και μοριακές μεθόδους. Η επιτυχία της καλλιέργειας σχετίζεται με το είδος του δείγματος και την κλινική εικόνα (193). Οι μοριακές μέθοδοι αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR χρησιμοποιούνται με στόχους πλασμιδιακά γονίδια *OspA* και *OspB* καθώς και χρωμοσωμικά γονίδια ή τμήματα 16S rRNA 5S-23S rRNA intergenic spacer region (202). Στις περιπτώσεις ασθενών με αρθρίτιδα Lyme, η ευαισθησία της PCR σε αρθρικό υγρό ήταν υψηλή σε σύγκριση σε άλλα βιολογικά υλικά όπως αίμα, ENY και ούρα (203). Συγκριτικά με τα κλινικά δεδομένα, διαπιστώθηκε ότι η ανίχνευση γονιδιακού υλικού ήταν αποτελεσματική εάν δεν είχε χορηγηθεί καθόλου ή είχε χορηγηθεί ακατάλληλη αντιμικροβιακή θεραπεία και ότι το θετικό αποτέλεσμα PCR αντιστρέφονταν μετά από την κατάλληλη θεραπεία (203). Σε αντίθεση με την καλλιέργεια η PCR δεν μπορεί να αποσαφηνίσει εάν η λοίμωξη είναι ενεργός, αφού ενδέχεται να ανιχνευθεί γενετικό υλικό νεκρών βακτηρίων (193).

Στις αρχικές εντοπισμένες μορφές της νόσου θεραπευτικά χορηγούνται κατά προτίμηση δοξυκυκλίνη, αμοξυκιλλίνη, φαινομεθυλπενικιλίνη και κεφουροξίμη axetil. Οι μακρολίδες ως λιγότερο αποτελεσματικές, χρησιμοποιούνται ως θεραπεία δεύτερης γραμμής (193). Έως σήμερα δεν υπάρχει εμβόλιο για την πρόληψη της μπορρελίωσης Lyme.

3.6.2. Υπόστροφος Πυρετός

Ο υπόστροφος πυρετός οφείλεται σε σπειροχαΐτες του γένους *Borrelia* και όπως αναφέρθηκε με βάση τα επιδημιολογικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του διακρίνουμε τον επιδημικό φθειρογενή υπόστροφο πυρετό και τον ενδημικό κροτωνογενή υπόστροφο πυρετό. Ο επιδημικός φθειρογενής υπόστροφος πυρετός

έχει ως υποδόχο τον άνθρωπο, μεταδίδεται με την ψείρα του σώματος του ανθρώπου και αποδίδεται στην *Borrelia recurrentis*. Έχει εξαλειφθεί από τις περισσότερες χώρες αλλά εξακολουθεί να απαντάται σε περιοχές της Αφρικής (Κέρας της Αφρικής) και της Νότιας Αμερικής καθώς και σε συνθήκες που επικρατούν αυξημένος συγχρωτισμός και κακή υγιεινή (204,205). Ο κροτωνογενής υπόστροφος πυρετός έχει ως υποδόχα μικρά τρωκτικά, μεταδίδεται από τους μαλακούς κρότωνες του γένους *Ornithodoros* και οφείλεται σε τουλάχιστον 15 είδη *Borrelia* που έχουν καταγραφεί κυρίως σε Αμερική και Ευρώπη (204). Σχετικά πρόσφατα έχουν καταγραφεί και τα είδη *Borrelia miyamotoii* και *Borrelia lonestary* μεταδιδόμενα από σκληρούς κρότωνες (206). Στην Ευρώπη, σύμφωνα με το ECDC, το διάστημα Ιουλίου-Οκτωβρίου 2015, διαγνώστηκαν σε χώρες της Ε.Ε. και Ελβετία 27 περιστατικά υπόστροφου πυρετού με δύο αυτόχθονα περιστατικά στην Ιταλία (Τορίνο) (207). Πρόσφατη καταγραφή περιστατικού κροτωνογενούς υπόστροφου πυρετού αφορούσε και την Ελλάδα. Επρόκειτο για τουρίστα ο οποίος κατά την επιστροφή του στο Βέλγιο, μετά από ταξίδι στην Ελλάδα και πιο συγκεκριμένα στο νησί της Τήλου, διαγνώστηκε με τη συγκεκριμένη νόσο που οφείλονταν στη *Borrelia persica* (208).

Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου περιλαμβάνουν υψηλό πυρετό συνοδευόμενο από μη ειδικά συμπτώματα όπως κεφαλαγία, κακουχία, αρθραλγίες και κόπωση. Έχουν επίσης παρατηρηθεί αιμορραγικές εκδηλώσεις, που οφείλονται σε παροδική θρομβοκυτοπενία, και νευρολογικές επιπλοκές (209). Τα συμπτώματα συνήθως υποχωρούν μετά από 3-6 ημέρες, ωστόσο μετά από μία εβδομάδα εμφανίζεται υποτροπή με παρόμοια συμπτώματα και ακολουθεί αριθμός υποτροπών που μπορεί να ξεπεράσουν τις 10. Συνήθως όμως τα συμπτώματα υποχωρούν μετά από 3 υποτροπές. Τα κύματα των υποτροπών αποδίδονται στην ικανότητα του παθογόνου για αντιγονική μετατροπή της εξωτερικής του επιφάνειας (210).

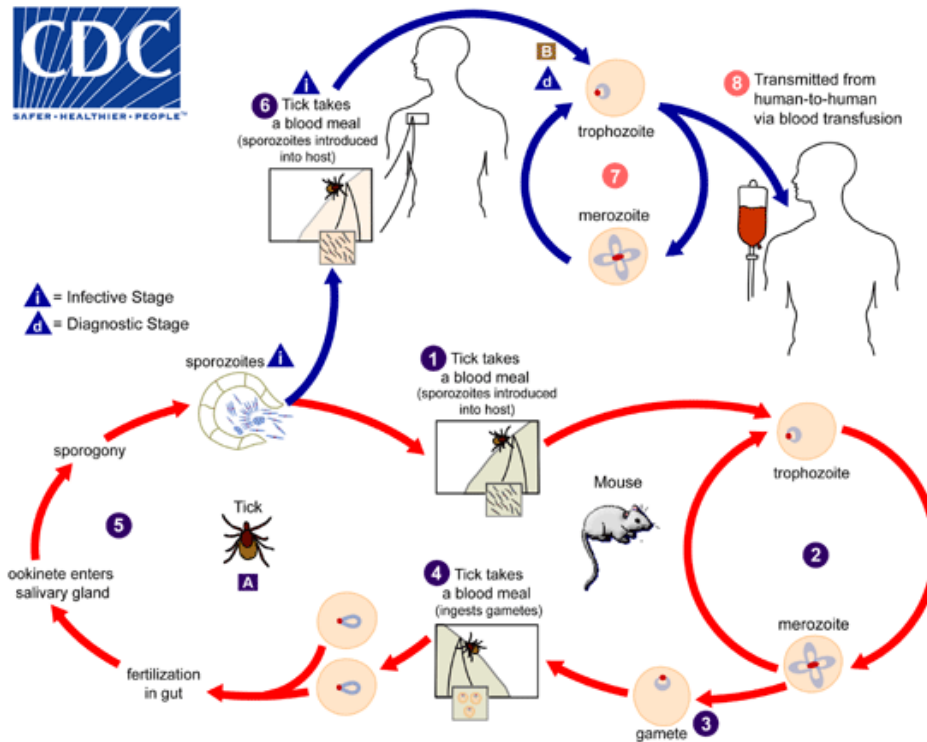
Η μικροσκόπηση παρασκευάσματος παχείας σταγόνας και λεπτής στιβάδας που λαμβάνονται κατά το επεισόδιο του πυρετού αποτελεί τη συνηθέστερη μέθοδο διάγνωσης (211). Για τον φθειρογενή υπόστροφο πυρετό η συνιστώμενη θεραπεία περιλαμβάνει εφ' άπαξ δόση τετρακυκλίνης ή ερυθρομυκίνης ενώ για τον κροτωνογενή υπόστροφο πυρετό συνιστάται δεκαήμερη θεραπεία με οποιοδήποτε από τα προαναφερθέντα αντιβιοτικά (209). Σε περίπτωση μηνιγγίτιδας ή εγκεφαλίτιδας μπορεί να εξεταστεί η παρεντερική χορήγηση β-λακτάμης (κεφτριαξόνης). Η θεραπεία (ανεξαρτήτως αντιβιοτικού) μπορεί να προκαλέσει την αντίδραση Jarisch-Herxheimer με συμπτώματα γενικευμένη κακουχία, κεφαλαγία,

πυρετό και υπόταση. Η επιπλοκή αυτή προκαλείται από καταιγίδα κυτταροκινών, κυρίως TNF- α , IL-6 και IL-8 (209).

3.7. Babesia

Το γένος *Babesia* ανήκει στο Φύλο: Apicomplexa, κλάση: Aconoidasida, τάξη: Piroplasmida οικογένεια: *Babesiidae* και είναι ενδοερυθροκυτταρικό παράσιτο που προκαλεί στον άνθρωπο και στα ζώα την πυροπλάσμωση (μπαμπεισίωση), εμπύρετο νόσημα ποικίλης βαρύτητας. Μεταδίδεται από τους κρότωνα της οικογένειας *Ixodidae* και πολλά ζώα μπορούν να λειτουργήσουν ως υποδόχα. Στην Αμερική, διαβιβαστής είναι ο κρότωνα *Ixodes scapularis* και το παθογόνο είδος είναι η *Babesia microti*. Στην ευρωπαϊκή περιοχή, η ασθένεια οφείλεται κυρίως στα είδη *Babesia divergens*, *Babesia venatorum* και σε μικρότερο βαθμό στην *Babesia microti* (212). Στην Ευρώπη ο κρότωνα *Ixodes ricinus* είναι διαβιβαστής και για τα τρία προαναφερθέντα είδη. Από τα 50 περίπου αυτόχθονα περιστατικά που έχουν καταγραφεί, τα 35 αποδίδονται στη *B. divergens*, τα 5 στην *B. venatorum* και τα 11 στην *B. microti* (212).

Ο κύκλος ζωής του παρασίτου περιλαμβάνει δύο ξενιστές: τον ενδιάμεσο σπονδυλωτό και τον τελικό που είναι ο κρότωνα. Ειδικότερα για την *B. microti*, ενδιάμεσο ξενιστή αποτελούν τρωκτικά, κυρίως το είδος *Peromyscus leucopus* και τελικό ξενιστή, ο κρότωνα *Ixodes scapularis*. Οι σποροζωίτες του παρασίτου εισέρχονται στο τρωκτικό μέσω του νύγματος του κρότωνα και με κυτταροδιαιρέσεις παράγονται οι μεροζωίτες. Κάποιοι εξελίσσονται σε αρσενικούς και θηλυκούς γαμέτες. Αφού καταποθούν με το αίμα από τον κρότωνα, ακολουθεί η γονιμοποίηση στον πεπτικό του σωλήνα και προκύπτουν οι ωοκινέτες που στους σιελογόνους αδένες του κρότωνα εξελίσσονται σε σποροκύστες, οι οποίες περιέχουν τους σποροζωίτες. Μέσω του νύγματος του κρότωνα οι σποροζωίτες του παρασίτου μεταφέρονται στον άνθρωπο (Εικόνα 25). Σε αυτόν τον κύκλο ο άνθρωπος αποτελεί αδιέξοδο ξενιστή. Η μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο μπορεί να γίνει μέσω μετάγγισης μολυσμένου αίματος. Τέτοια περιστατικά έχουν καταγραφεί κυρίως στις ΗΠΑ και μόνο ένα παρόμοιο στην Ευρώπη (212).



Εικόνα 25 Βιολογικός κύκλος του παρασίτου *Babesia microti* (213)

Ύστερα από ενδοκύτωση των παρασίτων στα ερυθρά αιμοσφαίρια ξεκινά μία σειρά διαιρέσεων με αποτέλεσμα την παραγωγή μεροζωιτών. Κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων και την απελευθέρωση των μεροζωιτών (που αποτελούν τη μολυσματική μορφή) εμφανίζονται τα συμπτώματα της λοίμωξης. Οι επιπλοκές της λοίμωξης περιλαμβάνουν αιμολυτική αναιμία, αιμοσφαιριναιμία και νεφρική ανεπάρκεια. Η απελευθέρωση αυτή γίνεται περιοδικά γεγονός που δικαιολογεί την περιοδικότητα του πυρετού στη νόσο. Στην εμφάνιση των κλινικών εκδηλώσεων συμβάλλει η παραγωγή προφλεγμονοδών κυτταροκινών και η απόφραξη των αιμοφόρων αγγείων λόγω της ερυθροκυτταρικής προσκόλλησης. Τόσο η φυσική όσο και η επίκτητη ανοσία περιορίζουν την μόλυνση από το πρωτόζωο. Ο σπλήνας διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην άμυνα, με την απομάκρυνση των μολυσμένων ερυθροκυττάρων και η κυτταρική ανοσία είναι σημαντική, γεγονός που καταδεικνύεται από το γεγονός ότι πειραματόζωα και άνθρωποι με ανοσοκαταστολή έχουν δυσκολία στον έλεγχο της λοίμωξης (212). Η δομή των σπληνικών φλεβιδίων επιτρέπει στα μακροφάγα τη φαγοκυττάρωση και καταστροφή των μολυσμένων ερυθροκυττάρων και των εμπεριεχομένων παρασίτων. Η ανατομική ή λειτουργική ασπληνία αποτελεί παράγοντα κινδύνου για κεραυνοβόλο, δυνητικά θανατηφόρο νόσο από *B. microti* και από *B. divergens*.

Οι κλινικές εκδηλώσεις ποικίλλουν από ήπιες, υποκλινικές λοιμώξεις έως κεραυνοβόλο αιμολυτική νόσο. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι χρόνιες υποκλινικές λοιμώξεις δεν είναι ασυνήθεις (214). Θανατηφόρα περιστατικά έχουν αναφερθεί ειδικά σε ανοσοκατεσταλμένα ή σπληνεκτομηθέντα άτομα. Στους ανοσοεπαρκείς μπορούν να εμφανιστούν συμπτώματα παρόμοια με της ελονοσίας όπως πυρετός με ρίγος, αναιμία και κακουχία (26) καθώς επίσης και σπληνομεγαλία, ίκτερος λόγω αιμόλυσης και πετέχειες λόγω διάχυτης ενδοαγγειακής πήξης (215).

Η διάγνωση βασίζεται στη μικροσκοπική ανίχνευση των παρασίτων μέσα στα ερυθροκύτταρα σε παρασκευάσματα παχείας σταγόνας και λεπτής στιβάδας, μετά από χρώση Giemsa ή Wright. Οι τροφοζωίτες δεν είναι εύκολα διακριτοί από τα γαμετοκύτταρα. Ειδικότερα για την *B. microti* σχηματίζουν ένα δακτύλιο που μοιάζει με το παράσιτο της ελονοσίας *Plasmodium falciparum*. Μορφολογικό χαρακτηριστικό του παρασίτου αποτελεί ο σχηματισμός μίας τετράδας (Σταυρός της Μάλτας), αν και δεν παρατηρείται συχνά (26,215). Η PCR και η real time PCR είναι ευαίσθητες διαγνωστικές μέθοδοι. Οι ορολογικές δοκιμασίες μπορούν να επιβεβαιώσουν αναδρομικά την λοίμωξη, αν και δεν είναι χρήσιμες στη διάγνωση της οξείας φάσης της νόσου (215).

Θεραπευτικά χορηγούνται ατοβακόνη και αζιθρομυκίνη για 7-10 ημέρες. Εναλλακτικά χορηγείται κλινδαμυκίνη και κινίνη. Σε ασθενείς με παρασαιμία $\geq 10\%$, σοβαρή αιμόλυση (αιμοσφαιρίνη < 10 g/dL) ή πνευμονική, ηπατική ή νεφρική ανεπάρκεια πιθανόν να χρειαστεί αφαιμαξομετάγγιση (215). Παρατεταμένη αντιβιοτική θεραπεία είναι απαραίτητη σε περιπτώσεις ανοσοκατεσταλμένων με εμμένουσα και υποτροπιάζουσα λοίμωξη (216).

Αυτή η σελίδα σκοπίμως είναι λευκή.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Υλικό και Μέθοδοι

1.1. Δειγματοληψία

Κατά το χρονικό διάστημα Νοεμβρίου 2016 έως Νοεμβρίου 2017, σε 5 κτηνιατρικές κλινικές, συλλέχθηκαν δείγματα εκτοπαρασίτων ψύλλων και κροτώνων από σκύλους και γάτες που προέρχονταν από 39 περιοχές από τις 7 Περιφερειακές ενότητες της Περιφέρειας Αττικής. Οι περιοχές δειγματοληψίας περιγράφονται στον Πίνακα 1 και απεικονίζονται στον χάρτη της Εικόνας 26. Τα ζώα προσήλθαν στις κλινικές είτε μέσω φιλοζωικών οργανώσεων στο πλαίσιο προγραμμάτων στείρωσεως, είτε μέσω των κηδεμόνων τους στο πλαίσιο τακτικής κλινικής εξέτασης. Ως εκ τούτου, δεν αφορούσε πειραματική διαδικασία που απαιτεί έγκριση σύμφωνα με το ΠΔ160/91 και δεν περιλάμβανε πειραματισμό πάνω στα συμμετέχοντα ζώα (Κώδικας Δεοντολογίας και καλής πρακτικής του ΕΚΠΑ (2017)). Στην περίπτωση δεσποζόμενων ζώων πριν από τη συλλογή προηγείτο η ενημέρωση και η προφορική συναίνεση του κηδεμόνα του ζώου. Τα εκτοπαράσιτα απομακρύνθηκαν με λαβίδα, τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια Erpendorf που περιείχαν αλκοόλη 95% και φυλάχθηκαν στους 4° C έως ότου ταυτοποιηθούν. Για κάθε ζώο καταγράφηκε η ημερομηνία συλλογής, το είδος του ζώου, η περιοχή προέλευσης του, η ηλικία του, το αν ήταν δεσποζόμενο ή αδέσποτο, η κατηγορία και ο συνολικός αριθμός των συλλεχθέντων εκτοπαρασίτων. Από κάθε ζώα επιλέχθηκε ένα εκτοπαράσιτο, είτε κρότωνα, είτε ψύλλος και σε αυτό πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση των ζωνοτικών βακτηρίων.



Εικόνα 26 Χάρτης με τις περιοχές προέλευσης των δειγμάτων φύλλων και κροτώνων στην περιφέρεια Αττικής

Πίνακας 4 Περιοχές προέλευσης των δειγμάτων

| | |
|--|-----------------|
| Περιφ. Ενότητα Κεντρικού Τομέα Αθηνών | Αθήνα |
| | Αμπελόκηποι |
| | Εξάρχεια |
| | Νέος Κόσμος |
| | Ομόνοια |
| | Παγκράτι |
| | Πετράλωνα |
| | Ηλιούπολη |
| | Καισαριάνη |
| | Κολωνός |
| | Βύρνας |
| Περιφ. Ενότητα Ανατολικής Αττικής | Κάλαμος |
| | Κορωπί |
| | Παλλήνη |
| | Πικέρμι |
| | Βάρκιζα |
| | Βούλα |
| Περιφ. Ενότητα Νήσων | Σαλαμίνα |
| Περιφ. Ενότητα Βόρειου Τομέα Αθηνών | Άγιος Στέφανος |
| | Εκάλη |
| | Χαλάνδρι |
| | Μαρούσι |
| | Νέα Ερυθραία |
| Περιφ. Ενότητα Πειραιά | Δραπετσώνα |
| | Κερατσίνι |
| | Μοσχάτο |
| | Πέραμα |
| | Πειραιάς |
| | Ρέντης |
| | Ταύρος |
| Περιφ. Ενότητα Νοτίου Τομέα Αθηνών | Άγιος Δημήτριος |
| | Αργυρούπολη |
| | Γλυφάδα |
| | Καλλιθέα |
| | Νέα Σμύρνη |
| | Παλαιό Φάληρο |
| Περιφ. Ενότητα Δυτικού Τομέα Αθηνών | Χαϊδάρι |
| | Περιστέρι |

1.2. Συστηματική Ταξινόμηση Εκτοπαρασίτων

Η συστηματική ταξινόμηση των εκτοπαρασίτων έγινε με τη βοήθεια συγγραμμάτων που περιλάμβαναν τις αντίστοιχες ταξινομικές κλείδες. (40,42,217,20) και σχετική βιβλιογραφία. Για την παρατήρησή τους χρησιμοποιήθηκε στερεοσκόπιο ZEISS Stemi 305 και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή KODAK EasyShare DX7590.

1.2.1. Συστηματική ταξινόμηση των ψύλλων

Η ταξινομική διάκριση των ψύλλων ως προς το γένος και το είδος βασίζεται κυρίως στο σχήμα και τη δομή των γεννητικών οργάνων και στην παρουσία και κατανομή τριχών, ακανθοειδών τριχών και κτενιδίων. Κτενίδια ονομάζονται οι βελονοειδείς αποφύσεις της επιδερμίδας. Όταν βρίσκονται κατά μήκος του περιθωρίου της κraniaκής κάψας συνιστούν το παρεϊακό κτενίδιο. Όταν εμφανίζονται στο οπίσθιο μέρος του προθώρακα συνιστούν το προθωρακικό κτενίδιο. Ταυτόχρονη παρουσία ή απουσία τους ή ύπαρξη του προθωρακικού με απουσία του παρεϊακού (αλλά ποτέ το αντίστροφο) παρατηρείται σε διάφορα είδη (20). Στους θηλυκούς ψύλλους η απόληξη της κοιλίας είναι στρογγυλεμένη και δεν στρέφεται προς τα πάνω όπως στους αρσενικούς (218).

Ειδικότερα στη διάκριση του γένους *Ctenocephalides*, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που εξετάζονται περιλαμβάνουν: το σχήμα του μπροστινού τμήματος της κεφαλής, την οπίσθια κνήμη και τη χαιοταξία της στην επιφανειακή πλευρά, το παρεϊακό κτενίδιο, την παρουσία 2 ή 3 βελονοειδών τριχών στον επιστερνίτη και τα αρσενικά και θηλυκά γεννητικά όργανα (22,219–221).

1.2.2. Συστηματική ταξινόμηση των κροτώνων

Η ταξινομική διάκριση των κροτώνων βασίζεται στην ύπαρξη του θυρεού στην ραχιαία επιφάνειά τους, που τους διακρίνει σε σκληρούς (οικογένεια: *Ixodidae*) και μαλακούς (οικογένεια: *Argasidae*). Στους σκληρούς κρότωνες η ύπαρξη του θυρεού αποτελεί επίσης και διακριτικό γνώρισμα του φύλου, με δεδομένο ότι στους αρσενικούς ο θυρεός καλύπτει ολόκληρη την ραχιαία πλευρά, ενώ στους θηλυκούς το 1/3 αυτής. Σε ό,τι αφορά το αναπτυξιακό στάδιο οι προνύμφες είναι πολύ μικρές, δύσκολα διακρίνονται δια γυμνού οφθαλμού και είναι εξάποδες ενώ οι νύμφες είναι λίγο μεγαλύτερες, φέρουν 4 ζεύγη ποδιών και δεν διαθέτουν γεννητικό πόρο (40).

Σημαντικό γνώρισμα αποτελεί και η ψευδοκεφαλή, το σχήμα της οποίας διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα γένη. Τα θηλυκά άτομα φέρουν στη ραχιαία επιφάνεια της ψευδοκεφαλής δύο πορώδεις χώρους οι οποίοι επίσης αποτελούν ταξινομικό χαρακτηριστικό. Διαγνωστικά χαρακτηριστικά αποτελούν τα τρία πρώτα τμήματα των προσακτρίδων καθώς και η οδόντωση του υποστόματος.

Στην κοιλιακή επιφάνεια παρατηρούνται αυλακώσεις. Οι αυλακώσεις που περιβάλλουν τον γεννητικό πόρο και την έδρα και ονομάζονται γεννητικές και αντίστοιχα εδρικές αυτές που περιβάλλουν την έδρα. Η εδρική αύλακα μπορεί να περιβάλλει την έδρα από την πρόσθια ή οπίσθια πλευρά της. Η πρόσθια θέση της αποτελεί γνώρισμα του γένους *Ixodes*. Επίσης σε αρσενικά άτομα ορισμένων γενών γύρω από την έδρα υπάρχουν τα εδρικά και παραεδρικά πλακίδια που αποτελούν επίσης διαγνωστικά χαρακτηριστικά για τα γένη *Rhipicephalus* και *Hyalomma*. Στην κοιλιακή επιφάνεια στα πλάγια και πίσω από το τέταρτο ισχίο, διακρίνεται το αναπνευστικό στίγμα. Το σχήμα και η κατασκευή του αναπνευστικού στίγματος όπως επίσης το ισχίο, ο τροχαντήρας και ο ταρσός των ποδιών αποτελούν ταξινομικά χαρακτηριστικά. Στον ταρσό των *Ixodidae* υπάρχει χαρακτηριστικό σικυοειδές εξάρτημα και ένα ζεύγος αγκίστρων (40,217).

Σε ορισμένα είδη το οπίσθιο άκρο του σώματος διαχωρίζεται σε πλακίδια που δημιουργεί μία δαντελωτή όψη και αποτελεί χαρακτηριστικό στοιχείο των γενών *Rhipicephalus*, *Hyalomma* και *Amblyomma* (217).

1.3. Μοριακές μέθοδοι

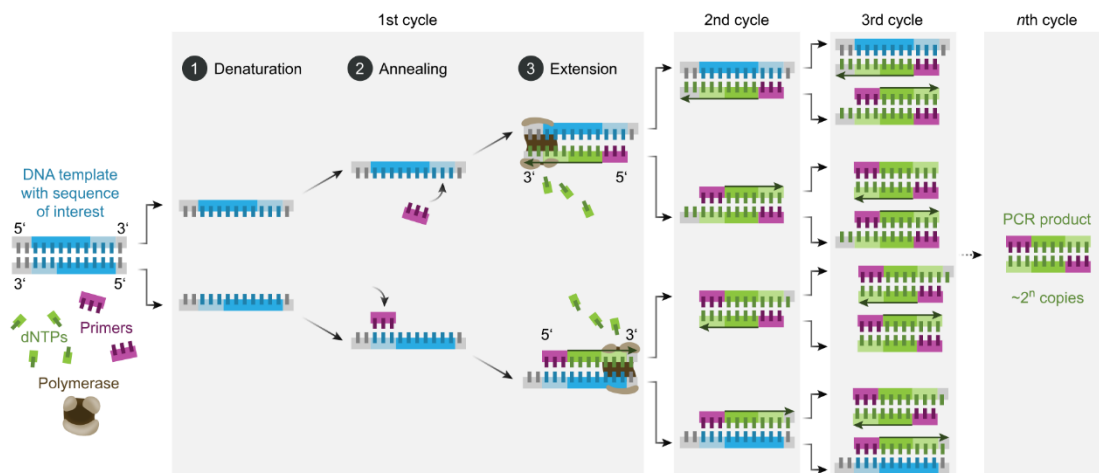
Η διευρεύνηση του μικροβιώματος κάθε δείγματος εκτοπαρασίτου έγινε με την εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Η αρχή αυτής της μεθόδου βασίζεται στην ενίσχυση ή πολλαπλασιασμό (amplification) τμημάτων DNA με τη χρήση θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται *in vitro* η παραγωγή ενός πολύ μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και μέσω αυτής διαπιστώνεται η ύπαρξη του DNA του προς εξέταση οργανισμού (222).

Τα προαπαιτούμενα για την αντίδραση PCR είναι η αλληλουχία DNA-στόχος (μήτρα DNA) που θα ενισχυθεί, οι εκκινητές (ολιγονουκλεοτίδια μήκους 15-35 bp) οι οποίοι θα συνδεθούν με τα συμπληρωματικά τμήματα αυτής της αλληλουχίας και προσδιορίζουν τα όρια του προς ενίσχυση τμήματος DNA, η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση που θα επιτελέσει την πολλαπλή αντιγραφή και τα ελεύθερα 5΄τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) από τα οποία θα συντεθούν τα

αντίγραφο DNA. Η αντίδραση αυτή επιτελείται σε ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχει τις κατάλληλες συνθήκες για την δράση του ενζύμου και την υβριδοποίηση των μορίων των νουκλεϊκών οξέων. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε συσκευή που ονομάζεται θερμοκυκλοποιητής σε επαναλαμβανόμενους κύκλους εναλλασσόμενων θερμοκρασιών που καθιστούν δυνατό τον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Κάθε κύκλος αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια (223):

1. Το στάδιο αποδιάταξης (denaturation) του DNA-στόχου με θέρμανση περίπου στους 95 °C, κατά το οποίο αποδιάσσονται τα δίκλινα μόρια DNA
2. Το στάδιο αναδιάταξης/υβριδισμού (annealing) των εκκινήτων με συμπληρωματικές ακολουθίες που πραγματοποιείται με επώαση σε θερμοκρασία από 40 έως 60 °C. Η θερμοκρασία αυτή εξαρτάται από την νουκλεοτιδική ακολουθία των εκκινήτων. Το στάδιο αυτό διαρκεί αρκετά δευτερόλεπτα.
3. Το στάδιο αντιγραφής/επιμήκυνσης (extension) κατά το οποίο συντίθενται νέες αλυσίδες DNA από την DNA πολυμεράση σε θερμοκρασία περίπου 72 °C. Στο τέλος αυτού του σταδίου ολοκληρώνεται η επιμήκυνση των αλληλουχιών και ο διπλασιασμός των μορίων του DNA

Αυτή η διαδικασία, που αποτελεί ένα θερμικό κύκλο, επαναλαμβάνεται 30-40 φορές και καταλήγει στην παραγωγή της αλληλουχίας στόχου σε εκατομμύρια αντίγραφα που είναι το τελικό προϊόν PCR (amplicon) (Εικόνα 27).

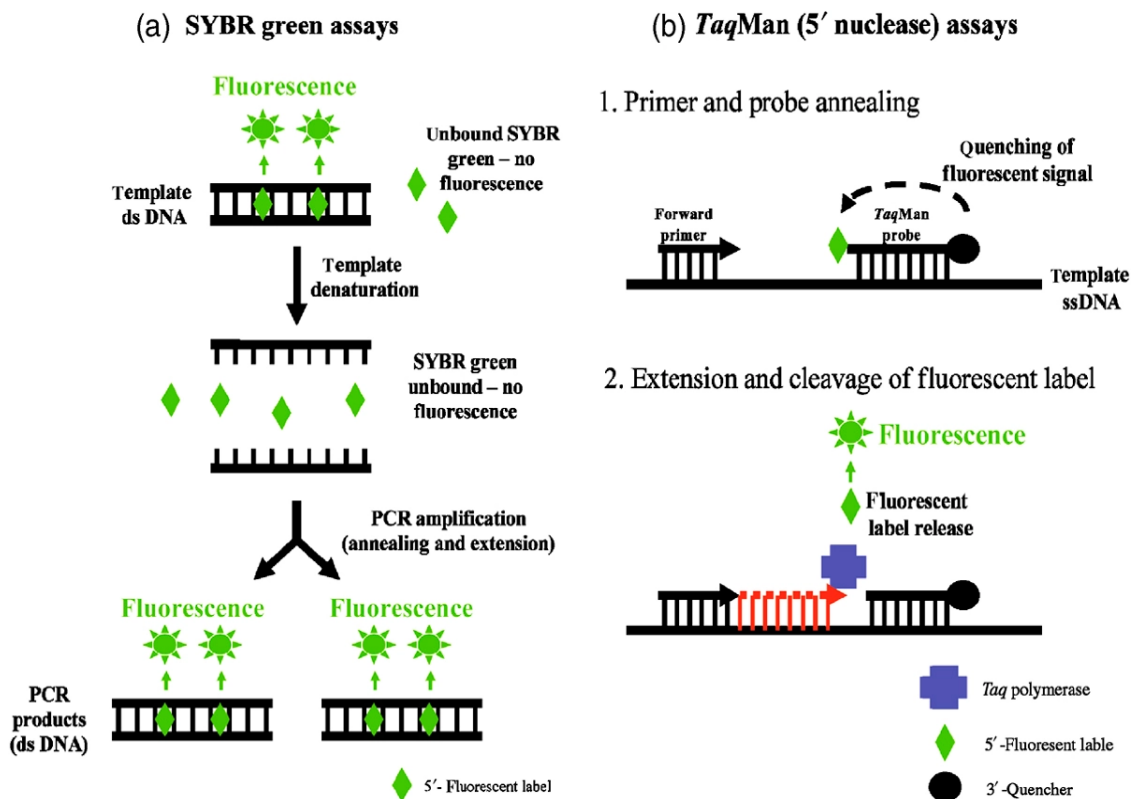


Εικόνα 27 Τα τρία στάδια: 1. Αποδιάταξη (Denaturation), 2. Υβριδισμός (Annealing), 3. Επιμήκυνση (Extension) που περιλαμβάνονται σε ένα θερμικό κύκλο της PCR και η εκθετική αύξηση των αντιγράφων της αλληλουχίας DNA
(CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=96042657>)

Η PCR ως τεχνική έχει ευρεία εφαρμογή στην Διαγνωστική Μικροβιολογία. Προκειμένου δε να βελτιστοποιηθεί η ειδικότητα και η ευαισθησία της, πέραν της συμβατικής (conventional PCR) έχουν αναπτυχθεί διάφοροι άλλοι τύποι όπως η εμφωλεασμένη (nested PCR) και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR) που χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα εργασία.

Στην εμφωλεασμένη PCR περιλαμβάνονται δύο ζεύγη εκκινητών: με το πρώτο ενισχύεται η αλληλουχία DNA-στόχος (εξωτερική PCR) και με το δεύτερο μία εσωτερική αλληλουχία του στόχου που έχει ήδη ενισχυθεί (εσωτερική PCR). Έτσι αυξάνεται η ακρίβεια της αρχικής μεθόδου, η ειδικότητα και η ευαισθησία. Στην περίπτωση της συμβατικής αλλά και της εμφωλεασμένης PCR μετά από την ενίσχυση του υπό εξέταση DNA-στόχου, ακολουθεί ανίχνευση του προϊόντος της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη (223).

Στην real time PCR, η ανίχνευση του προϊόντος της PCR γίνεται σε πραγματικό χρόνο μέσω της ιχνηθέτησής του με φθορίζουσες χρωστικές και της μέτρησης της εκπομπής του παραγόμενου φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και για τον λόγο αυτό απαιτείται και ειδικός θερμοκυκλοποιητής που φέρει ανιχνευτές του φθορισμού (Εικόνα 28) (224). Ανάμεσα στα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα συστήματα ανίχνευσης διακρίνονται οι ειδικές χρωστικές (SYBR Green, LCGREEN) που προσδένονται σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA) και οι ανιχνευτές υδρόλυσης (TaqMan hydrolysis probes) ή ιχνηθέτες τύπου TaqMan (225). Οι πρώτες εκπέμπουν φθορισμό όταν προσδένονται στην μικρή αύλακα του dsDNA και χαρακτηρίζονται ως μη ειδικές αφού μπορούν να προσκολληθούν σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA που σχηματίζονται κατά την πραγματοποίηση της PCR. Οι δεύτερες είναι μικρά ολιγονουκλεοτίδια που φέρουν μια φθορίζουσα χρωστική στο 5' άκρο και ένα μόριο απόσβεσης φθορισμού (quencher) στο 3' άκρο και μέσω του φαινομένου μεταφοράς ενέργειας μέσω συντονισμού του φθορισμού (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) η ενέργεια του φθοριοφόρου μορίου απορροφάται από τον αποσβεστήρα και έτσι δεν ανιχνεύεται σήμα φθορισμού από τον ιχνηθέτη (226). Κατά την φάση της σύνθεσης νέων αλυσίδων DNA, η DNA πολυμεράση δρώντας ως 5' εξωνουκλεάση, υδρολύει τον ιχνηθέτη TaqMan με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό της φθορίζουσας χρωστικής από τον αποσβεστήρα φθορισμού και κατά συνέπεια την εκπομπή φωτός ανιχνεύεται από αισθητήρες που φέρει ο θερμοκυκλοποιητής. Η αύξηση του φθορισμού συνεπάγεται και αύξηση του προϊόντος της PCR (225).



Εικόνα 28 Οι χημείες της real time PCR: a) SYBR green και b) TaqMan (224)

1.3.1. Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA

Από κάθε ζώο επιλέχθηκε ένα εκτοπαράσιτο, είτε κρότωνας είτε ψύλλος, από το οποίο πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA. Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε το κιτ αντιδραστηρίων NucleoSpin® Tissue, της εταιρείας Macherey-Nagel, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή που περιγράφονται στο User Manual NucleoSpin® Tissue, 2014. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρήση στηλών με τεχνολογία μεμβρανών διοξειδίου του πυριτίου, στις οποίες προσδένεται το DNA. Στη διαδικασία που ακολουθείται τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνονται με πλύση, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Το ολικό DNA συλλέγεται με έκλουση με το αντίστοιχο διάλυμα που περιλαμβάνεται στο κιτ.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για κάθε εκτοπαράσιτο ήταν το ακόλουθο:

1. Ξέπλυμα με διάλυμα αλκοόλης 70%, ξέπλυμα με αποσταγμένο νερό για 10' (δισ) και στέγνωμα σε διηθητικό χαρτί.

2. Τεμαχισμός του εκτοπαρασίτου με αποστειρωμένη λεπίδα νυστεριού μέσα σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5 ml και προσθήκη 180 μl διαλύματος T1 και 25 μl πρωτεΐνάσης K και ανάδευση των δειγμάτων σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex) και επώαση στους 56 °C καθόλη τη διάρκεια της νύχτας.
3. Ανάδευση των δειγμάτων και προσθήκη 200 μl διαλύματος B3 και επώαση στους 70 °C επί 10 min. Ελαφριά ανάδευση των δειγμάτων.
4. Προσθήκη 210 μl αιθανόλης (96-100%) και ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα.
5. Τοποθέτηση ισάριθμων με τα δείγματα, ειδικών στηλών με μεμβράνη πυριτίου (NucleoSpin® Tissue Column) σε σωληνάρια συλλογής και μεταφορά του αιωρήματος που προέκυψε από το βήμα 4 στις στήλες. Φυγοκέντρηση στα 11000 x g επί 1 min. Απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο σωληνάριο συλλογής.
6. Προσθήκη 500 μl διαλύματος BW. Φυγοκέντρηση στα 11000 x g επί 1 min. Απομάκρυνση του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο σωληνάριο συλλογής. Προσθήκη 600 μl διαλύματος B5. Φυγοκέντρηση στα 11000 x g επί 1 min. Απομάκρυνση του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο σωληνάριο συλλογής.
7. Φυγοκέντρηση στα 11000 x g επί 1 min.
8. Τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5 ml και προσθήκη 100 μl διαλύματος BE προθερμασμένου στους 70 °C. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και φυγοκέντρηση στα 11000 x g επί 1 min. Συλλογή του διηθήματος και φύλαξή του στους -20 °C.

1.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η ανίχνευση όλων των υπό εξέταση παθογόνων πραγματοποιήθηκε με αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction [PCR]) σε θερμοκυκλοποιητή BioRad S1000 με τη χρήση εκκινητών οι οποίοι προτείνονται μέσα από την βιβλιογραφία που αναζητήθηκαν στην βάση PubMed και οι οποίοι περιγράφονται στον Πίνακα 2. Για την αξιολόγηση της απομόνωσης ολικού γονιδιωματικού DNA, εφαρμόστηκε PCR για ανίχνευση του μιτοχονδριακού γενετικού τόπου της κυτοχρωμικής οξειδάσης I (COI) των αρθροπόδων (227) με τους εκκινητές που επίσης περιγράφονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 5 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των υπό διερεύνηση παθογόνων μικροοργανισμών

| Παθογόνο | Γονίδιο | Εκκινητής | Ακολουθία Εκκινητή (5'→3') | Προϊόν PCR/μέγεθος σε ζεύγη βάσεων | Βιβλιογραφική Αναφορά |
|------------------------------|--|-------------------|--------------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| <i>Babesia</i> | 18S rRNA | BJ1 | GTCTTGTAATTGGAATGATGG | 411-452 | (228) |
| | | BN2 | TAGTTTATGGTTAGGACTACG | | |
| <i>Bartonella</i> | 16S-23S rRNA internal transcribed spacer (ITS) | 325s | CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG | 420-780 | (229) |
| | | 1100as | GAACCGACGACCCCCTGCTTGCAAAGCA | | |
| <i>Bartonella</i> | <i>glt(A)</i> | CSH1f | GCGAATGAAGCGTGCCTAAA | 359 | (230) |
| | | BhCS.1137 | AATGCAAAAAGAACAGTAAACA | | |
| <i>Borellia</i> | <i>hbb</i> | Hbb640 | GTAAGGAAATTAGTTTATGTCTTT | 153 | (231) |
| | | HbbBw | TAAGCTCTTCAAAAAAAGCATCTA | | |
| <i>Coxiella</i> | <i>htpB</i> gene | Q5 | GCGGGTGATGGTACCACAACA | 501 | (232) |
| | <i>htpB</i> gene | Q3 | GGCAATCACCAATAAGGGCCG | | |
| | <i>htpB</i> gene | Q6 | TTGCTGGAATGAACCCCA | 325 | |
| | <i>htpB</i> gene | Q4 | TCAAGCTCCGCACTCATG | | |
| <i>Ehrlichia / Anaplasma</i> | 16S rRNA | EHR16SD | GGTACCYACAGAAGAAGTCC | 345 | (229) |
| | | EHR16SR | TAGCACTCATCGTTTACAGC | | |
| <i>Francisella</i> | <i>lpaA</i> | FT593 | GYAGGTTTAGCKAGCTGTTCTAC | 233 | (233) |
| | | FT825 | GGAGCYTGCCATTGTAATCTTAC | | |
| <i>Rickettsia</i> | citrate synthase (<i>gltA</i>) | Rp CS.877p (for) | GGGGCCTGCTCACGGCGG | 380 | (229) |
| | | Rp CS.1258n (rev) | ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA | | |
| | outer membrane protein (<i>ompA</i>) | Rr 190.70p (for) | ATGGCGAATATTTCTCCAAAA | 532 | (232) |
| | | Rr 190.602n (rev) | AGTGCAGCATTGCTCCCCCT | | |
| Arthropods | CO1 | Ron | GGAGCYCCWGATATAGCTTTCCC | 488 | (227) |
| | | Nancy | CCTGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC | | |

Για κάθε αντίδραση παρασκευάστηκε Master Mix σε σωληνάριο Eppendorf 1.5 mL, συνολικού όγκου αντίστοιχου του συνολικού αριθμού των δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένου και του αρνητικού μάρτυρα) που αποτελείται από τις κατάλληλες ποσότητες (Πίνακας 6) των ακόλουθων αντιδραστηρίων:

- Thermo Scientific DreamTaq™ Buffer (10X) που περιείχε KCl και $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ καθώς και 20 mM MgCl_2 (Invitrogen™)
- Thermo Scientific DreamTaq™ DNA Polymerase 5 U/μL (500U) (Invitrogen™)
- Thermo Scientific dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 10 mM Invitrogen™
- ddH₂O (molecular biology grade)
- Δείγμα

Πίνακας 6 Στοιχειομετρία Master Mix για την αντίδραση PCR

| Αντιδραστήρια | Όγκος σε μl | Τελική συγκέντρωση | Αρχική συγκέντρωση |
|-----------------------|-------------|--------------------|--------------------|
| PCR Buffer (X) | 2.5 | 1 | 10 |
| dNTPs (mM) | 0.5 | 0.2 | 10 |
| Εκκινητής1 (mM) | 0.25 | 1 | 100 |
| Εκκινητής2 (mM) | 0.25 | 1 | 100 |
| Taq (U/μL) | 0.2 | 1 | 5 |
| DNA (μL) | 3 | | |
| H ₂ O (μL) | 18.3 | | |
| Total (λ) | 25 | | |

Το Master Mix αναδεύτηκε ήπια με τη χρήση με τη χρήση vortex και 22 μl διαμοιράστηκαν σε σωληνάκια Eppendorf 0.2 mL. Σε κάθε ένα από αυτά προστέθηκαν 3 μl δείγματος DNA. Στη συνέχεια τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή και εφαρμόστηκαν προγράμματα με διαφορετικές συνθήκες ανάλογα με το τμήμα του γονιδίου του προς εξέταση παθογόνου μικροοργανισμού. Συνολικά εξετάστηκαν οκτώ γένη παθογόνων μικροοργανισμών σε συμβατικές και εμφωλεασμένες αντιδράσεις PCR των οποίων οι συνθήκες παρατίθενται αναλυτικά:

Babesia: Ενίσχυση τμήματος γονιδίου 18S rRNA

- **Στάδιο αρχικής αποδιάταξης:** 94°C – 3 min
- **35 κύκλοι**
 - Αποδιάταξη: 94 °C – 30 sec
 - Υβριδισμός: 64 °C – 45 sec
 - Επιμήκυνση: 72 °C – 30 sec
- **Στάδιο τελικής επιμήκυνσης:** 72 °C – 7 min

Bartonella: Ενίσχυση τμήματος γονιδιακού τόπου 16S-23S rRNA ITS

- **Στάδιο αρχικής αποδιάταξης:** 94°C – 5 min
- **55 κύκλοι**
 - Αποδιάταξη: 94°C – 15 sec
 - Υβριδισμός: 66°C – 15 sec
 - Επιμήκυνση: 72°C – 15 sec
- **Στάδιο τελικής επιμήκυνσης:** 72 °C - 1min

Bartonella: Ενίσχυση τμήματος γονιδίου glt(A)

- **Στάδιο αρχικής αποδιάταξης:** 94°C - 5min
- **35 κύκλοι**
 - Αποδιάταξη: 94°C – 30 sec
 - Υβριδισμός: 52,5°C – 30 sec
 - Επιμήκυνση: 72°C – 30 sec
- **Στάδιο τελικής επιμήκυνσης:** 72 °C – 10 min

Borellia: Ενίσχυση τμήματος γονιδίου hbb

- **Στάδιο αρχικής αποδιάταξης:** 98°C – 30 sec
- **40 κύκλοι**
 - Αποδιάταξη: 98°C – 5 sec
 - Υβριδισμός: 57°C – 30 sec
 - Επιμήκυνση: 72°C – 10 sec
- **Στάδιο τελικής επιμήκυνσης:** 72 °C – 5 min

Coxiella: Ενίσχυση τμήματος γονιδίου htpB**Εξωτερική PCR με εκκινητές Q5/Q3**

- **Στάδιο αρχικής αποδιάταξης:** 94 °C – 3 min
- **36 κύκλοι**
 - Αποδιάταξη: 94 °C – 60 sec
 - Υβριδισμός: 56 °C – 60 sec
 - Επιμήκυνση: 72 °C – 60 sec
- **Στάδιο τελικής επιμήκυνσης:** 72°C – 4 min

Εσωτερική PCR με εκκινητές Q6/Q4

- **Στάδιο αρχικής αποδιάταξης:** 94 °C – 3 min
- **36 κύκλοι**
 - Αποδιάταξη: 94 °C – 60 sec
 - Υβριδισμός: 52 °C – 60 sec
 - Επιμήκυνση: 72 °C – 60 sec
- **Στάδιο τελικής επιμήκυνσης:** 72 °C – 4 min

Ehrlichia/Anaplasma: Ενίσχυση τμήματος γονιδίου 16S rRNA

- **Στάδιο αρχικής αποδιάταξης:** 94 °C - 5min
- **35 κύκλοι**
 - Αποδιάταξη: 94 °C – 30 sec
 - Υβριδισμός: 55 °C – 30 sec
 - Επιμήκυνση: 72 °C – 90 sec
- **Στάδιο τελικής επιμήκυνσης:** 72 °C – 5 min

Francisella: Ενίσχυση τμήματος γονιδίου IpnA

- **Στάδιο αρχικής αποδιάταξης:** 94 °C - 9min
- **40 κύκλοι**
 - Αποδιάταξη: 94 °C -15sec
 - Υβριδισμός: 60 °C - 60sec
 - Επιμήκυνση: 72 °C – 90 sec
- **Στάδιο τελικής επιμήκυνσης:** 65 °C – 7 min

Rickettsia: Ενίσχυση τμήματος γονιδίου gltA

- **Στάδιο αρχικής αποδιάταξης:** 94 °C - 5min
- **35 κύκλοι**
 - Αποδιάταξη: 94 °C – 30 sec
 - Υβριδισμός: 55 °C – 30 sec
 - Επιμήκυνση: 72 °C – 90 sec
- **Στάδιο τελικής επιμήκυνσης:** 72 °C – 5 min

1.3.3. Ηλεκτροφόρηση

Στην περίπτωση των συμβατικών και των εμφωλεασμένων PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των θετικών δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης. Με την ηλεκτροφόρηση γίνεται δυνατός ο διαχωρισμός του προϊόντος ή/και των προϊόντων της αντίδρασης PCR. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην κίνηση των τμημάτων DNA κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου διαμέσου των πόρων που δημιουργούνται στην πηκτή της αγαρόζης. Η θέση τους πάνω στην πηκτή αγαρόζης προσδιορίζεται με τη χρήση υπεριώδους φωτός και τη χρήση φθορίζουσας ουσίας (βρωμιούχου αιθιδίου, (EtBr)) που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 2%. Ηλεκτροφόρηση ακολούθησε μετά από κάθε PCR.

Η διαδικασία που εφαρμόστηκε ήταν η ακόλουθη:

Σε κωνική φιάλη 500 ml αναμίχθηκαν 100 ml TBE 0,5X με 2g αγαρόζης (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) ώστε να προκύψει διάλυμα αγαρόζης 2% w/v. Το διάλυμα αναδεύτηκε και θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων ώστε να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Προστέθηκε 10ml βρωμιούχο αιθίδιο, αναδεύτηκε και διαμοιράστηκε προσεκτικά στο εκμαγείο στο οποίο βρίσκονταν τα κατάλληλα χτενάκια. Έτσι

δημιουργήθηκαν τα φρεάτια στα οποία τοποθετήθηκαν τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα. Από κάθε δείγμα αναμίχθηκαν 5μl με 2μl κυανού της βρωμοφαινόλης (Loading dye) και τοποθετήθηκαν στα φρεάτια του πηκτώματος. Παράλληλα με τα δείγματα τοποθετήθηκε στο πρώτο και στο τελευταίο φρεάτιο μάρτυρας μοριακών βαρών Fast Gene 100bp DNA Marker 100 bp (DNA ladder (100 bp - 3000 bp)) Nippon Genetics. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στη συσκευή HU20 Maxi-Standard Horizontal με τροφοδοτικό Apelex PS 9009T σε τάση 104mV για 45min. Το πήκτωμα στη συνέχεια τοποθετήθηκε στη συσκευή υπεριώδους φωτός Bio-Rad GelDoc XR+ Gel Documentation System (Chemidoc XRS+ Gel Imaging System) και φωτογραφήθηκε με ενσωματωμένο σύστημα φωτογράφισης.

1.3.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Για την ανίχνευση βακτηρίων του γένους *Rickettsia* και *Wolbachia* (τάξη Rickettsiales) εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα real-time PCR σε θερμοκυκλοποιητή BioRad CFX96. Πιο συγκεκριμένα εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα που αφορούσαν την ανίχνευση ρικετσιών της ομάδας του κηλιδοβλατιδώδους πυρετού (SFG group) και *R. conorii* στους κρότνες. Εφαρμόστηκαν επίσης πρωτόκολλα για την ανίχνευση *Wolbachia* (PanWolbachia) και *W. Pipientis* καθώς και *R. felis* στους ψύλλους.

Στα στάδια προετοιμασίας της πειραματικής διαδικασίας περιλαμβάνεται η προετοιμασία του διαλύματος του πειράματος σύμφωνα με τον Πίνακα 7, ώστε να περιέχονται οι κατάλληλοι όγκοι του βασικού διαλύματος (Master Mix που περιέχει την Taq πολυμεράση), των εκκινητών και του ιχνηθέτη τύπου TaqMan.

Το διάλυμα διαμοιράστηκε σε σωληνάρια 0,1 ml (όσα και τα δείγματα συμπεριλαμβανομένου αρνητικού μάρτυρα και θετικού μάρτυρα) και ακολούθησε η προσθήκη του DNA των δειγμάτων. Το πρωτόκολλο περιλάμβανε τα στάδια της ενεργοποίησης της πολυμεράσης, την αποδιάταξη του DNA και στη συνέχεια τον υβριδισμό των εκκινητών και την επιμήκυνση σύμφωνα με την αναφερόμενη βιβλιογραφία του Πίνακα 9. Οι εκκινητές, οι ιχνηθέτες και οι γενετικοί τόποι που είναι οι ακολουθίες στόχοι για το κάθε παθογόνο περιγράφονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 7 Στοιχειομετρία Master Mix για την αντίδραση real time PCR

| Συστατικά | | Final conc.(20 μ L reaction) |
|-------------------------|-------------|----------------------------------|
| PCR-grade water | 4 μ L | N/A |
| qPCR Master Mix | 10 μ L | 1X |
| Εκκινητής1 (10 μ M) | 0.5 μ L | 100 – 400 nM |
| Εκκινητής2 (10 μ M) | 0.5 μ L | 100 – 400 nM |
| Ιχνηθέτης (10 μ M) | 0.5 μ L | 100 – 500 nM |
| Υπόστρωμα DNA | 5 μ L | <250 ng |

Πίνακας 8 Βήματα της real time PCR

| Βήμα | Θερμοκρασία. | Διάρκεια | Κύκλοι |
|--|--------------|---------------|--------|
| Ενεργοποίηση ενζύμου | 95°C | 5 min | 1 |
| Αποδιάταξη | 95°C | 10 sec | 40 |
| Υβριδισμός/επιμήκυνση/λήψη αποτελεσμάτων | 60°C | \geq 40 sec | |

Πίνακας 9 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση γονιδιακών τόπων βακτηρίων της τάξης *Rickettsiales*

| Παθογόνο | Γονίδιο | Ακολουθία εκκινητή / ιχνηθέτη (5'→3') | Προϊόν PCR/μέγεθος σε ζεύγη βάσεων | Βιβλιογραφική Αναφορά |
|--------------------------------------|----------------------------|--|------------------------------------|-----------------------|
| SFG <i>Rickettsia</i> genus specific | <i>gltA</i> | F: GTG-AAT-GAA-AGA-TTA-CAC-TAT-TTAT R: GTA- TCT-TAG-CAA-TCA-TTC-TAA-TAGC FAM-CTA TTA TGC TTG CGG CTG TCG GTT C-TAMRA | 166 | (234) |
| <i>Rickettsia conorii</i> | Putative acetyltransferase | F: TTG-GTA-GGC-AAG-TAG-CTA-AGC-AAA R: GGA-AGT-ATA-TGG-GAA-TGC-TTT-GAA FAM-GCG-GTT-ATT-CCT-GAA-AAT-AAG-CCG-GCA-TAMRA | 116 | (234) |
| <i>Rickettsia felis</i> specific | Biotin synthase | F: ATG-TTC-GGG-CTTCCG-GTA-TG R: CCG-ATT-CAG-CAGGTT-CTT-CAA 6-FAM- GCT-GCG-GCGGTA-TTT-TAG-GAA-TGGG-TAMRA | 120 | (86) |
| PanWolbachia | 23S ribosomal RNA | F: CCA-AAA-TTA-CAG-CTA-AGT-GG R: AGT-GAG-CTG-TTA-CGC-TTT-CT 6-FAM-TAC-AGC-TAG-GAG-GTT-GGC-TT-TAMRA | 100 | (235) |
| <i>Wolbachia pipientis</i> | <i>rpoB</i> | F: TCA-TGC-GCG-TTC-AGT-AGGAC R: TGC-CCA-ACA-TTC-CAT-TTC-AC 6-FAM-AGG-AAA-GTC-TCA-TTT-TGG-TGG-TAGCG-TAMRA | 103 | (Αυτή η εργασία) |

1.3.5. Αλληλούχιση (Εύρεση Πρωτοδιάταξης)

Προκειμένου να αλληλουχηθούν, τα προϊόντα PCR καθαρίστηκαν με ειδικό κιτ αντιδραστηρίων ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα εκκινητών και dNTPs. Για το σκοπό αυτό (μετά από ηλεκτροφόρηση) αφαιρέθηκαν από την πηκτική αгарόζης πάνω στην τράπεζα υπεριώδους με την χρήση κατάλληλο νυστεριού, τα τεμάχια του πηκτώματος που περιείχαν το αντίστοιχο προϊόν της PCR τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια Eppendorf 1,5mL και καθαρίστηκαν με το κιτ αντιδραστηρίων NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της εταιρείας Macherey-Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

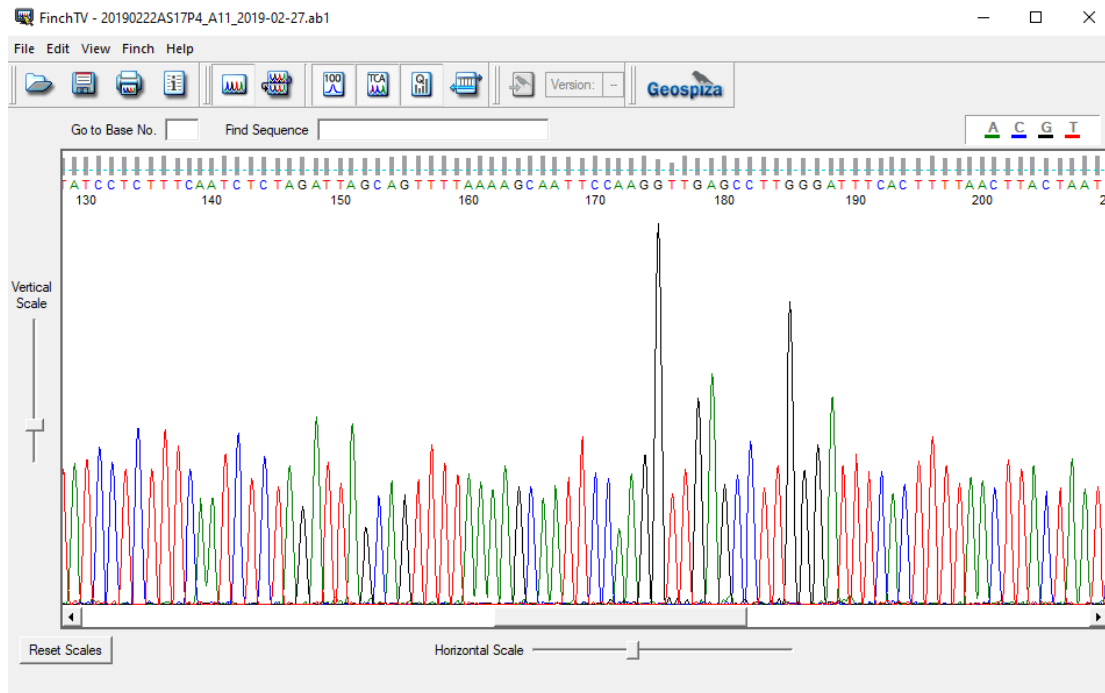
Η διαδικασία καθαρισμού για κάθε θετικό δείγμα, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το εγχειρίδιο User Manual NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Tissue, 2017 και ήταν η ακόλουθη:

1. Αποκοπή τμήματος πηκτής αгарόζης με το τμήμα του DNA, με τη βοήθεια νυστεριού πάνω σε ειδική τράπεζα φθορισμού (UV transilluminator). Μεταφορά του σε σωληνάριο Eppendorf και ζύγισή του ώστε να προσδιοριστεί ο απαιτούμενος όγκος διαλύματος NT1. Για κάθε 100 mg πηκτής αгарόζης <2%, προστίθενται 200 μ L διαλύματος NT1. Ακολουθεί επώαση στους 50 °C για 10 min ώστε να ρευστοποιηθεί πλήρως η πηκτική αгарόζης σε κάθε σωληνάριο.
2. Τοποθέτηση των στηλών NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up σε σωληνάρια συλλογής και μεταφορά 700 μ L από το διάλυμα που προέκυψε στο προηγούμενο βήμα. Φυγοκέντρηση στα 11000 x g επί 30 sec. Απομάκρυνση του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο σωληνάριο συλλογής. Επανάληψη της διαδικασίας με το υπόλοιπο μέρος του διαλύματος που προέκυψε κατά το βήμα 1.
3. Προσθήκη 500 μ l διαλύματος NT3 σε κάθε στήλη και φυγοκέντρηση στα 11000 x g επί 30 sec. Απομάκρυνση του διηθήματος και επανάληψη της διαδικασίας πλύσης ώστε να ελαχιστοποιηθεί η ποσότητα των χαοτροπικών αλάτων.
4. Φυγοκέντρηση στα 11000 x g επί 1 min για πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος NT3. Επιπλέον επώαση των στηλών σε θερμοκρασία 70 °C επί 5 min.
5. Τοποθέτηση των στηλών σε σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5 ml και προσθήκη 30 μ l διαλύματος NE. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και φυγοκέντρηση στα 11000 X g επί 1 min. Συλλογή του διηθήματος που περιέχει το καθαρισμένο προϊόν της PCR.

Τα καθαρισμένα προϊόντα PCR, εστάλησαν στην εταιρεία CeMIA μαζί με τους αντίστοιχους εκκινητές (συγκέντρωσης 5 pmol/ μ L ανά αντίδραση). Με τη μέθοδο

κατά Sanger και χρήση του αυτόματου αναλυτή αλληλουχιών ABI3730xl έγινε η εύρεση της πρωτοδιάταξης και προς τις δύο κατευθύνσεις. Από κάθε δείγμα προέκυψαν δύο αλληλουχίες που απεικονίστηκαν σε αντίστοιχα χρωματογραφήματα. Η επεξεργασία τους έγινε με το πρόγραμμα FinchTV 1.3.1 και από αυτή προέκυψε η τελική αλληλουχία η οποία κατατέθηκε στη βάση GenBank.

Παρατίθεται ενδεικτική εικόνα χρωματογραφήματος (Εικόνα 29).



Εικόνα 29 Χρωματογράφημα από την αλληλούχιση τμήματος γονιδιακού τόπου 16S-23S rRNA ITS *Bartonella spp.* με χρήση του προγράμματος FinchTV 1.3.1

1.3.6. Βιοπληροφορική ανάλυση αλληλουχιών

Όλες οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν μέσω του λογισμικού BLAST (blastn suite) το οποίο συγκρίνει τις νουκλεοτιδικές ακολουθίες και υπολογίζει την στατιστική σημαντικότητα ούτως ώστε να βρεθεί η ομολογία τους με άλλες που έχουν ήδη κατατεθεί στην βάση GenBank®. Από σύγκριση και τον βαθμό ομολογίας ταυτοποιήθηκαν τα βακτηριακά είδη που ανιχνεύτηκαν στην παρούσα εργασία. Ακολούθησε η υποβολή των αλληλουχιών στην βάση GenBank®, η απόδοση των αριθμών πρόσβασης (accession numbers) και η δημοσίευσή τους στη νουκλεοτιδική βάση δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (NCBI Nucleotide database) των Η.Π.Α.

1.3.7. Φυλογενετική ανάλυση

Η φυλογενετική ανάλυση μας επιτρέπει να συγκρίνουμε αλληλουχίες και να εκτιμήσουμε πόσο σχετίζονται εξελικτικά μεταξύ τους μέσω της κατασκευής φυλογενετικών δέντρων. Μπορεί να διεξαχθεί με νουκλεοτιδικές ή πρωτεϊνικές αλληλουχίες. Με την ανάλυση αυτή οι πιο σχετιζόμενες εξελικτικά αλληλουχίες καταλαμβάνουν γειτονικούς κλάδους σε ένα δέντρο. Τα φυλογενετικά δέντρα που προκύπτουν μπορεί να είναι με ρίζα ή χωρίς. Στην πρώτη περίπτωση μπορούμε να προσδιορίσουμε τον κοινό πρόγονο άρα και την εξελικτική διαδικασία ενώ στη δεύτερη δεν μπορούμε να προσδιορίζουμε την κατεύθυνση κατά την οποία συντελέστηκε η εξελικτική διαδικασία (236).

Η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων, αποτελείται από τέσσερα διακριτά στάδια:

- **Την πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών.** Προϋποθέτει την αναζήτηση νουκλεϊκών ακολουθιών σε αντίστοιχες βάσεις δεδομένων, την περικοπή τους ώστε να στοιχίζονται ακολουθίες που έχουν παρόμοιο μήκος, την εκτέλεση του κατάλληλου προγράμματος πολλαπλής στοίχισης και πολλές φορές απαιτείται επιπλέον χειροκίνητη επεξεργασία. Αποτελεί το πιο σημαντικό στάδιο της διαδικασίας.
- **Τον καθορισμό του μοντέλου αντικατάστασης.** Αυτή είναι μια απαίτηση των περισσότερων μεθόδων (με εξαίρεση αυτή της Μέγιστης Φειδωλότητας) και χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή, καθώς ένα απλό μοντέλο μπορεί να κάνει εύκολους τους υπολογισμούς αλλά μπορεί να μην είναι ρεαλιστικό.
- **Την κατασκευή του δέντρου.** Η φυλογενετική πρόβλεψη μπορεί να στηριχτεί σε μεθόδους που χρησιμοποιούν τις αποστάσεις (distance methods) όπως η μέθοδος Ένωσης Γειτόνων (Neighbor Joining) και σε αυτές που χρησιμοποιούν ευρετικές μεθόδους (heuristic methods) όπως η μέθοδος της Μέγιστης Φειδωλότητας (Maximum Parsimony) και η μέθοδος της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood). Οι πρώτες υπολογίζουν τις αποστάσεις συγκρίνοντας κάθε ζεύγος των ακολουθιών. Οι δεύτερες βασίζονται σε χαρακτήρες και τους χρησιμοποιούν με τρόπο ώστε η θέση του κάθε χαρακτήρα να εκτιμάται σε συνάρτηση με τις θέσεις των υπολοίπων χαρακτήρων.
- **Την αξιολόγηση του δέντρου.** Συνήθως γίνεται με τη μέθοδο bootstrap. Κατά τη μέθοδο αυτή τα δεδομένα επανα-ομαδοποιούνται μέσω τυχαία επιλεγμένων κάθετων στηλών από τις στοιχισμένες ακολουθίες ώστε να παραχθεί μία νέα συστοιχία του ίδιου μήκους. Κάθε στήλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί περισσότερες από μία φορές και τα δέντρα προκύπτουν από

πολλές από αυτές συστοιχίες των επανα-ομαδοποιημένων ακολουθιών. Η σημαντικότητα των κλάδων στηρίζεται όταν μεγάλο ποσοστό (>70%) των επανα-ομαδοποιήσεων δίνουν τους κλάδους αυτούς (237).

Στην παρούσα εργασία για τη φυλογενετική ανάλυση επιλέχθηκαν από την GenBank ακολουθίες ειδών *Bartonella* με βάση τον 16S-23S rRNA ITS γενετικό τόπο και ακολουθίες *Ehrlichia canis*, *Wolbachia pipientis* και *Candidatus Midichloria mitochondrii* με βάση το γονίδιο 16S rRNA. Οι ακολουθίες και τα αντίστοιχα είδη που επιλέχθηκαν για την φυλογενετική ανάλυση του γενετικού τόπου 16S/23S rRNA ITS *Bartonella* spp., γονιδίου 16S RNA *Ehrlichia* spp., γονιδίου 16S RNA *Wolbachia pipientis* και γονιδίου 16S RNA *Candidatus Midichloria mitochondrii* περιγράφονται στους Πίνακες 10, 11, 12 και 13 αντίστοιχα.

Οι ακολουθίες των ειδών *Bartonella* spp., *Ehrlichia* spp., *Wolbachia pipientis* και *Candidatus Midichloria mitochondrii* στοιχήθηκαν με χρήση του προγράμματος ClustalX (Παράρτηματα 2,3,4,5). Χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα φυλογενετικής ανάλυσης MEGA 11 (238) (<https://www.megasoftware.net/>) και PHYLIP (239) (Phylogenetic Inference Package, <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Εφαρμόστηκε η μέθοδος της Μέγιστης Πιθανοφάνειας και η αξιοπιστία ελέγχθηκε με την μέθοδο bootstrap με 1000 επαναλήψεις.

Πίνακας 10 Περιγραφή των ειδών/ στελεχών *Bartonella* spp. που χρησιμοποιήθηκαν για τη φυλογενετική ανάλυση του γενετικού τόπου 16S/23S rRNA ITS

| Κωδικός | Περιγραφή | Είδος / Στέλεχος | Γεωγραφική Περιοχή | Πηγή απομόνωσης | Γενετικός τόπος |
|----------|--------------------------------------|------------------|--------------------|-----------------------------|------------------|
| AB602564 | <i>Bartonella acomydis</i> | | Agypt | <i>Acomys russatus</i> | 16S/23S rRNA ITS |
| AF312506 | <i>Bartonella alsatica</i> | | Unknown | CIP 105477 | 16S/23S rRNA ITS |
| HM622140 | <i>Bartonella florencae</i> | | France | <i>Crocidura russula</i> | 16S/23S rRNA ITS |
| L35100 | <i>Bartonella quintana</i> | | Uknown | ---- | 16S/23S rRNA ITS |
| AF312490 | <i>Bartonella koehlerae</i> | | Uknown | ATCC 700693 | 16S/23S rRNA ITS |
| KX499345 | <i>Bartonella koehlerae</i> | subsp. Bothieri | Namibia | <i>Acinonyx jubatus</i> | 16S/23S rRNA ITS |
| L35101 | <i>Bartonella henselae</i> | strain Houston | Uknown | ----- | 16S/23S rRNA ITS |
| HM636451 | <i>Bartonella senegalensis</i> | | Senegal | <i>Ornithodoros sonrai</i> | 16S/23S rRNA ITS |
| AB602557 | <i>Bartonella jaculi</i> | | Egypt | <i>Jaculus orientalis</i> | 16S/23S rRNA ITS |
| AB602558 | <i>Bartonella jaculi</i> | | Egypt | <i>Jaculus orientalis</i> | 16S/23S rRNA ITS |
| EU294521 | <i>Bartonella volans</i> | | USA | <i>Glaucomys volans</i> | 16S/23S rRNA ITS |
| AB674252 | <i>Bartonella washoensis</i> | | Japan | <i>Tamias sibiricus</i> | 16S/23S rRNA ITS |
| AB602561 | <i>Bartonella pachyuromydis</i> | | Netherlands | <i>Pachyuromys duprasi</i> | 16S/23S rRNA ITS |
| JF766267 | <i>Bartonella tribocorum</i> | | Georgia | <i>Apodemus sylvaticus</i> | 16S/23S rRNA ITS |
| AF312504 | <i>Bartonella vinsonii</i> | subsp. Arupensis | Uknown | ATCC 700727 | 16S/23S rRNA ITS |
| AB498009 | <i>Bartonella capreoli</i> | | Japan | <i>Apodemus</i> sp. mouse | 16S/23S rRNA ITS |
| AB498007 | <i>Bartonella japonica</i> | | Japan | <i>Apodemus argenteus</i> | 16S/23S rRNA ITS |
| EU111770 | <i>Bartonella cooperiplainsensis</i> | | Australia | Australian rat | 16S/23S rRNA ITS |
| AB602559 | <i>Bartonella callosciuri</i> | | Thailand | <i>Callosciurus notatus</i> | 16S/23S rRNA ITS |
| AB602560 | <i>Bartonella callosciuri</i> | | Thailand | <i>Callosciurus notatus</i> | 16S/23S rRNA ITS |
| AB498008 | <i>Bartonella silvatica</i> | | Japan | <i>Apodemus speciosus</i> | 16S/23S rRNA ITS |
| AF312494 | <i>Bartonella bacilliformis</i> | | Peru | Human Blood | 16S/23S rRNA ITS |
| KP720651 | <i>Bartonella ancashensis</i> | | Peru | Human Blood | 16S/23S rRNA ITS |
| DQ538396 | <i>Bartonella australis</i> | | Australia | Kangaroo | 16S/23S rRNA ITS |
| EU589237 | <i>Bartonella clarridgeiae</i> | | China | Cat | 16S/23S rRNA ITS |

Πίνακας 11 Περιγραφή των στελεχών *Ehrlichia* spp. που χρησιμοποιήθηκαν για τη φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA

| Κωδικός | Περιγραφή | Στέλεχος | Γεωγραφική Περιοχή | Πηγή απομόνωσης | Γενετικός τύπος |
|-----------|------------------------------|--------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------|
| MN922610 | <i>Ehrlichia canis</i> | isolate VH1-58 | Greece | <i>Canis lupus familiaris</i> | 16S rRNA |
| MN227484 | <i>Ehrlichia canis</i> | strain NJ32 | Iraq | <i>Canis lupus familiaris</i> | 16S rRNA |
| MK507008 | <i>Ehrlichia canis</i> | clone CuD125 | Cuba | <i>Canis lupus familiaris</i> | 16S rRNA |
| EF011111 | <i>Ehrlichia canis</i> | strain GR78 | Greece | <i>Canis lupus familiaris</i> | 16S rRNA |
| AF373612 | <i>Ehrlichia canis</i> | isolate VHE | Venezouela | <i>Homo sapiens</i> | 16S rRNA |
| NR_118741 | <i>Ehrlichia canis</i> | strain Oklahoma | USA | ----- | 16S rRNA |
| AB934388 | <i>Ehrlichia canis</i> | ----- | Uganda | Tick | 16S rRNA |
| AF156786 | <i>Ehrlichia canis</i> | strain Gxht67 | China | Tick | 16S rRNA |
| KJ410257 | <i>Ehrlichia</i> sp. | BL157-9 | China | <i>Hyalomma asiaticum</i> | 16S rRNA |
| AB934389 | <i>Ehrlichia</i> sp. | JN-2014 | Uganda | Tick | 16S rRNA |
| GU227701 | <i>Ehrlichia</i> sp. | Yunnan | Uganda | <i>Apodemus latronum</i> | 16S rRNA |
| NR_037059 | <i>Ehrlichia chaffeensis</i> | strain Arkansas | USA | ----- | 16S rRNA |
| KX987321 | <i>Ehrlichia</i> sp. | strain WHHLDGH-5 | China | <i>Haemaphysalis longicornis</i> | 16S rRNA |
| KU535865 | <i>Ehrlichia muris</i> | isolate Est1709 | Estonia | <i>Ixodes persulcatus</i> | 16S rRNA |
| NR_148800 | <i>Ehrlichia minasensis</i> | strain UFMG-EV | Brazil | <i>Rhipicephalus microplus</i> | 16S rRNA |
| MN148616 | <i>Ehrlichia ewingii</i> | strain Hubei CW46 | China | <i>Haemaphysalis flava</i> | 16S rRNA |
| NR_025962 | <i>Ehrlichia muris</i> | strain AS145 | Unknown | <i>Eothenomys kageus</i> | 16S rRNA |
| AB013008 | <i>Ehrlichia muris</i> | ----- | Japan | <i>Apodemus speciosus</i> | 16S rRNA |
| KJ410251 | <i>Ehrlichia</i> sp. | TC248-16 | China | <i>Dermacentor nuttalli</i> | 16S rRNA |
| LC386012 | <i>Ehrlichia</i> sp. | It20 | Japan | <i>Ixodes turdus</i> | 16S rRNA |
| MZ433241 | <i>Ehrlichia chaffeensis</i> | strain Shihezi | China | <i>Canis lupus familiaris</i> | 16S rRNA |
| AB211162 | <i>Ehrlichia</i> sp. | SS15-E-L | Japan | Deer | 16S rRNA |
| MK757649 | <i>Ehrlichia canis</i> | strain Mizoram | India | <i>Rhipicephalus sanguineus</i> | 16S rRNA |
| MZ323326 | <i>Ehrlichia canis</i> | isolate 117PE | Brazil | <i>Felis catus</i> | 16S rRNA |
| MN148607 | <i>Ehrlichia ewingii</i> | strain Hubei CW22 | China | <i>Haemaphysalis flava</i> | 16S rRNA |
| MK757650 | <i>Ehrlichia canis</i> | strain Aizawl | India | <i>Rhipicephalus sanguineus</i> | 16S rRNA |
| DQ647615 | <i>Ehrlichia ruminantium</i> | strain Kiswani | Unknown | ----- | 16S rRNA |
| KU586082 | <i>Ehrlichia</i> sp. | isolate WHAEAL-144 | China | <i>Aedes albopictus</i> | 16S rRNA |
| NR_074513 | <i>Ehrlichia ruminantium</i> | strain Welgevonden | Unknown | <i>Amblyomma hebraeum</i> | 16S rRNA |

Πίνακας 12 Περιγραφή των στελεχών *Wolbachia pipientis* που χρησιμοποιήθηκαν για τη φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA

| Κωδικός | Περιγραφή | Στέλεχος | Γεωγραφική Περιοχή | Πηγή απομόνωσης | Γενετικός τόπος |
|----------|---|--------------------------------------|--------------------|---------------------------------|-----------------|
| MF944223 | <i>Wolbachia pipientis</i> | isolate_Anopheles_gambiae_wAnga_Mali | ----- | <i>Anopheles gambiae</i> | 16S rRNA |
| LN864488 | <i>Wolbachia pipientis</i> | strain_478 | Spain---- | <i>Ctenocephalides</i> sp. | 16S rRNA |
| AY026912 | <i>Wolbachia pipientis</i> | ----- | Belgium | <i>Lycoriella solani</i> | 16S rRNA |
| AY227740 | <i>Wolbachia</i> sp. | wCer1 | Hungary | <i>Rhagoletis cerasi</i> | 16S rRNA |
| GU724968 | <i>Wolbachia pipientis</i> | isolate_56ZLIN | Slovakia | <i>Ixodes ricinus</i> | 16S rRNA |
| AY833061 | <i>Wolbachia pipientis</i> | wRi | France | <i>Drosophila simulans</i> | 16S rRNA |
| OM438142 | <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Ctenocephalides felis</i> | isolate_V12 | Iran | <i>Ctenocephalides felis</i> | 16S rRNA |
| MN853993 | <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Ctenocephalides canis</i> | clone_LG1 | China | <i>Ctenocephalides canis</i> | 16S rRNA |
| MH521187 | <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Ctenocephalides canis</i> | isolate_ERUWolCcan2 | Turkey | <i>Ctenocephalides canis</i> | 16S rRNA |
| AJ628416 | <i>Wolbachia pipientis</i> | ----- | Italy | <i>Ctenocephalides felis</i> | 16S rRNA |
| AY335935 | <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Xenopsylla cheopis</i> | ----- | Brazil | <i>Xenopsylla cheopis</i> | 16S rRNA |
| MH618380 | <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Cimex lectularius</i> | strain_Bel-42 | Serbia | <i>Cimex lectularius</i> | 16S rRNA |
| AY335932 | <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Phtiropsylla agenoris</i> | ----- | Argentina | <i>Phtiropsylla agenoris</i> | 16S rRNA |
| AJ306315 | <i>Wolbachia pipientis</i> | strain_trb1/tb | Hungary | <i>Trachelipus ratzeburgii</i> | 16S rRNA |
| KF751211 | <i>Wolbachia pipientis</i> | isolate_191062 | China | <i>Stomaphis sinisalicis</i> | 16S rRNA |
| EU780684 | <i>Wolbachia pipientis</i> | strain_papa01 | Tunisia | <i>Phlebotomus papatasi</i> | 16S rRNA |
| DQ235287 | <i>Wolbachia pipientis</i> | strain_wSh | Greece | <i>Drosophila sechellia</i> | 16S rRNA |
| AF501664 | <i>Wolbachia pipientis</i> | ----- | USA | <i>Homalodisca coagulata</i> | 16S rRNA |
| AY566424 | <i>Wolbachia pipientis</i> | strain_wCalt2 | Panama | <i>Chelymorphia alternans</i> | 16S rRNA |
| MF581595 | <i>Wolbachia</i> sp. | isolate_SYM-210 | Pakistan | <i>Bemisia tabaci</i> | 16S rRNA |
| GQ981315 | <i>Wolbachia pipientis</i> | strain_wFlu | Brazil | <i>Aedes fluviatilis</i> | 16S rRNA |
| MW727486 | <i>Wolbachia pipientis</i> | isolate_MA66_ROPascani | Romania | <i>Myrmecophilus acervorum</i> | 16S rRNA |
| MT554839 | <i>Wolbachia pipientis</i> | clone_PY_KM2017 | China | <i>Epipemphigus yunnanensis</i> | 16S rRNA |
| AY335923 | <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Ctenocephalides felis</i> | ----- | Peru | <i>Ctenocephalides felis</i> | 16S rRNA |
| AY335926 | <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Pullex irritans</i> | ----- | USA | <i>Pulex irritans</i> | 16S rRNA |
| MG977004 | <i>Wolbachia</i> sp. | isolate_165_MED_BragancaSP | Brazil | <i>Bemisia tabaci</i> | 16S rRNA |
| KY345413 | <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Ctenocephalides felis</i> | isolate_ALSK01 | Kazakhstan | <i>Ctenocephalides felis</i> | 16S rRNA |
| DQ402518 | <i>Ca. Wolbachia inokumae</i> | ----- | France | <i>Phlebotomus perniciosus</i> | 16S rRNA |
| U23709 | <i>Wolbachia pipientis</i> | ----- | ----- | <i>Culex pipiens</i> | 16S rRNA |

Πίνακας 13 Περιγραφή των στελεχών *Candidatus Midichloria mitochondrii* που χρησιμοποιήθηκαν για τη φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA

| Κωδικός | Περιγραφή | Στέλεχος | Γεωγραφική Περιοχή | Πηγή απομόνωσης | Γενετικός Τύπος |
|----------|--|----------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------|
| KX359181 | <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii | isolate PoTiPL0120dt | Portugal | <i>Ixodes ricinus</i> | 16S rRNA |
| KU559921 | <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii | isolate 58cda | France | <i>Ixodes ricinus</i> | 16S rRNA |
| OM982404 | <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii | clone VEHR human | Italy | <i>Homo sapiens</i> | 16S rRNA |
| HF568841 | <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii | strain MA7 | Italy | <i>Equus caballus</i> | 16S rRNA |
| AJ566640 | <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii | ----- | Italy | <i>Ixodes ricinus</i> | 16S rRNA |
| MZ954838 | <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii | clone IRIC HS ITA | Italy | <i>Ixodes ricinus</i> | 16S rRNA |
| HF568843 | <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii | strain NI1 | Italy | <i>Equus caballus</i> | 16S rRNA |
| LC381237 | <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii | ----- | Ghana | <i>Ixodes aulacodi</i> | 16S rRNA |
| MK416236 | <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii | clone 372F2 | Tunisia | <i>Hyalomma dromedarii</i> | 16S rRNA |
| MW092748 | <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii | isolate QtHaT10 | Qatar | <i>Hyalomma aegyptium</i> | 16S rRNA |
| AM411593 | <i>Candidatus</i> Midichloria sp. AtubES1 | isolate AtubES1 | Italy | <i>Amblyomma tuberculatum</i> | 16S rRNA |
| MK416239 | <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii | clone 88M2 | Tunisia | <i>Hyalomma dromedarii</i> | 16S rRNA |
| HF568840 | <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii | strain OV2 | Italy | <i>Ovis aries</i> | 16S rRNA |
| AM411590 | <i>Candidatus</i> Midichloria sp. HymarES1 | isolate HymarES1 | Italy | <i>Hyalomma marginatum</i> | 16S rRNA |
| KX359182 | <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii | isolate PoTiPL0192dt | Portugal | <i>Hyalomma lusitanicum</i> | 16S rRNA |
| HF568836 | <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii | strain AG7 | Italy | <i>Canis lupus familiaris</i> | 16S rRNA |
| LR742710 | <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii | isolate FJ8-24 | Malaysia | <i>Haemaphysalis wellingtoni</i> | 16S rRNA |
| MT965821 | <i>Candidatus</i> Midichloria sp. | isolate Hap2 | Brazil | <i>Amblyomma tigrinum</i> | 16S rRNA |
| FM992373 | <i>Candidatus</i> Midichloria sp. | isolate Ixholo2 | Australia | <i>Ixodes holocyclus</i> | 16S rRNA |
| HG793392 | <i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii | strain CB8 | Italy | <i>Canis lupus familiaris</i> | 16S rRNA |
| AM181356 | <i>Candidatus</i> Midichloria symbiont of <i>Hyalomma marginatum</i> | strain 3 | Unknown | <i>Hyalomma marginatum</i> | 16S rRNA |
| AM181355 | <i>Candidatus</i> Midichloria symbiont of <i>Hyalomma marginatum</i> | strain 2 | Unknown | <i>Hyalomma marginatum</i> | 16S rRNA |
| AM181354 | <i>Candidatus</i> Midichloria symbiont of <i>Hyalomma marginatum</i> | strain 1 | Unknown | <i>Hyalomma marginatum</i> | 16S rRNA |
| MW648737 | <i>Lariskella</i> endosymbiont of <i>Ixodes persulcatus</i> | clone JLIp591 | Unknown | ----- | 16S rRNA |
| LR585338 | <i>Candidatus</i> Cyrtobacter sp. (ex <i>Euplotes eurytomus</i>) | ----- | | <i>Euplotes eurytomus</i> | 16S rRNA |
| JQ726712 | <i>Candidatus</i> Lariskella arthropodarum | clone NpLaKsw | Japan | <i>Nysius plebeius</i> | 16S rRNA |
| AF069962 | <i>Candidatus</i> Jidaibacter acanthamoeba | ----- | Unknown | <i>Acanthamoeba</i> sp. | 16S rRNA |
| JF714221 | <i>Rickettsia</i> sp. H820 | ----- | China | ----- | 16S rRNA |
| HE978250 | <i>Candidatus</i> Cyrtobacter zanobii | ----- | Italy | <i>Euplotes aediculatus</i> | 16S rRNA |
| AB746412 | <i>Lariskella</i> endosymbiont of <i>Curculio morimotoi</i> | isolate: P124 2 | Japan | <i>Curculio morimotoi</i> | 16S rRNA |

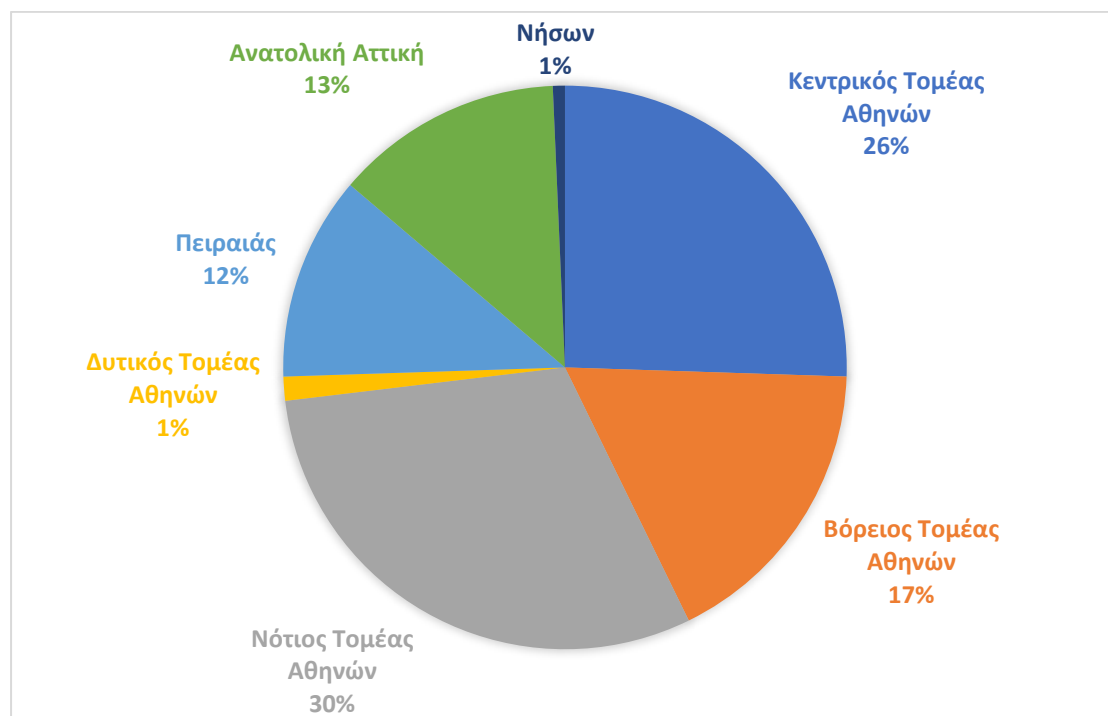
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αυτή η σελίδα σκοπίμως είναι λευκή.

2. Αποτελέσματα

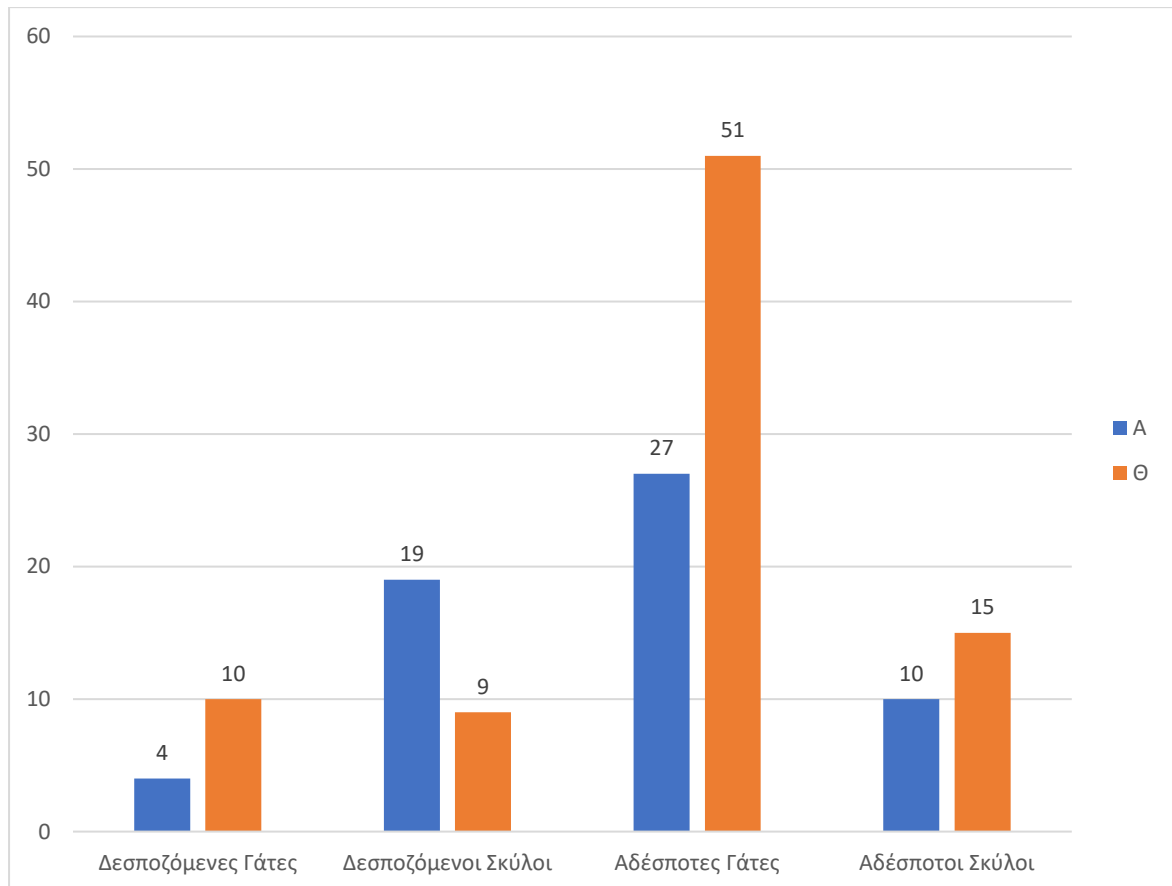
2.1. Δειγματοληψία

Στην παρούσα διδακτορική εργασία συλλέχθηκαν συνολικά 312 εκτοπαράσιτα, ψύλλοι και κρότωνες από 145 ξενιστές, σκύλους και γάτες που προέρχονταν από 39 περιοχές της Αττικής. Οι περιοχές αυτές ανήκαν στις 7 περιφερειακές ενότητες της Αττικής Περιφερειακή Ενότητα Κεντρικού Τομέα Αθήνας, Περιφερειακή Ενότητα Βόρειου Τομέα Αθήνας, Περιφερειακή Ενότητα Νότιου Τομέα Αθήνας, Περιφερειακή Ενότητα Δυτικού Τομέα Αθήνας, Περιφερειακή Ενότητα Ανατολικής Αττικής, Περιφερειακή Ενότητα Πειραιά και Περιφερειακή Ενότητα Νήσων. Τα περισσότερα ζώα ξενιστές προέρχονται από τον Νότιο Τομέα Αθήνας και ακολουθεί σε αριθμό δειγμάτων ο Κεντρικός Τομέας Αθήνας, ο Βόρειος Τομέας, η Ανατολική Αττική, Περιφερειακή Ενότητα Πειραιά, ο Δυτικός Τομέας και η Περιφερειακή Ενότητα Νήσων όπως αποτυπώνεται στο Γράφημα 1.



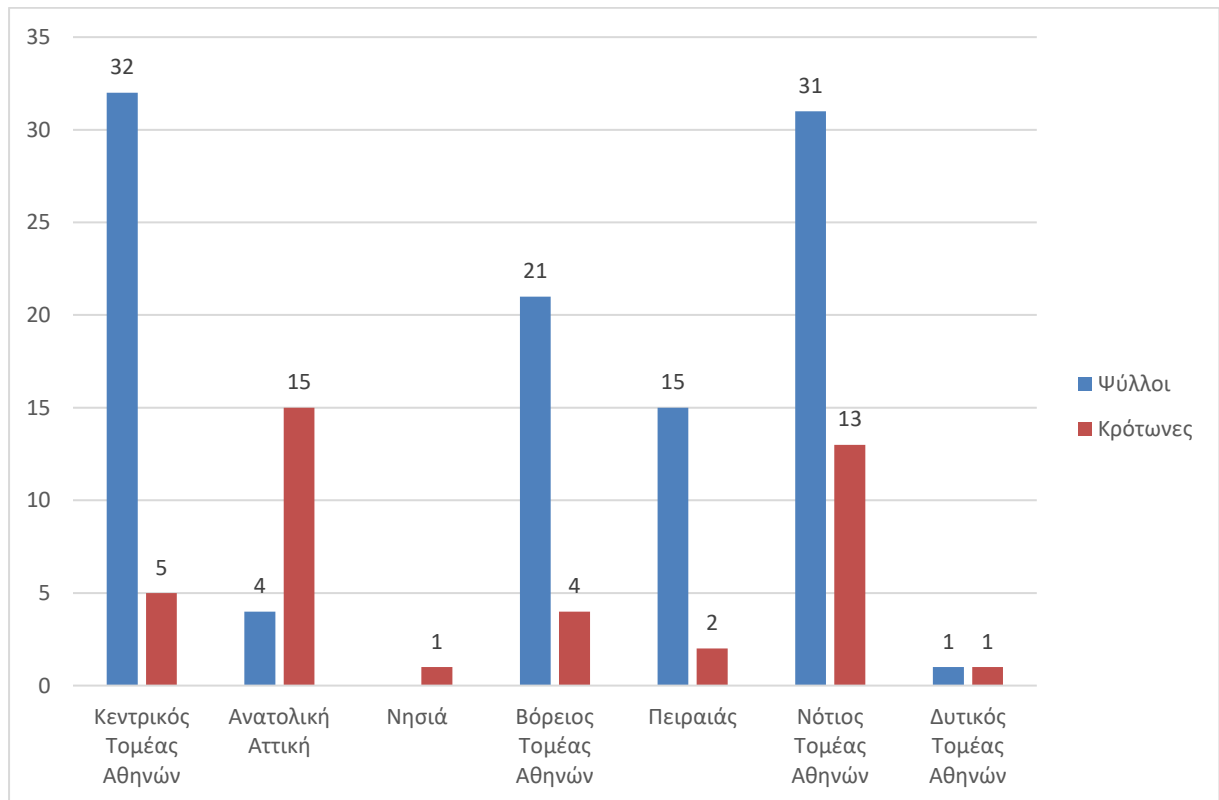
Γράφημα 1 Κατανομή των δειγμάτων ανά Περιφερειακή Ενότητα νομού Αττικής

Από τα 145 ζώα, τα 53 ήταν σκύλοι (28 δεσποζόμενοι και 25 αδέσποτοι / 24 θηλυκοί και 29 αρσενικοί) και τα 92 γάτες (14 δεσποζόμενες και 78 αδέσποτες / 61 θηλυκές και 31 αρσενικές) όπως αποτυπώνεται στο Γράφημα 2.



Γράφημα 2 Κατανομή ανά φύλο συνόλου δεσποζόμενων και αδέσποτων ξενιστών

Από κανένα ζώο δεν συλλέχθηκαν ταυτόχρονα εκτοπαράσιτα και των δύο κατηγοριών. Συνολικά εξετάσθηκαν μεμονωμένα 145 εκτοπαράσιτα (1 από κάθε ζώο). Από αυτά τα 104 ήταν ψύλλοι και τα 41 κρότωνα. Η κατανομή τους ανά περιφερειακή ενότητα, απεικονίζεται στο Γράφημα 3.



Γράφημα 3 Κατανομή των εξετασθέντων εκτοπαράσιτων ανά περιφερειακή ενότητα

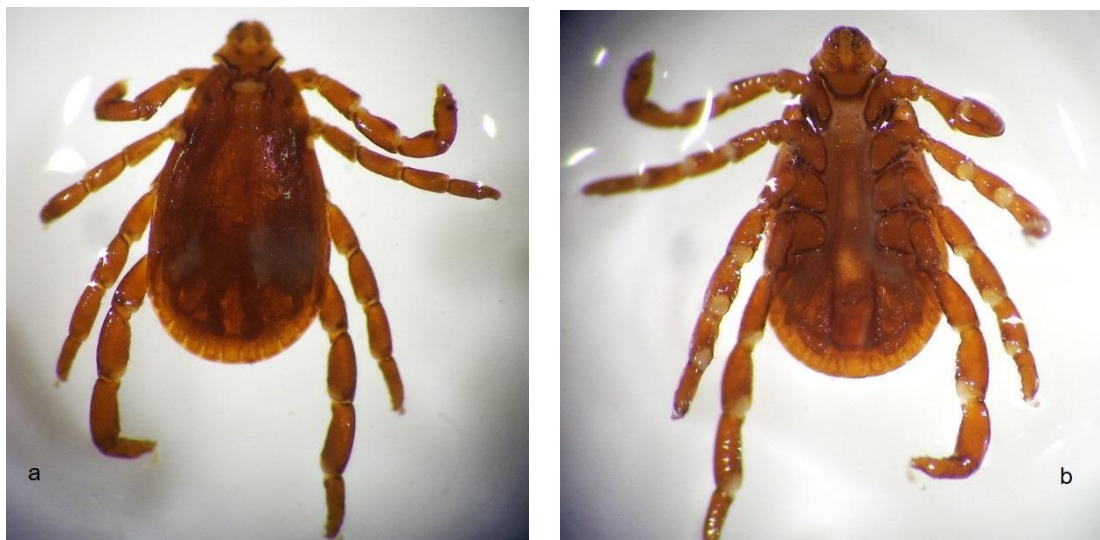
Από τους 104 ψύλλους, οι 86 προέρχονταν από γάτες (15 δεσποζόμενες / 73 αδέσποτες) και 18 προέρχονταν από σκύλους (12 δεσποζόμενους / 6 αδέσποτους). Από τους 41 κρότωνα, οι 6 προέρχονταν από γάτες (1 δεσποζόμενη / 5 αδέσποτες) και 35 προέρχονταν από σκύλους (16 δεσποζόμενους και 19 αδέσποτους).

2.2. Συστηματική Ταξινόμηση Εκτοπαρασίτων

Σύμφωνα με τη συστηματική τους ταξινόμηση όλοι οι ψύλλοι ανήκουν στο είδος *Ctenocephalides felis* (97♀/7♂) και οι ενήλικοι κρότωνες στο είδος *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (34♀/4♂). Στους κρότωνες περιλαμβάνονταν επίσης δύο νύμφες *Rhipicephalus* sp. καθώς και ένας θηλυκός κρότωνας *Ixodes* sp. (Εικόνες 30-33).



Εικόνα 30 Άρσενικός κρότωνας *Rhipicephalus sanguineus* s.l.
(Ραχιαία όψη (a) και κοιλιακή όψη (b))



Εικόνα 31 Θηλυκός κρότωνας *Rhipicephalus sanguineus* s.l.
(Ραχιαία όψη (a) και κοιλιακή όψη (b))



Εικόνα 32 Θηλυκός κρότωνας *Ixodes* sp. (Ραχιαία όψη (a) και κοιλιακή όψη (b))



Εικόνα 33 Ψύλλος *Ctenocephalides felis* (Θηλυκός (a) και αρσενικός (b))

2.3. Μοριακές δοκιμασίες

Σε κάθε ένα από τα 145 εκτοπαράσιτα που ανήκαν στο γένος *Rhipicephalus* sp. και *Ixodes* sp και στα είδη *Rhipicephalus sanguineus* s.l. και *Ctenocephalides felis*, διερευνήθηκε η παρουσία οκτώ γενών παθογόνων βακτηρίων (*Bartonella*, *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Coxiella*, *Francisella*, *Borrelia*) και του παρασιτικού γένους *Babesia* με τις μοριακές μεθόδους: συμβατική, εμφωλεασμένη και ποσοτική qPCR.

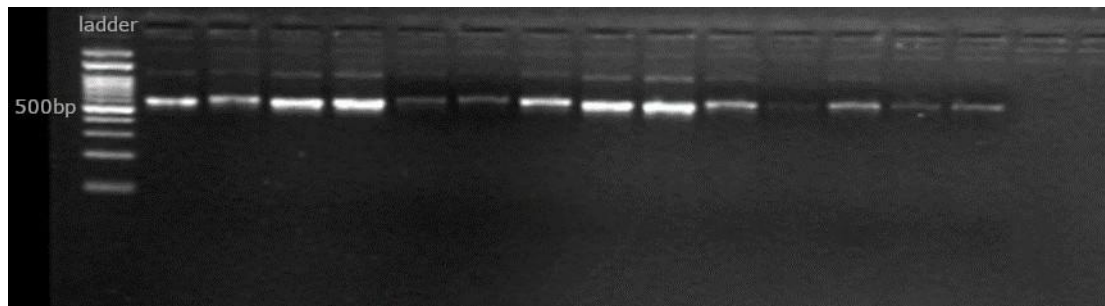
2.3.1. Αποτελέσματα ανίχνευσης βακτηρίων *Bartonella* spp.

Η ανίχνευση βακτηρίων *Bartonella* spp. έγινε ως προς δύο γενετικούς τόπους: εσωτερικό μεταγραφόμενο διάστημα 16S-23S rRNA (ITS) και γονίδιο της κιτρικής συνθετάσης (*gltA*). Με βάση την PCR του ITS γενετικού τόπου ανιχνεύθηκε *Bartonella* spp. σε 14 /104 των εξετασθέντων ψύλλων (12 από γάτες και 2 από σκύλους) ενώ δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα κρότωνα. Στα προϊόντα μεγέθους 540-590 bp (Εικόνα 34) που προέκυψαν, βρέθηκαν δύο αλληλουχίες 545 bp ομόλογες 100% με αντίστοιχες αλληλουχίες *B. henselae* strain A233 και ομόλογες >99% (545/546 identities, 1/546 gaps) με αρκετές άλλες αλληλουχίες *B. henselae* που περιλαμβάνονται στην βάση GenBank. Πέντε αλληλουχίες μεγέθους 528 bp βρέθηκαν 100% ομόλογες με αντίστοιχες αλληλουχίες *B. clarridgeiae* και έξι αλληλουχίες μεγέθους 509 bp βρέθηκαν >96% ομόλογες (509/528 identities) με αντίστοιχες αλληλουχίες *B. clarridgeiae* λόγω έλλειψης ενός τμήματος 19 bp. Η αλληλούχιση του προϊόντος PCR ενός δείγματος (ML0035) δεν κατέστη δυνατή.

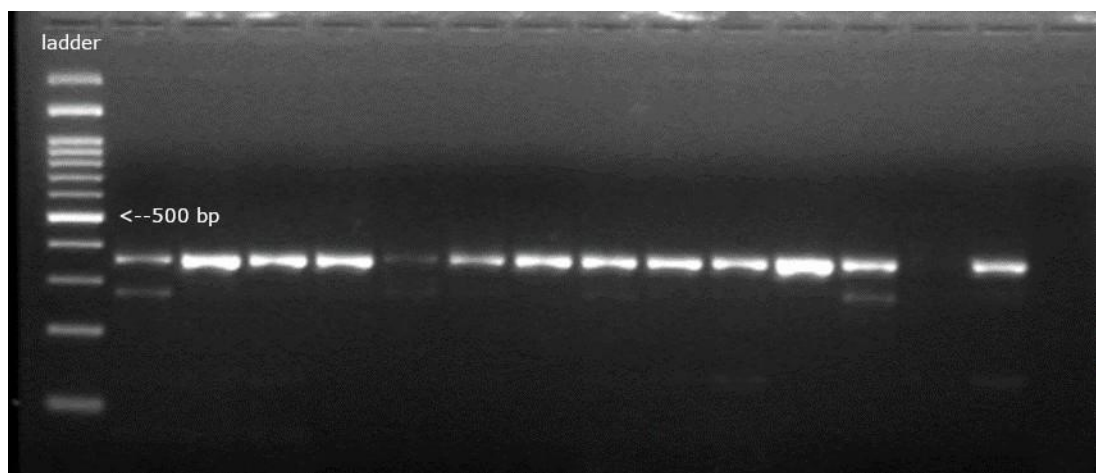
Τα θετικά δείγματα από την πρώτη PCR επιβεβαιώθηκαν και με δεύτερη PCR για το γονίδιο *gltA* με την οποία προέκυψαν προϊόντα μεγέθους 317 bp (Εικόνα 35). Από αυτά, τρεις αλληλουχίες ήταν ομόλογες 100% με αλληλουχίες *B. henselae*. Από αυτές τις τρεις, δύο ταυτοποιήθηκαν ως *B. henselae* και με τον ITS γενετικό τόπο ενώ μία δεν είχε ταυτοποιηθεί γιατί δεν έγινε δυνατή η αλληλούχισή της. Έξι ακολουθίες βρέθηκαν 100% ομόλογες με αλληλουχίες *B. clarridgeiae* και οι οποίες αντιστοιχούσαν στις αλληλουχίες ITS μεγέθους 528bp και 509bp που ήταν ομόλογες 100% και >96% με τις αλληλουχίες *B. clarridgeiae*. Οι ακολουθίες δύο δειγμάτων είχαν 316/317 ταυτόσημες βάσεις και ομολογία 99,7% επίσης με *B. clarridgeiae*. Σε δύο δείγματα δεν έγινε δυνατή η αλληλούχιση. Συμπερασματικά, με βάση την αλληλούχιση και των δύο γενετικών τόπων 3/104 δείγματα ταυτοποιήθηκαν ως *B. henselae* και 11/104 δείγματα ταυτοποιήθηκαν ως *B. clarridgeiae*, όπως περιγράφεται στον Πίνακα 14.

Τα 12/14 θετικά δείγματα ψύλλων προέρχονταν από γάτες και τα 6/14 θετικά δείγματα προέρχονταν από την περιοχή της Αθήνας. Τα θετικά δείγματα σε *B. henselae* βρέθηκαν στην Αθήνα, Νέα Σμύρνη και Μαρούσι. Τα θετικά δείγματα σε *B. clarridgeiae* βρέθηκαν σε Αθήνα, Νέα Σμύρνη, Παγκράτι, Αμπελοκήπους, Πετράλωνα, Καισαριανή, Χαλάνδρι, Παλαιό Φάληρο και Ρέντη. Δεν ανιχνεύθηκε *Bartonella* spp. στα δείγματα των κροτώνων (Εικόνα 36).

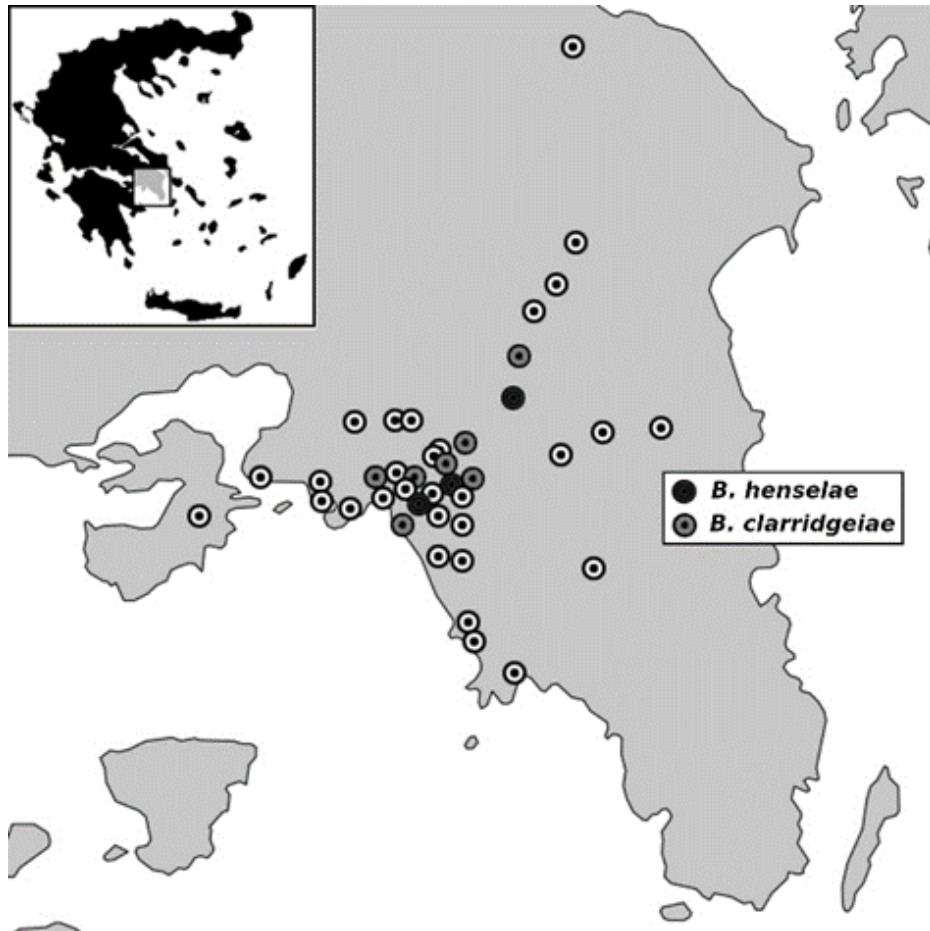
Οι αλληλουχίες *Bartonella* sp. που προέκυψαν από την μελέτη μας, κατατέθηκαν στην GenBank με κωδικούς αριθμούς πρόσβασης MN170534-MN170544 για τον γενετικό τόπο 16S-23S rRNA ITS και MN170987-MN170998 για το γονίδιο *gltA*. Συμπερασματικά, 6 αλληλουχίες ITS βρέθηκαν κατά 96,4% όμοιες με τις αλληλουχίες *B. clarridgeiae*. Για 4 από αυτές ως προς το γονίδιο *gltA* υπήρχε >99% ομολογία με αλληλουχίες *B. clarridgeiae*. Κατά συνέπεια και οι 6 αυτές αλληλουχίες ταυτοποιήθηκαν ως *B. clarridgeiae*. Αυτό υποστηρίζεται περαιτέρω και από το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με βάση τον γενετικό τόπο 16S-23S rRNA ITS που ομαδοποιεί τη νέα ακολουθία ML0046 μαζί αλληλουχία *B. clarridgeiae* (Εικόνα 37) .



Εικόνα 34 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% προϊόντων PCR τμήματος του γονιδιακού τόπου 16S-23S rRNA ITS *Bartonella* sp. (565bp). Στο πρώτο φρεάτιο: μάρτυρας μοριακών βαρών.



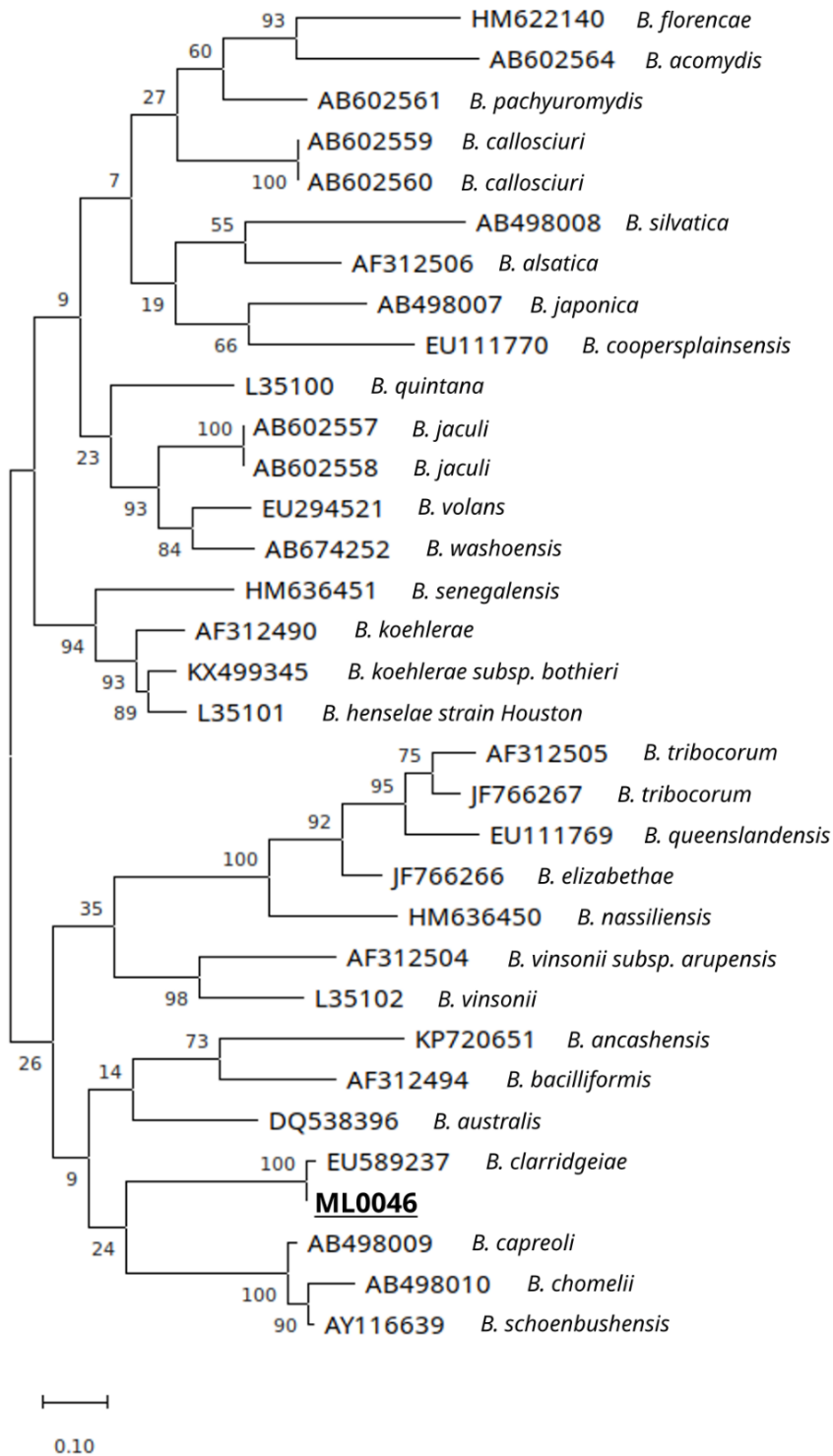
Εικόνα 35 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% προϊόντων PCR τμήματος του γονιδίου *gltA* *Bartonella* sp. (330bp). Στο πρώτο φρεάτιο: μάρτυρας μοριακών βαρών.



Εικόνα 36 Τοποθεσίες δειγματοληψίας. Με γκρι δείχνονται οι τοποθεσίες των θετικών δειγμάτων ψύλλων *C. felis* ως προς την παρουσία *B. clarridgeiae* και με μαύρο χρώμα οι τοποθεσίες των θετικών δειγμάτων *C. felis* ως προς την παρουσία *B. henselae*.

Πίνακας 14 Αποτελέσματα από την ανάλυση BLAST για τους δύο γενετικούς τόπους *Bartonella* sp. (Για τις αλληλουχίες με * δεν ήταν εφικτή η αλληλούχιση). Συμπεριλαμβάνονται οι τοποθεσίες/ξενιστές προέλευσης των δειγμάτων

| Κωδ. Δείγματος | Περιοχή Συλλογής | Ξενιστής | % Ομολογία | | Είδος <i>Bartonella</i> |
|----------------|-------------------|----------|--|--|-------------------------|
| | | | ITS genomic fragment | gltA fragment | |
| ML0061 | Αθήνα-Κέντρο | Γάτα | 99.8% <i>B. henselae</i> (545/546 bp) | 100% <i>B. henselae</i> (317/317 bp) | <i>B. henselae</i> |
| ML0082 | Νέα Σμύρνη | Γάτα | 99.8% <i>B. henselae</i> (545/546 bp) | 100% <i>B. henselae</i> (317/317 bp) | <i>B. henselae</i> |
| ML0035 | Μαρούσι | Σκύλος | -----* | 100% <i>B. henselae</i> (317/317 bp) | <i>B. henselae</i> |
| ML0053 | Αθήνα-Κέντρο | Γάτα | 100% <i>B. clarridgeiae</i> (528/528 bp) | 100% <i>B. clarridgeiae</i> (317/317 bp) | <i>B. clarridgeiae</i> |
| ML0054 | Αθήνα-Κέντρο | Γάτα | 100% <i>B. clarridgeiae</i> (528/528 bp) | 100% <i>B. clarridgeiae</i> (317/317 bp) | <i>B. clarridgeiae</i> |
| ML0059 | Αθήνα-Παγκράτι | Σκύλος | 100% <i>B. clarridgeiae</i> (528/528 bp) | 100% <i>B. clarridgeiae</i> (317/317 bp) | <i>B. clarridgeiae</i> |
| ML0094 | Παλαιό Φάληρο | Γάτα | 100% <i>B. clarridgeiae</i> (528/528 bp) | 100% <i>B. clarridgeiae</i> (317/317 bp) | <i>B. clarridgeiae</i> |
| ML0110 | Χαλάνδρι | Γάτα | 100% <i>B. clarridgeiae</i> (528/528 bp) | 100% <i>B. clarridgeiae</i> (317/317 bp) | <i>B. clarridgeiae</i> |
| ML0086 | Αθήνα-Πετράλωνα | Γάτα | 96.4% <i>B. clarridgeiae</i> (509/528 bp) | 100% <i>B. clarridgeiae</i> (317/317 bp) | <i>B. clarridgeiae</i> |
| ML0089 | Παλαιό Φάληρο | Γάτα | 96.4% <i>B. clarridgeiae</i> (509/528 bp) | 100% <i>B. clarridgeiae</i> (317/317 bp) | <i>B. clarridgeiae</i> |
| ML0025 | Ρέντης | Γάτα | 96.4% <i>B. clarridgeiae</i> (509/528 bp) | 99.7% <i>B. clarridgeiae</i> (316/317 bp) | <i>B. clarridgeiae</i> |
| ML0045 | Αθήνα-Αμπελόκηποι | Γάτα | 96.4% <i>B. clarridgeiae</i> (509/528 bp) | 99.7% <i>B. clarridgeiae</i> (316/317 bp) | <i>B. clarridgeiae</i> |
| ML0046* | Καισαριανή | Γάτα | 96.4% <i>B. clarridgeiae</i> (509/528 bp) | -----* | <i>B. clarridgeiae</i> |
| ML0096c* | Νέα Σμύρνη | Γάτα | 96.4% <i>B. clarridgeiae</i> (509/528 bp) | -----* | <i>B. clarridgeiae</i> |



Εικόνα 37 Φυλογενετικό δέντρο Μέγιστης Πιθανοφάνειας ακολουθιών *Bartonella* με βάση αλληλουχίες του γενετικού τόπου 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ITS. Οι τιμές αξιοπιστίας στους κόμβους του δέντρου προέκυψαν από 100 επαναλήψεις. Η κλίμακα δηλώνει διαφορά νουκλεοτιδίων 10%. Η ακολουθία ML0046 προήλθε από ψύλλο *Ctenocephalides felis* από γάτα.

2.3.2. Αποτελέσματα ανίχνευσης βακτηρίων *Rickettsia* spp.

Από την εξέταση των δειγμάτων ψύλλων με την ειδική *R. felis* qPCR για το γονίδιο της συνθετάσης της βιοτίνης, ανιχνεύθηκε *Rickettsia felis* σε 5/104 (4,8%) δείγματα από τα οποία τα 3 προέρχονταν από γάτες και τα δύο από σκύλους (Πίνακας 15). Δύο από τα δείγματα προέρχονται από την περιοχή του Χαλανδρίου, ενώ τα υπόλοιπα προέρχονταν από Αθήνα-Αμπελοκήπους, Κάλαμο και Νέα Σμύρνη (Εικόνα 39).

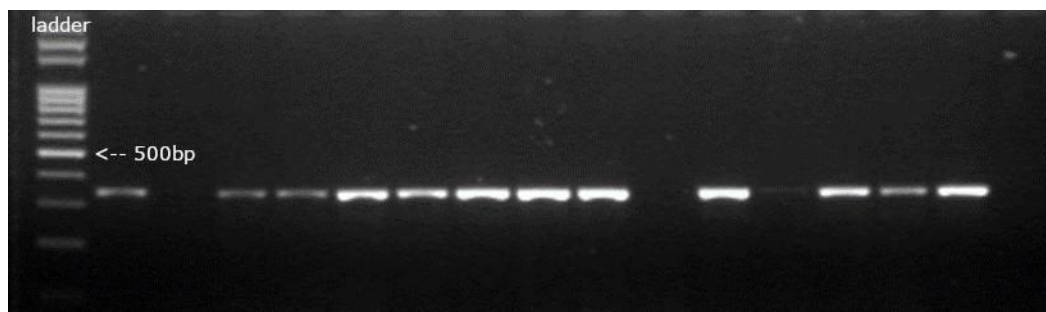
Από την εξέταση των δειγμάτων κροτώνων με SFG (Spotted fever group) qPCR για το γονίδιο της γαλακτικής αφυδρογονάσης, βρέθηκαν θετικά τρία δείγματα κροτώνων. Από την εφαρμογή της εξειδικευμένης *R. conorii* qPCR για το γονίδιο putative acetyltransferase που ακολούθησε, ανιχνεύθηκε *Rickettsia conorii* σε 3/41 (7,3%) δείγματα από τα οποία τα δύο προέρχονταν από γάτες και το ένα από σκύλο (Πίνακας 15). Οι τοποθεσίες προέλευσης των δειγμάτων ήταν η Καλλιθέα, ο Πειραιάς και το Μοσχάτο (Εικόνα 40).

Πίνακας 15 Αποτελέσματα από τις ειδικές qPCR για *Rickettsia felis* ψύλλων σε δείγματα *Ctenocephalides felis* και για *Rickettsia conorii* σε δείγματα κροτώνων *Rhipicephalus sanguineus* s.l., *Rhipicephalus* sp. και *Ixodes* sp. Συμπεριλαμβάνονται οι τοποθεσίες και οι ξενιστές προέλευσης των δειγμάτων

| Κωδ. Δείγματος | Περιοχή Συλλογής | Εκτοπαράσιτο | Ξενιστής | Είδος <i>Rickettsia</i> |
|----------------|-------------------|---------------------------|----------|---------------------------|
| ML0014 | Χαλάνδρι | <i>C. felis</i> | Γάτα | <i>Rickettsia felis</i> |
| ML0019 | Αθήνα-Αμπελόκηποι | <i>C. felis</i> | Γάτα | <i>Rickettsia felis</i> |
| ML0034 | Κάλαμος | <i>C. felis</i> | Σκύλος | <i>Rickettsia felis</i> |
| ML0097 | Νέα Σμύρνη | <i>C. felis</i> | Γάτα | <i>Rickettsia felis</i> |
| ML0109 | Χαλάνδρι | <i>C. felis</i> | Γάτα | <i>Rickettsia felis</i> |
| ML0030 | Καλλιθέα | <i>R. sanguineus</i> s.l. | Σκύλος | <i>Rickettsia conorii</i> |
| ML0068 | Πειραιάς | <i>R. sanguineus</i> s.l. | Γάτα | <i>Rickettsia conorii</i> |
| ML0071 | Μοσχάτο | <i>R. sanguineus</i> s.l. | Γάτα | <i>Rickettsia conorii</i> |

2.3.3. Αποτελέσματα ανίχνευσης βακτηρίων *Ehrlichia* spp. / *Anaplasma* spp.

Σε όλα τα δείγματα των εκτοπαρασίτων εφαρμόστηκε συμβατική PCR για τον γενετικό τόπο 16S rRNA για την ανίχνευση βακτηρίων των γενών *Anaplasma* και *Ehrlichia* (οικ. *Anaplasmataceae*) (Εικόνα 38 και Εικόνα 39). Από την εφαρμογή αυτή προέκυψε προϊόν PCR σε 61/104 (58,7%) δείγματα ψύλλων και σε 2/41 (4,9%) δείγματα κροτώνων. Ενδεικτικά θετικά δείγματα από ψύλλους αλληλουχήθηκαν και η ανάλυση τους με BLAST έδειξε 100% ομολογία (586/586) με κλώνους *Wolbachia ripientis* από διάφορες περιοχές όπως Ισπανία (GenBank: LN864488) και Ηνωμένες Πολιτείες (GenBank: CP051156, MF944223). Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν από την εφαρμογή PanWolbachia qPCR για τον γενετικό τόπο *WSPq* σε όλα τα δείγματα ψύλλων. Τα θετικά δείγματα από την ανωτέρω πειραματική διαδικασία επιβεβαιώθηκαν και με *Wolbachia ripientis* qPCR για τον γενετικό τόπο *ftsZ*. Συνολικά 64/104 (61,5%) επιβεβαιώθηκαν ως *Wolbachia ripientis* με την *Wolbachia ripientis* qPCR.

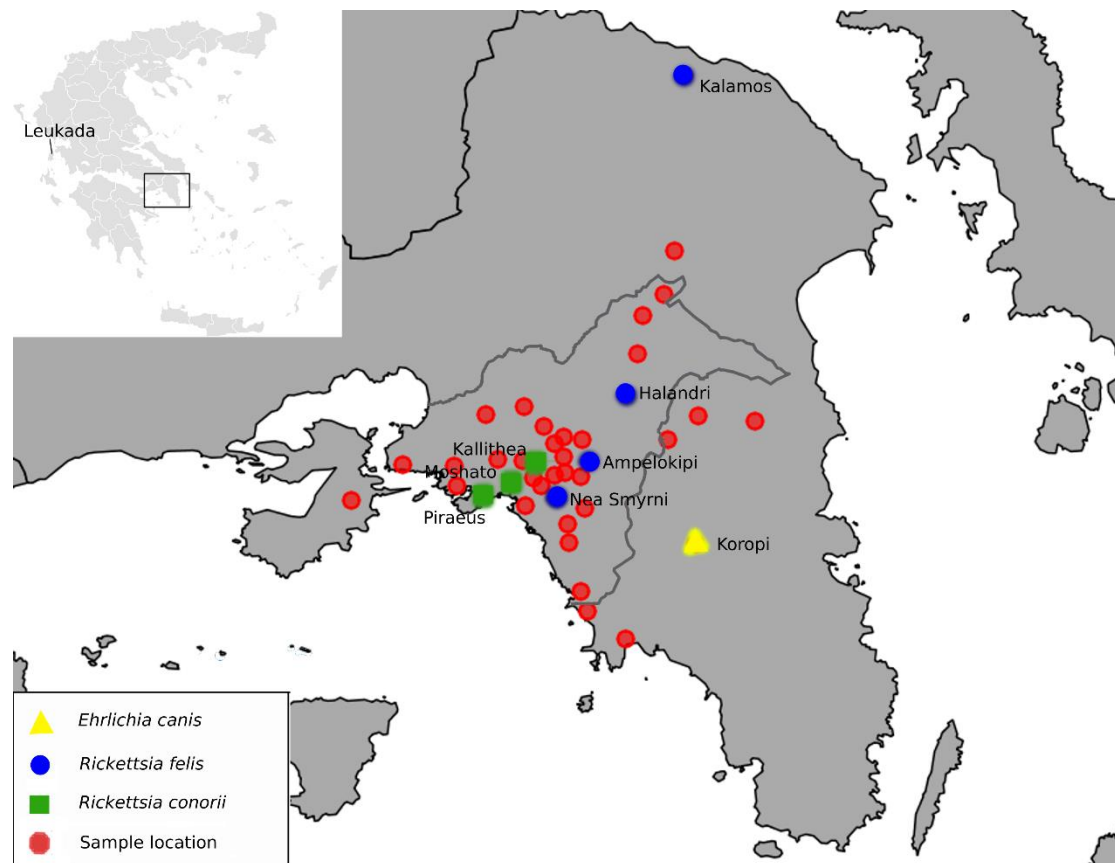


Εικόνα 38 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% προϊόντων PCR τμήματος γονιδίου 16SrRNA *Anaplasmataceae* (345 bp) από δείγματα ψύλλων Στο πρώτο φρεάτιο: μάρτυρας μοριακών βαρών.



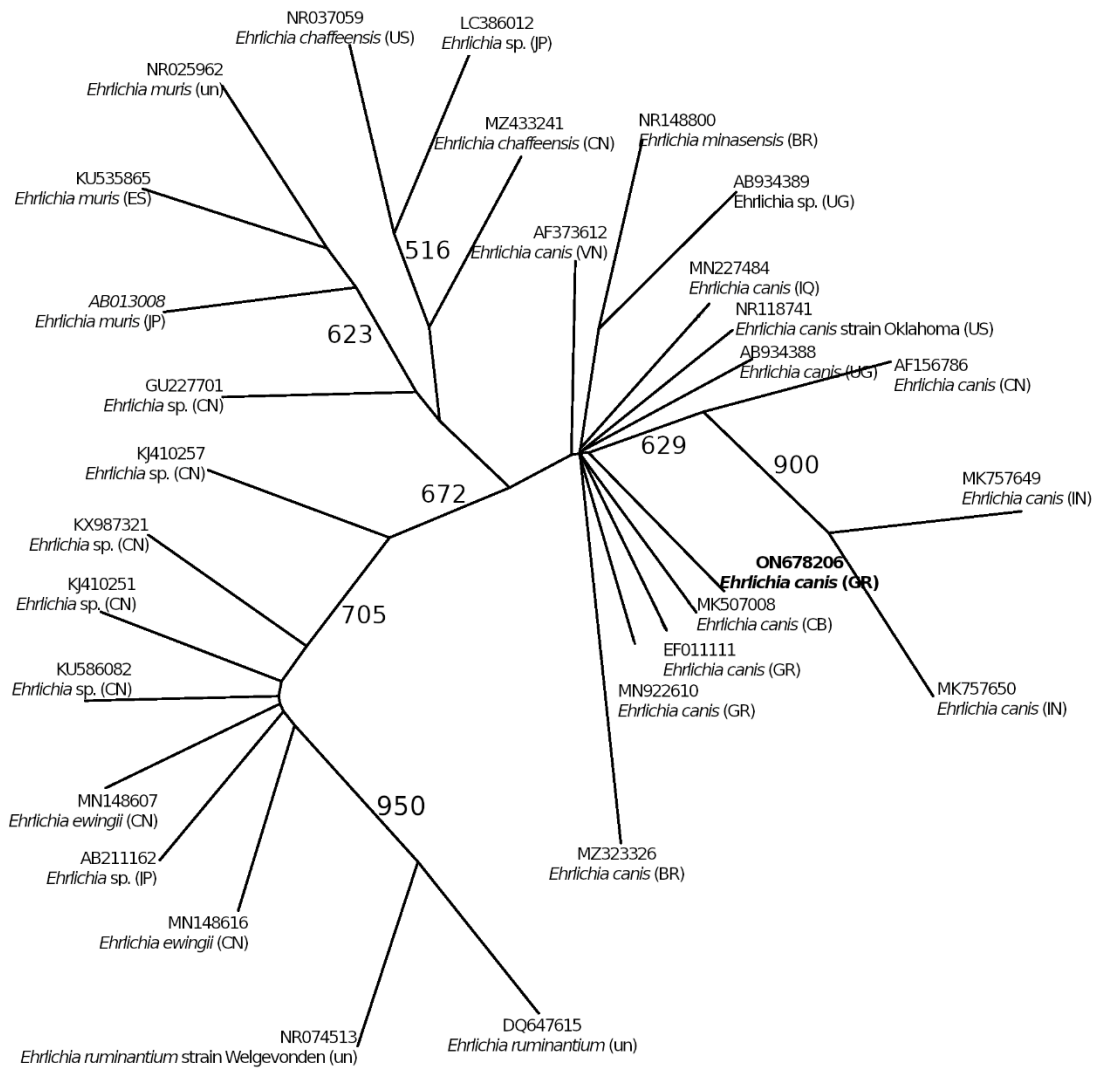
Εικόνα 39 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% προϊόντων PCR τμήματος γονιδίου 16SrRNA *Anaplasmataceae* (345 bp) από δείγματα κροτώνων. Στο πρώτο φρεάτιο: μάρτυρας μοριακών βαρών.

Τα δύο θετικά δείγματα από κρότωνες αφορούσαν δείγμα *R. sanguineus* s.l. και δείγμα *Ixodes* sp.. Η αλληλούχισή τους και η συνακόλουθη ανάλυση BLAST των αλληλουχιών έδειξε για το πρώτο δείγμα 100% (564/564) ομολογία με τον κλώνο *Ehrlichia canis* VH1-58 (GenBank:MN922610) από την Ελλάδα και με αλληλουχίες *E. canis* από Ιράκ (GenBank: MN227484) και Κούβα (GenBank: MK507008). Για την δεύτερη αλληλουχία προέκυψε ομολογία 100% (564/564) με κλώνους *Candidatus Midichloria mitochondrii* από Πορτογαλία (GenBank: KX359181), Γαλλία (GenBank: KU559921) και Ιταλία (GenBank: OM982404, GenBank: HF568841, GenBank: CP002130). Συνεπώς ανιχνεύθηκε *Ehrlichia canis* 1/41 (2,4%) και *Candidatus Midichloria mitochondrii* 1/41 (2,4%) στα δείγματα των κροτώνων (Εικόνα 40).

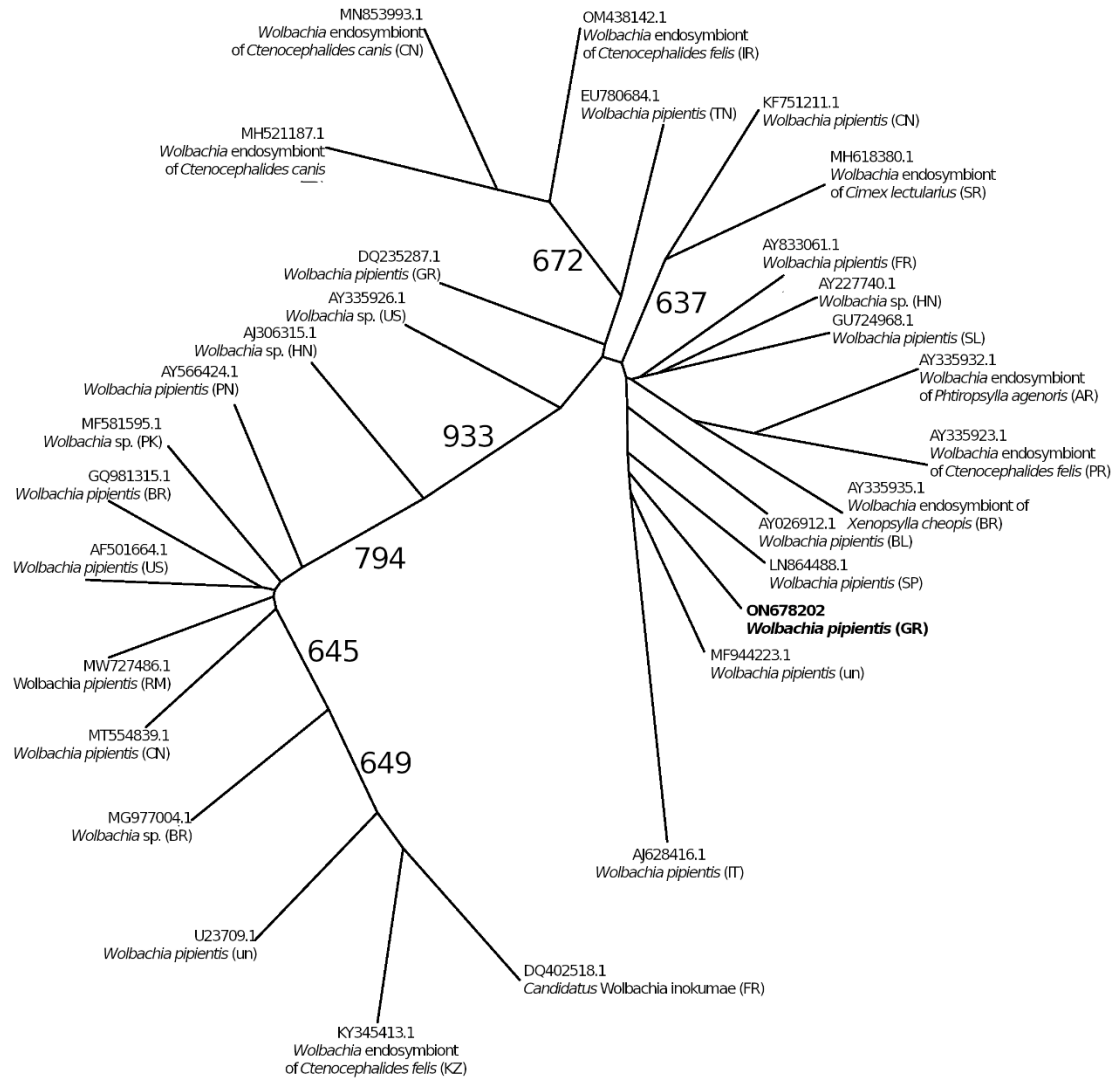


Εικόνα 40 Οι τοποθεσίες δειγματοληψίας απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα. Οι τοποθεσίες από τις οποίες προέρχονται τα θετικά δείγματα εκτοπαρασίτων απεικονίζονται για την *Rickettsia felis* με μπλε, για την *Rickettsia conorii* με πράσινο και για την *Ehrlichia canis* με κίτρινο χρώμα.

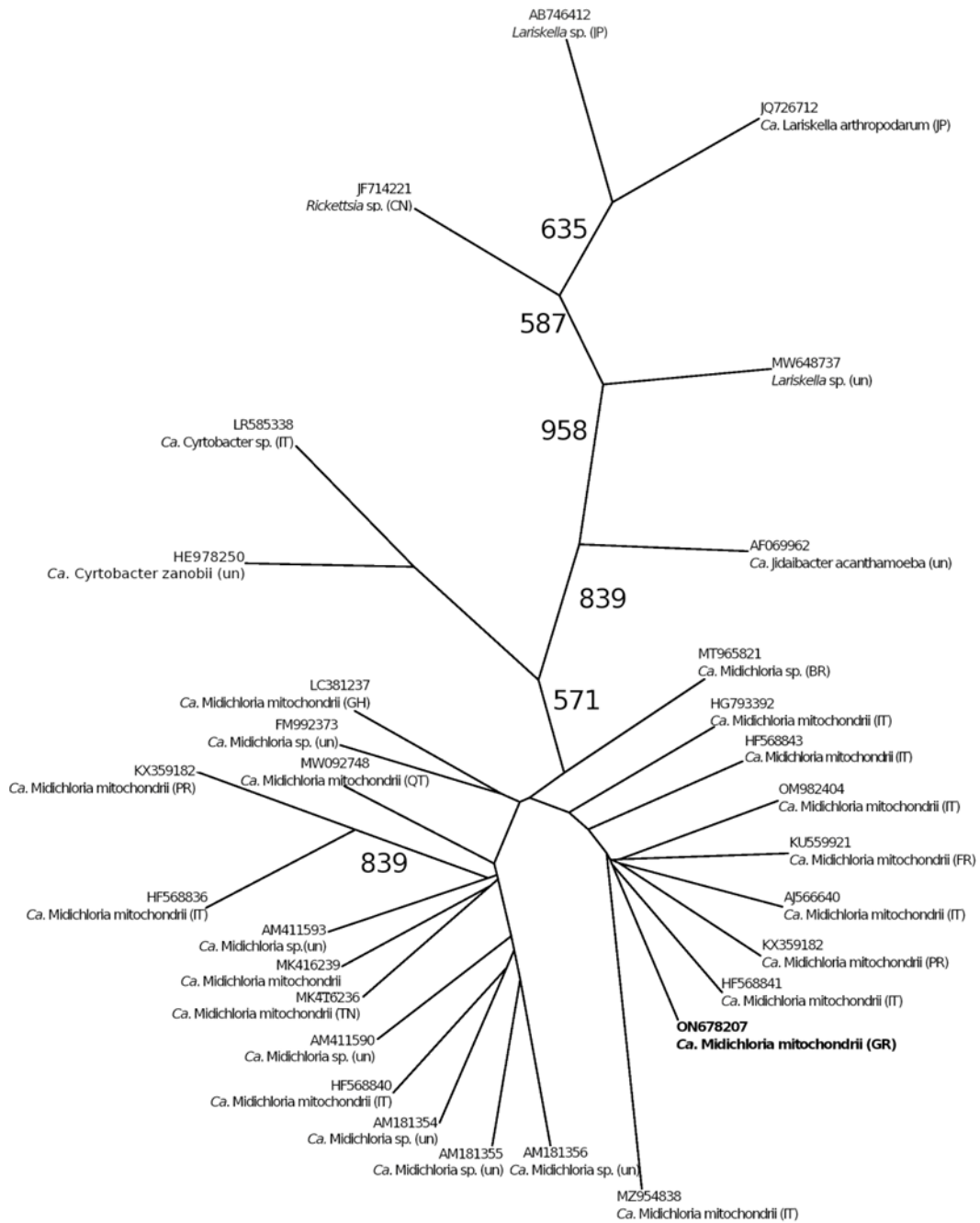
Οι αλληλουχίες που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη κατατέθηκαν στην GenBank με κωδικούς αριθμούς πρόσβασης ON678202-ON678207. Η φυλογενετική ανάλυση και τα αντίστοιχα δένδρογράμματα που προέκυψαν επιβεβαίωσαν την ομαδοποίηση τους με αλληλουχίες *Ehrlichia canis*, *Wolbachia pipientis*, και *Candidatus Midichloria mitochondrii* από την GenBank προερχόμενες από την Ελλάδα και άλλα κράτη. Πιο συγκεκριμένα η αλληλουχία ON6781206 *Ehrlichia canis* που προέκυψε από την παρούσα εργασία ομαδοποιείται με τις αλληλουχίες EF011111 *Ehrlichia canis* strain GR78 και MN922610 *Ehrlichia canis* isolate VH1-58 που προέρχονται από την Ελλάδα (Εικόνα 41). Η αλληλουχία EF011111 αφορά εργασία του 2007 και δείγμα από σκύλο νοσοούντα με μονοκυτταρική ερλιχίωση (240). Η αλληλουχία MN922610 αφορά εργασία του 2020 και προέρχεται επίσης από σκύλο (241). Η αλληλουχία ON678202 *Wolbachia pipientis* της παρούσας εργασίας ομαδοποιείται με αλληλουχίες από την ευρωπαϊκή περιοχή και απέχει φυλογενετικά από την ακολουθία DQ235287 *Wolbachia pipientis* strain wSh, που έχει βρεθεί στον ελληνικό χώρο και η οποία προέρχεται από *Drosophila sechellia* (Εικόνα 42). Η αλληλουχία ON678207 *Candidatus Midichloria mitochondrii* της παρούσας εργασίας ομαδοποιείται με αλληλουχίες από την περιοχή της Μεσογείου κυρίως από Ιταλία και Γαλλία και Πορτογαλία (Εικόνα 43) καθώς δεν βρέθηκε αντίστοιχη αλληλουχία από την Ελλάδα.



Εικόνα 41 Φυλογενετικό δέντρο Μέγιστης Πιθανοφάνειας *Ehrlichia canis*, με βάση αλληλουχίες τμήματος 305bp 16S rRNA. Οι τιμές αξιοπιστίας στους κόμβους του δέντρου προέκυψαν από 1000 επαναλήψεις.



Εικόνα 42 Φυλογενετικό δέντρο Μέγιστης Πιθανοφάνειας *Wolbachia pipientis*, με βάση αλληλουχίες τμήματος 305bp 16S rRNA. Οι τιμές αξιοπιστίας στους κόμβους του δέντρου προέκυψαν από 1000 επαναλήψεις.



Εικόνα 43 Φυλογενετικό δέντρο Μέγιστης Πιθανοφάνειας *Candidatus Midichloria mitochondrii* με βάση αλληλουχίες τμήματος 305bp 16S rRNA. Οι τιμές αξιοπιστίας στους κόμβους του δέντρου προέκυψαν από 1000 επαναλήψεις.

2.3.4. Αποτελέσματα ανίχνευσης βακτηρίων *Coxiella* spp.

Σε όλα τα δείγματα των 145 εκτοπαρασίτων, εφαρμόστηκε συμβατική PCR για τον γενετικό τόπο *htpB* για την ανίχνευση βακτηρίων του γένους *Coxiella*. Από την εφαρμογή του πειράματος δεν ανιχνεύθηκε γενετικό υλικό αυτού του γένους.

2.3.5. Αποτελέσματα ανίχνευσης βακτηρίων *Francisella* spp.

Σε όλα τα δείγματα των 145 εκτοπαρασίτων, εφαρμόστηκε συμβατική PCR για το γονίδιο *lphA* για την ανίχνευση βακτηρίων του γένους *Francisella*. Από την εφαρμογή του πειράματος δεν ανιχνεύθηκε γενετικό υλικό βακτηρίων αυτού του γένους.

2.3.6. Αποτελέσματα ανίχνευσης βακτηρίων *Borrelia* spp.

Σε όλα τα δείγματα των 145 εκτοπαρασίτων, εφαρμόστηκε συμβατική PCR για τον γενετικό τόπο *hbb* για την ανίχνευση βακτηρίων του γένους *Coxiella*. Από την εφαρμογή του πειράματος δεν ανιχνεύθηκε γενετικό υλικό βακτηρίων αυτού του γένους.

2.3.7. Αποτελέσματα ανίχνευσης παρασίτων *Babesia* spp.

Σε όλα τα δείγματα των 145 εκτοπαρασίτων, εφαρμόστηκε συμβατική PCR για το γονίδιο 18S rRNA για την ανίχνευση παρασίτων του γένους *Babesia*. Από την εφαρμογή του πειράματος δεν ανιχνεύθηκε γενετικό υλικό παρασίτων αυτού του γένους.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αυτή η σελίδα σκοπίμως είναι λευκή.

3. Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται αυξημένο ενδιαφέρον για την αναζήτηση παθογόνων μικροοργανισμών που μεταδίδονται από διαβιβαστές σε παγκόσμιο επίπεδο. Σε αυτό έχουν συμβάλει η κλιματική αλλαγή και οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες συμπεριλαμβανομένων των αγροτικών δραστηριοτήτων και της αστικοποίησης που συντελούν σε νέες αλληλεπιδράσεις μεταξύ παθογόνων, διαβιβαστών και ξενιστών. Ειδικότερα σε ό,τι αφορά τον επιπολασμό των ασθενειών που μεταδίδονται από κρότνες, η επέκταση των πόλεων και των κατοικημένων περιοχών σε ζώνες πρασίνου, οι δραστηριότητες αναψυχής σε υπαίθριους χώρους και πολλές φορές σε περιοχές άγριας ζωής έχουν συμβάλει στην αύξηση του (242). Επιπλέον στην αύξηση του έχουν συμβάλει και οι σύγχρονες διαγνωστικές μοριακές τεχνικές όπως η συμβατική PCR, η PCR πραγματικού χρόνου, η αλληλούχιση, η ανάστροφη υβριδοποίηση μετά από πολυπλεκτική PCR (reverse line blotting) και άλλες μέθοδοι οι οποίες επιτρέπουν την έγκαιρη διάγνωση των μολύνσεων αλλά ταυτόχρονα την ανίχνευση παθογόνων πολλές φορές άγνωστων έως τώρα καθώς και τη διάκριση μεταξύ ειδών και στελεχών που δεν ήταν εύκολο να ταυτοποιηθούν (45). Σε ό,τι αφορά τους ψύλλους, θεωρούνται ξενιστές πολλών και υποτιμημένων παθογόνων που θα μπορούσαν να αναδυθούν παίρνοντας ενδεχομένως επιδημική μορφή (243). Σε αυτήν την κατηγορία παθογόνων ανήκουν οι ρικέτσιες καθώς πολλές από αυτές ανευρίσκονται σε νέους ξενιστές ταυτόχρονα και με την εύρεση ψύλλων σε νέες γεωγραφικές περιοχές που δεν είχαν αναφερθεί έως τώρα στη βιβλιογραφία (243).

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η ανίχνευση παθογόνων σε ψύλλους και κρότνες από ζώα συντροφιάς σκύλους και γάτες στην ευρύτερη περιοχή της Αττικής με στόχο την συμβολή στη μελέτη της μοριακής επιδημιολογίας ζωνοδών που απαντούν στον ελλαδικό χώρο. Στην Αττική που διαβιοί το μεγαλύτερο μέρος του ελληνικού πληθυσμού διαβιοί επίσης και μεγάλος αριθμός αδέσποτων και δεσποζόμενων ζώων που περιλαμβάνει κυρίως γάτες και σκύλους. Έγινε προσπάθεια ώστε οι τοποθεσίες προέλευσης των ζώων αυτών να καλύψουν κατά το δυνατόν πληρέστερα την περιοχή της Αττικής. Οι περιοχές προέλευσης των ζώων ξενιστών ήταν 39 αστικές και περιαστικές περιοχές που κάλυψαν επτά περιφερειακές ενότητες της Αττικής: την Περιφερειακή Ενότητα του Κεντρικού, Βόρειου, Νότιου και Δυτικού Τομέα Αθήνας, την Περιφερειακή Ενότητα Ανατολικής Αττικής και την Περιφερειακή Ενότητα Πειραιά και Περιφερειακή Ενότητα Νήσων. Στην περιοχή της Αθήνας καταγράφηκαν ως περιοχές προέλευσης το κέντρο (περιοχή της πλατείας

Ομονοίας), οι Αμπελόκηποι, τα Εξάρχεια, ο Νέος Κόσμος, το Παγκράτι και τα Πετράλωνα.

Τα ζώα από τα οποία συλλέχθηκαν τα εκτοπαράσιτα περιλάμβαναν αδέσποτα ζώα τα οποία συμμετείχαν σε προγράμματα στείρωσης μέσω φιλοζωικών οργανώσεων αλλά και δεσποζόμενα στο πλαίσιο κτηνιατρικής εξέτασης. Στην μελέτη μας τα αδέσποτα ζώα υπερτερούν αριθμητικά έναντι των δεσποζόμενων γεγονός που μπορεί να δικαιολογηθεί από τον μεγάλο αριθμό αδέσποτων ζώων αλλά και από το ότι πλέον κάποια από τα αδέσποτα ζώα τυγχάνουν πλέον βασικής κτηνιατρικής φροντίδας μέσω των φιλοζωικών ομάδων και σωματείων που δραστηριοποιούνται σε συνεργασία και με τους δήμους, για την υποστήριξή τους σε όλες τις περιοχές της Αττικής.

Από τα συλλεχθέντα εκτοπαράσιτα οι ψύλλοι υπερέχουν αριθμητικά έναντι των κροτώνων. Όλοι οι ψύλλοι ταυτοποιήθηκαν μορφολογικά ως ***Ctenocephalides felis***, γεγονός που θεωρείται αναμενόμενο αφού πρόκειται για είδος με ευρεία εξάπλωση σε εύκρατες και τροπικές περιοχές. Όπως έχει αναφερθεί οι ξενιστές του εκτός από τις γάτες, μπορούν να είναι σκύλοι, ρακούν, μαρσιποφόρα και ποντικοί, ενώ το είδος αυτό είναι παρόν ακόμα και σε κατοικίες ανθρώπων κυρίως σε περιοχές της Αφρικής (243). Ο ψύλλος *Ctenocephalides canis* έχει επίσης αναφερθεί στη χώρα μας αλλά δεν εξετάστηκε στην παρούσα εργασία. Σε έρευνα του 1995, το είδος *C. canis* βρέθηκε στους σκύλους σε μεγαλύτερη συχνότητα (71.3%) απ' ό,τι στις γάτες (5.3%), ενώ το είδος *C. felis* βρέθηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα στις γάτες (97.4%) απ' ό,τι στους σκύλους 40.3% (244). Δεύτερη αναφορά που σχετίζεται επίσης με την χώρα μας αφορούσε εκτοπαράσιτα αδέσποτων γατών στην περιοχή της Θεσσαλονίκης (245) καθώς και σε διερεύνηση περιστατικών πιθανής έκθεσης ανθρώπων σε *Rickettsia felis* στην περιοχή των Χανίων Κρήτης και της Ευβοίας (85). Είναι ένα είδος που περιλαμβάνει αρκετά υποείδη στη διερεύνηση και ταυτοποίηση των οποίων συμβάλλουν καθοριστικά οι μοριακές τεχνικές. Στην χώρα μας μία τέτοια διερεύνηση δεν έχει έως τώρα διεξαχθεί παρόλον ότι θεωρείται μαζί με τον *Pulex irritans* ενδεχομένως το πιο σημαντικό είδος ψύλλου ως διαβιβαστής παθογόνων. Αντίθετα υπάρχουν αναφορές από Ευρωπαϊκές χώρες (συμπεριλαμβανομένων και κάποιων Μεσογειακών) όπως Ουγγαρία, Κροατία, Ιταλία, Μάλτα, Ισραήλ (246) και Τσεχία, Ρουμανία (221) που επιβεβαιώνουν τόσο την ύπαρξη *C. felis felis* όσο και την αριθμητική του υπεροχή έναντι του *C. canis*. Οι αναφορές από την Ευρωπαϊκή περιοχή ως προς την ύπαρξη των δύο αυτών ειδών δείχνουν σε άλλες περιπτώσεις υπεροχή του *C. felis* και σε άλλες του *C. canis*. Σε ορισμένες χώρες της Δυτικής Ευρώπης φαίνεται να υπερτερεί ο *C. felis* (247,248). Σε άλλες χώρες της Ανατολικής

Ευρώπης όπως Βουλγαρία, Ρουμανία, Λιθουανία Σλοβακία ο *C. canis* απαντάται σε μεγαλύτερες συχνότητες σε σκύλους έναντι του *C. felis* (249). Σύμφωνα με τον Bitam et al 2010, παρόλον ότι ο *C. canis* αναφέρεται ως ο ψύλλος του σκύλου συνήθως ανευρίσκεται σε μικρότερους αριθμούς στους σκύλους από ότι ο *C. felis* (243). Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στο ότι η γεωγραφική διερεύνηση των δύο αυτών ειδών θα άξιζε μεγαλύτερης προσοχής με δεδομένο ότι κάποια είδη και κάποιοι συγκεκριμένοι βιότυποι φαίνονται να συσχετίζονται με συγκεκριμένα παθογόνα για τα οποία αποτελούν δυνητικά ικανούς διαβιβαστές (221).

Στην παρούσα μελέτη οι κρότωνες που ταυτοποιήθηκαν ανήκουν στο είδος ***Rhipicephalus sanguineus s.l.*** που αναφέρεται και ως ο καφές κρότωνας του σκύλου. Αποτελεί είδος με παγκόσμια εξάπλωση και έχει βρεθεί σε χώρους κατοικίας σε αστικά περιβάλλοντα αλλά και σε ψυχρές περιοχές όπως ο Καναδάς και οι Σκανδιναβικές χώρες (20,250). Χαρακτηρίζεται ως ενδοφιλικό είδος το οποίο μπορεί να βρεθεί στο εσωτερικό των σπιτιών σε τοίχους, χαλιά και επίπλωση (251). Στην χώρα μας υπάρχουν αρκετές αναφορές για την ύπαρξή του κυρίως από την περιοχή της Βόρειας Ελλάδας ήδη από την δεκαετία του 1990 (252). Η συλλογή τους προέρχεται κατά κύριο λόγο από σκύλους (252,109,253,254) αλλά και από μηρυκαστικά και ανθρώπους (255–259). Ο εντοπισμός του σε πρόβατα, αίγες και σκύλους αναφέρεται μεταξύ άλλων περιοχών δειγματοληψίας και στην περιοχή της Αττικής από τους Latrofa et al. το 2017, αλλά και από τους Chaligiannis et al. το 2018 χωρίς να γίνεται ακριβής αναφορά στον ξενιστή προέλευσης (253,258). Στη εργασία των Latrofa et al. αναφέρεται επίσης ότι το είδος *R. sanguineus* υπερτερεί αριθμητικά έναντι όλων των άλλων συλλεχθέντων ειδών και στην περιοχή της Αθήνας αναφέρονται 69 δείγματα, γεγονός το οποίο συμφωνεί και με τα δικά μας ευρήματα. Από τα έως τώρα δεδομένα η εύρεσή του σε γάτες στην χώρα μας γίνεται για πρώτη φορά στην παρούσα εργασία και αποτελεί και την πρώτη αναφορά στην περιοχή μελέτης. Αυτό το εύρημα συνάδει με ευρήματα μελετών από άλλες μεσογειακές χώρες όπως η Ιταλία (260) και η Πορτογαλία (229).

Στην εργασία μας βρέθηκε επίσης ένας θηλυκός διογκωμένος κρότωνας ***Ixodes sp.*** σε σκύλο για τον οποίο είχε αναφερθεί από τον ιδιοκτήτη του ότι είχε προηγηθεί ταξίδι στην Λευκάδα, οπότε ενδεχομένως η ανεύρεσή του στην Αττική να οφείλεται στο συγκεκριμένο ταξίδι, με δεδομένο ότι σε όλα τα ζώα συλλέχθηκαν μόνο κρότωνες του είδους *R. sanguineus*. Είδη του γένους *Ixodes* όπως *Ixodes ricinus*, *Ixodes gibbosus* και *Ixodes hexagonus* έχουν αναφερθεί από τον Papadopoulos et al. το 1996 στην περιοχή της Μακεδονίας στη Βόρεια Ελλάδα (252). Το είδος *I. gibbosus* αναφέρθηκε από τον Chaligiannis et al. το 2018 σε πρόβατα στην Λήμνο και από την

Psaroulaki et al. το 2006 σε μηρυκαστικά στο νησί της Κεφαλονιάς (109,258). Αναφορά του είδους *I. ricinus* υπάρχει σε εργασίες από τη Βόρεια Ελλάδα που συμπεριλάμβανε και τη Θεσσαλονίκη (253,261). Το είδος αυτό αναφέρθηκε και σε γάτες σε εργασίες από την Ιταλία και την Πορτογαλία (229,260). Αναφέρεται ως το πιο συχνό είδος κρότωννα σε γάτες στην Ευρώπη (260). Παρόλα αυτά δεν έχει έως τώρα υπάρξει αναφορά εύρεσής του στην Αττική, ενδεχομένως λόγω του ότι οι μελέτες που σχετίζονται με κρότωνες στην περιοχή της Αττικής είναι πολύ περιορισμένες. Η αναφορά του στην παρούσα εργασία, είναι η πρώτη αναφορά του γένους αυτού στην υπό μελέτη περιοχή.

Τα παθογόνα που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη περιλαμβάνουν δύο είδη *Bartonella*: ***Bartonella henselae*** και ***Bartonella clarridgeiae*** στους ψύλλους *C. felis*. Επίσης ανιχνεύθηκαν δύο είδη ρικετσιών που ανήκουν και τα δύο στην ομάδα του κηλιδοβλατιδώδους πυρετού: ***Rickettsia conorii*** στους κρότωνες *R. sanguineus* s.l. και ***R. felis*** στους ψύλλους *C. felis*. Το παθογόνο ***Ehrlichia canis*** ανιχνεύθηκε σε έναν κρότωννα *R. sanguineus* s.l.. Εκτός των ανωτέρω, βρέθηκαν και δύο ενδοσυμβιωτικά βακτήρια: ο ενδοσυμβιώτης ***Candidatus Midichloria mitochondrii*** σε κρότωννα *Ixodes* sp. καθώς και η ***Wolbachia pipientis***, ο πιο διαδεδομένος ενδοσυμβιώτης των αρθροπόδων, στους περισσότερους ψύλλους *C. felis*.

Ήδη από την δεκαετία του 1990 υπήρξε η πρώτη αναφορά μπαρτονελλώσεων στην Ελλάδα και αφορούσε παιδιά (262). Ακολούθησαν αναφορές τη δεκαετία του 2000 σε εργασίες που σχετίζονταν με υγιείς πληθυσμούς (263–265) αλλά και σε ασθενείς με HIV (266). Η «νόσος εξ ονύχων γαλής» προκαλείται από την *B. henselae* και αναφορές περιστατικών έχουν καταγραφεί στη χώρα μας (267–271). Ενδεικτικά της έκθεσης του πληθυσμού της Αττικής στην *B. henselae* είναι τα ευρήματα πρόσφατης οροεπιδημιολογικής μελέτης στην περιοχή της Αττικής στην οποία ανευρέθηκε οροθετικότητα σε ποσοστό 17,8%, που αφορούσε κυρίως την περιοχή του Πειραιά. Η μελέτη βασίστηκε στο έμμεσο ανοσοφθορισμό χωρίς όμως να γίνει δυνατή η επιβεβαίωση μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western (272). Με τη «νόσο εξ ονύχων γαλής» στον άνθρωπο σχετίζεται και η *B. clarridgeiae* (273). Συνδέεται επίσης με νευρίτιδα και τύφλωση σε γάτες και ενδοκαρδίτιδα και ηπατικές νόσους σε σκύλους (274). Στην Ελλάδα, μελέτες που αφορούσαν μοριακή ανίχνευση *Bartonella* σε ζώα έγιναν σε γάτες από νησιά και Αθήνα, με συχνότητα *B. henselae* (6/148) με τα 4/7 θετικά δείγματα να προέρχονται από την Αθήνα (275). Σε γάτες από Μακεδονία και Θεσσαλία βρέθηκαν 3 είδη *Bartonella*: *B. henselae*, *B. clarridgeiae* και *B. kholerae*, σε ποσοστό 7%. (276). Σε παρόμοιες εργασίες που αφορούσαν σκύλους βρέθηκε επίσης *B. rochalimae* και *Bartonella* strain HMD (277) καθώς και *Candidatus*

Bartonella merieuxii, *B. henselae* και *B. rochalimae* (278). Αντίστοιχες αναφορές υπάρχουν σε άλλες μεσογειακές χώρες όπως Πορτογαλία (229) και Ιταλία (279).

Στην παρούσα εργασία επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ***Bartonella spp.*** 14/104 (13,5%) στους ψύλλους *C. felis*. Πιο συγκεκριμένα ανιχνεύθηκαν τα είδη ***Bartonella henselae*** με συχνότητα 2.9% και ***Bartonella clarridgeiae*** με συχνότητα 10,6%. Τα δείγματα προέρχονται από 10 διαφορετικές τοποθεσίες: από κέντρο Αθήνας, Αμπελόκηπους, Παγκράτι και Πετράλωνα (περιοχή Αθήνας), από Μαρούσι και Χαλάνδρι (Βόρεια Προάστια), από Παλαιό Φάληρο και Νέα Σμύρνη (Νότια Προάστια), από Καισαριανή (ανατολικά) και Ρέντη (Νοτιο-δυτικά). Τα περισσότερα θετικά δείγματα προέρχονται από την περιοχή της Αθήνας, γεγονός που μπορεί οφείλεται και στον μεγάλο αριθμό δειγμάτων από την περιοχή αυτή σε σχέση με τις υπόλοιπες. Τα μισά θετικά δείγματα 7/14 προέρχονταν από αδέσποτα γατάκια 2-6 μηνών, γεγονός που επίσης μπορεί να αποδοθεί στον μεγάλο αριθμό γατιών αυτής της ηλικίας στη μελέτη μας. Η σύγκριση των αλληλουχιών της παρούσας εργασίας με αλληλουχίες της GenBank έδειξαν ομολογία 100% με παθογόνα στελέχη *B. henselae* Houston-1 (L38987) και *B. clarridgeiae* που απομονώθηκε από περιστατικό αποστήματος της ρίζας της αορτής στην Μεγάλη Βρετανία (280). Ενδεχομένως μπαρτονελλώσεις που έχουν διαγνωστεί και στη χώρα μας να οφείλονται και σε αυτό το είδος, με δεδομένο ότι οι ορολογικές δοκιμασίες δεν μπορούν να διακρίνουν τα είδη μεταξύ τους. Το γεγονός ότι η *B. clarridgeiae* υπερτερεί σε συχνότητα στους ψύλλους *C. felis* έναντι της *B. henselae* που βρέθηκε στην δική μας μελέτη, συνάδει με αποτελέσματα και άλλων μελετών που αφορούν χώρες της Μεσογείου (281–283).

Στην μελέτη μας δεν ανιχνεύθηκε *Bartonella spp.* στους κρότωνα, αν και έχει αναφερθεί σε μελέτες σε κρότωνα *Rhipicephalus spp.* και *Ixodes spp.* σε ευρωπαϊκές χώρες και στις ΗΠΑ (159,284,285,229,260,286). Παρόλα αυτά ο ρόλος τους ως διαβιβαστή του συγκεκριμένου παθογόνου δεν έχει αποδειχθεί και αποτελεί αντικείμενο διερεύνησης (287).

Η Ελλάδα θεωρείται ενδημική χώρα για τον Μεσογειακό κηλιδοβλατιδώδη πυρετό που οφείλεται στην *Rickettsia conorii*. Στη χώρα μας έχουν έως τώρα αναφερθεί 13 είδη ρικετσιών που έχουν ανιχνευθεί είτε με ορολογικές δοκιμασίες, είτε με μοριακές τεχνικές σε μελέτες σχετιζόμενες με ανθρώπους, αρθρόποδα και ζώα. Ήδη από τη δεκαετία του 1980, διάφορες μελέτες αναφέρουν την ύπαρξη ρικετσιών σε ανθρώπους από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Σε οροεπιδημιολογική μελέτη σε δύο τοποθεσίες στην περιοχή της Κρήτης (Τυμπάκι και Ανώγεια) κατά τις χρονιές 1985-87, βρέθηκαν συνολικά 19/419 θετικά δείγματα για *R. conorii* (288). Στον νομό Φωκίδας (περιοχή Κεντρικής Ελλάδας), το 1991 είχε διεξαχθεί μελέτη ανίχνευσης *R.*

conorii στον ανθρώπινο πληθυσμό με οροθετικότητα 45.3% για το συγκεκριμένο παθογόνο (92). Η *R. conorii* και η *R. typhi* είχαν αναζητηθεί σε οροεπιδημιολογική μελέτη του 2002 σε υγιή άτομα στην περιοχή της Βόρειας Ελλάδας και είχαν βρεθεί με συχνότητα 7,9% και 2% αντίστοιχα (289). Παρόμοια εργασία διεξήχθη και στην Κρήτη σε βάθος χρόνου 14 ετών και οι συχνότητες που βρέθηκαν και για τα δύο παθογόνα ποίκιλαν ανάλογα με τη χρονολογία μελέτης (263). Άλλη εργασία επίσης από την περιοχή της Κρήτης είχε επιβεβαιώσει ορολογικά την *R. conorii* σε ασθενείς με υποψία Μεσογειακού Κηλιδώδους Πυρετού (96). Τα είδη που έχουν σχετισθεί άμεσα με ασθενείς στην Ελλάδα είναι η *R. conorii* (94), *R. sibirica mongolotimonae* (112), *R. aeschlimanii* (107) και η *R. slovacica* (131). Η *R. massiliae* ανιχνεύθηκε σε Άγγλο πολίτη διαμένοντα στην Κρήτη με ιστορικό νύγματος από κρότωνα στη χώρα του, την οποία είχε επισκεφθεί ακριβώς πριν από τη νόσησή του (128).

Εκτός από τις μελέτες που αφορούν ανθρώπους, σε πρόσφατες εργασίες έχει ανιχνευθεί *R. conorii* και σε σκύλους από 4 νησιά του Αιγαίου με ορολογικές και μοριακές δοκιμασίες με ποσοστό 46,5% και 11% αντίστοιχα (254). Σε παρόμοια εργασία σε γάτες από 3 νησιά και την περιοχή της Αθήνας ανιχνεύθηκαν *Rickettsia typhi* και *R. felis* σε παρόμοιο ποσοστά 43,5% και 33,8% αντίστοιχα (275).

Τα είδη ρικετσιών που έχουν ανιχνευθεί σε κρότωνα στον Ελλαδικό χώρο είναι τα ακόλουθα 11 είδη: *R. conorii*, *R. massiliae*, *R. rhipicephali*, *R. aeschlimanii*, *R. slovacica*, *R. raoulti*, *R. hoogstraadii*, *R. africae*, *R. monacensis*, *Candidatus R. barbariae* και *R. sibirica mongolotimonae*. Οι κρότωνα συλλέχθηκαν από ζώα κατοικίδια αίγες, πρόβατα, αγελάδες, άλογα, σκύλους αλλά και από ανθρώπους (94,107,109,112,128,253,255–257,275,290). Οι περιοχές προέλευσης (που σε κάποιες περιπτώσεις αναγράφονται αναλυτικά στην περιγραφή των αποτελεσμάτων αυτών των εργασιών), περιλαμβάνουν κυρίως τη Βόρεια Ελλάδα (Μακεδονία και Θράκη) αλλά και την Φωκίδα, την Κεφαλονιά, τη Στερεά Ελλάδα, τη Λάρισα, την Εύβοια και την Κρήτη ενώ σε κάποιες από αυτές είχε συμπεριληφθεί και η Αθήνα (253,290).

Στην μελέτη μας ανιχνεύθηκε η ***R. conorii*** σε κρότωνα *R. sanguineus* s.l. (3/41, 7,3%). Το είδος αυτό αποτελεί το βασικό διαβιβαστή του συγκεκριμένου παθογόνου στην περιοχή της Μεσογείου. Η αναφορά αυτή είναι η πρώτη στην περιοχή της Αττικής και πρώτη σε κρότωνα προερχόμενους από γάτες. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με την εύρεση *R. conorii* σε κρότωνα *R. sanguineus* προερχομένων από σκύλους από την Φωκίδα και την Κεφαλονιά (109,255) και από Εύβοια και Κρήτη (85). Όμως σε έρευνες του 2017 και 2019 που περιλάμβαναν κρότωνα *Rh. sanguineus* από σκύλους και από την περιοχή της Αθήνας (253,290) δεν έγινε

δυνατή η ανίχνευσή της. Στις δύο αυτές εργασίες γίνεται αναφορά της *R. massiliae* σε *R. sanguineus* (290) χωρίς όμως να προσδιορίζεται επακριβώς η προέλευση των διαβιβαστών και *R. massiliae* σε *R. sanguineus* / *Rh. turanicus* από τη Θεσσαλονίκη (253). Σε εργασία που αφορούσε κρότωνες που συλλέχθηκαν από ανθρώπους στην περιοχή της Θράκης τις χρονιές 2008-2009 - έτη κατά τα οποία υπήρξε έξαρση περιστατικών από νύγματα κροτώνων σε ανθρώπους- ανιχνεύθηκαν τα είδη *R. aeshlimanii*, *R. africae*, *R. massiliae*, *R. monacensis*, *Candidatus R. barbariae* (256). Ενδιαφέρουσα παρατήρηση στην εργασία αυτή αποτελεί το γεγονός ότι δεν ανιχνεύθηκε η *R. conorii* παρόλον ότι τη χρονιά 2008, καταγράφηκαν και 2 θάνατοι στη Β. Ελλάδα που οφείλονταν σε κροτωνογενή νόσηματα, εκ των οποίων ο ένας οφείλονταν σε *R. conorii* (256). Μια πιθανή εξήγηση, όπως αναφέρει και η συγγραφέας, είναι το ότι το στέλεχος Malish της *R. conorii* που έχει καταγραφεί στη χώρα μας, επηρεάζει και την επιβίωση των κροτώνων *R. sanguineus* όπως έχει καταγραφεί σε σχετικές μελέτες της παθογονικότητάς τους στους συγκεκριμένους κρότωνες (256).

Οι τρεις κρότωνες *R. sanguineus* στους οποίους ανιχνεύθηκε *R. conorii* προέρχονται από Καλλιθέα, Πειραιά και Μοσχάτο και οι δύο από τους τρεις προέρχονταν από γάτες, από τις οποίες η μία ήταν δεσποζόμενη. Η εύρεση του συγκεκριμένου κρότωννα σε γάτα καταγράφεται για πρώτη φορά στην Ελλάδα όπως έχει ήδη αναφερθεί. Το γεγονός ότι βρέθηκε και σε δεσποζόμενη γάτα θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από το ότι το είδος *R. sanguineus* είναι ευρέως διαδεδομένο και σε αστικά περιβάλλοντα και όπως έχει διαπιστωθεί μπορεί να ολοκληρώσει τον κύκλο ζωής του ακόμα και εντός κτιρίων (291). Θα μπορούσε να δικαιολογηθεί και από τον τρόπο διαβίωσης της δεσποζόμενης γάτας, εφόσον αυτή περνάει χρόνο εκτός της ανθρώπινης κατοικίας, σε τοποθεσίες που μπορεί να βρεθεί και το συγκεκριμένο είδος κρότωννα. Η εύρεση της *R. conorii* αναφέρεται για πρώτη φορά στην περιοχή της Αττικής, παρόλον ότι έχει αναφερθεί στην Ελλάδα σε άλλες περιοχές τόσο σε αρθρόποδα στη Φωκίδα και στην Κεφαλονιά (109,255), όσο και σε σκύλους από νησιά (254) καθώς και σε ανθρώπους (94). Το εύρημα αυτό δημιουργεί επίσης ερωτηματικά σχετικά με τον ρόλο της γάτας στην επιδημιολογία των ρικετσιών της ομάδας του κηλιδοβλατιδώδους πυρετού. Δεδομένα από μελέτες σε Νότια Αφρική και Ισπανία δείχνουν την παρουσία *R. conorii* σε αίμα γατιών σε αρκετά σημαντικά ποσοστά (292,293). Με βάση αυτό θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως δείκτες της παρουσίας ρικετσιών αφού για να θεωρηθεί ένα ζωικό είδος δείκτης παρουσίας ρικέτσιας θα πρέπει να εκτεθεί στον διαβιβαστή της, να έχει ευαισθησία στην μόλυνση από την ρικέτσια και να παρουσιάζει ορολογική ανταπόκριση σε αυτή (292).

Ο *R. sanguineus* αναφέρεται ως διαβιβαστής και της *R. massiliae* (59). Στην δική μας μελέτη δεν ανευρέθηκε η συγκεκριμένη ρικέτσια, ενδεχομένως λόγω του μικρού αριθμού εξετασθέντων κροτώνων. Στην χώρα μας έχει αναφερθεί σε κρότωνα *R. sanguineus* και *R. turanicus* από τη Θεσσαλονίκη (253) και σε 2 κρότωνα *R. sanguineus* χωρίς να αναφέρεται η περιοχή προέλευσης (290). Έχει επίσης αναφερθεί εισαγόμενο περιστατικό κηλιδοβρατιδώδους πυρετού που οφείλονταν σε *R. massiliae* σε ασθενή από την Κρήτη που είχε ταξιδέψει στην Αγγλία (128). Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι σε εργασία από την Γαλλία έχει αναφερθεί μόλυνση από *R. conorii* και από *R. massiliae* τριμελούς οικογένειας που ζούσε σε ισόγεια μονοκατοικία, σε πόλη κοντά στη Νίκαια της Γαλλίας. Μέσα από το σπίτι συλλέχθηκαν 22 κρότωνα στους οποίους ανιχνεύθηκε *R. conorii* (41%) και *R. massiliae* (32%) (294). Παρόμοια αναφορά με μολύνσεις ασθενών από το περιβάλλον της οικίας τους έχει αναφερθεί και σε περιστατικά μεσογειακού κηλιδοβρατιδώδους πυρετού στο Ισραήλ Jacobson 1982 από (295).

Σε ό,τι αφορά τις ρικέτσιες που μεταδίδονται μέσω των ψύλλων, στην εργασία μας δεν ανιχνεύθηκε η ***R. typhi***, που ανήκει στην ομάδα του εξανθηματικού τύφου, μια ρικέτσια που συνήθως μεταφέρεται από τους ψύλλους των ποντικών *Xenopsylla cheopis*. Πρόσφατη εργασία στην περιοχή της Αττικής ανέφερε την ανίχνευση *R. typhi* με ορολογικές και μοριακές δοκιμασίες σε 174 ορούς από δείγματα ανθρώπων σε σύνολο 5365 εξετασθέντων δειγμάτων, που συλλέχθηκαν την περίοδο 2012-2019 από όλη την Ελλάδα (296). Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές, βρέθηκε συσχέτιση του γεγονότος αυτού με ηλιοθεραπεία στη θάλασσα κατά τους θερινούς μήνες που αναφέρθηκε στο ιστορικό των ασθενών.

Στην μελέτη μας ανιχνεύθηκε η ***R. felis*** σε πέντε δείγματα ψύλλων *C. felis* (5/104). Τα τρία δείγματα προέρχονταν από γάτες και τα δύο από σκύλους, εκ των οποίων ο ένας δεσποζόμενος. Αναφορικά με τις θέσεις προέλευσης των δειγμάτων εντοπίζονται σε διάφορες περιοχές της Αττικής. Τα δύο δείγματα προέρχονταν από έναν σκύλο και μία γάτα από το Χαλάνδρι, και τα άλλα τρία από γάτα από την Αθήνα, από γάτα από τη Νέα Σμύρνη και από σκύλο από τον Κάλαμο. Για το συγκεκριμένο παθογόνο υπάρχει ήδη αναφορά σε εργασία του 2017 όπου ανιχνεύθηκε ορολογικά και μοριακά σε αίμα γάτας προερχόμενης από το νησί της Μυκόνου, ενώ στην ίδια εργασία αναφέρθηκε και η *R. typhi* σε Μύκονο, Κρήτη, Σκόπελο και Αθήνα σε συνολικό ποσοστό 33,8% (275). Η συγκεκριμένη ρικέτσια, αποτελεί άλλο ένα είδος που έχει εντοπιστεί μοριακά στον αρθρόποδο διαβιβαστή *C. felis* στην Ελλάδα. Σε μελέτη του 2021 στην Αττική (297) και σε μελέτη του 2018 που διεξήχθη στην περιοχή της Κρήτης και της Εύβοιας βρέθηκε επίσης σε ψύλλους *C. felis* (85). Στην

δεύτερη μελέτη που περιλάμβανε διερεύνηση 8 κλινικών περιπτώσεων με αυξημένα αντισώματα ως προς *C. felis*, αν και στα δείγματα των ασθενών δεν ταυτοποιήθηκε μοριακά η *R. felis*, ανιχνεύθηκε σε ψύλλους *C. felis* που προέρχονταν από το περιβάλλον των ασθενών. Στην Ελλάδα υπάρχει μια αναφορά τριών κρουσμάτων που οφείλονται στο συγκεκριμένο παθογόνο από την περιοχή της Χαλκίδας στην Εύβοια (84).

Η *R. felis* χαρακτηρίζεται ως αναδυόμενο παθογόνο, για το οποίο ο ψύλλος *C. felis* αποτελεί τον βασικό διαβιβαστή, έχει παγκόσμια διασπορά και έχει εντοπιστεί σε αρθρόποδα και σε ανθρώπους σε χώρες της λεκάνης της Μεσογείου (Γαλλία Ισπανία και Αίγυπτο) (298). Σε περιοχές της Αφρικής ενδημικές της ελονοσίας, έχει βρεθεί ότι ο ανωφελής κώνωπας συμμετέχει στη διασπορά και της *R. felis* (83). Από τον ίδιο ερευνητή αναφέρεται ότι υπάρχουν αναφορές ασθενών λόγω *R. felis* που είχαν επαφή με σκύλους ή με γάτες χωρίς να αναφέρουν ιστορικό νύγματος ψύλλου. Με βάση τα ανωτέρω, ενδεχομένως η διερεύνησή του συγκεκριμένου παθογόνου και στην Ελλάδα θα έπρεπε να τύχει μεγαλύτερης προσοχής. Σε αυτό συνηγορούν οι σύγχρονες συνθήκες που ευνοούν τις μετακινήσεις των ανθρώπινων πληθυσμών αλλά και των ζώων σε συνδυασμό με τις μεταβαλλόμενες κλιματολογικές συνθήκες που ευνοούν την διασπορά και των διαβιβαστών και των παθογόνων. Μελέτες που θα συμπεριλάμβαναν ζώα, ανθρώπους αλλά και αρθρόποδα θα μπορούσαν να διαφωτίσουν την επιδημιολογία του συγκεκριμένου αναδυόμενου παθογόνου και στη χώρα μας.

Η ***Ehrlichia canis*** ανιχνεύθηκε σε έναν κρότωνα *R. sanguineus* (1/41) από αδέσποτο σκύλο από το Κορωπί, περιοχή που βρίσκεται έξω από τον αστικό ιστό της Αθήνας. Αυτή είναι και η πρώτη αναφορά σε αρθρόποδο διαβιβαστή στην Ελλάδα. Η ανίχνευση έγινε με συμβατική PCR και η αλληλούχιση που ακολούθησε έδειξε ομολογία 100% με αλληλουχία προερχόμενη από αίμα σκύλου από την περιοχή της Κρήτης (241). Άρα ενδεχομένως να πρόκειται για στέλεχος που είναι κοινό στον Ελλαδικό χώρο. Σε παλαιότερες μελέτες που περιλάμβαναν γάτες από 3 νησιά και την Αθήνα ανιχνεύθηκε με ορολογικές μεθόδους σε ποσοστό 6,3% μόνο στην περιοχή της Αθήνας (275) και με ορολογικές και μοριακές μεθόδους σε σκύλους από 4 νησιά του Αιγαίου σε συνολικό ποσοστό 9,5% (254). Σε μεγάλης κλίμακας οροεπιδημιολογική μελέτη που περιλάμβανε σκύλους από όλη την Ελλάδα, ανιχνεύθηκε *Ehrlichia* spp. σε ποσοστό 12,5% χωρίς να γίνεται διαχωρισμός σε είδη, λόγω των διασταυρούμενων αντιδράσεων όπως αναφέρεται από τον συγγραφέα (299). Παρόμοια αναφορά αλλά ως προς ανίχνευση με ορολογικές μεθόδους της *E. canis* σε σκύλους υπάρχει και σε άλλη εργασία του ίδιου έτους με ποσοστό 12,5%

και μάλιστα στην περιοχή της Αττικής 8,4% (300) και σε εργασία του 2020 με εύρεσή του στην περιοχή της Κρήτης και της Λέρου με ποσοστό 7,5% (241). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τόσο οι γάτες όσο και οι σκύλοι έχουν εκτεθεί στην *E. canis* στην περιοχή της Αττικής. Η εύρεση του παθογόνου σε σκληρούς κρότωναes από την περιοχή της Αττικής συμβαδίζει με αυτά τα ευρήματα και αποτελεί την πρώτη αναφορά ανίχνευσής της στον κρότωνα *R. sanguineus* για τη χώρα μας.

Το είδος *E. canis* αναφέρεται κυρίως ως είδος κτηνιατρικής σημασίας και προκαλεί την μονοκυτταρική ερλιχίωση του σκύλου (139). Είδη του γένους *Ehrlichia* που συνδέονται με ασθένεια στους ανθρώπους είναι η *Ehrlichia chaffeensis* που προκαλεί την ανθρώπινη μονοκυτταρική ερλιχίωση και η *Ehrlichia ewingii* που προκαλεί την κοκκιοκυτταρική ερλιχίωση και στους σκύλους και στους ανθρώπους. Παρ' όλα αυτά, η *E. canis* έχει ανιχνευθεί σε ανθρώπους και έχει συνδεθεί και με νόσηση, όπως φαίνεται από σχετικές δημοσιεύσεις από τη Βραζιλία (137–139). Σε δημοσίευση του 2017 αναφέρθηκε ότι ένας νέος γονότυπος *E. canis*, συγγενικός με βραζιλιάνικο γονότυπο που βρέθηκε σε σκύλους, ανιχνεύθηκε σε υγιείς ενήλικες αιμοδότες στην Κόστα Ρίκα (140) συνηγορώντας στο ενδεχόμενο να υπάρχει ασυμπτωματική λοίμωξη και στους ανθρώπους (136).

Στην οικογένεια **Anaplasmataceae** εκτός από το γένος *Ehrlichia*, ανήκει και το γένος *Anaplasma*. Το είδος *Anaplasma phagocytophilum* που προκαλεί την ανθρώπινη κοκκιοκυτταρική αναπλάσμωση δεν ανιχνεύθηκε στην δική μας εργασία. Βασικός του διαβιβαστής στην Ευρώπη είναι ο κρότωναes *Ixodes ricinus*. Ενδεχομένως η μη εύρεσή του να δικαιολογείται από το γεγονός ότι στα δείγματά μας βρέθηκε ένας μόνο κρότωναes του γένους *Ixodes*, του οποίου η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους δεν κατέστη δυνατή. Παρόλα αυτά αναφορές του γένους *Anaplasma* έχουν υπάρξει σε εργασίες που αφορούν κρότωναes στην χώρα μας. *Anaplasma* spp. ανιχνεύθηκε σε κρότωναes από σκύλους (20,5%) και μηρυκαστικά (19,8%) (258) και *Anaplasma platys* σε κρότωναes *R. sanguineus* από Θεσσαλονίκη (253). Το *A. phagocytophilum* έχει ανιχνευθεί σε κρότωναes *I. ricinus* (από αίγες από τη Βόρεια Ελλάδα) (261) και σε κρότωναes *R. bursa* (από αίγες από τη Βόρεια Ελλάδα) (257). Σε εργασίες που σχετίζονται με σκύλους, βρέθηκαν *Anaplasma* spp. 6,2% (299), *A. phagocytophilum* 1% (254) και *Anaplasma platys* (241) και σε εργασία που σχετίζονταν με γάτες βρέθηκε *E. canis* 6,3% στην περιοχή της Αθήνας (275). Σε ανθρώπινα δείγματα είχε αναφερθεί οροθετικότητα ήδη από τη δεκαετία 2000 στην Β. Ελλάδα (301) και στην Κρήτη (302). Περιστατικά ανθρώπινης κοκκιοκυτταρικής αναπλάσμωσης έχουν επίσης διαγνωσθεί στα οποία περιλαμβάνεται και ένα θανατηφόρο περιστατικό το 2017 (303,304). Αυτά συνηγορούν στο ότι περαιτέρω διερεύνηση θα ήταν χρήσιμη,

καθώς όπως έχει ήδη αναφερθεί η νόσος θεωρείται υποδιαγνωσμένη στην Ελλάδα αλλά και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες (142,301).

Τα αποτελέσματα μας επιβεβαιώνουν την ύπαρξη του γένους *Wolbachia* και του είδους ***Wolbachia pipientis*** σε μεγάλο αριθμό ψύλλων *C. felis*. Το αποτέλεσμα αυτό συμβαδίζει με άλλες μελέτες από τη Γαλλία με συχνότητα 17,8% (281) και Ισπανία με συχνότητα 69,4% (305) στις οποίες χρησιμοποιήθηκε παρόμοια μεθοδολογία δηλαδή χρήση εκκινητών για *Ehrlichia / Anaplasma (Anaplasmataceae)*. Τα αποτελέσματά μας συμβαδίζουν περισσότερο με την μελέτη από την Ισπανία, γεγονός που ενδεχομένως οφείλεται στο δεδομένο ότι ο μεγαλύτερος αριθμός εξετασθέντων ψύλλων ήταν θηλυκοί. Η *Wolbachia* είναι ένα υποχρεωτικά ενδοσυμβιωτικό βακτήριο το οποίο απαντάται σε αρθρόποδα και σε νηματώδεις σκώληκες. Σύμφωνα με τους Zug and Hammerstein, στα αρθρόποδα απαντάται σε ποσοστό 40% (306). Στους φιλαριωδείς νηματώδεις έλμινθες, η συνύπαρξη με την *Wolbachia* είναι απαραίτητη για την επιβίωση, ανάπτυξη και αναπαραγωγή τους (307). Θεωρείται παρασιτικός οργανισμός που επηρεάζει τις αναπαραγωγικές ιδιότητες του ξενιστή ώστε να εξασφαλίσει τη διαίωσή του μέσω των θηλυκών ατόμων (308). Ο αναπαραγωγικός χειρισμός του ξενιστή του (reproductive manipulation) επιτυγχάνεται μέσω των εξής 4 μηχανισμών: κυτοπλασμική ασυμβατότητα, θανάτωση των αρσενικών, θηλυκοποίηση και θηλυτόκο παρθενογένεση (309). Η μελέτη των διαφόρων στελεχών που βασίστηκε στο γονίδιο *ftsZ* έδειξε την ύπαρξη επιμέρους ομάδων που χαρακτηρίστηκαν ως υπερομάδες και ονομάστηκαν με τα αρχικά του αγγλικού αλφαβήτου Α έως Η (310,308). Η ύπαρξη της *Wolbachia* (υπερομάδες Α, Β και F) έχει αναφερθεί σε ψύλλους κτηνιατρικής σημασίας, χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί ο ρόλος που διαδραματίζει ως προς την ευζωία και την αναπαραγωγή τους (311). Επιπλέον η ανεύρεσή τους κατεξοχήν σε θηλυκά άτομα που ενδεχομένως οφείλεται στην ύπαρξη της *Wolbachia* (305), χρήζει επιπλέον διερεύνησης ώστε να μπορεί να αιτιολογηθεί πράγματι από της παρουσία του συγκεκριμένου ενδοσυμβιώτη. Σχετικά με την ύπαρξη *Wolbachia* σε κρότωνα, υπάρχουν επίσης αναφορές των υπερομάδων Α και F σε διάφορα είδη κροτώνων τα οποία επίσης χρήζουν διερεύνησης (311). Η εύρεσή της στον κρότωνα *Ixodes ricinus* έχει συσνετιστεί με την ύπαρξη της παρασιτοειδούς σφήγκας *Ixodiphagus hookeri* (312).

Στην εργασία μας ανιχνεύθηκε επίσης και ο ενδοσυμβιώτης ***Candidatus midichloria mitochondrii*** στον μοναδικό κρότωνα *Ixodes* sp. που περιλήφθηκε στα δείγματα των εκτοπαρασίτων και αποτελεί την πρώτη αναφορά για τον συγκεκριμένο ενδοσυμβιώτη στην περιοχή της Αττικής. Η παρουσία του μοναδικού αυτού κρότωνα, θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από ταξίδι που είχε προηγηθεί στο νησί της

Λευκάδας, σύμφωνα με την μαρτυρία του κηδεμόνα του σκύλου στον οποίο ανευρέθηκε. Η αλληλουχία αυτή είχε 100% ομολογία με αλληλουχίες στην GenBank που απομονώθηκαν από *Ixodes ricinus* από χώρες της Μεσογείου: την Πορτογαλία (A.N. KX359181), τη Γαλλία (A.N. KU559921) και την Ιταλία (A.N. CP002130) όπως επίσης και από αίμα ανθρώπου (A.N. OM982404) αλλά και αλόγου (A.N. HF568841) από την Ιταλία. Στην Ελλάδα η μοναδική αναφορά του *Candidatus mitochondrii* έχει γίνει σε κρότωνα *I. ricinus* που συλλέχθηκαν από αίγες στη Βόρεια Ελλάδα (257). Η παρουσία του σε αίμα ανθρώπου αλλά και άλλων θηλαστικών που είχαν υποστεί νύγμα κρότωνα, έχει επιβεβαιωθεί με ορολογικές δοκιμασίες (313,314). Πρόσφατη εργασία καταδεικνύει επίσης την μετάδοση του ενδοσυμβιώτη αυτού σε ανθρώπους από διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες. Για τον λόγο αυτό στη συγκεκριμένη εργασία προτείνεται ότι η ενσωμάτωση αντιγόνων από *M. mitochondrii* από τους σιελογόνους αδένες των κροτώνων σε πολύ-αντιγονικό τεστ, θα διευκόλυε τη διάγνωση νύγματος κρότωνα σε ανθρώπους (315).

Σε ό,τι αφορά την μη ανίχνευση βακτηρίων των γενών *Anaplasma* / *Ehrlichia*, *Coxiella*, *Francisella*, *Borrelia* και του παρασιτικού πρωτοζώου *Babesia* στην παρούσα εργασία, θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από τον όχι μεγάλο αριθμό δειγμάτων κροτώνων αλλά και από το γεγονός ότι συγκεκριμένα είδη γένη και είδη κροτώνων που δεν περιλαμβάνονταν στα δείγματά μας, συνδέονται ως διαβιβαστές με κάποια από αυτά. Επίσης θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι εξετάστηκε μόνο ένας γενετικός δείκτης για κάθε παθογόνο. Ο έλεγχος με περισσότερους γενετικούς δείκτες ενδεχομένως να έδινε τη δυνατότητα ανίχνευσης, παρά τον περιορισμένο αριθμό δειγμάτων.

Κάποια από τα παθογόνα που αναζητήθηκαν επίσης σε άλλες ερευνητικές εργασίες, δεν έχουν ανευρεθεί παρόλον ότι η αναζήτησή τους αφορούσε μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Παράδειγμα αποτελεί το γένος *Borrelia* και πιο συγκεκριμένα το είδος *Borrelia burgdorferi*, που δεν έχει ανιχνευθεί έως σήμερα στη χώρα μας ακόμα και σε έρευνες που περιλάμβαναν μεγάλο αριθμό κροτώνων (195). Αντιθέτως σε γειτονικές μας χώρες υπάρχουν αντίστοιχες αναφορές ανίχνευσης του συγκεκριμένου γένους σε κρότωνα αλλά και σε ανθρώπους (196). Ο βασικός του διαβιβαστής στην Ευρώπη είναι το είδος *Ixodes ricinus*, το οποίο μέχρι σήμερα δεν έχει καταγραφεί στην Αττική. Ενδεχομένως η πιο ενδελεχής καταγραφή της πανίδας των κροτώνων στην Αττική, καταστήσει δυνατή την ανίχνευσή του και στην περιοχή αυτή στο μέλλον. Εν τούτοις, ενδιαφέρον γεγονός αποτελεί η πρόσφατη καταγραφή 2 κρουσμάτων μπορρελιώσεων στη χώρα μας που οφείλονταν στην *Borrelia afzelii*. Η διάγνωση αυτή βασίστηκε αποκλειστικά σε ορολογικές μεθόδους (196).

Τα βακτήρια του γένους *Francisella*, αποτελούν μικροοργανισμούς που δεν έχουν έως σήμερα ανιχνευθεί στην Ελλάδα παρόλον ότι υπάρχουν αναφορές κρουσμάτων σε άλλες χώρες της Μεσογείου όπως Ιταλία, Γαλλία, Ισπανία και Τουρκία. Σε ανασκόπηση του 2015, αναφέρεται ότι η τουλαραιμία εμφανίζεται με εποχική κατανομή στους ανθρώπους στην Ε.Ε. με τις περισσότερες περιπτώσεις να εμφανίζονται το καλοκαίρι και στις αρχές του φθινοπώρου (316). Τα δεδομένα επιτήρησης που βασίζονται στην υποχρεωτική δήλωση σε ζώα ή/και ανθρώπους θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην χαρτογράφηση της νόσου και στην εκτίμηση ενδεχόμενου κινδύνου για διάφορες περιοχές (316). Σύμφωνα με την τελευταία έκθεση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Ελέγχου Νοσημάτων, κατά την τελευταία πενταετία παρατηρείται αυξητική τάση στον αριθμό των καταγραφών της νόσου στην Ευρώπη (317).

Σύμφωνα με πρόσφατη νομοθεσία, πλέον και στη χώρα μας η δήλωση των ρικετσιώσεων (ομάδα κηλιδωδών πυρετών και ομάδα τύφου), των μπορρελιώσεων, των αναπλασμών και των ερλιχιώσεων, της μπαμπεσίωσης και του φθειρογενούς υπόστροφου πυρετού είναι υποχρεωτική (100). Το γεγονός αυτό θα μπορέσει να συνεισφέρει στην πληρέστερη και σωστότερη αποτύπωση των νοσημάτων αυτών στην ελληνική επικράτεια.

Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας, κάτω από το πρίσμα της Ενιαίας Υγείας, συνηγορούν στο ότι η διερεύνηση των αρθρόποδων διαβιβαστών αποτελεί ένα ζήτημα που θα πρέπει να τύχει μεγαλύτερης προσοχής με δεδομένο ότι η εύρεσή τους σε συγκεκριμένες περιοχές και συγκεκριμένες χρονικές περιόδους θα μπορούσε να συνεισφέρει και στη διάγνωση και έγκαιρη αντιμετώπιση περιστατικών που αφορούν νόσους μεταδιδόμενες από διαβιβαστές και ειδικά σε περιπτώσεις που οι νοσούντες δεν μπορούν να ανακαλέσουν επαφή με συγκεκριμένα αρθρόποδα (κρότωνα ή ψύλλους). Ειδικότερα για τους κρότωνα που αποτελούν τον δεύτερο σημαντικότερο διαβιβαστή παθογόνων μετά από τα κουνούπια, η διερεύνηση αυτή θα πρέπει να περιλαμβάνει συλλογή από το περιβάλλον, από τα οικόσιτα ζώα αλλά και από ζώα της άγριας πανίδας. Επιπλέον, η καταγραφή δειγμάτων εκτοπαρασίτων που συλλέγονται και από ανθρώπους θα πρέπει να τύχει μεγαλύτερης προσοχής και θα πρέπει να περιλαμβάνει όλες τις περιοχές της χώρας μας. Κάτι τέτοιο έως τώρα αναφερθεί μόνο στην περιοχή της Β. Ελλάδας. Η σωστή παρακολούθηση των πανίδας των κροτώνων εκτός από τη συλλογή τους, θα πρέπει να συνοδεύεται και από τη σωστή ταυτοποίησή τους με την συμπερίληψη μοριακών μεθόδων. Τα προαναφερθέντα σε συνδυασμό με τον ταυτόχρονο έλεγχο τους για παθογόνους

μικροοργανισμούς θα μπορέσουν να συνεισφέρουν γενικότερα στη μελέτη της επιδημιολογίας των κροτωνογενών νοσημάτων στη χώρα μας.

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνήθηκε η ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών σε εκτοπαράσιτα που συλλέχθηκαν από δεσποζόμενα και αδέσποτα ζώα συντροφιάς στην Αττική. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι τα εξής:

- Τα συλλεχθέντα εκτοπαράσιτα: κρότωνες και ψύλλοι ανήκουν στα γένη *Rhipicephalus*, *Ixodes* (κρότωνες) και *Ctenocephalides* (ψύλλοι). Τα είδη που ταυτοποιήθηκαν ήταν το είδος κρότωνα *Rhipicephalus sanguineus* s.l. και το είδος ψύλλου *Ctenocephalides felis*, αμφότερα με παγκόσμια εξάπλωση. Το γένος *Ixodes* καταγράφεται πρώτη φορά στην Αττική και δείχνει ότι η ανεύρεση εκτοπαράσιτων σε περιοχές που δεν είχαν προγενέστερη αναφορά δεν είναι απίθανη, με δεδομένη τη ευκολότερη δυνατότητα μετακίνησης ανθρώπων και ζώων αλλά και την μεταφορά τους μέσω της άγριας πανίδας.
- Ανιχνεύθηκε *Bartonella henselae* και *Bartonella clarridgeiae* στους ψύλλους *Ctenocephalides felis* στην περιοχή της Αττικής. Από τα στελέχη *Bartonella clarridgeiae* που ανιχνεύθηκαν το ένα παρουσιάζει έλλειμμα βάσεων στην αλληλουχία του εξεταζόμενου γονιδιακού τόπου 16S-23S rRNA ITS, γεγονός που το διαφοροποιεί από τα στελέχη που έχουν έως σήμερα κατατεθεί στη γονιδιακή βάση GenBank.
- Ανιχνεύθηκε *Rickettsia conorii* στους κρότωνες *Rhipicephalus sanguineus* s.l.. Αποτελεί πρώτη καταγραφή για το συγκεκριμένο παθογόνο στην Αττική και πρώτη καταγραφή για *R. sanguineus* προερχόμενο από γάτα, στην Ελλάδα. Με δεδομένο το ότι η χώρα μας χαρακτηρίζεται ως ενδημική του μεσογειακού κηλοδιβλατιδώδους πυρετού και τον μεγάλο αριθμό αδέσποτων ζώων στη χώρα μας, ο ρόλος και της γάτας στην επιδημιολογία αυτού του παθογόνου αξίζει περαιτέρω διερεύνησης.
- Ανιχνεύθηκε *Rickettsia felis* στους ψύλλους *Ctenocephalides felis* που θεωρείται ως το κύριο είδος διαβιβαστή του. Αποτελεί μία καταγραφή που καταδεικνύει την ύπαρξή του στην Αττική.
- Ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα *Ehrlichia canis* στους κρότωνες *Rhipicephalus sanguineus* s.l., που αποτελούν φορέα του συγκεκριμένου παθογόνου. Αποτελεί μια συμβολή στην μελέτη της επιδημιολογίας του συγκεκριμένου παθογόνου.
- Ανιχνεύθηκαν 2 ενδοσυμβιωτικά είδη της τάξεως των Rickettsiales: *Wolbachia pipientis* και *Candidatus Midichloria mitochondrii* στους ψύλλους *Ctenocephalides felis* και τον κρότωνα *Ixodes* sp. αντίστοιχα. Ειδικά το πρώτο

διερευνάται ως προς τον ρόλο που διαδραματίζει στην παθογονικότητα των αρθροπόδων διαβιβαστών διαμέσου τροποποίησης της βιολογικής τους συμπεριφοράς.

- Η PCR σε συνδυασμό με την αλληλούχιση κατά Sanger επιτρέπει την διαφοροποίηση γονότυπων σε σχέση με τους ήδη κατατεθειμένους στην βάση GenBank, στοιχείο που μπορεί να είναι χρήσιμο σε επιδημιολογικές μελέτες. Η qPCR επίσης επιτρέπει την άμεση ανίχνευση παθογόνων και σε δείγματα προερχόμενα από αρθρόποδα.
- Η συλλογή και ταυτοποίηση των εκτοπαρασίτων από ζώα που συχνά έρχονται σε επαφή με τον άνθρωπο καθώς και η διερεύνηση του μικροβιώματός τους είναι χρήσιμη για μια ολοκληρωμένη προσέγγιση της επιδημιολογίας των παθογόνων μικροοργανισμών στο πλαίσιο της Ενιαίας Υγείας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αυτή η σελίδα σκοπίμως είναι λευκή.

5. Βιβλιογραφία

1. Messina J. Environmental Change & Infectious Diseases. Rockefeller Found Econ Counc Planet Health. 2018;
2. Barker CM, Reisen WK. Chapter 4 - Epidemiology of Vector-Borne Diseases. In: Mullen GR, Durden LA, editors. Medical and Veterinary Entomology (Third Edition) [Internet]. Academic Press; 2019. p. 33–49. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128140437000042>
3. World Health Organization. Global Vector Control Response 2017-2030 [Internet]. 6th ed. Geneva: World Health Organization; 2017 [cited 2022 Feb 24]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/345573>
4. Marcondes CB. Generalities and Importance of Arthropod-Borne Diseases. In: Marcondes CB, editor. Arthropod Borne Diseases [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cited 2022 Mar 22]. p. 3–5. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-13884-8_1
5. Otranto D. Arthropod-borne pathogens of dogs and cats: From pathways and times of transmission to disease control. Vet Parasitol. 2018 Feb;251:68–77.
6. Harwood RF (Robert F, James MT, Herms WB. Entomology in human and animal health. 7th ed. New York: Macmillan; 1979.
7. Goddard J. INFECTIOUS DISEASES AND ARTHROPODS [Internet]. Vol. 40. HMP Communications, LLC; 2000 [cited 2023 Feb 25]. Available from: <https://go.gale.com/ps/i.do?p=AONE&sw=w&issn=00107069&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA60598204&sid=googleScholar&linkaccess=abs>
8. Durden LA, Mullen GR. Chapter 1 - Introduction. In: Mullen GR, Durden LA, editors. Medical and Veterinary Entomology (Third Edition) [Internet]. Academic Press; 2019. p. 1–16. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128140437000017>
9. Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2001 Mar 15;32(6):897–928.
10. Akhoundi M, Sereno D, Marteau A, Bruel C, Izri A. Who Bites Me? A Tentative Discriminative Key to Diagnose Hematophagous Ectoparasites Biting Using Clinical Manifestations. Diagnostics. 2020 May 15;10(5):308.
11. Burkett-Cadena ND. Morphological Adaptations of Parasitic Arthropods. In: Medical and veterinary entomology. 3rd edition. San Diego, CA: Elsevier; 2019.
12. Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D. Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. Vet Parasitol. 2011 Nov;182(1):14–21.
13. Sutherst RW. Global Change and Human Vulnerability to Vector-Borne Diseases. Clin Microbiol Rev. 2004 Jan;17(1):136–73.

14. Lavoipierre MMJ. Feeding Mechanism of Blood-sucking Arthropods. *Nature*. 1965 Oct;208(5007):302–3.
15. Andrade BB, Teixeira CR, Barral A, Barral-Netto M. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *An Acad Bras Ciênc*. 2005 Dec;77:665–93.
16. Rizzo MC, Arruda LK, Chapman MD, Fernandez-Caldas E, Baggio D, Platts-Mills TA, et al. IgG and IgE antibody responses to dust mite allergens among children with asthma in Brazil. *Ann Allergy*. 1993 Aug;71(2):152–8.
17. University of Edinburgh. Wellcome Collection. [cited 2023 Feb 28]. Flea larva. Available from: <https://wellcomecollection.org/works/d2fte5zh>
18. Carr J. PIXNIO - Public Domain Images. 2016 [cited 2023 Mar 1]. Free picture: scanning, electron micrograph, parasitic, flea. Available from: <https://pixnio.com/science/microscopy-images/insects/scanning-electron-micrograph-sem-of-a-parasitic-flea-2>
19. Lewis RE. Résumé of the Siphonaptera (Insecta) of the World. *J Med Entomol*. 1998 Jul 1;35(4):377–89.
20. Lane RP, Crosskey RW. *Medical Insects and Arachnids* [Internet]. Lane RP, Crosskey RW, editors. Dordrecht: Springer Netherlands; 1993 [cited 2022 Feb 22]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-1554-4>
21. Roberts LS, Schmidt GD, Janovy J. Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology. 8th ed. Boston: McGraw-Hill Higher Education; 2009. 701 p.
22. Lewis RE. Notes on the Geographical Distribution and Host Preferences in the Order Siphonaptera. Part 8. New Taxa Described Between 1984 and 1990, with a Current Classification of the Order. *J Med Entomol*. 1993 Jan 1;30(1):239–56.
23. Χανιώτης ΒΝ. Αρθρόποδα και Δημόσια Υγεία: Λοιμώξεις, Αλλεργίες, Εξωπαρασιτισμός [Internet]. Αθήνα: Zymel; 2001. 195 p. Available from: https://opac.seab.gr/search~S15*gre/?searchtype=i&SORT=D&searcharg=978-960-7116-24-6&searchindex=i&searchscope=15
24. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2020 [cited 2023 Mar 2]. How fleas spread disease | CDC. Available from: https://www.cdc.gov/fleas/life_cycle_and_hosts.html
25. Martínez-Carrasco C, Berriatua E, Garijo M, Martínez J, Alonso FD, Ruiz de Ybáñez R. Epidemiological Study of Non-systemic Parasitism in Dogs in Southeast Mediterranean Spain Assessed by Coprological and Post-mortem Examination. *Zoonoses Public Health*. 2007 Jun;54(5):195–203.
26. Mathison BA, Pritt BS. MEDICAL PARASITOLOGY. In: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods - 24th Edition [Internet]. 24th ed. Elsevier; 2021 [cited 2023 Mar 26]. p. 1290–351. Available from: <https://www.elsevier.com/books/henrys-clinical-diagnosis-and-management-by-laboratory-methods/mcpherson/978-0-323-67320-4>

27. Marshall AG. The cat flea, *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) as an intermediate host for cestodes. *Parasitology*. 1967 Aug;57(3):419–30.
28. Bartsocas CS, von Graevenitz A, Blodgett F. Dipylidium infection in a 6-month-old infant. *J Pediatr*. 1966 Nov 1;69(5, Part 1):814–5.
29. WHO. Plague [Internet]. 2022 [cited 2023 Mar 5]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/plague>
30. Eisen RJ, Gage KL. Transmission of Flea-Borne Zoonotic Agents. *Annu Rev Entomol*. 2012;57(1):61–82.
31. Portillo A, Santibáñez S, García-Álvarez L, Palomar AM, Oteo JA. Rickettsioses in Europe. *Microbes Infect*. 2015 Nov 1;17(11):834–8.
32. Blanton LS, Walker DH. Flea-Borne Rickettsioses and Rickettsiae. *Am J Trop Med Hyg*. 2017 Jan 11;96(1):53–6.
33. Okaro U, Addisu A, Casanas B, Anderson B. Bartonella Species, an Emerging Cause of Blood-Culture-Negative Endocarditis. *Clin Microbiol Rev*. 2017 Jul;30(3):709–46.
34. Álvarez-Fernández A, Breitschwerdt EB, Solano-Gallego L. Bartonella infections in cats and dogs including zoonotic aspects. *Parasit Vectors*. 2018 Dec 4;11(1):624.
35. Telford SR, Goethert HK. Ecology of Francisella tularensis. *Annu Rev Entomol*. 2020 Jan 7;65:351–72.
36. LiFO. LiFO. 2019 [cited 2023 Mar 2]. Λύθηκε το «μυστήριο» με τους ψύλλους στο ΑΠΘ - Βρήκαν πώς και γιατί εξαπλώθηκαν | LiFO. Available from: [https://www.lifo.gr/now/greece/lythike-mystirio-me-toys-psyλλoys-sto-apth-brikan-pos-kai-giati-exaplothikan](https://www.lifo.gr/now/greece/lythike-mystirio-me-toys-psyллоys-sto-apth-brikan-pos-kai-giati-exaplothikan)
37. Rust M. The Biology and Ecology of Cat Fleas and Advancements in Their Pest Management: A Review. *Insects*. 2017 Oct 27;8:118.
38. Rust M. Recent Advancements in the Control of Cat Fleas. *Insects*. 2020 Sep 29;11.
39. Rust MK. Insecticide Resistance in Fleas. *Insects*. 2016 Mar;7(1):10.
40. Pantazis G. I panis ton krotonon tis Hellados. In: *Epistimoniki Epetiris Panepistimiou*. Athens; 1947. p. 71–182. (*Epistimoniki Epetiris Panepistimiou Athinon (1946-1947)*).
41. Estrada-Peña A. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. 2015 Apr;34(1):53.
42. Walker JB, Keirans JE, Horak I. The genus Rhipicephalus (Acardi, Ixodidae): a guide to the brown ticks of the world. Cambridge ; New York: Cambridge University Press; 2000. 643 p.
43. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 1997 Oct;10(4):694–719.
44. Mertens M, Schmidt K, Ozkul A, Groschup MH. The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health. *Antiviral Res*. 2013 May 1;98(2):248–60.

45. Baneth G. Tick-borne infections of animals and humans: a common ground. *Int J Parasitol*. 2014 Aug 1;44(9):591–6.
46. Ereemeeva ME, Dasch GA. Challenges Posed by Tick-Borne Rickettsiae: Eco-Epidemiology and Public Health Implications. *Front Public Health* [Internet]. 2015 [cited 2023 May 7];3. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2015.00055>
47. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2022 [cited 2023 Mar 18]. Tickborne Diseases of the US: A Reference for HC Providers | CDC. Available from: <https://www.cdc.gov/ticks/tickbornediseases/index.html>
48. Commins SP, James HR, Kelly EA, Pochan SL, Workman LJ, Perzanowski MS, et al. The relevance of tick bites to the production of IgE antibodies to the mammalian oligosaccharide galactose- α -1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 May;127(5):1286-1293.e6.
49. ΕΟΔΥ. Τσιμπούρια - Κρότωνες [Internet]. Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας. 2022 [cited 2023 Mar 17]. Available from: <https://eody.gov.gr/disease/tsimpyria-krotones/>
50. ECDC. *Ixodes ricinus* - Factsheet for experts [Internet]. 2017 [cited 2023 Mar 16]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/tick-factsheets/ixodes-ricinus>
51. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2020 [cited 2023 Mar 20]. Preventing tick bites on people | CDC. Available from: https://www.cdc.gov/ticks/avoid/on_people.html
52. Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020 Nov 1;70(11):5607–12.
53. Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*. 2020 Jan 1;2020:baaa062.
54. Krawczak FS, Labruna MB, Hecht JA, Paddock CD, Karpathy SE. Genotypic Characterization of *Rickettsia bellii* Reveals Distinct Lineages in the United States and South America. *BioMed Res Int*. 2018 Apr 8;2018:e8505483.
55. Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Oct;26(4):657–702.
56. Olano JP. Rickettsial Infections. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1063(1):187–96.
57. Faccini-Martínez ÁA, García-Álvarez L, Hidalgo M, Oteo JA. Syndromic classification of rickettsioses: an approach for clinical practice. *Int J Infect Dis*. 2014 Nov 1;28:126–39.
58. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2020 [cited 2023 Mar 4]. How ticks spread disease | CDC. Available from: https://www.cdc.gov/ticks/life_cycle_and_hosts.html

59. Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier PE, Sotto A, et al. Warmer Weather Linked to Tick Attack and Emergence of Severe Rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008 Nov 18;2(11):e338.
60. Renvoisé A, Mediannikov O, Raoult D. Old and new tick-borne rickettsioses. *Int Health*. 2009 Sep 1;1(1):17–25.
61. Angelakis E, Raoult D. 187 - Rickettsia and Rickettsia-Like Organisms. In: Cohen J, Powderly WG, Opal SM, editors. *Infectious Diseases (Fourth Edition)* [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2023 May 7]. p. 1666-1675.e1. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702062858001878>
62. Olano JP, Walker DH. RICKETTSIAE AND OTHER RELATED INTRACELLULAR BACTERIA. In: *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* [Internet]. 24th ed. Elsevier; 2021 [cited 2023 Mar 26]. p. 1254–65. Available from: <https://www.elsevier.com/books/henrys-clinical-diagnosis-and-management-by-laboratory-methods/mcpherson/978-0-323-67320-4>
63. Martinez JJ, Seveau S, Veiga E, Matsuyama S, Cossart P. Ku70, a Component of DNA-Dependent Protein Kinase, Is a Mammalian Receptor for Rickettsia conorii. *Cell*. 2005 Dec 16;123(6):1013–23.
64. Chan YGY, Cardwell MM, Hermanas TM, Uchiyama T, Martinez JJ. Rickettsial Outer-Membrane Protein B (rOmpB) Mediates Bacterial Invasion through Ku70 in an Actin, c-Cbl, Clathrin and Caveolin 2-Dependent Manner. *Cell Microbiol*. 2009 Apr;11(4):629–44.
65. Gouin E, Egile C, Dehoux P, Villiers V, Adams J, Gertler F, et al. The RickA protein of Rickettsia conorii activates the Arp2/3 complex. *Nature*. 2004 Jan 29;427(6973):457–61.
66. Gillespie JJ, Ammerman NC, Beier-Sexton M, Sobral BS, Azad AF. Louse- and flea-borne rickettsioses: biological and genomic analyses. *Vet Res*. 2009;40(2):12.
67. Walker DH, Valbuena GA, Olano JP. Pathogenic Mechanisms of Diseases Caused by Rickettsia. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;990(1):1–11.
68. Raoult D, Dutour O, Houhamdi L, Jankauskas R, Fournier PE, Ardagna Y, et al. Evidence for Louse-Transmitted Diseases in Soldiers of Napoleon's Grand Army in Vilnius. *J Infect Dis*. 2006 Jan 1;193(1):112–20.
69. Badiaga S, Brouqui P. Human louse-transmitted infectious diseases. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Apr 1;18(4):332–7.
70. Bechah Y, Capo C, Mege JL, Raoult D. Epidemic typhus. *Lancet Infect Dis*. 2008 Jul 1;8(7):417–26.
71. Williams SG, Sacci JB, Schriefer ME, Andersen EM, Fujioka KK, Sorvillo FJ, et al. Typhus and typhuslike rickettsiae associated with opossums and their fleas in Los Angeles County, California. *J Clin Microbiol*. 1992 Jul;30(7):1758–62.

72. Gikas A, Doukakis S, Pediaditis J, Kastanakis S, Psaroulaki A, Tselentis Y. Murine typhus in Greece: epidemiological, clinical, and therapeutic data from 83 cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002 May;96(3):250–3.
73. Chaliotis G, Kritsotakis EI, Psaroulaki A, Tselentis Y, Gikas A. Murine typhus in central Greece: epidemiological, clinical, laboratory, and therapeutic-response features of 90 cases. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* 2012 Aug;16(8):e591-596.
74. Anyfantakis D, Doukakis S, Papadakis M, Triantafyllidou D, Bambili K, Polimili G, et al. Liver function test abnormalities in murine typhus in Greece: a retrospective study of 165 cases. *Infez Med.* 2013 Sep;21(3):207–10.
75. Tsioutis C, Chaliotis G, Kokkini S, Doukakis S, Tselentis Y, Psaroulaki A, et al. Murine typhus in elderly patients: a prospective study of 49 patients. *Scand J Infect Dis.* 2014 Nov 1;46(11):779–82.
76. Karalexi MA, Mitrogiorgou M, Atsali E, Theodorakopoulos A, Attilakos A, Tsagris V. Murine Typhus Mimicking Kawasaki Disease in a Preadolescent Girl. *Pediatr Infect Dis J.* 2018 Oct;37(10):e260–1.
77. Sarikloglou E, Goula A, Sidiropoulos C, Tsolia M, Papa A. Murine Typhus with Marked Thrombocytopenia in a Child in Northern Greece and Literature Review. *Jpn J Infect Dis.* 2018 Sep 21;71(5):368–9.
78. Spornovasilis N, Tsioutis C, Zafeiri M, Hamilos G, Gikas A. Severe Murine Typhus Presenting with Acalculous Cholecystitis: A Case Report and Literature Review. *Case Rep Med.* 2017;2017:3769074.
79. Dumler JS, Taylor JP, Walker DH. Clinical and laboratory features of murine typhus in south Texas, 1980 through 1987. *JAMA.* 1991 Sep 11;266(10):1365–70.
80. Brown LD, Macaluso KR. *Rickettsia felis*, an Emerging Flea-Borne Rickettsiosis. *Curr Trop Med Rep.* 2016 Jun 1;3(2):27–39.
81. Azad AF, Sacci JB, Nelson WM, Dasch GA, Schmidtman ET, Carl M. Genetic Characterization and Transovarial Transmission of a Typhus-Like *Rickettsia* Found in Cat Fleas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(1):43–6.
82. Hirunkanokpun S, Thepparit C, Foil LD, Macaluso KR. Horizontal transmission of *Rickettsia felis* between cat fleas, *Ctenocephalides felis*. *Mol Ecol.* 2011;20(21):4577–86.
83. Angelakis E, Mediannikov O, Parola P, Raoult D. *Rickettsia felis* : The Complex Journey of an Emergent Human Pathogen. *Trends Parasitol.* 2016 Jul;32(7):554–64.
84. Χαλιώτης Γ. Κλινική μελέτη και μοριακή επιδημιολογία των ρικετσιώσεων στην περιοχή της Χαλκίδας [Internet] [Διδακτορική Διατριβή]. Πανεπιστήμιο Κρήτης. Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Ιατρικής; 2013 [cited 2023 Mar 21]. Available from: <http://hdl.handle.net/10442/hedi/36140>
85. Chochlakis D, Germanakis A, Chaliotis G, Kapetanaki S, Kalogeraki L, Gkika E, et al. Potential exposure of humans to *Rickettsia felis* in Greece. *Acta Trop.* 2018 Feb;178:40–5.

86. Socolovschi C, Mediannikov O, Sokhna C, Tall A, Diatta G, Bassene H, et al. *Rickettsia felis* –associated Uneruptive Fever, Senegal. *Emerg Infect Dis*. 2010 Jul;16(7):1140–2.
87. Maina AN, Knobel DL, Jiang J, Halliday J, Feikin DR, Cleaveland S, et al. *Rickettsia felis* Infection in Febrile Patients, Western Kenya, 2007–2010 - Volume 18, Number 2— February 2012 - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC. 2012 [cited 2023 May 15]; Available from: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/2/11-1372_article
88. Mediannikov O, Socolovschi C, Edouard S, Fenollar F, Mouffok N, Bassene H, et al. Common Epidemiology of *Rickettsia felis* Infection and Malaria, Africa. *Emerg Infect Dis*. 2013 Nov;19(11):1775–83.
89. Zhu Y, Fournier PE, Ereemeeva M, Raoult D. Proposal to create subspecies of *Rickettsia conorii* based on multi-locus sequence typing and an emended description of *Rickettsia conorii*. *BMC Microbiol*. 2005 Mar 14;5(1):11.
90. Walker DH, de Sousa R. Reply to Fournier and Raoult. *J Infect Dis*. 2009 Apr 1;199(7):1098–9.
91. De Sousa R, Luz T, Parreira P, Santos-Silva M, Bacellar F. Boutonneuse fever and climate variability. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Oct;1078:162–9.
92. Babalis T, Dupont HT, Tselentis Y, Chatzichristodoulou C, Raoult D. *Rickettsia conorii* in Greece: Comparison of a Microimmunofluorescence Assay and Western Blotting for Seroepidemiology. *Am J Trop Med Hyg*. 1993 Jun 1;48(6):784–92.
93. Bitsori M, Galanakis E, Papadakis C, Sbyrakis S. Facial nerve palsy associated with *Rickettsia conorii* infection. *Arch Dis Child*. 2001 Jul;85(1):54–5.
94. Psaroulaki A, Germanakis A, Gikas A, Scoulica E, Tselentis Y. First isolation and genotypic identification of *Rickettsia conorii* Malish 7 from a patient in Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 Apr;24(4):297–8.
95. Spengos K, Stouraitis G, Voumvourakis K, Zambelis T, Karandreas N. Motor and sensory polyneuritis with distal conduction failure as uncommon complication of an acute *Rickettsia conorii* infection. *J Neurol Sci*. 2005 Jul 15;234(1):113–6.
96. Germanakis A, Psaroulaki A, Gikas A, Tselentis Y. Mediterranean Spotted Fever in Crete, Greece: Clinical and Therapeutic Data of 15 Consecutive Patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Oct 1;1078(1):263–9.
97. Tsiachris D, Deutsch M, Vassilopoulos D, Zafiropoulou R, Archimandritis AJ. Sensorineural hearing loss complicating severe rickettsial diseases: Report of two cases. *J Infect*. 2008 Jan 1;56(1):74–6.
98. Papa A, Dalla V, Petala A, Maltezou HC, Maltezos E. Fatal Mediterranean spotted fever in Greece. *Clin Microbiol Infect*. 2010 Jun 1;16(6):589–92.
99. Tzanetakos D, Papadopoulou M, Kanellopoulos D, Mamali M, Safarikas M, Katsianos D, et al. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy associated with *Rickettsia conorii*: First case report. *J Neurol Sci*. 2016 Dec;371:60–1.

100. ΕΟΔΥ. Επιδημιολογική επιτήρηση μη ιογενών νοσημάτων που μεταδίδονται με κρότωνες ή ψύλλους [Internet]. 2022 [cited 2023 Mar 25]. Available from: https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2022/04/epidimiologiki_epit_lyme-rik-anap-erlix-2022.pdf
101. Walker DH, Occhino C, Tringali GR, Rosa SD, Mansueto S. Pathogenesis of rickettsial eschars: The tache noire of boutonneuse fever. *Hum Pathol*. 1988 Dec 1;19(12):1449–54.
102. Antón E, Font B, Muñoz T, Sanfeliu I, Segura F. Clinical and Laboratory Characteristics of 144 Patients with Mediterranean Spotted Fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003 Feb 1;22(2):126–8.
103. Raoult D, Gallais H, Ottomani A, Resch JP, Tichadou D, De Micco P, et al. [Malignant form of Mediterranean boutonneuse fever. 6 cases]. *Presse Medicale Paris Fr* 1983. 1983 Oct 29;12(38):2375–8.
104. Rovey C, Brouqui P, Raoult D. Questions on Mediterranean Spotted Fever a Century after Its Discovery. *Emerg Infect Dis*. 2008 Sep;14(9):1360–7.
105. De Sousa R, França A, Dória Nóbrega S, Belo A, Amaro M, Abreu T, et al. Host- and microbe-related risk factors for and pathophysiology of fatal *Rickettsia conorii* infection in Portuguese patients. *J Infect Dis*. 2008 Aug 15;198(4):576–85.
106. Raoult D, Fournier PE, Abboud P, Caron F. First Documented Human *Rickettsia aeschlimannii* Infection - Volume 8, Number 7—July 2002 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. 2002 Jul [cited 2023 May 19]; Available from: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/7/01-0480_article
107. Germanakis A, Chochlakis D, Angelakis E, Tselentis Y, Psaroulaki A. *Rickettsia aeschlimannii* Infection in a Man, Greece. *Emerg Infect Dis*. 2013 Jul;19(7):1176–7.
108. Fernández Soto P, Encinas Grandes A, Pérez Sánchez R. *Rickettsia aeschlimannii* in Spain: molecular evidence in *Hyalomma marginatum* and five other tick species that feed on humans. 2003 Jul [cited 2023 May 18]; Available from: <https://digital.csic.es/handle/10261/10915>
109. Psaroulaki A, Ragiadakou D, Kouris G, Papadopoulos B, Chaniotis B, Tselentis Y. Ticks, Tick-Borne Rickettsiae, and *Coxiella burnetii* in the Greek Island of Cephalonia. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Oct 1;1078(1):389–99.
110. Foissac M, Socolovschi C, Raoult D. « Lymphangitis-associated rickettsiosis » due à *Rickettsia sibirica mongolitimonae*. *Ann Dermatol Vénéréologie*. 2013 Aug 1;140(8):521–7.
111. Yu X, Jin Y, Fan M, Xu G, Liu Q, Raoult D. Genotypic and antigenic identification of two new strains of spotted fever group rickettsiae isolated from China. *J Clin Microbiol*. 1993 Jan;31(1):83–8.
112. Psaroulaki A, Germanakis A, Gikas A, Scoulica E, Tselentis Y. Simultaneous Detection of “*Rickettsia mongolotimonae*” in a Patient and in a Tick in Greece. *J Clin Microbiol*. 2005 Jul;43(7):3558–9.

113. Chochlakis D, Ioannou I, Sandalakis V, Dimitriou T, Kassinis N, Papadopoulos B, et al. Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks in Cyprus. *Microb Ecol.* 2012 Feb 1;63(2):314–23.
114. Toledo A, Olmeda A, Escudero R, Jado I, Valcarcel F, Casado-Nistal M, et al. Tick-Borne Zoonotic Bacteria in Ticks Collected from Central Spain. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Aug 1;81:67–74.
115. Edouard S, Parola P, Socolovschi C, Davoust B, Scola BL, Raoult D. Clustered Cases of *Rickettsia sibirica mongolitimonae* Infection, France - Volume 19, Number 2—February 2013 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC.* 2013 [cited 2023 May 19]; Available from: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/2/12-0863_article
116. Mera IGF de, Ruiz-Fons F, Fuente G de la, Mangold AJ, Gortázar C, Fuente J de la. Spotted Fever Group Rickettsiae in Questing Ticks, Central Spain - Volume 19, Number 7—July 2013 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC.* 2013 [cited 2023 May 19]; Available from: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/7/13-0005_article
117. Ramos JM, Jado I, Padilla S, Masiá M, Anda P, Gutiérrez F. Human Infection with *Rickettsia sibirica mongolitimonae*, Spain, 2007–2011 - Volume 19, Number 2—February 2013 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC.* 2013 [cited 2023 May 19]; Available from: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/2/11-1706_article
118. Jakimovski D, Mateska S, Simin V, Bogdan I, Mijatović D, Estrada-Peña A, et al. Mediterranean spotted fever-like illness caused by *Rickettsia sibirica mongolitimonae*, North Macedonia, June 2022. *Eurosurveillance.* 2022 Oct 20;27(42):2200735.
119. Berrelha J, Briolant S, Muller F, Rolain JM, Marie JL, Pagés F, et al. *Rickettsia felis* and *Rickettsia massiliae* in Ivory Coast, Africa. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Dec 1;15:251–2.
120. Mediannikov O, Diatta G, Fenollar F, Sokhna C, Trape JF, Raoult D. Tick-borne rickettsioses, neglected emerging diseases in rural Senegal. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Sep 14;4(9):e821.
121. Khrouf F, M’Ghirbi Y, Znazen A, Ben Jemaa M, Hammami A, Bouattour A. Detection of *Rickettsia* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks and *Ctenocephalides felis* fleas from southeastern Tunisia by reverse line blot assay. *J Clin Microbiol.* 2014 Jan;52(1):268–74.
122. Kumsa B, Socolovschi C, Raoult D, Parola P. Spotted fever group rickettsiae in ixodid ticks in Oromia, Ethiopia. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2015 Feb 1;6(1):8–15.
123. Halajian A, Palomar AM, Portillo A, Heyne H, Luus-Powell WJ, Oteo JA. Investigation of *Rickettsia*, *Coxiella burnetii* and *Bartonella* in ticks from animals in South Africa. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2016 Mar;7(2):361–6.
124. Vanegas A, Keller C, Krüger A, Manchang TK, Hagen RM, Frickmann H, et al. Molecular detection of spotted fever group rickettsiae in ticks from Cameroon. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2018 Dec;9(4):1049–56.
125. Elelu N, Ola-Fadunsin SD, Bankole AA, Raji MA, Ogo NI, Cutler SJ. Prevalence of tick infestation and molecular characterization of spotted fever *Rickettsia massiliae* in

- Rhipicephalus species parasitizing domestic small ruminants in north-central Nigeria. PloS One. 2022;17(2):e0263843.
126. Ali A, Zahid H, Zeb I, Tufail M, Khan S, Haroon M, et al. Risk factors associated with tick infestations on equids in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan, with notes on Rickettsia massiliae detection. Parasit Vectors. 2021 Jul 13;14(1):363.
 127. Eldin C, Virgili G, Attard L, Edouard S, Viale P, Raoult D, et al. Rickettsia massiliae infection after a tick bite on the eyelid. Travel Med Infect Dis. 2018 Nov 1;26:66–8.
 128. Chochlakis D, Bongiorni C, Partalis N, Tselentis Y, Psaroulaki A. Possible Rickettsia massiliae Infection in Greece: an Imported Case. Jpn J Infect Dis. 2016 Jul 22;69(4):328–30.
 129. Raoult D, Berbis P, Roux V, Xu W, Maurin M. A new tick-transmitted disease due to Rickettsia slovaca. The Lancet. 1997 Jul 12;350(9071):112–3.
 130. Cazorla C, Enea M, Lucht F, Raoult D. First Isolation of Rickettsia slovaca from a Patient, France. Emerg Infect Dis. 2003 Jan;9(1):135.
 131. Kostopoulou V, Chochlakis D, Kanta C, Katsanou A, Rossiou K, Rammos A, et al. A Case of Human Infection by Rickettsia slovaca in Greece. Jpn J Infect Dis. 2016;69(4):335–7.
 132. Whiteford SF, Taylor JP, Dumler JS. Clinical, Laboratory, and Epidemiologic Features of Murine Typhus in 97 Texas Children. Arch Pediatr Adolesc Med. 2001 Mar 1;155(3):396–400.
 133. Raoult D, Dasch GA. Immunoblot cross-reactions among Rickettsia, Proteus spp. and Legionella spp. in patients with Mediterranean spotted fever. FEMS Immunol Med Microbiol. 1995 Mar;11(1):13–8.
 134. Blanton LS. The Rickettsioses: A Practical Update. Infect Dis Clin North Am. 2019 Mar;33(1):213–29.
 135. Fredericks CN. Introduction to the Rickettsiales and Other Intracellular Prokaryotes. In 2006. p. 457–66.
 136. Conrad ME. Review: Ehrlichia Canis: A Tick-Borne Rickettsial-like Infection in Humans Living in the Southeastern United States. Am J Med Sci. 1989 Jan;297(1):35–7.
 137. Perez M, Rikihisa Y, Wen B. Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. J Clin Microbiol. 1996 Sep;34(9):2133–9.
 138. Perez M, Bodor M, Zhang C, Xiong Q, Rikihisa Y. Human Infection with Ehrlichia canis Accompanied by Clinical Signs in Venezuela. Ann N Y Acad Sci. 2006;1078(1):110–7.
 139. Unver A, Perez M, Orellana N, Huang H, Rikihisa Y. Molecular and Antigenic Comparison of Ehrlichia canis Isolates from Dogs, Ticks, and a Human in Venezuela. J Clin Microbiol. 2001 Aug;39(8):2788–93.
 140. Bouza-Mora L, Dolz G, Solórzano-Morales A, Romero-Zuñiga JJ, Salazar-Sánchez L, Labruna MB, et al. Novel genotype of Ehrlichia canis detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. Ticks Tick-Borne Dis. 2017 Jan 1;8(1):36–40.

141. Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Jul 22;3:31.
142. ECDC. Factsheet on Human granulocytic anaplasmosis [Internet]. 2018 [cited 2023 May 23]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/human-granulocytic-anaplasmosis/factsheet-human-granulocytic-anaplasmosis>
143. Rikihisa Y. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nat Rev Microbiol*. 2010 May;8(5):328–39.
144. Pruneau L, Moumène A, Meyer DF, Marcelino I, Lefrançois T, Vachiéry N. Understanding Anaplasmataceae pathogenesis using “Omics” approaches. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014 Jul 2;4:86.
145. Dahmani M, Davoust B, Sambou M, Bassene H, Scandola P, Ameer T, et al. Molecular investigation and phylogeny of species of the Anaplasmataceae infecting animals and ticks in Senegal. *Parasit Vectors*. 2019 Oct 22;12(1):495.
146. Biggs HM, Behravesh CB, Bradley KK, Dahlgren FS, Drexler NA, Dumler JS, et al. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis — United States: A Practical Guide for Health Care and Public Health Professionals. *MMWR Recomm Rep*. 2016 May 13;65(2):1–44.
147. Ismail N, Bloch KC, McBride JW. Human Ehrlichiosis and Anaplasmosis. *Clin Lab Med*. 2010 Mar 1;30(1):261–92.
148. Dumler SJ, Walker DH. *Ehrlichia chaffeensis* (Human Monocytotropic Ehrlichiosis), *Anaplasma phagocytophilum* (Human Granulocytotropic Anaplasmosis), and Other Anaplasmataceae. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett’s infectious disease essentials*. Philadelphia, PA: Elsevier; 2017. p. 266–7.
149. España PP, Uranga A, Cillóniz C, Torres A. Q Fever (*Coxiella burnetii*). *Semin Respir Crit Care Med*. 2020 Aug;41(4):509–21.
150. Duron O, Sidi-Boumedine K, Rousset E, Moutailler S, Jourdain E. The Importance of Ticks in Q Fever Transmission: What Has (and Has Not) Been Demonstrated? *Trends Parasitol*. 2015 Nov;31(11):536–52.
151. Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, et al. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. *Clin Microbiol Rev*. 2017 Jan;30(1):115–90.
152. CDC. CDC | Bioterrorism Agents/Diseases (by category) | Emergency Preparedness & Response [Internet]. 2019 [cited 2023 Apr 20]. Available from: <https://www.emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>
153. Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Nelson KE, Nelson WC, et al. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci*. 2003 Apr 29;100(9):5455–60.

154. Hackstadt T. Steric hindrance of antibody binding to surface proteins of *Coxiella burnetii* by phase I lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 1988 Apr;56(4):802–7.
155. Million M, Thuny F, Richet H, Raoult D. Long-term outcome of Q fever endocarditis: a 26-year personal survey. *Lancet Infect Dis*. 2010 Aug;10(8):527–35.
156. Angelakis E, Raoult D. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Jul 1;44(1):16–25.
157. Breitschwerdt EB, Kordick DL. *Bartonella* Infection in Animals: Carriership, Reservoir Potential, Pathogenicity, and Zoonotic Potential for Human Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Jul;13(3):428–38.
158. Kaiser PO, Riess T, O'Rourke F, Linke D, Kempf VAJ. *Bartonella* spp.: Throwing light on uncommon human infections. *Int J Med Microbiol*. 2011 Jan 1;301(1):7–15.
159. Wikswo ME, Hu R, Metzger ME, Eremeeva ME. Detection of *Rickettsia rickettsii* and *Bartonella henselae* in *Rhipicephalus sanguineus* Ticks from California. *J Med Entomol*. 2007 Jan 1;44(1):158–62.
160. Billeter SA, Levy MG, Chomel BB, Breitschwerdt EB. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med Vet Entomol*. 2008;22(1):1–15.
161. Regier Y, O'Rourke F, Kempf VAJ. *Bartonella* spp. - a chance to establish One Health concepts in veterinary and human medicine. *Parasit Vectors*. 2016 May 10;9(1):261.
162. Maguiña C, Guerra H, Ventosilla P. Bartonellosis. *Clin Dermatol*. 2009 May 1;27(3):271–80.
163. Minnick MF, Anderson BE, Lima A, Battisti JM, Lawyer PG, Birtles RJ. Oroya Fever and Verruga Peruana: Bartonellosis Unique to South America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jul 17;8(7):e2919.
164. Regnery RL, Anderson BE, Clarridge JE, Rodriguez-Barradas MC, Jones DC, Carr JH. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol*. 1992 Feb;30(2):265–74.
165. Lamas C, Curi A, Bóia M, Lemos E. Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 May;103(3):221–35.
166. Pulliainen AT, Dehio C. Persistence of *Bartonella* spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 May 1;36(3):563–99.
167. Minnick MF, Battisti JM. Pestilence, persistence and pathogenicity: infection strategies of *Bartonella*. *Future Microbiol*. 2009 Aug;4(6):743–58.
168. Scherer DC, DeBuron-Connors I, Minnick MF. Characterization of *Bartonella* bacilliformis flagella and effect of anti-flagellin antibodies on invasion of human erythrocytes. *Infect Immun*. 1993 Dec;61(12):4962–71.

169. Pulliainen AT, Dehio C. Bartonella henselae: Subversion of vascular endothelial cell functions by translocated bacterial effector proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Mar 1;41(3):507–10.
170. Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, Maguina C, Dolan MJ, Raoult D. Recommendations for treatment of human infections caused by Bartonella species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jun;48(6):1921–33.
171. Florin TA, Zaoutis TE, Zaoutis LB. Beyond cat scratch disease: widening spectrum of Bartonella henselae infection. *Pediatrics.* 2008 Dec;121(5):e1413-1425.
172. Maurin M, Raoult D. Bartonella infections: Diagnostic and management issues. *Curr Opin Infect Dis.* 1998;11(2):189–93.
173. Bruce D. Trench Fever. Final Report of the War Office Trench Fever Investigation Committee. *Epidemiol Infect.* 1921 Nov;20(3):258–88.
174. Gomes C, Ruiz J. Carrion’s Disease: the Sound of Silence. *Clin Microbiol Rev.* 2017 Nov 29;31(1):e00056-17.
175. Maurin M, Eb F, Etienne J, Raoult D. Serological cross-reactions between Bartonella and Chlamydia species: implications for diagnosis. *J Clin Microbiol.* 1997 Sep;35(9):2283–7.
176. Rolain JM, Lecam C, Raoult D. Simplified Serological Diagnosis of Endocarditis Due to Coxiella burnetii and Bartonella. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Nov;10(6):1147–8.
177. Edouard S, Nabet C, Lepidi H, Fournier PE, Raoult D. Bartonella, a common cause of endocarditis: a report on 106 cases and review. *J Clin Microbiol.* 2015 Mar;53(3):824–9.
178. Gutierrez R, Taussat MV, Buffet JP, Harrus S. Guidelines for the isolation, molecular detection, and characterization of Bartonella Species. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2017;17(1):42.
179. Carvalho CL, Lopes de Carvalho I, Zé-Zé L, Nuncio MS, Duarte EL. Tularaemia: A challenging zoonosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2014 Mar;37(2):85–96.
180. Petersen JM, Mead PS, Schriefer ME. Francisella tularensis: an arthropod-borne pathogen. *Vet Res [Internet].* 2009 [cited 2023 Apr 19];40(2). Available from: <https://hal.science/hal-00903078>
181. Lundström JO, Andersson AC, Bäckman S, Schäfer ML, Forsman M, Thelaus J. Transstadial Transmission of Francisella tularensis holarctica in Mosquitoes, Sweden. *Emerg Infect Dis [Internet].* 2011 May 5 [cited 2023 Apr 19];Volume 17. Available from: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/5/10-0426_article
182. Lopes De Carvalho I, Nuncio MS, David De Morais J. Tularemia. *Acta Med Port.* 2009;22(3):281–90.
183. Ellis J, Oyston PCF, Green M, Titball RW. Tularemia. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Oct;15(4):631–46.

184. Wojewoda CM, Stempak LM. MEDICAL BACTERIOLOGY. In: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods - 24th Edition [Internet]. 24th ed. Elsevier; 2021 [cited 2023 Mar 26]. p. 1130–65. Available from: <https://www.elsevier.com/books/henrys-clinical-diagnosis-and-management-by-laboratory-methods/mcpherson/978-0-323-67320-4>
185. Splettstoesser WD, Tomaso H, Al Dahouk S, Neubauer H, Schuff-Werner P. Diagnostic procedures in tularaemia with special focus on molecular and immunological techniques. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2005 Aug;52(6):249–61.
186. World Health Organization. WHO Guidelines on tularaemia [Internet]. World Health Organization; 2007 [cited 2023 Apr 21]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43793>
187. Pritt BS, Respcio-Kingry LB, Sloan LM, Schriefer ME, Replogle AJ, Bjork J, et al. *Borrelia mayonii* sp. nov., a member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, detected in patients and ticks in the upper midwestern United States. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016;66(11):4878–80.
188. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2015 [cited 2023 Mar 22]. Relapsing fever home | CDC. Available from: <https://www.cdc.gov/relapsing-fever/index.html>
189. Kugeler KJ, Schwartz AM, Delorey MJ, Mead PS, Hinckley AF. Estimating the Frequency of Lyme Disease Diagnoses, United States, 2010–2018. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2021 Feb [cited 2023 Mar 18];27(2). Available from: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/27/2/20-2731_article
190. Girard YA, Travinsky B, Schotthoefer A, Fedorova N, Eisen RJ, Eisen L, et al. Population structure of the lyme borreliosis spirochete *Borrelia burgdorferi* in the western black-legged tick (*Ixodes pacificus*) in Northern California. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Nov;75(22):7243–52.
191. Wang P, Glowacki MN, Hoet AE, Needham GR, Smith KA, Gary RE, et al. Emergence of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease vector and agent, in Ohio. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014 Jun 4;4:70.
192. Eisen L, Breuner NE, Hojgaard A, Hoxmeier JC, Pilgard MA, Replogle AJ, et al. Comparison of Vector Efficiency of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) From the Northeast and Upper Midwest of the United States for the Lyme Disease Spirochete *Borrelia mayonii*. *J Med Entomol*. 2017 Jan;54(1):239–42.
193. Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis—from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS Microbiol Rev*. 2018 May 1;42(3):233–58.
194. Marques AR, Strle F, Wormser GP. Comparison of Lyme Disease in the United States and Europe. *Emerg Infect Dis*. 2021 Aug;27(8):2017–24.
195. Γέρου Σ. Μοριακή και ορολογική μελέτη της διασποράς της *borrelia burgdorferi* στη Μακεδονία και Θράκη [Internet] [Διδακτορική Διατριβή]. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ). Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Ιατρικής. Τομέας Βιολογικών Επιστημών και Προληπτικής Ιατρικής. Εργαστήριο Β' Μικροβιολογίας; 2009 [cited 2023 May 21]. Available from: <http://hdl.handle.net/10442/hedi/19476>

196. Karageorgou I, Koutantou M, Papadogiannaki I, Voulgari-Kokota A, Makka S, Angelakis E. Serological evidence of possible *Borrelia afzelii* Lyme disease in Greece. *New Microbes New Infect.* 2022 Mar 31;46:100978.
197. Rollend L, Fish D, Childs JE. Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: a summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2013 Feb;4(1–2):46–51.
198. Porcella SF, Schwan TG. *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum*: a comparison of functional genomics, environmental adaptations, and pathogenic mechanisms. *J Clin Invest.* 2001 Mar 15;107(6):651–6.
199. Norris SJ. The vls antigenic variation systems of Lyme disease *Borrelia*: eluding host immunity through both random, segmental gene conversion and framework heterogeneity. *Microbiol Spectr.* 2014 Dec;2(6):10.1128/microbiolspec.MDNA3-0038–2014.
200. Steere AC, Strle F, Wormser GP, Hu LT, Branda JA, Hovius JWR, et al. Lyme borreliosis. *Nat Rev Dis Primer.* 2016 Dec 15;2:16090.
201. Jutras BL, Lochhead RB, Kloos ZA, Biboy J, Strle K, Booth CJ, et al. *Borrelia burgdorferi* peptidoglycan is a persistent antigen in patients with Lyme arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Jul 2;116(27):13498–507.
202. Dumler JS. Molecular methods for ehrlichiosis and Lyme disease. *Clin Lab Med.* 2003 Dec 1;23(4):867–84.
203. Nocton JJ, Dressler F, Rutledge BJ, Rys PN, Persing DH, Steere AC. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by Polymerase Chain Reaction in Synovial Fluid from Patients with Lyme Arthritis. *N Engl J Med.* 1994 Jan 27;330(4):229–34.
204. Meri T, Cutler SJ, Blom AM, Meri S, Jokiranta TS. Relapsing Fever Spirochetes *Borrelia recurrentis* and *B. duttonii* Acquire Complement Regulators C4b-Binding Protein and Factor H. *Infect Immun.* 2006 Jul;74(7):4157–63.
205. Warrell DA. Louse-borne relapsing fever (*Borrelia recurrentis* infection). *Epidemiol Infect.* 2019 ed;147:e106.
206. Barbour AG. Phylogeny of a relapsing fever *Borrelia* species transmitted by the hard tick *Ixodes scapularis*. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2014 Oct;27:551–8.
207. ECDC. louse-borne-relapsing-fever-in-eu-rapid-risk-assessment-17-nov-15.pdf [Internet]. 2015 [cited 2023 Mar 26]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/louse-borne-relapsing-fever-in-eu-rapid-risk-assessment-17-nov-15.pdf>
208. Billiet A, Vanderschueren S, Lagrou K, Pilate T, Fournier PE, Luciani L, et al. Tick borne relapsing fever after travelling to a Greek island. *J Travel Med.* 2022 Mar 1;29(2):taab073.
209. Nikolic D. SPIROCHETE INFECTIONS. In: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods [Internet]. 24th ed. Elsevier; 2021 [cited 2023 Mar 26]. p. 1229–

45. Available from: <https://www.elsevier.com/books/henrys-clinical-diagnosis-and-management-by-laboratory-methods/mcpherson/978-0-323-67320-4>
210. Dworkin MS, Schwan TG, Anderson DE, Borchardt SM. Tick-Borne Relapsing Fever. *Infect Dis Clin North Am*. 2008 Sep 1;22(3):449–68.
211. Cutler SJ. Relapsing Fever *Borreliae*: A Global Review. *Clin Lab Med*. 2015 Dec 1;35(4):847–65.
212. Hildebrandt A, Zintl A, Montero E, Hunfeld KP, Gray J. Human Babesiosis in Europe. *Pathogens*. 2021 Sep 9;10(9):1165.
213. CDC. CDC - Babesiosis - Biology [Internet]. 2019 [cited 2023 Mar 30]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/babesiosis/biology.html>
214. Westblade LF, Simon MS, Mathison BA, Kirkman LA. *Babesia microti*: from Mice to Ticks to an Increasing Number of Highly Susceptible Humans. *J Clin Microbiol*. 2017 Oct;55(10):2903–12.
215. Krause PJ. Human babesiosis. *Int J Parasitol*. 2019 Feb 1;49(2):165–74.
216. Krause PJ, Gewurz BE, Hill D, Marty FM, Vannier E, Foppa IM, et al. Persistent and Relapsing Babesiosis in Immunocompromised Patients. *Clin Infect Dis*. 2008 Feb 1;46(3):370–6.
217. Estrada-Peña A, Bouattour A, J-L C, Walker A. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region. *A Guide to Identification of Species*. 2004.
218. Service MW. *Medical entomology for students*. 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2012. 303 p.
219. Beaucournu JC, Ménier K. Le genre *Ctenocephalides* Stiles et Collins, 1930 (Siphonaptera, Pulicidae). *Parasite*. 1998 Mar 1;5(1):3–16.
220. Linardi PM, Santos JLC. *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species. *Rev Bras Parasitol Veterinária*. 2012 Dec;21:345–54.
221. Lawrence AL, Hii SF, Jirsová D, Panáková L, Ionică AM, Gilchrist K, et al. Integrated morphological and molecular identification of cat fleas (*Ctenocephalides felis*) and dog fleas (*Ctenocephalides canis*) vectoring *Rickettsia felis* in central Europe. *Vet Parasitol*. 2015 Jun;210(3–4):215–23.
222. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*. 2013 Mar;133(3):1–4.
223. Papanikolaou G, Palaiologou D, Katsareli E, Katsila T, Tsarouha H, Tzetis M, et al. *Laboratory Exercises in Human Genetics* [Internet]. 2016 [cited 2023 Jan 31]. Available from: <http://repository.kallipos.gr/handle/11419/641>
224. Smith CJ, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*. 2009;67(1):6–20.

225. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996 Oct 1;6(10):986–94.
226. Behlke M, Huang L, Bogh L, Rose S, Devor E. Fluorescence and Fluorescence Applications. In 2005 [cited 2023 Feb 5]. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Fluorescence-and-Fluorescence-Applications-Behlke-Huang/cd272287f31602717de8c6436fb4fe4ef746ee41>
227. Duron O, Noël V, McCoy KD, Bonazzi M, Sidi-Boumedine K, Morel O, et al. The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLOS Pathog.* 2015;11(5):e1004892.
228. Schorn S, Pfister K, Reulen H, Mahling M, Silaghi C. Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasit Vectors.* 2011 Jul 15;4(1):135.
229. Maia C, Ferreira A, Nunes M, Vieira ML, Campino L, Cardoso L. Molecular detection of bacterial and parasitic pathogens in hard ticks from Portugal. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2014 Jun 1;5(4):409–14.
230. Corduneanu A, Sándor AD, Ionică AM, Hornok S, Leitner N, Bagó Z, et al. *Bartonella* DNA in heart tissues of bats in central and eastern Europe and a review of phylogenetic relations of bat-associated bartonellae. *Parasit Vectors.* 2018 Aug 29;11(1):489.
231. Schreiber C, Krücken J, Beck S, Maaz D, Pachnicke S, Krieger K, et al. Pathogens in ticks collected from dogs in Berlin/Brandenburg, Germany. *Parasit Vectors.* 2014 Dec 2;7(1):535.
232. Reye AL, Stegny V, Mishaeva NP, Velhin S, Hübschen JM, Ignatyev G, et al. Prevalence of Tick-Borne Pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* Ticks from Different Geographical Locations in Belarus. *PLOS ONE.* 2013;8(1):e54476.
233. Escudero R, Toledo A, Gil H, Kováčsová K, Rodríguez-Vargas M, Jado I, et al. Molecular Method for Discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella*-Like Endosymbionts. *J Clin Microbiol.* 2008 Sep;46(9):3139–43.
234. Bechah Y, Socolovschi C, Raoult D. Identification of Rickettsial Infections by Using Cutaneous Swab Specimens and PCR. *Emerg Infect Dis.* 2011 Jan;17(1):83–6.
235. Diarra AZ, Kone AK, Doumbo Niare S, Laroche M, Diatta G, Atteynine SA, et al. Molecular Detection of Microorganisms Associated with Small Mammals and Their Ectoparasites in Mali. *Am J Trop Med Hyg.* 2020 Dec;103(6):2542–51.
236. Deléage Gilbert. *Bioinformatique : cours et applications / Gilbert Deléage, Manolo Gouy [Internet]. 2e édition. Paris: Dunod; 2015. (Sciences sup Sciences de la vie cours). Available from: <https://www.librairie-gallimard.com/livre/9782100587513-bioinformatique-cours-et-cas-pratique-gilbert-deleage-manolo-gouy/>*
237. Mount DW. *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis.* CSHL Press; 2004. 762 p.
238. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol.* 2021 Jul 1;38(7):3022–7.

239. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J Mol Evol.* 1981 Nov 1;17(6):368–76.
240. Siarkou VI, Mylonakis ME, Bourtzi-Hatzopoulou E, Koutinas AF. Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of Ehrlichia canis strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. *Vet Microbiol.* 2007 Dec 15;125(3–4):304–12.
241. Kostopoulou D, Gizzarelli M, Ligda P, Foglia Manzillo V, Saratsi K, Montagnaro S, et al. Mapping the canine vector-borne disease risk in a Mediterranean area. *Parasit Vectors.* 2020 Dec;13(1):282.
242. Caminade C, McIntyre KM, Jones AE. Impact of recent and future climate change on vector-borne diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2019 Jan;1436(1):157–73.
243. Bitam I, Dittmar K, Parola P, Whiting MF, Raoult D. Fleas and flea-borne diseases. *Int J Infect Dis.* 2010 Aug 1;14(8):e667–76.
244. Koutinas AF, Papazahariadou MG, Rallis TS, Tzivara NH, Himonas CA. Flea species from dogs and cats in northern Greece: environmental and clinical implications. *Vet Parasitol.* 1995 May 1;58(1):109–15.
245. Lefkaditis MA, Sossidou AV, Panorias AH, Koukeri SE, Paştıu AI, Athanasiou LV. Urban stray cats infested by ectoparasites with zoonotic potential in Greece. *Parasitol Res.* 2015 Oct 1;114(10):3931–4.
246. Hornok S, Beck R, Farkas R, Grima A, Otranto D, Kontschán J, et al. High mitochondrial sequence divergence in synanthropic flea species (Insecta: Siphonaptera) from Europe and the Mediterranean. *Parasit Vectors.* 2018 Apr 2;11(1):221.
247. Bond R, Riddle A, Mottram L, Beugnet F, Stevenson R. Survey of flea infestation in dogs and cats in the United Kingdom during 2005. *Vet Rec.* 2007;160(15):503–6.
248. Gilles J, Just FT, Silaghi C, Pradel I, Lengauer H, Hellmann K, et al. Rickettsia felis in Fleas, France. *Emerg Infect Dis.* 2008 Apr;14(4):684–6.
249. Beugnet F, Bourdeau P, Chalvet-Monfray K, Cozma V, Farkas R, Guillot J, et al. Parasites of domestic owned cats in Europe: co-infestations and risk factors. *Parasit Vectors.* 2014 Jun 25;7(1):291.
250. Dantas-Torres F, Maia C, Latrofa MS, Annoscia G, Cardoso L, Otranto D. Genetic characterization of Rhipicephalus sanguineus (sensu lato) ticks from dogs in Portugal. *Parasit Vectors.* 2017 Mar 13;10:133.
251. Dantas-Torres F. Biology and ecology of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus. *Parasit Vectors.* 2010 Apr 8;3(1):26.
252. Papadopoulos B, Morel PC, Aeschlimann A. Ticks of domestic animals in the Macedonia region of Greece. *Vet Parasitol.* 1996 May 1;63(1):25–40.
253. Latrofa MS, Angelou A, Giannelli A, Annoscia G, Ravagnan S, Dantas-Torres F, et al. Ticks and associated pathogens in dogs from Greece. *Parasit Vectors.* 2017 Dec;10(1):301.

254. Diakou A, Di Cesare A, Morelli S, Colombo M, Halos L, Simonato G, et al. Endoparasites and vector-borne pathogens in dogs from Greek islands: Pathogen distribution and zoonotic implications. Fuehrer HP, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2019 May 8;13(5):e0007003.
255. Psaroulaki A, Spyridaki I, Ioannidis A, Babalis T, Gikas A, Tselentis Y. First Isolation and Identification of *Rickettsia conorii* from Ticks Collected in the Region of Fokida in Central Greece. J Clin Microbiol. 2003 Jul;41(7):3317–9.
256. Papa A, Xanthopoulou K, Kotriotsiou T, Papaioakim M, Sotiraki S, Chaligiannis I, et al. Rickettsia species in human-parasitizing ticks in Greece. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2016 May;110(5):299–304.
257. Papa A, Tsioka K, Kontana A, Papadopoulos C, Giadinis N. Bacterial pathogens and endosymbionts in ticks. Ticks Tick-Borne Dis. 2017 Jan 1;8(1):31–5.
258. Chaligiannis I, Fernández de Mera IG, Papa A, Sotiraki S, de la Fuente J. Molecular identification of tick-borne pathogens in ticks collected from dogs and small ruminants from Greece. Exp Appl Acarol. 2018 Apr;74(4):443–53.
259. Papa A, Tsioka K, Daskou MA, Minti F, Papadopoulou E, Melidou A, et al. Application of 16S rRNA next generation sequencing in ticks in Greece. Heliyon [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2023 May 22];6(7). Available from: [https://www.cell.com/heliyon/abstract/S2405-8440\(20\)31386-4](https://www.cell.com/heliyon/abstract/S2405-8440(20)31386-4)
260. Pennisi MG, Persichetti MF, Serrano L, Altet L, Reale S, Gulotta L, et al. Ticks and associated pathogens collected from cats in Sicily and Calabria (Italy). Parasit Vectors. 2015 Oct 7;8:512.
261. Kachrimanidou M, Papa A, Chochlakis D, Pavlidou V, Psaroulaki A. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks from Greece. Vector Borne Zoonotic Dis Larchmt N. 2011 Oct;11(10):1391–3.
262. Karpathios T, Golphinos C, Psychou P, Garoufi A, Papadimitriou A, Nicolaidou P. Cat scratch disease in Greece. Arch Dis Child. 1998 Jan 1;78(1):64–6.
263. Antoniou M, Economou I, Wang X, Psaroulaki A, Spyridaki I, Papadopoulos B, et al. Fourteen-year seroepidemiological study of zoonoses in a Greek village. Am J Trop Med Hyg. 2002 Jan 1;66(1):80–5.
264. Tea A, Alexiou-Daniel S, Arvanitidou M, Diza E, Antoniadis A. OCCURRENCE OF *BARTONELLA HENSELAE* AND *BARTONELLA QUINTANA* IN A HEALTHY GREEK POPULATION. Am J Trop Med Hyg. 2003 May 1;68(5):554–6.
265. Pape M, Mandraveli K, Alexiou-Daniel St. Clinical aspects of Bartonella infection in northern Greece. Clin Microbiol Infect. 2009 Dec;15:91–2.
266. Pape M. Occurrence of Bartonella henselae and Bartonella quintana among Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. Ann N Y Acad Sci. 2005 Dec 1;1063(1):299–301.

267. Chondrogiannis K, Vezakis A, Derpapas M, Melemeni A, Fragulidis G. Seronegative cat-scratch disease diagnosed by PCR detection of *Bartonella henselae* DNA in lymph node samples. *Braz J Infect Dis*. 2012 Jan;16(1):96–9.
268. Anyfantakis D, Kastanakis M, Papadomichelakis A, Petrakis G, Bobolakis E. Cat-scratch disease presenting as a solitary splenic abscess in an immunocompetent adult: case report and literature review. 2013;4.
269. Dimopoulos S, Eleftherakis E, Charitos C, Al E. *Bartonella Quintana* Endocarditis as a Cause of Severe Aortic Insufficiency and Heart Failure. *Hellenic J Cardiol*. 2012;4.
270. Samarkos M, Antoniadou V, Vaiopoulos AG, Psychogiou M. Encephalopathy in an adult with cat-scratch disease. *BMJ Case Rep*. 2018 Mar 5;2018:bcr2017223647.
271. Kalogeropoulos D, Asproudis I, Stefaniotou M, Moschos MM, Mentis A, Malamos K, et al. *Bartonella henselae*- and *quintana*-associated uveitis: a case series and approach of a potentially severe disease with a broad spectrum of ocular manifestations. *Int Ophthalmol*. 2019 Nov;39(11):2505–15.
272. Dougas G, Mavrouli M, Tsakris A, Billinis C, Papaparaskevas J. Serosurvey of IgG Antibodies against *Bartonella henselae* and *Rickettsia typhi* in the Population of Attica, Greece. *Trop Med Infect Dis*. 2020 Sep 16;5(3):145.
273. Kordick DL, Hilyard EJ, Hadfield TL, Wilson KH, Steigerwalt AG, Brenner DJ, et al. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). *J Clin Microbiol*. 1997 Jul;35(7):1813–8.
274. Vieira-Damiani G, Diniz PPV de P, Pitassi LHU, Sowly S, Scorpio DG, Lania BG, et al. *Bartonella clarridgeiae* Bacteremia Detected in an Asymptomatic Blood Donor. *J Clin Microbiol*. 2015 Jan;53(1):352–6.
275. Diakou A, Di Cesare A, Accettura PM, Barros L, Iorio R, Paoletti B, et al. Intestinal parasites and vector-borne pathogens in stray and free-roaming cats living in continental and insular Greece. Johnson C, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Jan 31;11(1):e0005335.
276. Mylonakis ME, Schreeg M, Chatzis MK, Pearce J, Marr HS, Saridomichelakis MN, et al. Molecular detection of vector-borne pathogens in Greek cats. *Ticks Tick-Borne Dis*. 2017;9(2):171–5.
277. Diniz PPVP, Billeter SA, Otranto D, De Caprariis D, Petanides T, Mylonakis ME, et al. Molecular Documentation of *Bartonella* Infection in Dogs in Greece and Italy. *J Clin Microbiol*. 2009 May;47(5):1565–7.
278. Mylonakis ME, Soubasis N, Balakrishnan N, Theodorou K, Kasabalis D, Saridomichelakis M, et al. Molecular identification of *Bartonella* species in dogs with leishmaniosis (*Leishmania infantum*) with or without cytological evidence of arthritis. *Vet Microbiol*. 2014 Nov 7;174(1):272–5.
279. Latrofa MS, Iatta R, Toniolo F, Furlanello T, Ravagnan S, Capelli G, et al. A molecular survey of vector-borne pathogens and haemoplasmas in owned cats across Italy. *Parasit Vectors*. 2020 Apr 21;13:116.

280. Logan MJ, Hall JL, Chalker VJ, O'Connell B, Birtles RJ. *Bartonella clarridgeiae* infection in a patient with aortic root abscess and endocarditis. *Access Microbiol.* 2019 Oct 10;1(10):e000064.
281. Rolain JM, Franc M, Davoust B, Raoult D. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis* and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerg Infect Dis.* 2003 Mar;9(3):338–42.
282. Sofer S, Gutiérrez R, Morick D, Mumcuoglu KY, Harrus S. Molecular detection of zoonotic bartonellae (*B. henselae*, *B. elizabethae* and *B. rochalimae*) in fleas collected from dogs in Israel. *Med Vet Entomol.* 2015;29(3):344–8.
283. Persichetti MF, Solano-Gallego L, Serrano L, Altet L, Reale S, Masucci M, et al. Detection of vector-borne pathogens in cats and their ectoparasites in southern Italy. *Parasit Vectors.* 2016;9(1):247–247.
284. Satta G, Chisu V, Cabras P, Fois F, Masala G. Pathogens and symbionts in ticks: a survey on tick species distribution and presence of tick-transmitted micro-organisms in Sardinia, Italy. *J Med Microbiol.* 2011;60(1):63–8.
285. Dietrich F, Schmidgen T, Maggi RG, Richter D, Matuschka FR, Vonthein R, et al. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato DNA in *Ixodes ricinus* Ticks in Europe. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Mar;76(5):1395–8.
286. Regier Y, Ballhorn W, Kempf VAJ. Molecular detection of *Bartonella henselae* in 11 *Ixodes ricinus* ticks extracted from a single cat. *Parasit Vectors.* 2017 Mar 13;10:105.
287. Angelakis E, Billeter SA, Breitschwerdt EB, Chomel BB, Raoult D. Potential for Tick-borne Bartonelloses. *Emerg Infect Dis.* 2010 Mar;16(3):385–91.
288. Antoniou M, Tselentis Y, Babalis T, Gikas A, Stratigakis N, Vlachonikolis I, et al. The seroprevalence of ten zoonoses in two villages of Crete, Greece. *Eur J Epidemiol.* 1995 Sep 1;11:415–23.
289. Alexiou-Daniel S, Manika K, Arvanmdou M, Antoniadis A. Prevalence of *Rickettsia conorii* and *Rickettsia typhi* infections in the population of northern Greece. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jan 1;66(1):76–9.
290. Moraga-Fernández A, Chaligiannis I, Cabezas-Cruz A, Papa A, Sotiraki S, de la Fuente J, et al. Molecular identification of spotted fever group *Rickettsia* in ticks collected from dogs and small ruminants in Greece. *Exp Appl Acarol.* 2019 Jul;78(3):421–30.
291. Hansford KM, Pietzsch M, Cull B, Medlock JM. Brown dog tick infestation of a home in England. *Vet Rec.* 2015;176(5):129–30.
292. Matthewman L, Kelly P, Hayter D, Downie S, Wray K, Bryson N, et al. Domestic cats as indicators of the presence of spotted fever and typhus group rickettsiae. *Eur J Epidemiol.* 1997 Jan;13(1):109–11.
293. Segura F, Pons I, Miret J, Pla J, Ortuño A, Noguerras MM. The role of cats in the eco-epidemiology of spotted fever group diseases. *Parasit Vectors.* 2014 Aug 1;7:353.

294. Renvoisé A, Delaunay P, Blanchouin E, Cannavo I, Cua E, Socolovschi C, et al. Urban family cluster of spotted fever rickettsiosis linked to *Rhipicephalus sanguineus* infected with *Rickettsia conorii* subsp. *caspia* and *Rickettsia massiliae*. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2012 Dec 1;3(5):389–92.
295. Uspensky I. Tick pests and vectors (Acari: Ixodoidea) in European towns: Introduction, persistence and management. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2014 Feb 1;5(1):41–7.
296. Labropoulou S, Charvalos E, Chatzipanagiotou S, Ioannidis A, Sylignakis P, Taka S, et al. Sunbathing, a possible risk factor of murine typhus infection in Greece. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021 Mar;15(3):e0009186.
297. Dougas G, Tsakris A, Billinis C, Beleri S, Patsoula E, Papaparaskevas J. Molecular detection of *Rickettsia felis* in common fleas in Greece and comparative evaluation of genotypic methods. *J Microbiol Methods.* 2021 Jan 1;180:106104.
298. Legendre K, Macaluso K. *Rickettsia felis*: A Review of Transmission Mechanisms of an Emerging Pathogen. *Trop Med Infect Dis.* 2017 Dec 19;2(4):64.
299. Angelou A, Gelasakis AI, Verde N, Pantchev N, Schaper R, Chandrashekar R, et al. Prevalence and risk factors for selected canine vector-borne diseases in Greece. *Parasit Vectors.* 2019 Dec;12(1):283.
300. Athanasiou LV, Kontos VI, Kritsepi Konstantinou M, Polizopoulou ZS, Rousou XA, Christodouloupoulos G. Cross-Sectional Serosurvey and Factors Associated with Exposure of Dogs to Vector-Borne Pathogens in Greece. *Vector Borne Zoonotic Dis Larchmt N.* 2019 Dec;19(12):923–8.
301. Alexiou-Daniel S, Manika K, Arvanitidou M, Diza E, Symeonidis N, Antoniadis A. Serologic Evidence of Human Granulocytic Ehrlichiosis, Greece. *Emerg Infect Dis.* 2002 Jun;8(6):643–4.
302. Chochlakis D, Papaeustathiou A, Minadakis G, Psaroulaki A, Tselentis Y. A serosurvey of *Anaplasma phagocytophilum* in blood donors in Crete, Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008 Jun 1;27(6):473–5.
303. Chochlakis D, Psaroulaki A, Kokkini S, Kostanatis S, Arkalati E, Karagrannaki E, et al. First evidence of *Anaplasma* infection in Crete, Greece. Report of six human cases. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Dec 1;15:8–9.
304. Tsiodras S, Spanakis N, Spanakos G, Pervanidou D, Georgakopoulou T, Campos E, et al. Fatal human anaplasmosis associated with macrophage activation syndrome in Greece and the Public Health response. *J Infect Public Health.* 2017 Nov 1;10(6):819–23.
305. Zurita A, Gutiérrez SG, Cutillas C. Infection Rates of *Wolbachia* sp. and *Bartonella* sp. in Different Populations of Fleas. *Curr Microbiol.* 2016 Nov;73(5):704–13.
306. Zug R, Hammerstein P. Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualisms in arthropod hosts. *Biol Rev.* 2015;90(1):89–111.
307. Slatko BE, Luck AN, Dobson SL, Foster JM. *Wolbachia* endosymbionts and human disease control. *Mol Biochem Parasitol.* 2014 Jul 1;195(2):88–95.

308. Bordenstein SR, Paraskevopoulos C, Dunning Hotopp JC, Sapountzis P, Lo N, Bandi C, et al. Parasitism and Mutualism in *Wolbachia*: What the Phylogenomic Trees Can and Cannot Say. *Mol Biol Evol.* 2009 Jan;26(1):231–41.
309. Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Oct;6(10):741–51.
310. Lo N, Beninati T, Sassera D, Bouman E a. P, Santagati S, Gern L, et al. Widespread distribution and high prevalence of an alpha-proteobacterial symbiont in the tick *Ixodes ricinus*. *Environ Microbiol.* 2006;8(7):1280–7.
311. Madhav M, Baker D, Morgan JAT, Asgari S, James P. *Wolbachia*: A tool for livestock ectoparasite control. *Vet Parasitol.* 2020 Dec 1;288:109297.
312. Plantard O, Bouju-Albert A, Malard MA, Hermouet A, Capron G, Verheyden H. Detection of *Wolbachia* in the Tick *Ixodes ricinus* is Due to the Presence of the Hymenoptera Endoparasitoid *Ixodiphagus hookeri*. *PLOS ONE.* 2012;7(1):e30692.
313. Mariconti M, Epis S, Gaibani P, Dalla Valle C, Sassera D, Tomao P, et al. Humans parasitized by the hard tick *Ixodes ricinus* are seropositive to *Midichloria mitochondrii* : is *Midichloria* a novel pathogen, or just a marker of tick bite? *Pathog Glob Health.* 2012 Nov;106(7):391–6.
314. Bazzocchi C, Mariconti M, Sassera D, Rinaldi L, Martin E, Cringoli G, et al. Molecular and serological evidence for the circulation of the tick symbiont *Midichloria* (Rickettsiales: Midichloriaceae) in different mammalian species. *Parasit Vectors.* 2013 Dec 12;6(1):350.
315. Serra V, Krey V, Daschkin C, Cafiso A, Sassera D, Maxeiner HG, et al. Seropositivity to *Midichloria mitochondrii* (order Rickettsiales) as a marker to determine the exposure of humans to tick bite. *Pathog Glob Health.* 2019 May 19;113(4):167–72.
316. Hestvik G, Warns-Petit E, Smith LA, Fox NJ, Uhlhorn H, Artois M, et al. The status of tularemia in Europe in a one-health context: a review. *Epidemiol Infect.* 2015 Jul;143(10):2137–60.
317. ECDC, European Food Safety Authority. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA J* [Internet]. 2022 Dec [cited 2023 Apr 19];20(12). Available from: <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2022.7666>

Αυτή η σελίδα σκοπίμως είναι λευκή.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Αυτή η σελίδα σκοπίμως είναι λευκή.

6. Παράρτηματα

6.1. Πίνακας εξετασθέντων δειγμάτων

| Sample No | Ectoparasite | Ectoparasite species | Female Specimen | Male Specimen | Nymph Specimen | Region | Locality | Host scientific name | Host | Host's Age/years |
|-----------|--------------|-------------------------------|-----------------|---------------|----------------|-----------------------|--------------------|------------------------|-----------|------------------|
| ML0001 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Agios Stefanos | Felis catus | Stray Cat | 0,3 |
| ML0002 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Agios Stefanos | Felis catus | Stray Cat | 0,25 |
| ML0003 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Nea Erythraia | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 2 |
| ML0004 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Nea Erythraia | Felis catus | Stray Cat | 3 |
| ML0007 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Ekali | Felis catus | Stray Cat | 1 |
| ML0008 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-East | Pallini | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 2 |
| ML0009 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Neos Kosmos | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 3 |
| ML0010 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Agios Dimitrios | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 5 |
| ML0011 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Halandri | Felis catus | Stray Cat | 2 |
| ML0012 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Halandri | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0013 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Halandri | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0014 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Halandri | Felis catus | Stray Cat | 2 |
| ML0015 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Halandri | Felis catus | Stray Cat | 2 |
| ML0016 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Halandri | Felis catus | Stray Cat | 2 |
| ML0017 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Ampelokipi | Felis catus | Stray Cat | 0,1 |
| ML0018 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Ampelokipi | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0019 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Ampelokipi | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0020 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Ampelokipi | Felis catus | Stray Cat | 0,3 |
| ML0021 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Ampelokipi | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 3,5 |
| ML0022 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Ilioupoli | Felis catus | Stray Cat | 0,1 |
| ML0023 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Glyfada | Felis catus | Stray Cat | 0,4 |

| | | | | | | | | | | |
|--------|-------|-------------------------------|---|---|--|-----------------------|--------------------|------------------------|-----------|-----|
| ML0024 | Fleas | Ctenocephalides felis | 0 | 1 | | Attica-Central Athens | Ilioupoli | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0025 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Rentis | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0026 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Agios Dimitrios | Felis catus | Stray Cat | 0,1 |
| ML0027 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Piraeus | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0028 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Neos Kosmos | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 3 |
| ML0029 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Felis catus | Stray Cat | 1 |
| ML0030 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Kallithea | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 8 |
| ML0031 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Glyfada | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 9 |
| ML0032 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-Islands | Salamina | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 0,2 |
| ML0033 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Felis catus | Stray Cat | 0,5 |
| ML0034 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-East | Kalamos | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 5 |
| ML0035 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Marousi | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 4 |
| ML0036 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Marousi | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 5 |
| ML0037 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Nea Erythraia | Felis catus | Owned Cat | 0,5 |
| ML0038 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Ekali | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 14 |
| ML0039 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Felis catus | Stray Cat | 0,5 |
| ML0040 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Glyfada | Felis catus | Owned Cat | 0,5 |
| ML0041 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Kallithea | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 2 |
| ML0042 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0043 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Neos Kosmos | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 10 |
| ML0044 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Marousi | Felis catus | Stray Cat | 10 |
| ML0045 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Ampelokipi | Felis catus | Stray Cat | 1 |
| ML0046 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Kaisariani | Felis catus | Stray Cat | 2 |
| ML0047 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Pagрати | Felis catus | Stray Cat | 3 |
| ML0048 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Kaisariani | Felis catus | Stray Cat | 3 |
| ML0049 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Kaisariani | Felis catus | Stray Cat | 2 |

| | | | | | | | | | | |
|--------|-------|-------------------------------|---|---|--|-----------------------|--------------------|------------------------|-----------|----|
| ML0050 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens | Felis catus | Stray Cat | 3 |
| ML0051 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Vironas | Felis catus | Stray Cat | 2 |
| ML0052 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens | Felis catus | Stray Cat | 3 |
| ML0053 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens | Felis catus | Stray Cat | 1 |
| ML0054 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens | Felis catus | Stray Cat | 4 |
| ML0055 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens | Felis catus | Stray Cat | 1 |
| ML0056 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens | Felis catus | Stray Cat | 2 |
| ML0057 | Fleas | Ctenocephalides felis | 0 | 1 | | Attica-Central Athens | Athens | Felis catus | Stray Cat | 3 |
| ML0058 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Omonia | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 4 |
| ML0059 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Pagрати | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 3 |
| ML0060 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Omonia | Felis catus | Stray Cat | 2 |
| ML0061 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens | Felis catus | Stray Cat | 1 |
| ML0062 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens | Felis catus | Stray Cat | 2 |
| ML0063 | Fleas | Ctenocephalides felis | 0 | 1 | | Attica-North Athens | Marousi | Felis catus | Stray Cat | 1 |
| ML0064 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-East | Koropi | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 4 |
| ML0065 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-East | Koropi | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 12 |
| ML0066 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 0 | 1 | | Attica-East | Koropi | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 2 |
| ML0067 | Ticks | Ixodes spp. | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 1 |
| ML0068 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Piraeus | Felis catus | Stray Cat | 2 |
| ML0069 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Kallithea | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 6 |
| ML0070 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 0 | 1 | | Attica-West Athens | Peristeri | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 10 |
| ML0071 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Moshato | Felis catus | Owned Cat | 4 |
| ML0072 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Ilioupoli | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 6 |
| ML0073 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Argyroupoli | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 2 |
| ML0074 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Neos Kosmos | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 3 |

Παράρτηματα

| | | | | | | | | | | |
|--------|-------|-------------------------------|---|---|--|-----------------------|------------------|------------------------|-----------|-------|
| ML0075 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 2 |
| ML0076 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Kallithea | Felis catus | Owned Cat | 2 |
| ML0077 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Kallithea | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0078 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Pagрати | Felis catus | Owned Cat | 1 |
| ML0079 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Piraeus | Felis catus | Stray Cat | 0,25 |
| ML0080 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Palaio Phaliro | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0081 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 2 |
| ML0082 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0083 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Kallithea | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0084 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-East | Voula | Felis catus | Stray Cat | 0,125 |
| ML0085 | Fleas | Ctenocephalides felis | 0 | 1 | | Attica-East | Voula | Felis catus | Stray Cat | 0,125 |
| ML0086 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Petralona | Felis catus | Stray Cat | 0,25 |
| ML0087 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens-Eksarxeia | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0088 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Palaio Phaliro | Felis catus | Stray Cat | 0,3 |
| ML0089 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Palaio Phaliro | Felis catus | Stray Cat | 0,5 |
| ML0090 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Palaio Phaliro | Felis catus | Stray Cat | 3 |
| ML0091 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Felis catus | Stray Cat | 0,1 |
| ML0092 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Piraeus | Felis catus | Owned Cat | 0,3 |
| ML0093 | Fleas | Ctenocephalides felis | 0 | 1 | | Attica-Central Athens | Kolonos | Felis catus | Owned Cat | 1 |
| ML0094 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Palaio Phaliro | Felis catus | Stray Cat | 0,3 |
| ML0095 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Tavros | Felis catus | Owned Cat | 4 |
| ML0096 | Fleas | Ctenocephalides felis | 0 | 1 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0097 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Felis catus | Stray Cat | 4 |
| ML0098 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 0 | 1 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Felis catus | Stray Cat | 3 |
| ML0099 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0100 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Felis catus | Stray Cat | 0,25 |

| | | | | | | | | | | |
|--------|-------|-------------------------------|---|---|---|-----------------------|------------|------------------------|-----------|------|
| ML0101 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Felis catus | Stray Cat | 0,25 |
| ML0102 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Felis catus | Owned Cat | 2 |
| ML0103 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Felis catus | Owned Cat | 2 |
| ML0104 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 8 |
| ML0105 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 5 |
| ML0106 | Fleas | Ctenocephalides felis | 0 | 1 | | Attica-North Athens | Marousi | Felis catus | Stray Cat | 3 |
| ML0107 | Ticks | Rhipicephalus sp. | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Halandri | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 9 |
| ML0108 | Ticks | Rhipicephalus sp. | 0 | 0 | 1 | Attica-North Athens | Halandri | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 1,5 |
| ML0109 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Halandri | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 1 |
| ML0110 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Halandri | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0111 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Halandri | Felis catus | Stray Cat | 0,5 |
| ML0112 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Halandri | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 6 |
| ML0113 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-East | Pikermi | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 1 |
| ML0114 | Ticks | Rhipicephalus sp. | 0 | 0 | 1 | Attica-East | Pikermi | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 2 |
| ML0115 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-East | Pikermi | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 2 |
| ML0116 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-East | Pallini | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 3 |
| ML0117 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-East | Pikermi | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 5 |
| ML0118 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-East | Pallini | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 2 |
| ML0119 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-East | Pallini | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 3 |
| ML0120 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-East | Pallini | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 0,5 |
| ML0121 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-East | Pikermi | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 1 |
| ML0122 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-East | Pikermi | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 4 |
| ML0123 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-East | Pikermi | Canis lupus familiaris | Stray Dog | 2 |
| ML0125 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-North Athens | Halandri | Felis catus | Owned Cat | 2 |
| ML0126 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Drapetsona | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 5 |
| ML0127 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Keratsini | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 6 |

Παράρτηματα

| | | | | | | | | | | |
|--------|-------|-------------------------------|---|---|--|-----------------------|-----------------|------------------------|-----------|------|
| ML0128 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Perama | Felis catus | Owned Cat | 2 |
| ML0129 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Piraeus | Felis catus | Stray Cat | 0,1 |
| ML0130 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Perama | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 10 |
| ML0131 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Keratsini | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 6 |
| ML0132 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Keratsini | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 1,5 |
| ML0133 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Keratsini | Felis catus | Owned Cat | 7 |
| ML0134 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Keratsini | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 11 |
| ML0135 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Piraeus | Keratsini | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 11 |
| ML0136 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Nea Smyrni | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0137 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-West Athens | Haidari | Felis catus | Stray Cat | 0,2 |
| ML0138 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-East | Varkiza | Felis catus | Stray Cat | 3 |
| ML0139 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Palaio Phaliro | Felis catus | Stray Cat | 0,25 |
| ML0140 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Palaio Phaliro | Felis catus | Stray Cat | 0,25 |
| ML0141 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Palaio Phaliro | Felis catus | Stray Cat | 0,25 |
| ML0142 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Palaio Phaliro | Felis catus | Stray Cat | 2 |
| ML0143 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens | Felis catus | Stray Cat | 5 |
| ML0144 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-Central Athens | Athens | Felis catus | Stray Cat | 10 |
| ML0145 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Agios Dimitrios | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 1 |
| ML0146 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Palaio Phaliro | Felis catus | Owned Cat | 0,2 |
| ML0147 | Ticks | Rhipicephalus sanguineus s.l. | 0 | 1 | | Attica-South Athens | Palaio Phaliro | Canis lupus familiaris | Owned Dog | 2 |
| ML0148 | Fleas | Ctenocephalides felis | 1 | 0 | | Attica-South Athens | Palaio Phaliro | Felis catus | Stray Cat | 2 |
| | | | | | | | | | | |

6.2. Ευθυγράμμιση των ακολουθιών 16S-23S rRNA ITS που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου *Bartonella*

```

>AB602564 B. acomydis
atctctaaaaataaag-----cctctcctctcttggtaaagataaggagtgc
tgtaaa-----
-----caaagagctgaaaaatcttctgccttctgcattgtaagaa-----
----aaagctcct-----ctgttaagag-tatgccggggaagg--ttttccggtttctc
ccggagggtctgtagctcagttggttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggcccaccaatcactctatcaat--ttagatacactggcaatttaa
atgccgcgacaccttttgcttgtaggca-----gcttgctaaaacttgtaa
aacatgacctataaatcagggtgtcataaaaaaacactataaaggaaactataaattggc
tgatttgctccttgaggataatgtccttaaa-----cttgctgataaagggtattataa
aatgaagttccttgattaaggcagttataagtgttataaata-----tttagaagtg
ttatgagaggcgttatgaaatatactgcttcttggtttcttccggcaacac-----
aaggtgag--caatttacagcaggatgtggcagttcaaaagggtggtg
ct-at-----tttcccttgctctatctcgaattttacctgctttc-----aa
attttgtaaatgct-----ttaaatttacaatttttgctctatatgtattttttt
a-ggggcccgtagctcagctgggagagcacc
>AF312506 B. alsatica
ctctacgcgatgcaag-----gcctt----aatagggtttcagaaaa----
-----
-----aatgctctttcagaa-----aacattttggtggtttataa-----
----gatgctgct-----tttataagat-gatgccggggaagg--ttttccggtttctc
ccggagggtctgtagctcagttggttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggcccaccaatttatctgtaaat--ttataagcgtgggtgaaactt
-----gcttatatggat-----
--cttgctctatcaatt-----tgtaagaaactta-----
----cttatcttacgggatga-----ttacttataaaaagg--ctttct
tatgaatttattta-----taatcttatgaatt-----tat-----
ttataaaag-----tgtggctacctcttggtttaagcaatgc-----
-----gaagttaaagcagttca-----
-----acagcaaaagtgatcccaattt-----aa
ga-----tctg-aaa--tttaaaagtttcaaatgcggttatcc--tg----ttttt
a-ggggcccgtagctcagctgggagagcacc
>HM622140 B. florencae
atttcttc-ctctaag-----agct-----tcccataa-----
-----
-----attgaaaag-----gaaattcttagtagaagatc-----
-ttaaaagctttt-----ctgttaagag-tatgccggggaagg--ttttccggtttctc
tcggagggtctgtagctcagttggttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggcccaccaatcactctattaat--ttatagccttgggtatatac
cttgagtgcttt-----ttctatgcaggttacttc
tataaagcccataaatt-----tgtaagtggtttctc-----
----cctcttacgcaataatgctcttaggc-----taattttcttaggtgtgctgata
aatgaacttgtaaaatg-----aagttcctgaaatcaagggtgattataaaac
ttatagaag-----cgttgtaaaatgctgcttttctgcttgcctgaggt-----
catgcag-----ggtggagaatttacaaggagatgaggcagctc-
-----acaggctgatgttattctccttctgtctgttctt-----ag
attttataagtgt-----tttaaaatcaaaaatttttgctgctgattaa-ctgtttt
a-ggggcccgtagctcagctgggagagcacc
>L35100 B. quintana
atctctta-caataag-----ccc-----tttgggac-----
-----
-----ttaaaggaa-----gacacttttgtgt-----
-----tttatgagat-aatgccggggaagg--ttttccggtttctc
ccggagggtctgtagctcagctggttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggcccaccaattttacatcactt--ttaagtgcttatagaattgt
aagc-----agttatgaaag-----
--cttgctgatagaaa-----ttttatggcgctta-----
----tccatttggtttaaagcagatatgtgac-----ttaagccatctaaaa-----tta
aagcagttcaaatgca-----tagaagtttgattttagacaat-----
-----ggaagtaaat-----
-----ttggataatgtgaattttgagcagatataaattt-----ag

```

```

gttctgcaaatTTTgcaaa--tctctcttcaaagagtttCGcatgTTTTatgctgTTTT
a-ggggCCgtagctcagctgggagagcacc
>AF312490 B. koehlerae
atctacac-aaacaag-----tcca-----ccgtggac-----
-----
-----tttgaaaag-----cgctttcctttataaaa-----
----ttgagcgt-----tttgaagag-gatgCCggggaagg--ttttccggtttatc
ccggaggccttgtagctcagttggtttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggcccaccaatTTtaccatttttataagtgcttttgaaaata
ag-----tacttctaaaat-----
---atcgcttctaaaaa-----ttggcatgcttg-----
----ttgcttttggtgtggtgatcCAAagt-----taaagcagtttaatg-gcaaaaa
aagcagttCAAatgcta-----aatgctaaaag-----gtcaaaatt-
ttgggaaag-----tgatTTTtgcagtgctatttgggtgatgtaaatt-----
-----tcgaatagtcagtgacgtaaatgcc-----
-----atataaaacatatcggttaattatatcacttt-----gg
gtcatacg---ttataa---tacctcctttaatcgTTTTa-----cctgTTTT
a-ggggCCgtagctcagctgggagagcacc
>KX499345 B. koehlerae subsp. bothieri
atctacacaaaataag-----ccca-----ccgtgggc-----
-----
-----tttgaaaaa-----cgctttcctttataaaa-----
----ttaagcgt-----tttataagag-gatgCCggggaagg--ttttccggtttatc
ccggaggccttgtagctcagttggtttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggcccaccaatTTtaccattgctttcataagtgacttt-aaaaatc
ag-----cacttctaaaa-----
---a--gcttatcaaaa-----ttggcaggctta-----
----ttgcttttggtgtgctg-atc-aaagt-----taaagcaactgaatg-g-taagc
aagcagttCAAatgcta-----aatgctaaaaa-----gttgaattc
cttgcaaaag-----tgatTTTtgcagtgctcatttgggtgatataaaatt-----
-----ccaataactcatggacgtaaatgcc-----
-----atataaaacatatcggttaactcatatcacttt-----gg
attatatacgTTTTTTaa---tccctcttttaacgTTTTaaacgctttatcctgTTTT
a-ggggCCgtagctcagctgggagagcacc
>L35101 B. henselae strain Houston
atctagacaaaacaag-----tcca-----ccgtgggc-----
-----
-----tttgaaaaa-----cgctttccttgataaaat-----
----ttaagcgt-----tttataagag-gatgCCggggaagg--ttttccggtttatc
ccggaggccttgtagctcagttggtttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggcccaccagtttaccattactttcataagtgcttttaaaaaata
ag-----tacttctaaaa-----
--gattgcttctaaaaa-----gcttatcaaaattggcaggctta-----
----ttgcttttggtgtgagtaatCAAagt-----taaagcaaatataatg-g-caaaa
aaacagttCAAatgcta-----aaatactaagga-----gtcaaaattc
cttgcaaaag-----tgatTTTtgcagctcatttgggtgatataaaatt-----
-----cCAAatgctcatagacgtcaatgcct-----
-----atatgaaac-tatcggttcaatcatatcgcttt-----ga
ggttatagattttgtaa---tccctcttttgatcgTTTTaaacgctttatcctgattt
a-ggggCCgtagctcagctgggagagcacc
>HM636451 B. senegalensis
atctacac--aaaaag-----tcca-----ccgtggac-----
-----
-----tttgcaaaa-----cgctttgctttataaaat-----
----tgaagcgtt-----ctacgaagag-gatgCCggggaagg--ttttccggtttatc
ccggaggccttgtagctcagttggtttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggcccaccaatTTtactcatcgctttcatcagtgcttttaaaagac
atccg-----tttttctaaaag-----
---attactgctgaaaa-----gcttaaaattggcagcgttt-----
----ttggTTTTgatgacacatCAAagt-----gaaagcagcttaaaag---gcaaaa
aagcagttCAAatgcta-----aagtgctcagaa-----cttgaattt
cttgcaaaag-----tgctttttctcatgctcatttgcctgatgatgagttgcttagtt
tatgcaaggacagagagtgTTTTatgcaaggacaaagatcctgcagatcaatgTTTTaa
TTtaaggcTTTTaatttaaggcatgtaagttcaatgctatcgcttt-----gg
TTaatatgttcc-----atcctTTTTtaacgTTTTaaacac-ttatcctatTTT
a-ggggCCgtagctcagctgggagagcacc
>AB602557 B. jaculi
atctagaaaaaacaag-----ccctg---tcttgagt-----
-----
-----tttcagagac--aacactgctgTTTTTataaaatgatgtggtTTTTat

```

```

aaaataaggtggt-----tttatcagat-aatgccggggaagg--ttttccggtttatc
ccggagggttgtagctcagttggtttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggcccaccaattattccatccc--ttaggcagtgctt----atga
-----cacttttatag-----
----aaggatataaata-----t-aaaaggatagaaa-----
----agcgttctgtataaaaggc-----taaaagagttc-----tata
taaaggattggacgct-----
-----tatccgtttcgcttaagcacgcc-----
-----aaagttaagcggctcaaacacagagcaa-----
-----tgcaaattttccgaagtttgactgtctattt-----ta
aaaaatgag-----aatctgttttaacagtttgg-atgttttatcctgtttt
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>AB602558 B. jaculi
atctagaaaaaacaag-----ccttg---tcttgagt-----
-----
-----tttcagagac--aacactgctgtttttataaaatgatgtggtttttat
aaaataaggtggt-----tttatcagat-aatgccggggaagg--ttttccggtttatc
ccggagggttgtagctcagttggtttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggcccaccaattattccatccc--ttaggcagtgctt----atga
-----cacttttatag-----
----aaggatataaata-----t-aaaaggatagaaa-----
----agcgttctgtataaaaggc-----taaaagagttc-----tata
taaaggattggacgct-----
-----tatccgtttcgcttaagcacgcc-----
-----aaagttaagcggctcaaacacagagcaa-----
-----tgcaaattttccgaagtttgactgtctattt-----ta
aaaaatgag-----aatctgttttaacagtttgg-atgttttatcctgtttt
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>EU294521 B. volans
atctacaaaanacaag-----ccttg---aathtagc-----
-----
-----tttcagaaa---gcacttttgtttttataaaat-----
----gatgtgt-----tttatgagat-tatgccggggaagg--ttttccggtttatc
ccggagggttgtagctcagttggtttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggcccaccaattactctatcat--tttctttatctgt-----
-----tcct-----
-----
----ttgattttgtgtgca-----gataacagttt-----tat
aaaggattatggcgct-----
-----tatctcttcgcttaagtaacttc-----
-----aaagttaacgc-gggcaaacgtaaaagcga-----
-----gcaaaattgctacaaaatttgcactgtctattt-----at
-----taacagtttggaaatcctttatctgtttt
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>AB674252 B. washoensis
atctacaaaaaacaag-----ccttg---gtttaggc-----
-----
-----tttcagaaaa--gacactcttgtttttgtaaagt-----
----ggtgtgt-----tttatgagat-gatgccggggaagg--ttttccggtttatc
ccggagggttgtagctcagttggtttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggcccaccaattactccatccat--tactttatctat-----
-----ccct-----
-----
----ttgattcaatgtgta-----gataacagttt-----tata
aaaggattatggcgct-----
-----tatccatttcgcttaagcacttc-----
-----aaagttaatgcagggcaaatgtaaaagcaat-----
-----gcaaaattgctacaaaatttgcactgtctcttt-----at
aacagtta-----gcgcataatttaacattttagaatcctttatcctgtttt
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>AB602561 B. pachyromydis
atctctta--agc-----gctgaagtgtcctca-----
-----
-----tttttaag----gggctttaagcagaagagc-----
-tttaaaagcttt-----tgtctgagaa-tatgccggggaagg--ttttccggtttatc
ccggagggttgtagctcagttggtttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggcccaccaatttaactatcca--ttaaagagc-----
-----gcttgtccaaaa-----
---gcctttttgaaaa-----tgta-----
---gcgcttatctgttt-----cgcttaaaag---agc

```

```

a-----
-----
-----aaaattagatgaag-----
-----ttcaaagacaaaagatctttgtaaattgatttt-----
-----aattttaaaagtttgagtgagggttatgctatttt
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>AF312505 B. tribocorum
atctcttaaaataaag-----cccggctcg-tttcaataaacaggatgttta
gacatatg-----tttaaattc-tacggttcctt-aa
ag-----accataaaatttaaaa-----aaggctttatgaagaaagct-----
--ctttatgcttttccagtgatttaagat-gataccggggaagg--ttttccggtttatc
ccggagggtctgtagctcagttggttagagcgcgcg- ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggccaccaatttatgctcgttt--tttgcttatccaaga--gtat
gaagcttaa-----gcgtattaag-----
-----cctcttttaatc-----ttgtttatttta-----
----aagatttaatttta-----tcattcaag-attgttt
gttaaatattattctatt-----aagtttgcaaa-----
----gggg-----agtttgcaagagggttttaaatcccttcatTT-----
--tgaaa-----ttccttcaaggtatagagaaatttaaatgatgtata
gagaa-----attdaaatgatgcaaatcaaaatagtacaaatca-----aa
gtcgtataaatgatccaagttgataaaatttcttgaggttgatttgagagagcattcctt
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>JF766267 B. tribocorum
atctcttaaaataaag-----cctgatctgttttaataaacaggatgttta
gacatatg-----tttaaattccttatggatcctt-aa
ag-----gtcataaaatttaaga-----aaggctttatgaagaaagca-----
--ctttaagcttttccaaygatttaagat-gataccggggaagg--ttttccggtttatc
ccggagggtctgtagctcagttggttagagcgcgcg- ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggccaccaatttatgctcgttt--tttgcttatccaaga--gtat
ggagcttaa-----gcgcatataag-----
-----tctcttttaatc-----ttgttttaagttta-----
----aagatttaatttta-----tcattcagag-attgttt
gttaaatattattccatt-----aagtttgcaaa-----
----gagga-----agtttgcaaggggatttttaaatcccttcatTT-----
--tgaaa-----ttccttcaaggtataggcaagtttaaatgatcc--
--aa-----atcaaaatagtacaagtcaaaatagtgcaaatca-----aa
gtagtgcagcaatccaagttgataaaatttcttgaggttgatttgagagagatattatt
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>EU111769 B. queenslandensis
atctcttaaaataaag-----cctgatctgttttaacaaacagggtgttta
gatatatg-----ttttaattccttatggatccttaa
aa-----aacatgaatttaaaa-----aaggctttatgaagaaagca-----
--ctttaagcttttccagtgatttaagat-gataccggggaagg--ttttccggtttatc
ccggagggtctgtagctcagttggttagagcgcgcg- ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggccaccaatttatgctcgttt--tttgcttatccaaga--gtgt
gaagcttaa-----gcgtattaag-----
-----tctcttcaatc-----ttgtttgttgta-----
----aagattttatttta-----ttctccaag--attgct
ggtaaatattatcctatt-----aaattc-----
-----ccaagaggatttttaaatcccttca-----
-----aaggtatagaggaattttaga-aagatata
gagag-----attdaaatgatgccaatcaaaatagtccaagtcg-----
-----ttcaaggtgatgaatttcttgagattgatttgaagagcattattt
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>JF766266 B. elizabethae
atctcttaaaataaag-----cctagcctgctttaaaaaac-gggcggttta
gatac-tc-----tttaaattccttatgaatcctt-aa
ag-----agtatgaatttaaaa-----aaggctttatgaagaaagca-----
--ctttaagcttttccaacgatttaagatmgataccggggaagg--ttttccggtttatc
ccggagggtctgtagctcagttggttagagcgcgcg- ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggccaccaatttatgctcgttt--tttgcttatccttgagccttat
gaagcttaa-----gcgtgtcaag-----
-----cctcttttaatc-----ttgttcatagttta-----
----aagatttaatttta-----acgtcccttcaaggg----tgca
gataaaatttaagaata-----aaaatc-----
-----aaatttaagcaatac--
---aa-----atcaaaataatattgattaaaagag---gatta-----aa
agaggacaagtcattcaagttgatcaatttcttgagattgatttgagagagcattcctt
a-ggggccgtagctcaactgggagagcacc

```


>HM636450 *B. massiliensis*
atctcttaaaataaagccttaaaataaaacctggcatgttttaaacacagggttttgta
gatagatc-----ttaaactcttaacggttt-aa
agcg--tatacatttgaaaaa----aaggctttatgaagaagca-----
-cttttaagcttttccaatgatttaagat-gataccggggaag--tttccggtttatc
cggagggttgtagctcagttggttagagcgcgcg- ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggccaccaatttatgctcattt--tttgcgtatcttgagcgttat
gaagcttaa-----gcgtattaaag-----
----cctcttttaaatc-----ttgtttcatattta-----
----aagatttctttatcgttcaaagatg-----ccaaaattgctaaag-attgttt
gttcaatttattccatt-----aaatttatcagacc-----atggggttta
aattcatga-----gatttgctaaagagaattttaaatcccttta-----
-----aagacatagataaaatttaattgtaac---
---aa-----atttaaaggatagaaatcaaacggctctaaataaaatgcagctgaaa
aaagcgtaggaatttaaattgataaaatggcttgagattgattttagagagcattcttt
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>AF312504 *B. vinsonii* subsp. *arupensis*
atctcttaaaaacaaa-----gcctcattctttcagaaaagagggtttttta
agaaaacagcagctttatactcagtggttctctcttaagagcctccttttctatgaa
aagtaagtttatttaaaagc----gtgctttttggttgagagtt--taccttattta
atttaagagttttctcttttatctaagag-tttccggggaag--tttccggtttatc
cggagggttgtagctcagttggttagagcgcgcg- ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggccaccaagttagaatcttctgttgaattgcttaaccac--
-----tgttgagaaact-----
-ccctcctttatgaga-----
---gaagttctaataagag-----aaaagctcttgagagcctcaaat
gacagacttcaaatc-----
-----tcgataaaactttaaagtggtcgtaaaat-----
-----gttcatgatataattttatgaaaata--
-----ttgagagatttgccagatgcactcgataaatct-----tg
gcaagaag-----attgataaatatcgggttgagggttagcgtttcattt
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>L35102 *B. vinsonii*
atctcttaaaaacaaa-----tcctcatgctctttta-----

-----tttaagaac---ttgctctttggttgagagtt-----actttt
aattaagagtttacttttttaattaagag-tttccggggaag--tttccggtttatc
cggagggttgtagctcagttggttagagcgcgcg- ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggccaccaatttagaat-----tacgaattgcttagccac--
-----tgttgagaaacg-----
-ccctcctttatgagaa-----
---gaagttctaataagcgtga-----gaaagctcttgagagcctcaaat
gatagactctgaaact-----
-----ctcggtaaaactttaaagtggtcgtaaaat-----
-----gtccatgatataattttatgatttta--
-----taaaaaatattgagagatttgctttctatcaa-----gg
ga-----attgataaatatcgggttgagggttagcgtttcattt
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>AB498009 *B. capreoli*
ttctgttcatcaaatt-----tcaaaagcgttttaaaacagataaagcgttt
aaaaaca-----ggtaaaaaagcgtttaagcagat
at---aaagcgtttaagaaa---catatctgtttcttaaacatat-----
ctttttgtttcttttggtttcttttggtt-tgtcccaggaaggtttttaccgatttact
cctgagggttgtagctcagttggttagagcgcgcg- ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggccaccaatttatga-----
-----ttgctgata-----

----agttttttgtgaa-----tgt
t-----

-----ttgatggtcttttatcttacgatctttcgcttt-----
-----tatggtgcaatctttcaaaagtatttgaactgttt
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>AB498010 *B. chomelii*
ttctgttcatcaaatt-----tcaaaagcgtttaagaacaggttaaaagcgt
ttaagca-----gatataaagcgtttaagaacat
ataaagaaggtggtttaagaaa---catatctgtttcttaaacatat-----
-----c-ttttggtttcttttatc-tgtcccaggaaggtttttaccgatttact
cctgagggttgtagctcagttggttagagcgcgcg- ttgataagcgtgaggtcggagg

```

ttcaagtcctcccaggccaccaatattatgattgctg--ataa-----
-----gtttgctgata-----
----agttttttgcgaa-----tgt
t-----
-----
-----ttgatggcttttatcttacgatctttcacttt-----
-----tatggtgcaatctttcaaaagtatttgaactgtttt
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>AY116639 B. schoenbuchensis
ttctgttcatcaaat-----tcaaaagcgtttaagaacaggtaaa-----
-----
-----aagtggttaagaaa--catatctgtttcttaaacatat-----
-----cttttgttttcttttggt-tgtcccgaggagggttttaccgatttact
cctgaggccttgtagctcagttggttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggccaccaatattatgattgctg--ataa-----
-----gtttgctgata-----
----agttttttgtgaa-----tgt
t-----
-----
-----ttgatggcttttatcttacgatctttcacttt-----
-----tatggtgcaatctttcaaaagtatttgaactgtttt
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>AB498007 B. japonica
atccac---gacaag-----ttct-----ttgtggga-----
-----
-----ctttaagaaa---aagcttttccattaaaagaa-----
-----tgct-----ttcatgtgat-agtgccggggagg--tttccggtttatc
ccggaggccttgtagctcagttggttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggccacca---tatccatccat--agaagagcgttagaaa---
-----gctgaaaagag-----
---ctttgctgtaaagt-----ttgaaaagacttgttt-----
-----atcgctttctgtaaaa-----tttggcgtttgtctg-tttttag
aagcggtcgaaaactga-----aagcattttgag-----
-----aacaagagtctttgaataggaaggacc-----
-----ataaagttcaagaggt-----
-----tcacatggttagagttaaattgtttaggatta-----ga
atgttctgtgtaaaat---gctgcatataaaaggttccgataaatgatttcggttt
g-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>EU111770 B. coopersplainsensis
atccgc---gataag-----ttct-----ttgtagaac-----
-----
-----ttaaagaaa---agcattttccattaaaagaa-----
-----tgct-----ttcatgtgat-aatgcccgggaagg--tttccggtttatc
ccggaggccttgtagctcagttggttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggccacca-ttatccatccat--agaaaagcgttagaaagttt
gactgttaacaggtcaacgttgtttttagtagcacaatattgtcttgaaaag-----
-agctttcttgtaaagt-----ttgagaaaacttgttt-----
-----atcgctttttgtaaga-----tggtggtttgtctg--ctttta
aagcgatcgaactga-----aagtgtttcaa-----gata-----
-----agag-----tcttggaacagaagagtcttggaatagaaaagaat-----
-----ataaagtttaggtgta-----
-----ttacatagcttagagttaaattgttcatgattg-----ga
acatttcatattgaaat---gctgcatataaaaggttccgataaatatttccggttt
-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>AB602559 B. callosciuri
atctcttataaataaagct-----cccgatagattttaaaaaacataaa-----
-----
-----ttttagagaaaatggggtaagcagtataaaaac-----gtc
cttaacaaagttttctgcttgataagat-aaggccggggaagg--tttccggtttatc
ccggaggccttgtagctcagttggttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggccaccactttatccatccat--ctctaaatgtttatcatgc--
-----ttttatgagaag-----
---attgctataaaagg-----attgtagc-----
---gcttatccgttt-----ggcagctgtgataag-----gta
aagcagttcaaggaa-----
-----aagtaatgcaatttgcatttgcattg-----

```

```

-----tatatttaacagaaat---
-----gtatattcaacagaaatctccttacacagttt-----
-----agcctattttccagtttgcaatccttctatcctattt-
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>AB602560 B. callosciuri
atctcttataaataaagct-----cccgatagattttaaaaaacataaa-----
-----
-----ttttagagaaaaatgggggtaagcagtataaaaac-----gtc
cttaacaaagtttttctgcttgataagat-aaggccggggaagg--ttttccggtttattc
ccggagggctttagctcagttggtttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggccaccactttatccatccat--ctctaagtgttatcatgc--
-----ttttatgagaag-----
---attgctataaaagg-----attgtagc-----
---gcttatccgttt-----ggcagctgtgataag----gta
aagcagttcaaggga-----
-----aagtaatgcaaatttgatttgcattg-----
-----tatatttaacagaaat---
-----gtatattcaacagaaatctccttacacagttt-----
-----agcctattttccagtttgcaatccttctatcctattt-
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>AB498008 B. silvatica
atctcttatcaagggaatt-----tgactgagatctcaaaagtccatat-----
-----
-----tttttaaaaatatgcgtgctttaagtaagccgtt-----ttg
aggaaaaagtgtttccacttggttaagatttagtccggggaagg--ttttccggtttattc
ccggagggctttagctcagttggtttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggccaccagtttccattctgat--ggaaaagcgcgataacat--
-----tcttatgaaaag-----
---cttgcttataagct-----tatgtataaaaataagcctgttcataaat
atagccttgttatttttagtcatcaaaaca-----tgaagcggttaaac-----ata
taaagatcatgcgaa-----aagggc-----
-----ttggccaagtgaactaaatctgcatggtt-----
-----agaattgcattatgcatcgtc---
-----caaaattcaatatgtactccacaatgaaaaatgc-----
-----tcttaattttatgtttttttaatgctgctgattgttt
agggggccgtagctcagctgggagagcacc
>AF312494 B. bacilliformis
atctgkccctcataaatrttt-----gaataaatattttaagag-----
-----
-----aggmactca----taaattttgagatagttgagaagaccttttgttt
tttggtctgttttattgtgatgtcagat-tgtaccggagaagg-tttttccggtttattc
ccggagggctttagctcagttggtttagagcgcgcgcattgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggccaccattttattccag-----gcctatgatt-----
-----
-----gatttctaggc-----aga
cattaatttgagg-----
-----cttatcttatagttttaggct-----
-----ta-----
-----ctatgtgtggtgctgctttt-----
-----tatcttttaactgccatggtggttg--gtaag-
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>KP720651 B. ancashensis
atctgttcatcatga-----ctttataaa-----
-----
-----gtagcttgg-----aagactttgatattttcttt-----
agggctctgctttttgttttatgtcagat-tgtaccggagaagg-tttttccggtttattc
ccggagggctttagctcagttggtttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggccaccattgatattcttaacattcatgctcat-
-----gctcattcacgt-----
---ctgagcttttattg-----
---gagttcataggtt-----tattgctttccag--tttagg
cagtaattagagga-----
-----gctttttccttcaaaagttggct-----
-----acgacatagatgggca---
-----ttgaagacggtacgtctaaagttcagcga-----
-----aagcgtttgattgtgtggttgtttactttgttga
agggggccgtagctcagctgggagagcacc
>DQ538396 B. australis
gtctgtatataattaag-----ccttttgatg-----

```

```

-----gttataaaa-----gaggtttttg-----
-----cagatcagat-tatgccggagaagg--ttttccggtttacc
ccggaggcctttagctcagttggttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggcccaccatttataacg-----gcttgaagcgg-----
-----cttatagaaggata-----
----tagatcatagatct-----atthtgccagg-----atc
ctataattgaattg-----tgattttttaagtaacttacgt-----
-----agcttatggagtgc-----
-----ttgaattttgtggctcttcttttgagaggttt-----
-----aagccttttcaagagtggaggcacgga--gcattg-
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>EU589237 B. clarridgeiae
atctgtttgcacaagc-----ctctgaga-----
-----gggatg-----aagatattgtttct-----
-----ttgatcagat-tatgccggtaaagg--ttttctggttacc
ctataggcctttagctcagttggttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggcccaccagttacacgatgctaaaagttgctatatgggagagtt
gataatc-----ccttacaggaaa-----
-ttattgcccttaataa-----aactttattttctaaaagcattca-----
----gagctgacatagaaatagagctgacatagaattgagaatctgacataggaattattg
aaattgtttggaaatta-----ttgaaattgtttctatca-----
ttttaaag-----gctaaaatattctgtctctatttttaaag-----
-----agcatcaggtgttttgaagagt---
-----gtgaagtttttaagtgtgaggtttttatattt-----ta
gtgtgaggttt-----ttataagggtatgacgtgagagcgttttgacctgttt
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc
>ML_46
atctgtttgcacaagc-----ctctgaga-----
-----gggatg-----aagatattgtttct-----
-----ttgatcagat-tatgccggtaaagg--ttttctggttacc
ctataggcctttagctcagttggttagagcgcgcgc-ttgataagcgtgaggtcggagg
ttcaagtcctcccaggcccaccagttacacgatgctaaaagttgctatatgggagagtt
gataatc-----ccttacaggaaa-----
-ttattgcccttaataa-----aactttattttctaaaagcattca-----
----gagctgacatagaa-----tagagctgacataggaattattg
aaattgtttggaaatta-----ttgaaattgtttctatca-----
ttttaaag-----gctaaaatattctgtctctatttttaaag-----
-----agcatcaggtgttttgaagagt---
-----gtgaagtttttaagtgtgaggtttttatattt-----ta
gtgtgaggttt-----ttataagggtatgacgtgagagcgttttgacctgttt
a-ggggccgtagctcagctgggagagcacc

```

6.3. Ευθυγράμμιση των ακολουθιών τμήματος γονιδίου 16S rRNA που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου *Ehrlichia*

30 309

```

MN922610  CGGCAAATC TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
MN227484  CGGCAAATC TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
MK507008  CGGCAAATC TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
EF011111  CGGCAAATC TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
AF373612  CGGCAAATC TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
NR118741  CGGCAAATC TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
AB934388  CGGCAAATC TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGAGAGGG GG-CAAGCGT
AF156786  CGGCAAATC TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
KJ410257  CGGCAAATC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
AB934389  CGGCAAATC TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GGGCAAGCGT
GU227701  CGGCAAATC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
NR037059  CGGCAAATC TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
KX987321  CGGCAAATC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
KU535865  CGGCAAATC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
NR148800  CGGCAAATC TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
MN148616  CGGCAAATC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
NR025962  CGGCAAATC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
AB013008  CGGCAAATC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
KJ410251  CGGCAAATC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
LC386012  CGGCAAATC TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
MZ433241  CGGCAAATC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
AB211162  CGGCAAATC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
MK757649  CGGCAAATC TGTGCCAGCA GCCGCGGC-A TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
MZ323326  CGGCAAATC TGTGRCAGCA GCCGCGGTAA TACG-TAGGG GG-CAAGCGT
MN148607  CGGCAAATC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
MK757650  CGGCAAATC TGTGCCAGCA GCCGCGGG-A TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
DQ647615  CGGCAAATC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
KU586082  CGGCAAATC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
NR074513  CGGCAAATC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT
ON678206  CGGCAAATC TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACG-GAGGG GG-CAAGCGT

TGTTCGGAAT TATTGGGCGT AAAGGGCACG TAGGTGGACT AGTAAGTTAA
TGTTCGGAAT TATTGGGCGT AAAGGGCACG TAGGTGGACT AGTAAGTTAA
TGTTCGGAAT TATTGGGCGT AAAGGGCACG TAGGTGGACT AGTAAGTTAA
TGTTCGGAAT TATTGGGCGT AAAGGGCACG TAGGTGGACT AGTAAGTTAA

```


TAGA-GGTCG AAAGAGGATA GCGGAATTCC TAGTGTAGAG GTGAAATTCG
TAGA-GGTCG AAAGAGGATA GCGGAATTCC TAGTGTAGAG GTGAAATTCG
CAGA-GGTCG AAAGAGGATA GCGGAATTCC TAGTGTAGAG GTGAAATTCG
TAGA-GGTCG AAAGAGGATA GCGGAATTCC TAGTGTAGAG GTGAAATTCG
TAGA-GGTCG AGAGAGGATA GCGGAATTCC TAGTGTAGAG GTGAAATTCG
TAGA-GGTCG AAAGAGGATA GCGGAATTCC TAGTGTAGAG GTGAAATTCG
TAGAAGGTCG AGAGAGGATA GCGGAATTCC TAGTGTAGAG GTGAAATTCG
TAGA-GGTCG AAAGAGGATA GCGGAATTCC TAGTGTAGAG GTGAAATTCG

TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAA GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAA GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAA GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAA GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAA GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAA GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC GGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC GGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC
TAGATATTAG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTATCT GGTTCGATAC

GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC
GTAGTCCAC

6.4. Ευθυγράμμιση των ακολουθιών τμήματος γονιδίου 16S rRNA που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου *Wolbachia*

30 307

```

MF944223  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
LN864488  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
AY026912  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
AY227740  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
GU724968  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
AY833061  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
OM438142  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
MN853993  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
MH521187  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
AJ628416  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
AY335935  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
MH618380  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
AY335932  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
AJ306315  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
KF751211  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
EU780684  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
DQ235287  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
AF501664  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
AY566424  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
MF581595  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
GQ981315  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
MW727486  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
MT554839  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
AY335923  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
AY335926  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
MG977004  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
KY345413  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGGGAGG GCTAGCGTTA
DQ402518  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGGGG GCTAGCGTTA
U23709    TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA
ON678202  TGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGAGG GCTAGCGTTA

TTCGGAATCA TTGGGCGTAA AGGGCGCGTA GGCTGATTAG TAAGTAAAA
TTCGGAATCA TTGGGCGTAA AGGGCGCGTA GGCTGATTAG TAAGTAAAA
TTCGGAATCA TTGGGCGTAA AGGGCGCGTA GCGGATTAG TAAGTAAAA
TTCGGAATTA TTGGGCGTAA AGGGCGCGTA GCGGATTAG TAAGTAAAA

```


AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC
AGTCCAC

6.5. Ευθυγράμμιση των ακολουθιών τμήματος γονιδίου 16S rRNA που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου *Candidatus Midichloria mitochondrii*

30 317

KX359181 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 KU559921 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 OM982404 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 HF568841 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 AJ566640 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 MZ954838 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 HF568843 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 LC381237 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 MK416236 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 MW092748 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 AM411593 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 MK416239 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 HF568840 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 AM411590 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 KX359182 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 HF568836 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 MT965821 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 FM992373 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 HG793392 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 AM181356 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 AM181355 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 AM181354 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT
 MW648737 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG AGCTAGCGTT
 LR585338 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCAAGCGTT
 JQ726712 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG AGCTAGCGTT
 AF069962 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCG-TAA TAC-GAAGGG GGCAAGCGTT
 JF714221 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAAGGG AGCTAGCGTT
 HE978250 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCAAGCGTT
 AB746412 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG AGCTAGCGTT
 ON678207 CGGCTAACTT CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TAC-GAAGGG GGCTAGCGTT

 ACTCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGTGCGT A-----GGCT GCTTAGTAAG
 ACTCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGTGCGT A-----GGCT GCTTAGTAAG
 ACTCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGTGCGT A-----GGCT GCTTAGTAAG
 ACTCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGTGCGT A-----GGCT GCTTAGTAAG

TCAAAAGTGA AAGCCTTGGG CTTAACCTAA GAATTGCTTT TGAAACTACT
TCAAAAGTGA AAGCCTTGGG CTCAACCTAA GAATTGCTTT TGAAACTACT
TCAAAAGTGA AAGCCTTGGG CTCAACCTAA GAATTGCTTT TGAAACTACT
TCAAAAGTGA AAGCCTTGGG CTTAACCTAA GAATTGCTTT TGAAACTGCT
TCAAAAGTGA AAGCCTTGGG CTCAACCTAA GAATTGCTTT TGAAACTACT
TCAAAAGTGA AAGCCTTGGG CTCAACCTAA GAATTGCTTT TGAAAC--C-
TCAAAAGTGA AAGCCTTGGG CTTAACCTAA GAATTGCTTT TGAAACTACT
TCAAAAGTGA AAGCCTTGGG CTTAACCTAA GAATTGCTTT TGAAACTACT
TCAAAAGTGA AAGCCTTGGG CTTAACCTAA GAATTGCTTT TGAAACTACT
TTGGGAGTGA AATCCTTGGG CTTAACCTAA GAATTGCTTT CAAAACTACT
TCAAAAGTGA AATCCTTGGG CTCAACCTAA GGGCTGTCTT TGAAACTGCA
TTGGGAGTGA AATCCTTGGG CTTAACCTAA GAATTGCTTT CAAAACTACT
TTGGAAGTGA AAGCCTAGGG CTCAACCTAA GAATTGCTTT CAAAACTGCC
TTGGGAGTGA AATCCTTGGG CTTAACCTAA GAATTGCTTT CAAAACTACT
TCAGGAATGA AATCCTTAAG CTCAACTAA GGGCTGTTC TGAAACTGCA
TTGGGAGTGA AATCCTTGGG CTTAACCTAA GAATTGCTTT CAAAACTACT
TCAAAAGTGA AAGCCTTGGG CTCAACCTAA GAATTGCTTT TGAAACTACC

AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-C-GTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA
AAGCTTGAGT A-CTGTAGGG GATAGCGGAA TTCCTAGTGT AGGGGTGAAA

G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
GTATACCCTG GTAGTCC
GTATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC
G-ATACCCTG GTAGTCC

6.6. Δημοσιεύσεις των αποτελεσμάτων της διατριβής σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά με κριτές

1. Liodaki M, Spanakos G, Samarkos M, Daikos GL, Christopoulou V, Piperaki ET. Molecular screening of cat and dog ectoparasites for the presence of Bartonella spp. in Attica, Greece. Acta Vet Hung. 2022 Mar 4. doi: 10.1556/004.2022.00004. Epub ahead of print. PMID: 35258479.
<https://akjournals.com/view/journals/004/70/1/article-p9.xml>
2. Liodaki, M.; Angelakis, E.; Spanakos, G.; Papadogiannaki, I.; Samarkos, M.; Daikos, G.L.; Christopoulou, B.; Piperaki, E.-T. Rickettsial Agents Associated with Ectoparasites in Attica, Greece. Zoonotic Dis. 2022, 2, 247-257.
<https://doi.org/10.3390/zoonoticdis2040020>