



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di
Sanità pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : SCIENZE VETERINARIE
INDIRIZZO: SANITÀ PUBBLICA E PATOLOGIA COMPARATA
CICLO: XXI

TITOLO TESI: Indagini in ambienti silvestri e periurbani del nord Italia su alcuni patogeni trasmessi da zecche

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Massimo Morgante
Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Mauro Dacasto
Supervisore :Ch.mo Prof. Marco Martini

Dottorando : Raffaela Corrain

Indice

	pagine
Riassunto	4
Summary	6
Introduzione	8
Erlichiosi granulocitica umana	
Introduzione	10
Cenni storici	10
Eziologia	11
Epidemiologia	12
Sintomatologia negli animali	14
Patogenesi, Sintomatologia e Diagnosi nell'uomo	15
Malattia da graffio del gatto	
Introduzione	17
Eziologia	17
Epidemiologia	18
Manifestazioni cliniche nell'uomo	19
Manifestazioni cliniche negli animali	20
Borreliosi di Lyme	
Introduzione	21
Cenni storici	21
Eziologia	22
Epidemiologia	23
Patogenesi, Sintomatologia e Diagnosi nell'uomo	28
Rickettsiosi Emergenti: <i>Rickettsia helvetica</i> e <i>Rickettsia monacensis</i>	
Introduzione	30
Eziologia	30
Epidemiologia	31
Manifestazioni cliniche e diagnosi nell'uomo	31

Tick-borne encephalitis	
Introduzione	32
Eziologia	32
Epidemiologia	33
Patogenesi, Sintomatologia e Diagnosi nell'uomo	34
Parte Sperimentale	
Indagine su ambienti silvestri del Veneto e del Friuli Venezia Giulia	
Materiali e metodi	37
Risultati	44
Discussione	60
Indagine su ambienti periurbani della città di Imola (Bologna)	
Introduzione	65
Materiali e metodi	65
Risultati	72
Discussione	76
Conclusioni	80
Bibliografia	81
Ringraziamenti	103

Riassunto

Lo scopo della tesi è lo studio dell'ecologia di *Ixodes ricinus* e dell'epidemiologia di alcuni agenti zoonosici (*Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia monacensis* e il virus della *Tick-borne encephalitis*) e la stima del rischio per l'uomo di contrarre queste infezioni.

Le aree di studio sono quelle tipicamente silvestri delle Prealpi del nord-est dell'Italia (nelle province di Verona, Vicenza, Treviso, Pordenone e Udine) e quelle periurbane di una cittadina del nord Italia (Imola, Bologna).

In entrambe le indagini è stata stimata la densità delle ninfe di *Ixodes ricinus* (numero di ninfe per 100m²) raccolte mediante la metodica del dragging lungo transetti di 100m ed è stata valutata l'influenza delle variabili stagionali (temperatura e umidità relativa del transetto, temperature medie massime mensili, piovosità mensile, umidità relativa mensile) ed ambientali (tipo di vegetazione ed altitudine) mediante modelli di regressione binomiali negativi

Nell'indagine svolta nelle aree silvestri la ricerca riguardante gli agenti patogeni si è concentrata sulla identificazione mediante Real-Time PCR di 3 patogeni: l'*Anaplasma phagocytophilum* (agente dell'Erlichiosi granulocitica umana), *Borrelia burgdorferi* s.l. (agente della malattia di Lyme) e del virus della *Tick-borne encephalitis* (TBE) mentre lo studio che ha coinvolto alcuni parchi della città di Imola ha evidenziato la presenza di *Anaplasma phagocytophilum* di *Borrelia burgdorferi* s.l., di *Bartonella henselae* e *B. clarridgeiae*, di *Rickettsia helvetica* e *R. monacensis*, ritenute rickettsiosi emergenti. L'identificazione della presenza di tutti questi patogeni è stata effettuata con PCR classica. È stata quindi valutata mediante modelli di regressione logistica la relazione tra prevalenza e fattori di rischio quali i mesi di campionamento, anno e abbondanza di zecche.

E' stato inoltre quantificato il rischio per l'uomo chiamato anche rischio acarologico, definendolo come la probabilità di trovare almeno una ninfa infetta in 100m di transetto.

I risultati ottenuti dimostrano una elevata diffusione della zecca *Ixodes ricinus* in habitat differenti, con dei picchi di densità in alcune aree probabilmente dovuti alle densità di micromammiferi presenti, che nei modelli di regressione non è stato possibile quantificare. Le indagini hanno confermato che l'abbondanza è influenzata notevolmente dalla stagione, con dei picchi primaverili ed autunnali, come in altre aree d'Europa, ma anche dalla tipologia di vegetazione.

Riguardo agli aspetti epidemiologici, viene confermata l'endemia di *Borrelia burgdorferi* s.l. in habitat silvestri e habitat periurbani, mentre *Anaplasma phagocytophilum* è presente in focolai con prevalenze più basse del 2% solo in alcune province (Udine, Pordenone, Treviso).

Di particolare interesse sono i risultati riguardanti la diffusione di *B.henselae* nelle zecche, poiché il principale agente della CSD è generalmente associato ad un tipico ciclo domestico che ha come ospite reservoir il gatto e come vettore la pulce (*Ctenocephalides felis*). I parchi periurbani potrebbero quindi rappresentare un interfaccia tra cicli domestici e cicli selvatici. Lo stesso fenomeno non è ipotizzabile per *B.clarridgeiae*, data la scarsa prevalenza nelle zecche.

Interessanti anche i risultati per *Richettsia helvetica* e *R.monacensis*, dimostrati essere da poco non solo endosimbionti di *Ixodes ricinus*, ma causa anche di zoonosi.

Nonostante le disomogeneità evidenziate anche dai valori del rischio acarologico, il rischio di infettarsi per l'uomo in habitat periurbani non è trascurabile, considerando anche la maggior frequentazione per le attività ricreative rispetto ad habitat silvestri.

Summary

Aim of the present work is to improve knowledge on ecology of *Ixodes ricinus* ticks, on epidemiology of some zoonotic agent (*Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia monacensis* and *Tick-borne encephalitis* virus) and to define human risk to bite exposure.

Study areas were some sites in the mountain habitats of the eastern Italian Alps and four public parks around Imola, province of Bologna. PCR were used for identification of all pathogens. Host seeking *Ixodes ricinus* ticks were harvested by dragging along transect of 100m. Density of ticks and association of prevalences of zoonotic infections in ticks with environmental variables (year, season, temperature, relative humidity, monthly rain, mean monthly temperature, vegetation cover, altitude) were evaluated using regression models.

Presence of three zoonotic agents, *Anaplasma phagocytophilum* (Human Granulocytic Erlichiosis agent), *Borrelia burgdorferi* s.l. (Lyme disease agent) and *Tick-borne encephalitis* virus (TBE) was surveyed in the mountain habitats.

In periurban parks *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Bartonella henselae* and *B. clarridgeiae* (cat scratch disease agents), *Rickettsia helvetica* and *R. monacensis*, two emerging rickettsial agents, were found.

Acarological Risk, defined as probability of collecting at least one infected nymph along a 100m transect, were calculated as estimate of human risk of infection by each of the pathogens found.

Results showed a high occurrence of *Ixodes ricinus* ticks in different habitats, with hot spots in some locality of mountain habitats, attributable to higher density of micromammals. Their abundance was also associated with season (higher abundance in spring and autumn) and vegetation cover.

Borrelia burgdorferi s.l. was widespread in wild and periurban habitats. *A. phagocytophilum* was present only in some localities in mountain habitats, with prevalence lower than 2%.

B.henselae infection resulted surprisingly high in ticks from one of the public parks although it has typically a domestic cycle, with fleas (*Ctenocephalides felis*) as vector and cats as reservoir. It can be therefore hypothesized that public parks may represent a link between the two cycles. Also the presence of *R. helvetica* and *R. monacensis* in public parks is an unexpected outcome: only few years ago these microorganismes were considered only as endosymbiont parasites of *Ixodes ricinus* and little is known about their epidemiology.

The Acarological Risk values calculated show that public parks may represent a disregarded threat to public health, and that these areas should be surveyed, especially when high vegetation and animal densities may support increasing tick abundances.

Introduzione

È ormai opinione comune che il surriscaldamento terrestre e il diverso utilizzo delle risorse ambientali da parte dell'uomo abbiano favorito l'aumentare delle popolazioni di zecche e quindi delle zoonosi da esse trasmesse.

Tuttavia, nonostante sia evidente che temperature più miti, umidità relative più elevate e una maggior estensione della superficie forestale favoriscano sia la popolazione di zecche sia le popolazioni ospiti, come micromammiferi ed ungulati selvatici, la relazione lineare con l'aumentare della diffusione dei patogeni di cui esse costituiscono il *reservoir* rimane ancora una supposizione che deve essere avvalorata.

L'abbondanza delle zecche è condizionata sicuramente da fattori abiotici come la temperatura e l'umidità relativa, ma anche da quelli biotici, come la disponibilità di ospiti vertebrati. Ad esempio, la popolazione di *I. ricinus*, che è la zecca più diffusa in tutta l'Europa centrale e meridionale, in realtà non verrebbe favorita a lungo termine da primavere precoci poiché anticipano l'attività delle ninfe, che nel contempo non hanno una grande disponibilità di ospiti vertebrati sia che si tratti di micromammiferi (che presentano il picco di natalità nella tarda primavera ed in estate) sia che si tratti di animali domestici che vengono portati al pascolo solo più tardi (Randolph, 2008).

La densità dei vettori è spesso invocata come fattore di rischio per la diffusione dei patogeni. Tuttavia, nonostante la densità sia indirettamente legata all'abbondanza di vertebrati e quindi alla maggior probabilità di infettarsi da parte della zecca, le specie ospiti sono tanto numerose quanto diverse le interazioni con i patogeni.

Nel caso di *Borrelia burgdorferi* ad esempio, mentre nei micromammiferi l'infezione si traduce in una lunga batteriemia, nei cervidi l'attività borrelcida contro tutte le genospecie non permetterebbe la trasmissione ad altri ospiti, se non tramite il co-feeding. L'aumentare della popolazione di questi ungulati, osservata in tutta Europa, pur favorendo la popolazione delle zecche non faciliterebbe quindi la diffusione di *Borrelia burgdorferi*.

Inoltre, lo studio dell'ecologia di ospiti e parassiti non deve far dimenticare lo scopo principale dell'interesse intorno a questi argomenti, cioè la salute pubblica. I dati riguardanti le infezioni trasmesse da zecche sono spesso frammentari. Le forme cliniche spesso non vengono riconosciute, e non esiste ancora un sistema di notificazione efficiente.

È quindi evidente che, nonostante le conoscenze riguardo agli argomenti esposti siano molto ampie, sia necessario approfondire alcuni aspetti ed in particolare quantificare in forma indiretta quale è il rischio di contrarre queste infezioni per l'uomo.

Gli studi descritti in questa tesi, effettuati in due habitat differenti come quello silvestre, in alcune aree del Veneto e del Friuli Venezia Giulia, e quello periurbano, in parchi della città di Imola (Bologna) hanno lo scopo di aumentare le conoscenze riguardo all'ecologia di *Ixodes ricinus* e all'epidemiologia delle infezioni trasmesse ma in particolare stimare il rischio di trasmissione in habitat così diversi, ma che dimostreremo essere in parte simili.

ERLICHIOSI GRANULOCITICA UMANA HUMAN GRANULOCITIC HERLICHIOSIS (HGE)

Introduzione

L'erlichiosi granulocitica umana (HGE) è stata descritta per la prima volta negli Stati Uniti nel 1994 in un paziente morto per una grave insufficienza respiratoria (Chen et al., 1994; Bakken et al., 1994) e da allora fino al 2000 sono stati riportati in USA circa 600 casi (Bakken e Dumler, 2000), quasi tutti registrati nei paesi che si affacciano alla costa atlantica mentre sono rari i casi osservati negli stati che si affacciano al Pacifico. In Europa, nonostante molte indagini sierologiche dimostrino l'esposizione all'infezione sia in popolazioni a rischio sia in donatori di sangue, con prevalenze variabili dallo 0 al 21% (Brouqui et al., 1995; Sumption et al., 1995; Bakken et al., 1996a; Dumler et al., 1997; Fingerle et al., 1997; Nuti et al., 1998; Pusterla et al., 1998; Christova e Dumler, 1999; Lebech et al., 1998; Cizman et al., 2000; Oteo et al., 2001; Daniel et al., 2002; Cinco et al., 2004), sono stati segnalati solo alcuni casi clinici sporadici. Il primo caso è stato descritto in Slovenia nel 1997 (Petrovec et al., 1997) e successivamente altri casi sono stati osservati sempre in Slovenia (Lotric-Furlan et al., 1998; Arnez et al., 2001) in Germania (Van Dobberburgh et al., 1999) in Spagna (Oteo et al., 2000), in Svezia (Eliasson I), in Scandinavia (Karlsson et al., 2001), Croazia (Misic-Majerus et al., 2000) Polonia (Tylewska et al., 2001) e Italia (Beltrame et al., 2006).

Cenni storici

Ehrlichia phagocytophila è stata isolata per la prima volta nel 1932 nelle zecche appartenenti alla specie *Ixodes ricinus*. Più tardi, nel 1969, Gribble descrive una infezione degli equini che compare alla fine dell'inverno e all'inizio della primavera che colpisce i granulociti. La patologia verrà denominata "Erlichiosi granulocitica equina" e l'agente responsabile *Ehrlichia equi*, denominazione che sarà pubblicata solo nel 1988. Nel 1994 in USA, l'agente dell'erlichiosi granulocitica umana (HGE) viene isolato da un centrifugato splenico di un paziente morto in uno stato di grave insufficienza respiratoria. Dall'analisi della sequenza della subunità 16S rRNA, viene evidenziata una percentuale di omologia del 99.9% con la subunità 16S rRNA di *Ehrlichia phagocytophila*, e del 99.8% con la subunità 16 S rRNA dell'*Ehrlichia equi*.

Ehrlichia phagocytophila, *Ehrlichia equi* e l'agente dell'HGE sembrano essere filogeneticamente più vicini ad *Anaplasma marginale* che ad *Ehrlichia canis*. In più, le tre specie presentano più del 99.5% di omologia per la subunità 16S rRNA, sono tutte trasmesse dalle zecche del genere *Ixodes* e

parassitano le cellule della linea mieloblastica. Solo nel 2001, Dumler e collaboratori, procedendo ad una riorganizzazione tassonomica dell'ordine delle Rickettsiales, sulla base delle sequenze del 16S rRNA, dei geni che codificano per le proteine esterne di membrana e dei geni degli operoni groESL, unificano le tre specie in una sola, chiamata *Anaplasma phagocytophila*, denominazione corretta un anno dopo con *Anaplasma phagocytophilum*.

Eziologia

A. phagocytophilum è un batterio Gram-, polimorfo (coccoide o ellissoide) di 0.2-2 µm di diametro appartenete all'ordine delle Rickettsiales, alla famiglia delle *Anaplasmataceae* e al genere *Anaplasma*. È un patogeno intracellulare obbligato e replica all'interno dei vacuoli delle granulociti neutrofili ed in minor misura negli eosinofili, formando delle morule (foto 1).

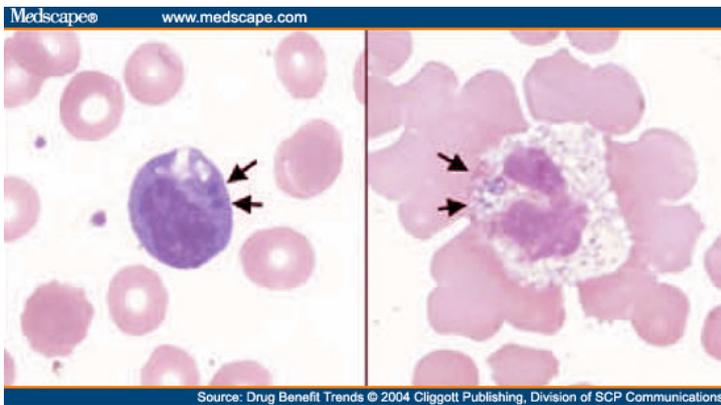


Foto 1. *A. phagocytophilum* in neutrofili ed eosinofili (<http://img.medscape.com>)

Al microscopio elettronico, le morule si distinguono in 2 forme: i corpi elementari e i corpi reticolari. Al contrario di altri batteri Gram-, manca dei geni che codificano per la sintesi dei peptidoglicani e del lipide A sulla parete cellulare, risultando particolarmente fragile (Migqum e Rikihisa, 2003). Nella superficie di membrana si trovano due proteine di superficie di membrana, p 44 e msp2, che giocano un ruolo fondamentale nella virulenza del batterio. Manca inoltre dei geni che codificano per il colesterolo e altri tipi di steroli, che vengono forniti da fonti esogene prima di essere incorporati nella membrana (Migqum e Rikihisa, 2003).

A. phagocytophilum è coltivabile in vitro nelle cellule IDE8 (cellule embrionali di *Ixodes scapularis*) e HL-60 (promielociti leucemici di origine umani) indifferenziati o differenziati in granulociti neutrofili.

Epidemiologia

Vettori

Principali vettori dell'infezione sono le zecche appartenenti alla famiglia Ixodidae, in particolare *Ixodes scapularis* nell'est degli Stati Uniti, *Ixodes pacificus* in California (Richter et al., 1996; Telford et al., 1996), *Ixodes persulcatus* in Cina ed in Russia (Cao et al., 2003; Shpynov et al., 2006) e *Ixodes ricinus* in Europa (Macleod e Gordon, 1993). Il batterio si trasmette transtadialmente mentre l'infezione transovarica non è stata evidenziata (Telford et al., 1996; Ogden et al., 1998)

In Europa, molteplici sono le indagini che hanno evidenziato il DNA del batterio in *Ixodes ricinus*: in Gran Bretagna (Ogden et al., 1998) in Polonia (Stankzak et al., 2004; Skotarczak et al., 2004; Grzeszczuk e Stankzak, 2006; Skotarczak et al., 2006) in Danimarca (Skarphedinsson et al., 2007) in Cecoslovacchia (Derdakova et al., 2003), Olanda (Wielinga et al., 2006), Svizzera (Leutenegger et al., 1999; Pusterla et al., 1999) Norvegia (Jenkins et al., 2001) Austria (Polin et al., 2004), Ungheria (Sreter et al., 2005), Italia (Piccolin et al., 2006; Mantelli et al., 2006) con prevalenze generalmente più basse rispetto a *Borrelia burgdorferi* s.l.

Alcuni Ixodidae nidicoli (*Ixodes trianguliceps* in Europa e *Ixodes spinipalpis* negli USA) sono implicati nell'epidemiologia dell'infezione. Indagini condotte in Inghilterra (Bown et al., 2003) e nell'ovest degli Stati Uniti (Castro et al., 2001) dimostrano che roditori come l'arvicola rossastra (*Clethrionomys glareolus*), il topo selvatico (*Apodemus sylvaticus*) e il ratto dei boschi (*Neotoma fuscipes*) assieme alle zecche nidicole sono in grado di mantenere l'infezione in un "ciclo chiuso", mentre le zecche esofile *Ixodes pacificus*, nell'ovest degli Stati Uniti, e *I. ricinus* in Europa, potrebbero infettarsi dai roditori e fungere da ponte tra il "ciclo chiuso" zecche endofile-roditori e uomo.

Nessuna indagine ha dimostrato la presenza di *A. phagocytophilum* in *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae appartenente alla sottofamiglia *Rhipicephalinae* che ha come ospiti di elezione i canidi ma che può attaccare diversi mammiferi compreso l'uomo). Tuttavia il DNA del batterio è stato isolato recentemente in *Rhipicephalus bursa* (zecca appartenente sempre alla sottofamiglia *Rhipicephalinae* che ha come ospiti ungulati domestici e selvatici) (Christova et al., 2003) in Albania ed in larve di *Neotrombicula autumnalis* (acaro della famiglia Trombiculidae, le cui larve si nutrono sulla pelle dei vertebrati, compreso l'uomo) (Fernandez-Soto et al., 2001) in Spagna. Il DNA del batterio è stato isolato anche in larve appartenenti alla famiglia *Syringophilidae*, acari che parassitano diverse specie di uccelli, facendo supporre che quest'ultimi potrebbero rappresentare dei reservoir per *A. phagocytophilum* (Skoracki et al., 2006). Anche se non è stata dimostrata la

capacità di queste ultime specie di trasmettere l'infezione ad ospiti vertebrati, finora il loro ruolo epidemiologico non può essere escluso.

Ospiti vertebrati

Mentre l'ecologia dell'infezione è stata chiarita nell'est degli Stati Uniti (dove i casi clinici umani sono notevolmente più numerosi), il ruolo epidemiologico delle diverse specie che ospitano *A. phagocytophilum* è tuttora oggetto di discussione sia in California e negli altri paesi della costa del Pacifico sia in Europa.

Nei paesi dell'est degli USA il principale reservoir è rappresentato dal peromisco dai piedi bianchi (*Peromyscus leucopus*), che mostra una prevalenza di infezione variabile dal 10.5% al 36% e la cui capacità di trasmettere l'agente patogeno è stata dimostrata sperimentalmente (Telford et al., 1996). L'infezione è stata riportata anche nel topo domestico (*Mus musculus*), nello scoiattolo striato (*Eutamias sp*) ed in altre specie di peromisco. In California invece, le conoscenze sui possibili reservoir sono limitate. Si è riscontrata un'infezione persistente (da 1 a 8 mesi) nel ratto dei boschi (*Neotoma fuscipes*) (Foley et al., 2002) e l'infezione è trasmissibile tramite inoculazione in altri ratti. Ancora, positività sierologiche e isolamenti con PCR sono state descritte in carnivori come i coyote, l'orso bruno, pantera, gatti, linci (Foley et al., 1999; Pusterla et al., 2000) e più recentemente in alcuni roditori come l'assapan (*Glaucomys sabrinus*), il chickeree (*Tamiasciurus douglasii*) e lo scoiattolo grigio occidentale (*Sciurus griseus*) (Foley et al., 2008).

In Europa alcune indagini hanno registrato alcune positività all'isolamento del DNA del batterio nell'arvicola rossastra (Ogden et al., 1998) e nell'arvicola agreste (*Microtus agrestis*) (Bown et al., 2003) in Inghilterra, nell'arvicola del nord in Polonia (*Microtus oeconomus*) (Grzeszczuk et al., 2006), nella crocidura rossiccia (*Crocidura russula*) in Spagna (Barandika et al., 2007), nel capriolo (*Capreolus capreolus*) nella Repubblica Ceca (Petrovec et al., 2003a), in Austria (Petrovec et al., 2003a; Polin et al., 2004) in Danimarca (Skaperdinsson et al., 2005) ed in Polonia (Adamska e Skotarczak, 2007), nel cervo (*Cervus elaphus*) in Austria (Polin et al., 2004), nel cinghiale (*Sus scrofa*), nella volpe (*Vulpes vulpes*) sempre nella Repubblica Ceca (Petrovec et al., 2003a) e nel daino (*Dama dama*) in Italia (Ebani et al., 2007). Tra gli animali domestici isolamenti del DNA del batterio sono stati ottenuti nella pecora (Stuen et al., 2002; Petrovec et al., 2003b), nella capra (Petrovec et al., 2003) e occasionalmente nel gatto (Tarello, 2005) e nel cane (Skotarczak et al., 2004). Indagini sierologiche indicano una diffusa esposizione all'agente sia nei ruminanti domestici (Amasategui et al., 2006) sia in quelli selvatici (Ebani et al., 2007) e un'occasionale esposizione anche in cani (Barutzki et al., 2006).

Infine, in Svezia il DNA di *A. phagocytophilum* è stato isolato da ninfe della specie *Ixodes ricinus* che parassitavano uccelli migratori quali il pettirosso (*Erithacus rubecula*), l'usignolo maggiore

(*Luscinia luscinia*), il merlo (*Turdus merula*) (Bjöersdorff et al., 2001) mentre negli USA, in pool di larve di *Ixodes scapularis* che infestavano il tordo americano (*Turdus migratorius*) e il tordo usignolo bruno (*Catharus fuscescens*) è stata isolato il DNA di *A. phagocytophilum*, facendo ipotizzare che le larve acquisiscano l'infezione tramite il co-feeding negli stessi uccelli (Daniels et al., 2002). Il ruolo degli uccelli migratori nella dispersione dell'agente e come reservoir necessita comunque di ulteriori approfondimenti.

Nonostante gli isolamenti biomolecolari e le positività sierologiche in molteplici specie animali, sono tuttora relativamente pochi i casi umani di erlichiosi granulocitica in Europa. Le cause potrebbero essere dovute ad una durata dell'infezione nei micromammiferi piuttosto breve (Bown et al., 2003) che non possono fungere da reservoir durante l'inverno. La scarsa diffusione dell'infezione è confermata da alcune indagini (Ogden et al., 1998; Barantika e al., 2007; Grzeszczuk et al., 2006) che hanno registrato su campioni di diverse specie di micromammiferi prevalenze di infezione molto basse. Inoltre, la distribuzione delle zecche che parassitano i roditori è altamente aggregata, condizione che non favorisce la diffusione tra roditori dell'infezione (Bown et al., 2003). Foley e collaboratori (2008) ipotizzano che la scarsa diffusione di *A. phagocytophilum* e la bassa incidenza dei casi umani in California potrebbe essere dovuta alla presenza di piccoli cluster dove la prevalenza di infezione è alta ma transitoria, associati alla grandezza delle colonie e all'home range del ratto dei boschi. L'infezione potrebbe essere introdotta da un individuo infetto alla colonia di suscettibili che diventerebbero immuni limitando la diffusione dell'infezione ad altre colonie. La stessa ipotesi potrebbe essere invocata anche per l'Europa, dove i casi clinici umani sono rari e *A. phagocytophilum* presenta generalmente una minor prevalenza di infezione tra le popolazioni di micromammiferi rispetto a *Borrelia burgdorferi* s.l., endemica in tutta Europa.

Sintomatologia negli animali

Negli ovini e nei bovini l'infezione è conosciuta come tick-borne fever e pasture fever rispettivamente. Dopo un'incubazione di circa 6 giorni negli ovini di circa 10 giorni nei bovini, *A. phagocytophilum* può causare febbre, anoressia, riduzione della produzione latte, mialgia, difficoltà respiratorie e occasionalmente aborto. Inoltre l'infezione predispone a sovrainfezioni batteriche (pasterellosi, misteriosi, enterotossiemie) e virali (louping ill).

Nel cavallo, dopo un periodo di incubazione di 10-20 giorni, l'infezione provoca febbre, anoressia, letargia, edema degli arti, atassia, ittero, formazione di petecchie, adenopatie. I sintomi persistono per una-tre settimane.

Occasionalmente sono state osservate forme cliniche caratterizzate da iperestesia, dolore muscolare e articolare, linfadenomegalia, gengivite e periodontite anche nel gatto (Tarello, 2005), nel cane con uveite, zoppia, linfadenopatia, letargia, distacco della retina e cecità (Barutzki et al., 2006) e nel capriolo (Stuen et al., 2006) con setticemia.

Patogenesi, Sintomatologia e Diagnosi nell'uomo

In vitro, il batterio penetra nei granulociti tramite fagocitosi ed inibisce la fusione fagosoma-lisosoma. La fase esponenziale della crescita inizierà solo dopo 48-72 ore e il plateau si raggiunge dopo 5-7 giorni dopo la penetrazione dei germi nei granulociti. Poiché la durata di vita media per i granulociti si aggira intorno a 2-3 giorni nei tessuti e a 12 ore nel sangue, sembra che il batterio sia in grado di inibire l'apoptosi tramite l'attacco durante la fase di penetrazione ad alcune proteine di membrana.

Dopo l'infezione, pochissimi individui sviluppano la patologia, e sembra che i casi di HGE europei siano clinicamente meno gravi rispetto a quelli osservati in USA (Blanco e Oteo, 2002). I sintomi clinici sono simili a quelli influenzali, con febbre, mal di testa, artralgia e mialgia. Si osservano manifestazioni a carico del sistema respiratorio (tosse, polmonite) dell'apparato gastrointestinale (nausea, vomito, diarrea), epatomegalia e splenomegalia. Il rash cutaneo, poco frequente negli USA (Aguero-Rosenfeld et al., 1996; Bakken et al., 1996b; Bakken e Dumler, 2000) è rarissimo in Europa (Karlsson et al., 2001; Eliasson I). In Europa, il decorso clinico è sempre favorevole; al contrario, in USA, la mortalità si aggira intorno allo 0-5% (Aguero-Rosenfeld et al., 1996; Bakken et al., 1996) generalmente provocata da infezioni opportunistiche dovute all'immunodepressione causata dalla neutropenia indotta da *A. phagocytophilum*.

La diagnosi di HGE può risultare facile quando nell'anamnesi del paziente viene ricordato il morso di una zecca e quando compaiono manifestazioni cliniche simil influenzali, ma può risultare piuttosto complicata quando la sintomatologia mostra quadri clinici meno frequenti.

La conferma di diagnosi di HGE necessita comunque della coltura, colorazione di strisci di sangue periferico (Giemsa, Wright) per evidenziare l'eventuale presenza di morule nei granulociti, test sierologici o PCR su sangue durante la fase acuta dell'infezione.

La CDC (*Center for Disease Control*) propone che per la conferma di HGE sia positiva almeno una delle tre indagini laboratoristiche: sieroconversione almeno 4 volte superiore al test dell'immunofluorescenza indiretta (IFA), PCR positiva o presenza di morule nel sangue, midollo osseo o nei leucociti del fluido cerebrospinale accompagnata da IFA con titolo superiore a 1:64. (Blanco e Oteo, 2002). Tuttavia, poiché si ritiene che la PCR potrebbe produrre false positività, la

conferma di HGE qualora la PCR risulti positiva dovrebbe essere accompagnata dalla presenza di morule (Blanco e Oteo, 2002).

Finora in Europa questo criterio diagnostico non è stato del tutto adottato. Generalmente la conferma di diagnosi di HGE si basa sulla PCR e sull'immunofluorescenza indiretta, mentre l'isolamento su coltura in cellule HL60 non è stata tuttora riportata.

La conferma tramite IFA è la metodica più comunemente utilizzata (Nicholson et al., 1997). L'80% e il 99.2% dei casi confermati rispettivamente in Europa e in USA sono risultati positivi a questo test. Tuttavia, false positività si possono verificare per cross-reazioni con *Ehrlichia* spp., come *E. chaffensis* o *E. ewingii* (Lotric-Furlan et al., 1998; Arnez et al., 2001), *Coxiella burnetii*, *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia typhi* (Comer et al., 1999; Guerrero et al., 2001). Per quanto riguarda le possibili relazioni con *Borrelia burgdorferi*, la simultanea sieropositività potrebbe essere dovuta sia a cross-reazione, ma anche a coinfezione (Magnarelli et al., 1995; Fingerle et al., 1997; Horovitz et al., 1998; Lebech et al., 1998; Leutenegger et al., 1999). In un modello sperimentale su topi di laboratorio, l'infezione con *A. phagocytophilum* non sembrerebbe indurre cross-reazione con *Borrelia burgdorferi* (Bunnell et al., 1999).

La PCR è stata utilizzata nel 73% dei casi europei (Blanco e Oteo, 2002). In 4 casi (27%) la sierologia risultava positiva mentre la PCR negativa.

MALATTIA DA GRAFFIO DI GATTO: *BARTONELLA HENSELAE* E *BARTONELLA CLARRIDGEIAE*

Introduzione

Nel 1909 Alberto Barton identificò *Bartonella bacilliformis* negli eritrociti umani ed essa è rimasta l'unico membro appartenente al genere fino al 1993, quando i microrganismi del genere *Rochalimaea* sono stati riclassificati nel genere *Bartonella* come *B. quintana*, *B. henselae*, *B. vinsonii* e *B. elizabethae* (Brenner et al., 1993). Nel 1995 sono state aggiunte altre cinque specie fino a quel momento appartenenti al genere *Grahamella* (*B. talpae*, *B. peromysci*, *B. grahamii*, *B. taylorii*, *B. doshiae*) (Birtles et al., 1995), mentre nel 1997 è stata inclusa *B. clarridgeiae* (Kordik et al., 1997), isolata l'anno precedente dal gatto di un paziente con setticemia da *B. henselae* (Lawson e Collins, 1996). In seguito, nel 1998 sono state aggiunte *B. tribocorum*, isolata dal sangue di topi selvatici (Heller et al., 1998), e *B. washoensis*, identificata in un uomo con problemi cardiaci e successivamente in roditori selvatici (Kosoy et al., 2003). Negli anni successivi la numerosità delle specie e sottospecie di *Bartonella* è aumentata ulteriormente con l'isolamento nel 1999 di *B. koehlerae* nel gatto (Droz et al., 1999), *B. alsatica* in conigli selvatici (Heller et al., 1999), *B. vinsonii* sottospecie *arupensis* in roditori (Welch et al., 1999) e *B. weissi* nel gatto (Marano et al., 1999). Nel 2001 dal sangue di un capriolo selvatico è stata isolata *B. schoenbuchensis* (Dehio et al., 2001), mentre a seguire nel 2002 sono state isolate *B. capreoli* nel capriolo e *B. bovis* nel bovino (Bermond et al., 2002). Le specie di più recente identificazione sono *B. chomelii*, isolata nel bovino (Maillard et al., 2004), *B. rattimassiliensis* e *B. phoceensis*, entrambe isolate nel ratto (Gundi et al., 2004). Infine, nel 2007, dal sangue di una donna con febbre, splenomegalia e anemia, è stata isolata una nuova specie per la quale è stata proposta la denominazione di *B. rochalimae* (Eremeeva et al., 2007).

Eziologia

I microrganismi del genere *Bartonella* sono bacilli e coccobacilli Gram negativi, appartengono alla famiglia *Bartonellaceae* del sottogruppo α -2 della classe *Proteobacteria*, e mostrano una stretta omologia evolutiva con i membri del genere *Brucella*, *Agrobacterium* e *Rhizobium*. Sono pleomorfi, di piccole dimensioni (0,5-0,6 x 1,2-2,0 μ m), aerobi, e vengono definiti “fastidious” a causa della difficoltà della loro coltura in vitro, che è caratterizzata da tempi di crescita molto lunghi (da 5-15 fino a oltre 45 giorni a seconda della specie). Infettano i globuli rossi e provocano

una batteriemia intraeritrocitaria cronica, solitamente asintomatica nell'ospite *reservoir*, dal quale possono essere trasmesse mediante un vettore, rappresentato da un artropode ematofago, ad un nuovo soggetto, che può appartenere alla specie *reservoir* o essere un ospite accidentale. Inoltre sono in grado di invadere le cellule endoteliali e di stimolarne la migrazione e la proliferazione, provocando lesioni di tipo vasoproliferativo (Dehio, 2004). Di solito c'è una relazione di specie-specificità tra ciascuna specie di *Bartonella*, l'ospite naturale e il vettore, che determina il possibile spettro d'ospite e influenza la distribuzione geografica dell'organismo (Jacomino et al., 2002).

Epidemiologia

La pulce del gatto (*Ctenocephalides felis*) rappresenta il vettore biologico principale nel ciclo domestico (Chomel et al., 1996).

Infatti *B. henselae*, ingerita dalla pulce durante il pasto di sangue sul gatto, si moltiplica nell'apparato digerente del parassita e da esso viene escreta con le feci, nelle quali rimane vitale per almeno 9 giorni (Higgins et al., 1996; Finkelstein et al., 2002). Attualmente si ritiene che l'esposizione a pulci e feci di pulci sia il fattore di rischio più importante nella trasmissione di *Bartonella* spp. tra gatti (Brunt et al., 2006), e che questa non avvenga tanto mediante il morso del parassita, quanto piuttosto mediante l'inoculazione delle feci, che avviene quando il gatto si gratta (Foil et al., 1998; Finkelstein et al., 2002). Tuttavia, negli ultimi anni, DNA di *Bartonella* spp. è stato riscontrato in zecche e mosche pungitrici, destando attenzione sul possibile ruolo di altri parassiti ematofagi nella trasmissione dell'infezione (Chang et al., 2001; Holden et al., 2006; Wikswo et al., 2007).

Le indagini condotte negli anni in numerosi Paesi hanno rivelato che l'infezione da *Bartonella* spp. nel gatto è ubiquitaria e che la prevalenza è molto variabile sia tra aree geografiche diverse, sia tra popolazioni feline diverse provenienti dalle stesse zone. Gli esami sierologici per la ricerca di anticorpi verso *B. henselae*, dimostrano un'elevata diffusione di questa specie con prevalenze comprese tra il 5% e l'80%. *B. clarridgeiae* ha invece una distribuzione irregolare e non è mai stata isolata in molti Paesi europei, in Australia e in America settentrionale (Boulouis et al., 2005).

L'esatto meccanismo della trasmissione di *B. henselae* dal gatto all'uomo è ancora poco chiaro, ma sembra avvenire soprattutto mediante il graffio e in misura minore mediante il morso (Carithers, 1985). Gli artigli del gatto si possono contaminare con feci di pulci infette o con il sangue del gatto infetto durante il *grooming* (Foil et al., 1998), mentre la cavità orale può venire contaminata attraverso sanguinamenti da patologie gengivali o dentali, o mediante il leccamento della cute contaminata o degli artigli (Fabbi et al., 2004). E' stato ipotizzato inoltre che l'infezione possa essere

trasmessa all'uomo mediante il contatto di feci di pulci infette con soluzioni di continuo cutanee o mediante il morso di pulci e zecche (Lucey et al., 1992; Zangwill et al., 1993; Rolain et al., 2003). Riguardo alla ipotizzabile esistenza di un ciclo selvatico, le informazioni sono limitate. *B. henselae* è stata isolata in *Ixodes ricinus* solo in due indagini (Sonogo et al., 2003a; Podsiadly et al. 2007), in *Ixodes pacificus*, *Ixodes scapularis* e in *Ixodes persulcatus* in altre tre studi (Chang et al., 2001; Eskow et al., 2001; Morozova et al., 2004). Il DNA di *B. henselae* è stato inoltre identificato nel sangue del topo selvatico (*Apodemus sylvaticus*) e dalla milza di altri micromammiferi (Kim et al., 2005). Tuttavia il ruolo dei vettori e dei reservoir in un ciclo alternativo a quello domestico deve essere ancora definito.

Manifestazioni cliniche nell'uomo

B. henselae è l' agente zoonosico che provoca la malattia da graffio del gatto (*cat scratch disease*, CSD) (Regnery et al., 1992), che si manifesta con formazioni di pustole, linfadenopatia regionale, ascessi linfonodali, angiomatosi bacillare (foto 2), febbre, cefalea e anoressia. Nel 5-9% dei casi e soprattutto in pazienti immunodepressi la CSD si manifesta in forma atipica, con la sindrome oculoghiandolare di Parinaud (linfadenopatia periauricolare e congiuntivite palpebrale), encefalite, endocardite, anemia emolitica, epatosplenomegalia, glomerulonefrite, polmonite, batteriemia ricorrente, neuroretinite, mialgia, artralgia e osteomielite (Margileth, 1993; Bass et al., 1997). Tra le complicazioni della CSD l'encefalite (*cat scratch disease encephalopathy*, CSDE) è una delle più gravi, e si ipotizza sia associata ad una risposta immunomediata nei confronti di *B. henselae* (Noah et al., 1995).

Attualmente, anche *B. clarridgeiae* si ritiene sia responsabile della CSD (Kordick et al., 1997; Windsor, 2001; Mansueto et al., 2003).

Le metodiche più frequentemente utilizzate per rilevare l'infezione nell'uomo è l'immufluorescenza indiretta, che evidenzia sia la presenza di IgM che le IgG, ma è stata applicata anche la real-time PCR per l'identificazione di *Bartonella* spp. da sangue periferico (Breitschwerdt et al., 2007).



Foto 2. angiomasiosi bacillare provocata da *B.henselae* (<http://www.maladies-a-tiques.com>)

Manifestazioni cliniche negli animali

Cane

B. clarridgeiae, *B. elizabethae*, *B. washoensis* e *B. quintana* sono state associate a casi di endocardite (Chomel et al., 2001; Mexas et al., 2002; Chomel et al., 2003; Kelly et al., 2006), mentre *B. henselae* è stata associata ad endocardite, epatopatie (Kitchell et al., 2000) e a linfadenite piogranulomatosa (Morales et al., 2007).

Gatto

Il gatto normalmente è un portatore asintomatico di *Bartonella* spp., ma l'infezione naturale è stata associata ad un alcune patologie. Sono stati riportati un caso di endocardite (Chomel et al., 2003) e numerosi casi di malattie oculari, tra cui uveiti, che hanno risposto alla terapia con farmaci attivi contro *Bartonella* spp. (Lappin e Black, 1999; Ketring et al., 2004).

Alcuni studi hanno riscontrato un'associazione tra sieropositività nei confronti di *B. henselae* e presenza di stomatite e disturbi delle vie urinarie (Glaus et al., 1997), ematuria (Breitschwerdt et al., 2005) e, in gatti coinfecti da FIV, linfadenopatia e gengivite (Ueno et al., 1996).

BORRELIOSI DI LYME

Introduzione

La borreliosi di Lyme (LB) è la patologia più comune trasmessa da *Ixodes ricinus* in Europa e da *Ixodes scapularis* nel Nord America. Annualmente vengono riportati da 14 a 140 casi ogni 100,000 abitanti (Avdikova et al., 2005). L'ultimo report del WHO (*World Health Organization*) registra la più alta incidenza nei paesi dell'Europa orientale e centrale, in particolare in Slovenia ed in Austria con 120 e 130 casi ogni 100.000 abitanti rispettivamente. Tuttavia, l'incidenza della LB è probabilmente sottostimata in molti paesi europei, poiché non tutti hanno istituito un sistema di notificazione efficiente.

In Italia è una malattia a denuncia obbligatoria dal 1990 ed è stata classificata dal Ministero della salute come patologia rara (meno di 5 casi ogni 10.000 abitanti). Il primo caso è stato segnalato in Liguria nel 1983 e fino al 1996 sono stati osservati 1324 casi; la maggior parte delle segnalazioni provengono dal Friuli-Venezia Giulia, Veneto e Trentino Alto Adige (Ciceroni e Ciarrocchi, 1998). Dal 1999 al 2004 il sito del Ministero della Salute riporta 1091 casi di LB con elevate differenze regionali (255 casi segnalati in Lombardia e solo 4 casi in Abruzzo e Sardegna).

Dalle diverse indagini sierologiche su popolazioni ritenute a rischio (cacciatori, forestali, taglialegna) effettuate in Friuli-Venezia Giulia, Veneto, Trentino Alto Adige, Abruzzo e Toscana si osservano prevalenze dal 3% al 27.7% (Ciceroni e Ciarrocchi, 1998), range probabilmente dovute alla metodica sierologica utilizzata (ELISA od Immunofluorescenza Indiretta) e alla numerosità campionaria. Indagini sierologiche su individui considerati non esposti mostrano prevalenze più basse (Ciceroni e Ciarrocchi, 1998).

Cenni storici

Nel 1883 Buchwald descriveva un caso di “atrofia cutanea idiopatica diffusa” in un paziente morso da una zecca e successivamente, nel 1909, Afzelius identificò il nesso causale tra il morso della zecca e l'eritema cronico migrante (ECM). Negli anni '70 Steere e ai suoi collaboratori (1977) conducendo un'indagine retrospettiva tra giovani abitanti della contea di Lyme (Connecticut, USA) definirono un quadro sintomatologico più completo, associando a focolai di artrite reumatoide (definita “artrite di Lyme”) ad agenti eziologici trasmessi da zecche. Nel 1992 Burgdorfer e i suoi collaboratori isolano una spirocheta dall'apparato digerente delle zecche e dimostrano la presenza di anticorpi specifici in pazienti affetti da artrite di Lyme e nel 1984 Johnson e collaboratori

classificano sulla base di caratteristiche genetiche e metaboliche la spirocheta precedentemente isolata nel genere *Borrelia* proponendo una nuova specie: *Borrelia burgdorferi*.

Eziologia

Borrelia burgdorferi sensu lato è una spirocheta facente parte del genere *Borrelia*, della famiglia delle Spirochaetaceae e dell'ordine Spirochaetales (Johnson et al., 1984). E' un batterio Gram-, mobile, con una lunghezza compresa tra 10 e 30 μm e una larghezza tra 0.2 e 0.3 μm (foto3).

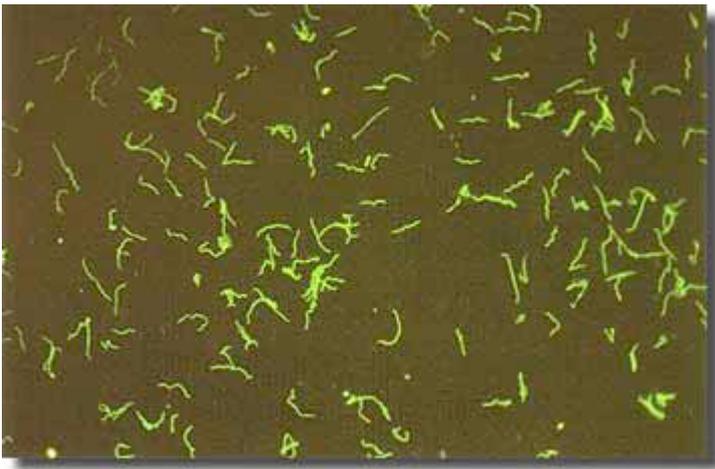


Foto 3. *Borrelia burgdorferi*. Immunofluorescenza indiretta su siero di bovino (foto del sito www.crev.it)

La sua crescita è difficoltosa e piuttosto lenta (tempo medio di divisione cellulare di 8-12 ore), richiede l'utilizzo di terreni specifici (Barbour Stonner Kelly II medium), un ambiente microaerofilo ed una temperatura compresa tra 30°C e i 34°C (Barbour, 1984; Barbour e Hayes, 1986). *Borrelia* non è in grado di produrre autonomamente aminoacidi, lipidi e non contiene enzimi in grado di produrre lipopolisaccaridi, per cui si ritiene che queste sostanze provengano dalle molecole degli ospiti e dei vettori. La membrana cellulare è circondata da 7 fino a 11 flagelli, la cui componente principale è la flagellina. La superficie esterna di membrana contiene un numero abbondante di proteine esterne di membrana (OspA-F) (Norris et al., 1992; Sadziene et al., 1993; Lam et al., 1994).

Il genoma è formato da un cromosoma lineare e da 21 plasmidi, che costituiscono il 40% del DNA totale. Ha un unico gene che codifica per il 16 S rRNA e due coppie per il 23 S rRNA e il 5S rRNA. I geni che codificano per rRNA e per la flagellina si localizzano nel cromosoma, mentre i circa 150 geni che codificano per la sintesi delle proteine esterne di membrana (Osp) sono quasi tutte localizzate nei plasmidi. Il ruolo delle proteine esterne di membrana sembrerebbe quello di facilitare la sopravvivenza della spirocheta in diversi tessuti ospiti, variando l'espressione dei geni codificanti per esse. Infatti, nell'intestino delle zecche le spirochete sintetizzano abbondantemente OspA,

mentre all'inizio del loro pasto di sangue risulta accelerata la produzione di OspC e ridotta la produzione di OspA.

Il genoma è stato completamente sequenziato (Fraser et al., 1997) e diverse sequenze genomiche, cromosomiali e plasmidiche specifiche per le varie genospecie di *Borrelia* sono state utilizzate ai fini diagnostici e di ricerca: per il gene OspA, per il gene *fla*, per i geni della proteina 16S e 23 S e per il gene della proteina p66.

L'analisi filogenetica ha potuto identificare 12 genospecie: *B. burgdorferi sensu stricto* (s.s.), presente in USA ed in Europa, rara in Russia e non segnalata in Asia, *Borrelia garinii* (Baranton et al., 1992) diffusa in Eurasia, *Borrelia afzelii* (Canica et al., 1993), *Borrelia valaisiana* (Wang et al. 1997), *Borrelia lusitaniae* presenti sempre in Eurasia (Le Fleche et al., 1997), *Borrelia japonica*, (Marconi et al., 1995), *Borrelia tanukii*, *Borrelia turdae* (Fukunaga et al. 1996) diffuse solo in Giappone, *Borrelia andersonii* (Marconi et al., 1995) identificata solo negli USA, *Borrelia sinica* (Masuzawa et al., 2001) isolata in Cina, *Borrelia bissetti* (Postic et al., 1998) localizzata principalmente in USA e *Borrelia spielmani* (Richter et al., 2004) isolata in Europa centrale ed in Francia.

Tra queste, sono considerate sicuramente patogene *B. burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, mentre la patogenicità di *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia bissetti* e *B. spielmanii* non è del tutto chiara. Il DNA di *Borrelia lusitaniae*, di *Borrelia valaisiana* e *Borrelia spielmanii* è stato isolato da biopsie di soggetti con eritema cronico migrante e acrodermatite cronica atrofizzante (Rijpkema et al., 1997; Robertson et al., 1999; Wang et al., 1999; Collares-Pereira et al., 2004; Foldvari et al., 2005; Maraspin et al., 2006).

Epidemiologia

Vettori

In Europa il vettore e reservoir del patogeno è *Ixodes ricinus*. Nell'America settentrionale lo stesso ruolo è svolto da *Ixodes scapularis*, mentre in Asia ed in Russia da *Ixodes persulcatus*. La trasmissione delle spirochete è transtadiale, mentre la trasmissione transovarica non è comune (inferiore al 5%) (Magnarelli et al., 1987; Matuschka et al. 1992). Infatti, solo nell'1% delle femmine infette l'infezione sistemica raggiunge le ovaie (Leuba-Garcia et al., 1994).

Larve, ninfe ed adulti si infettano durante il pasto di sangue da ospiti reservoir, che mantengono una spirochetemia per lunghi periodi. Tuttavia la trasmissione può avvenire anche qualora zecche non infette si cibino vicino o poco dopo zecche infette (co-feeding) in ospiti che non presentano

spirochetemia (considerati non reservoir). Infatti, le borrelie rimangono nella pelle, in qualche caso fino a 4 settimane, prima di diffondersi nei tessuti (Gern e Rais, 1996; Randolph et al., 1996).

Nelle zecche a digiuno, le borrelie si localizzano nell'intestino medio dove viene espressa la proteina esterna di superficie di membrana A (OspA), che possiede un recettore per il plasminogeno dell'organismo ospite. Quando le zecche iniziano il pasto di sangue, il plasminogeno si trasforma in plasmina, facilitando la migrazione delle borrelie dall'intestino medio all'emocele, viene aumentata la sintesi di OspC e diminuita quella di OspA (Coleman et al., 1997). Solo le spirochete con OspC e senza OspA entrano nelle ghiandole salivari, anche se Ohnishi et al (2001), dimostrano che l'80% delle borrelie che si localizzano nelle ghiandole salivari non esprimono nessuna delle due proteine.

Una volta che le zecche si attaccano all'ospite e iniziano il pasto di sangue, le borrelie iniziano a migrare nell'ospite dopo circa due-tre giorni dall'adesione della zecca (Kahl et al., 1998). Tuttavia le zecche con infezione sistemica possono trasmettere le spirochete subito dopo l'adesione (Leuba-Garcia et al., 1998).

Resta ancora da accertare il ruolo delle zanzare, tafani e mosche della famiglia degli *Stomoxidae* (Magnarelli e Anderson, 1988), pulci, pidocchi e acari (Pet'ko et al., 1998) risultati infetti. Sebbene non esistano studi sperimentali o di campo che dimostrino la capacità di agire come vettori, si possono considerare comunque carriers del patogeno. Possono quindi trasmettere la borrelia per via transtadiale ma non sono in grado di trasmetterla all'ospite (Kahl et al., 2002).

Ospiti vertebrati

Ixodes ricinus presenta una bassissima specificità parassitaria nutrendosi su più di 237 specie (Gern, 1994). Le larve e le ninfe si nutrono principalmente su micromammiferi roditori ed insettivori, come topi selvatici, arvicole, ghiri, ratti, toporagni, ricci e talpe, oltre che su uccelli terricoli e lucertole. Le ninfe e le femmine adulte (i maschi non si nutrono) si nutrono su ungulati domestici, selvatici e lagomorfi. L'uomo è un ospite accidentale.

Nonostante l'elevato spettro d'ospiti di *Ixodes ricinus*, solo alcuni vertebrati sono reservoir per la spirocheta, presentando una borreliemia di lunga durata e rappresentando così una sorgente di infezione per la zecca.

Finora, tra le specie reservoir sono inclusi roditori come il topo selvatico (*Apodemus sylvaticus*), il topo dal collo giallo (*Apodemus flavicollis*), il topo selvatico dal dorso striato (*Apodemus agrarius*), l'arvicola rossastra (*Clethrionomys glareolus*), l'arvicola agreste (*Microtus agrestis*) (Kurtenbach et al., 1998; Talleklint e Jaenson, 1994), il ghio (*Glis glis*), (Matuschka et al., 1999) il ratto delle chiaviche (*Rattus norvegicus*) ed il ratto nero (*Rattus rattus*) (Matuschka et al., 1996), lo scoiattolo rosso (*Sciurus vulgaris*) e grigio (*Sciurus carolinensis*) (Craine et al., 1997; Humair et al., 1998). Tra gli insettivori sono considerati reservoir il toporagno acquaiolo (*Neomys fodiens*), il toporagno

nano (*Sorex minutus*), il toporagno comune (*Sorex araneus*) (Talleklint e Jaenson, 1994) e il riccio (*Erinaceus europaeus*) (Gern et al., 1997). Anche la lepre comune (*Lepus europaeus*) e la lepre variabile (*Lepus timidus*) avrebbero un ruolo come reservoir (Talleklint e Jaenson, 1994).

Ungulati selvatici come il capriolo (*Capreolus capreolus*), il cervo (*Cervus elaphus*), il sika (*Cervus nipon yesoensis*), l'alce (*Alces alces*), il daino (*Dama dama*) e domestici come il bovino (*Bos taurus*) e la pecora (*Ovis ovis*) non sono ritenuti reservoir (Talleklint e Jaenson, 1994) anche se possono partecipare alla mantenimento dell'agente sia mantenendo la popolazione di zecche sia trasmettendo l'infezione ad esse tramite il co-feeding.

Il ritrovamento di diverse specie di borrelie nelle zecche (*Ixodes ricinus* e *Ixodes uriae*), in campioni di sangue e in biopsie cutanee provenienti da uccelli, in particolare da quelli terricoli (Olsen et al., 1995; Craine et al., 1997; Hanincova et al., 2003a; Kurtenbach et al., 1998) dimostra un possibile ruolo nel mantenimento del patogeno. In particolari gli uccelli migratori potrebbero favorirne la diffusione entro lunghe distanze (Olsen et al., 1995).

Cani (Hovius et al., 1998) gatti (Magnarelli et al., 1990) cavalli (Magnarelli et al., 2000) sono suscettibili all'infezione ma non rappresentano dei reservoir perché non sono in grado di trasmettere l'infezione alle zecche.

La sopravvivenza delle borrelie nei tessuti e nel sangue e quindi la capacità di un ospite di fungere da reservoir per la spirocheta dipende dall'azione borrelcida del complemento nei confronti delle diverse genospecie. *B. afzelii*, *B. garinii* (NT29 ribotipo, OspA tipo 4), *B. japonica* e *B. bissettii* sono resistenti al complemento dei roditori mentre *B. valaisiana* e *B. garinii* sono resistenti al complemento degli uccelli, *B. burgdorferi s.s.* ha una resistenza intermedia al complemento degli uccelli e dei roditori e spesso sembra infettante per entrambi (Kurtenbach et al., 2002a).

Il complemento dei cervidi ha un'attività borrelcida contro tutte le genospecie (Kurtenbach et al. 2002a).

L'azione borrelcida del complemento nelle diverse specie ospiti nei confronti delle varie genospecie induce una elevata variabilità nell'infettività per gli ospiti vertebrati e ne determina la capacità o meno di fungere da reservoir. *B. afzelii* è spesso osservata nei roditori del genere *Apodemus* e *Clethrionomys* (Wang et al., 1999; Hanincova et al., 2003b) e *B. burgdorferi s.s.* nel topo dalle zampe bianche (*Peromyscus leucopus*), nello scoiattolo striato nordamericano (*Tamias striatus*), nello scoiattolo grigio (*Sciurus carolinensis*), nell'arvicola della prateria (*Microtus pennsylvanicus*), nel procione (*Procyon lotor*), nella moffetta striata (*Mephitis mephitis*) e nel merlo americano (*Turdus migratorius*) (Derdacova et al., 2004), tutte specie presenti nel Nord-America dove questa genospecie è maggiormente diffusa rispetto all'Europa.

B. garinii e *B. valaisiana* sono più frequentemente isolate, spesso in associazione, negli uccelli (Kurtenbach et al., 1998; Hanincova et al., 2003a; Kurtenbach et al., 2002b;). In particolare *B. garinii*, sierotipo OspA 4 sembra essersi maggiormente adattato ai roditori più che agli uccelli (Hanincova et al., 2003b) ed è stato anche isolato in alcuni topi del genere *Apodemus* in Svizzera (Huegli et al., 2002). *B. valaisiana*, invece, riconosce come unici reservoir diverse specie di uccelli: marini, canori, migratori e fagiani (Kurtenbach et al., 1998; Hanincova et al., 2003a; Poupon et al. 2006).

B. spielmanii è associata al quercino (*Elyomis quercinus*) e al moscardino (*Muscardinus avellanarius*), dimostrando una elevata specie-specificità. Per *B. lusitaniae*, isolata sporadicamente solo da vettori (*Ixodes ricinus* e *Hyalomma marginatum*) in alcuni Paesi Europei (Portogallo, Francia, Italia, Cecoslovacchia, Polonia, Svizzera, Moldavia, Ucraina, Polonia, Bielorussia) (De Michelis et al., 2000; Bertolotti et al., 2006) non è stato ancora riconosciuto l'ospite reservoir, anche se si ipotizza che le comuni lucertole muraiole (*Podarcis muralis*) (Bertolotti et al., 2006; Richter e Matuschka, 2006), le lucertole degli arbusti (*Lacerta agilis*) (Richter e Matuschka, 2006) e alcuni uccelli migratori come il pettirosso (*Erithacus rubecula*) e il tordo (*Turdus philomenos*) possano fungere da reservoir (Poupon et al., 2006).

Altre genospecie, non segnalate in Europa, presentando un ristrettissimo spettro d'ospiti vertebrati e quindi sono diffuse solo in alcune aree geografiche.

B. andersonii è diffusa solo nel Nord America e riconosce come serbatoio il coniglio e come vettore *Ixodes dentatus* (Postic et al., 1998). *B. sibirica*, presente in Cina ed in Nepal ha come reservoir un roditore (*Niniventer confucianus*) e come vettore *Ixodes ovatus* (Masuzawa et al., 2001), mentre *B. japonica*, isolata in Giappone, riconosce come serbatoio il toporagno dalla coda lunga (*Sorex unguiculatus*) (Kawabata et al. 1993). Per altre genospecie (*B. tanukii*, *B. turdi*) sempre isolate in Giappone ed in ristrette aree geografiche, il serbatoio è tuttora sconosciuto.

Prevalenza in Europa

In Europa sono state descritte 6 genospecie: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi s.s.*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. bissettii* e *B. spielmanii* (Baranton et al., 1992; Hubalek e Halouzka, 1997; Gern et al., 1999; Wang et al., 1999; De Michelis et al. 2000; Kurtenbach et al., 2001; Foldvari et al., 2005; Maraspin et al., 2006).

Da una recente meta-analisi (Rauter e Hartung, 2004), la prevalenza media nelle zecche è risultata pari al 13% (15.516 positivi su 113.685 zecche). Negli adulti è stata osservata una prevalenza significativamente superiore (18.5%; 7974 positivi su 43.126) rispetto alle ninfe (10.1%; 6435 su 63894) mentre non è stata descritta alcuna differenza tra maschi e femmine (16.3% e 18.2% rispettivamente).

Correlando la latitudine e longitudine dei lavori presi in considerazione da Rauter e Hartung (2004) si mette in luce un aumento della prevalenza negli adulti progredendo da ovest ad est, mentre non si osserva nessun trend nelle ninfe. La latitudine non sembra avere alcun effetto né sulla prevalenza delle ninfe né su quella degli adulti. Tuttavia, la prevalenza varia significativamente nei vari Paesi europei. In Gran Bretagna, Irlanda, Italia, Francia, Germania del Nord e Polonia, si osserva una prevalenza inferiore al 11% delle ninfe e al 20% negli adulti. In altri Paesi (Svezia, Olanda, Belgio, Cecoslovacchia, ex Germania dell'Est, Repubblica Ceca, Slovenia, Ucraina, Moldavia, Svizzera, Ungheria) si riscontra una prevalenza superiore. Vengono riportati degli "hot spot" con prevalenze superiori al 30% in Portogallo e Bulgaria.

Per quanto riguarda la diffusione delle genospecie, la più frequentemente osservata è *B. afzelii* (37%), seguita da *B. garinii* (34%) e da *B. valaisiana* (20%), da *B. burgdorferi s.s.* (17%) e infine da *B. lusitaniae* (7%). Non sono state riscontrate differenze né tra prevalenze delle diverse genospecie né tra il numero di infezioni miste tra ninfe e adulti. Nel 13% delle zecche campionate si osservano generalmente infezioni multiple. La coinfezione può essere dovuta sia ad una molteplice infezione trasmessa per via trans-ovarica, sia ad una trasmissione tramite un pasto di sangue in un ospite coinfecto, sia alla trasmissione da una zecca coinfecta ad una non infetta tramite il co-feeding e infine a più infezioni acquisite da più ospiti infetti. Tuttavia, la prevalenza di infezioni miste negli adulti non risulta superiore a quella delle ninfe. Kurtenbach e collaboratori (2001) spiegano il fenomeno con la possibilità che anche nella zecca il complemento, ingerito dall'ospite durante il pasto di sangue, possa avere un'azione borrelcida nei confronti delle genospecie.

La diffusione delle genospecie varia tra Paesi Europei: in Cecoslovacchia, Sud della Germania, Repubblica Ceca, Norvegia, Finlandia, Estonia prevalgono *B. afzelii* e *B. garinii*, mentre in Gran Bretagna, Irlanda e nel centro-sud della Germania prevale *B. garinii*. In Francia, Belgio, Olanda, Austria e Svizzera non si registrano differenze significative tra le due genospecie (Rauter e Hartung 2004).

Infine, Rauter e Hartung (2004), dividendo in due periodi (dal 1983 al 1993 e dal 1994 al 2001) i lavori scientifici analizzati, non ritengono che si assista ad alcun trend nel corso degli anni. Nonostante che dal 1994 la maggior parte delle indagini utilizzino la PCR, ritenuta più sensibile della semina su coltura e dell'immunofluorescenza diretta, la prevalenza non sembra aumentare né nelle ninfe né negli adulti. Tuttavia, dal 1997 al 2001 si osserva un alta prevalenza sia nelle ninfe (superiore al 25%) sia negli adulti (superiore al 30%) ma non è possibile stabilire se l'aumento sia dovuto ad una reale maggior diffusione dell'infezione o ad un aumento della sensibilità nelle metodiche applicate.

Patogenesi, Sintomatologia e diagnosi nell'uomo

La trasmissione avviene tramite il morso di una zecca infetta. Altre forme di trasmissione (per via verticale o tramite trasfusione, altri vettori) non sono state tuttora documentate.

Dalla sede del morso, le borrelie si diffondono attraverso il sangue o la linfa a tutti i tessuti, con particolare tropismo per il tessuto cutaneo, il sistema nervoso e le articolazioni. Il tempo di incubazione varia da 4 giorni a 4 settimane e il 20% delle infezioni decorre in forma asintomatica (Branz, 2000). Si possono distinguere 3 stadi di patologia. Il primo (infezione localizzata) compare dopo 3 giorni-4 settimane dal morso ed è caratterizzato da una lesione cutanea tipica, l'Eritema Cronico migrante (ECM), accompagnato da tumefazione dei linfonodi regionali e malessere generale (foto 4). Il secondo stadio si manifesta dopo alcune settimane fino a qualche mese dal morso e spesso non è preceduto da ECM. In questo stadio l'infezione è generalizzata provocando meningite asettica, poliradicoloneurite, paralisi del nervo facciale (paralisi di Bell), lesioni cardiache e blocco della conduzione atrio-ventricolare, congiuntiviti, epatiti, artriti croniche intermittenti e lesioni cutanee. Il terzo stadio (infezione cronica) si può manifestare anche dopo anni dal morso della zecca. In questo stadio può comparire l'acrodermatite cronica atrofizzante (ACA), ma generalmente prevalgono manifestazioni a carico delle articolazioni (artrite reumatoide) e del sistema nervoso (atassia, paresi spastica, disordini mentali da encefalomielite cronica progressiva) (Branz, 2000).

La sintomatologia è correlata alle diverse genospecie patogene per l'uomo. *B.afzelii* si associa generalmente a lesioni cutanee, *B.burgodferi s.s.* a lesioni articolari mentre *B.garinii* alla neuroborreliosi (Balmelli e Piffaretti, 1995; Van Dam et al. 1993)

La diagnosi si basa generalmente sul quadro anamnestico e clinico del paziente. La diagnosi di ECM dove la Borreliosi di Lyme è endemica è puramente clinica poiché in tali circostanze i test di laboratorio non sono né necessari né raccomandati.

Qualora il quadro clinico e anamnestico non sia chiaro, si utilizzano sia metodi sierologici sia metodiche di isolamento e/o di biologia molecolare.

La diagnosi sierologica utilizza un primo test di screening che è un ELISA (*Enzyme linked Immunosorbent Assay*) o IFI (*indirect immunofluorescent assay*), seguito dall'Western blot, test più specifico utilizzato per confermare un'eventuale positività al test di screening.

Se l'Western blot risulta negativo, è probabile che il risultato della positività all'ELISA o all'IFI sia dovuto alla cross reattività con altri antigeni batterici oppure ad una policlonale attivazione delle cellule B nel corso di un'infezione da virus erpetico (specialmente nella Epstein- Barr).

L'isolamento in coltura è generalmente poco raccomandata: è poco sensibile, richiede lunghi periodi di incubazione ed è difficile da standardizzare.

Infine, l'elevata variabilità nella sensibilità tra differenti campioni clinici (biopsie cutanee, liquido sinoviale, sangue, siero, plasma, urine, liquido cefalo-rachidiano), la scarsa sensibilità nelle forme croniche, l'incapacità di distinguere organismi vitali dai non vitali e la possibilità di cross-contaminazioni tra campioni rende l'identificazione del DNA del batterio (tramite amplificazione di geni targets plasmidici o cromosomiali) una metodica tuttora non molto utilizzata.



Foto 4. Eritema cronico migrante (<http://www.farmacocura.it>)

RICKETTSIOSI EMERGENTI: *RICKETTSIA HELVETICA* E *RICKETTSIA MONACENSIS*

Introduzione

Rickettsia helvetica è stata isolata per la prima volta nel 1979 da zecche *Ixodes ricinus*, ma la sua patogenicità per l'uomo è stata scoperta solo nel 1999 in Svezia, come causa di due decessi dovuti ad una acuta perimiocardite (Nilsson et al., 1999).

Anche *R. monacensis*, prima di essere stata riconosciuta come causa di dermatite solo recentemente (Jado et al. 2007) si presumeva fosse un'endosimbionte ospitato nelle cellule di *Ixodes ricinus* (Baldrige et al., 2005).

Fino a poco tempo fa, si pensava che *R. conorii*, agente della Febbre bottonosa o febbre del Mediterraneo (MSF) fosse l'unica rickettsiosi presente nei paesi europei. Tuttavia sono emerse nuove rickettsiosi umane, causate da *R. mongolitimonae*, *R. slovaca* e *R. helvetica* (Fournier et al., 2000). Inoltre poiché per la diagnosi di infezione da *R. conorii* si utilizza la microimmuno fluorescenza (MIF) che può causare problemi di cross-reattività con altre specie di rickettsiae (Fournier et al., 2000), esiste la possibilità, soprattutto in aree non endemiche, che la malattia sia stata causata da altre rickettsiae.

Eziologia

Il genere *Rickettsia* fa parte dell'ordine delle *Rickettsiales* che comprende bacilli intracellulari gram-negativi e di piccole dimensioni (0.8 per 0.4 µm). Poiché sono intracellulari, risiedendo nel citoplasma o nel nucleo delle cellule parassitate, difficilmente si colorano con la comune colorazione di Gram, mentre possono essere evidenziate con la colorazione di Gimenez. (Raoult e Roux, 1997). Si coltivano su monostrati di cellule VERO, in Eagle's minimal essential medium (MEM) supplementato con il 4 % di siero fetale bovino ad una temperatura di 32°C.

Il genere *Rickettsia* comprende due gruppi: lo *Spotted Fever Group* (SPF) e il *Typhus group*. Quest'ultimo comprende solo 3 specie: *R. prowazekii* (agente del tifo epidemico), *R. typhi* (agente del tifo endemico) e *R. canada*, mentre del gruppo *Spotted Fever* entrano a far parte 19 specie: *R. conorii* (agente della febbre bottonosa), *R. rickettsii* (agente della Rocky Mountain SF), *R. rhipicephali*, *R. montana*, *R. japonica* (agente della Japanese SF), *R. parkeri*, *R. africae* (agente dell'African SF), *R. sibirica* (agente della North Asian SF), *R. bellii*, *R. akari*, *R. australis* (agente della Queensland SF), *R. helvetica*, *R. felis* (*California flea typhus*), *R. mongolitimonae*, *R. slovaca*, *R. aeschlimanni*, Israeli tick typhus rickettsia (Israeli SF) e Astrakhan fever rickettsia.

Epidemiologia

Le conoscenze rispetto a queste due specie di Rickettsia sono ancora limitate.

Il DNA di *R. helvetica* è stato identificato nelle zecche *Ixodes ricinus* in diversi studi europei (Parola et al., 1998; Beninati et al., 2002; Sonogo et al. 2003b; Sreter-Lancz et al., 2005; Wolfer et al., 2006; Skarphedinsson et al., 2007; Blaschitz et al., 2008; Floris et al., 2008; Marquez, 2008) e in altre specie di zecche come in *I. ventralloii* (Santos-Silva et al., 2006; Marquez, 2008) e in *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma plumbeum*, *Rhipicephalus bursa* e *Rhipicephalus sanguineus* (Christova et al., 2003). Anche *R. monacensis* è stata identificata in *I. ricinus* (Sreter et al., 2002; Sreter-Lancz et al., 2006; Floris et al., 2008; Marquez et al., 2008;). Poiché le rickettsiae infettano e si moltiplicano in quasi tutti i tessuti e possono quindi infettare anche l'ovaio e gli oociti della femmina adulta possono essere trasmesse per via transovarica ad almeno una parte della progenie. Inoltre l'infezione si mantiene anche per via transtadiale e, poiché le rickettsiae infettano anche le ghiandole salivari, l'infezione viene trasmessa attraverso il pasto di sangue.

Indagini sierologiche in Francia e Italia dimostrano la presenza di sieroconversione per *R. helvetica* in individui con forme cliniche aspecifiche (Fournier et al., 2000; Fournier et al., 2004).

Manifestazioni cliniche e Diagnosi nell'uomo

Si sospetta che *R. helvetica* sia causa di perimiocardite acuta (Nilsson et al., 1999), forme febbrili, sarcoidosi (Nilsson et al., 2002) mialgia e causi escare cutanee (Fournier et al., 2004).

R. monacensis è stato riconosciuto da poco come agente zoonosico (Jado et al., 2007) in Spagna, causando forme di dermatite.

Per la diagnosi sierologica di infezione da *R. helvetica* si utilizza la metodica dello *Western blot* facendo preventivamente adsorbire i campioni di siero con antigeni di *R. conorii*, *R. helvetica* *R. slovacica* o *R. mongolotimonae* per evitare cross-reazioni (Fournier et al., 2000).

TICK-BORNE ENCEPHALITIS (TBE)

Introduzione

Il virus della TBE è stato scoperto nel 1937 da Lev Zilber che associò una forma di encefalite acuta al morso delle zecche. Già tra gli anni '50 e '60 in Siberia e negli Urali venivano riportati tra 700 a 1200 casi all'anno e la situazione peggiorò con l'avvento della "Perestroika" con più di 11.000 casi all'anno che coinvolgevano una percentuale tra il 35% e il 45% di bambini (Gritsun et al., 2003). Casi clinici di TBE vengono riportati in tutta l'Europa dell'ovest, nell'Europa centrale ed in Scandinavia, per un totale di 13.000 casi annui, con un aumento del 400% negli ultimi 30 anni.

In Austria, Croazia, Repubblica Ceca, Estonia, Finlandia, Germania, Ungheria, Polonia, Lituania, Slovenia, Svezia e Svizzera si registrano un maggior numero di casi rispetto al resto dell'Europa.

A spiegare questo rapido aumento dei casi clinici di TBE vengono invocati sia i fattori climatici sia fattori sociali ed economici. Il cosiddetto "global warming" e climi meno rigidi soprattutto in alcune aree, così come cambiamenti della vegetazione causati dall'uomo come la il rimboschimento e l'aumento conseguente della densità di grandi ospiti vertebrati come gli ungulati favorirebbero la trasmissione del virus (Rizzoli et al., 2009).

Tuttavia, nei paesi che facevano parte all'Unione Sovietica, le variazioni climatiche non bastano a spiegare l'elevato aumento di casi, principalmente dovuto ai drastici cambiamento socio-economici sopravvenuti con la caduta del blocco sovietico.

In Italia, il virus della TBE ha una importanza secondaria per la salute pubblica rispetto alla borreliosi di Lyme e alla rickettsiosi. Tuttavia vengono riportati casi umani dal 1967, con focolai di infezione nel nord-est (nelle province di Trento, Belluno e Gorizia) e in centro Italia (province di Firenze e Latina) (Amaducci et al., 1976; Verani et al., 1995; Ciufolini et al., 1999). Indagini sierologiche su popolazioni a rischio mostrano una sieroprevalenza del 1% sia nelle province di Belluno sia di Trento (Caruso et al., 1997; Ciufolini et al., 1999). Inoltre è stato osservato nel nord-est un aumento annuo di casi dal 1982 ad oggi.

Eziologia

Il virus della TBE è un membro della famiglia *Flaviviridae* e del genere flavivirus, che comprende più di 70 specie di virus. I tick-borne flavivirus sono divisi in 2 gruppi: quelli che infettano i mammiferi (Mammalian group) e quelli che infettano gli uccelli marini (seabird group) e il virus della TBE è appartenente al primo gruppo, assieme ai virus della *West Nile* (WN), della *Louping ill*

(LIV), al *Langat virus* (LGTV), al *Powassan virus* (POWV), all'*Omsk hemorrhagic fever virus* (OHFV), al virus della *Febbre gialla* ed al virus *Murray Valley encephalitis* (Dumpis et al., 1998)

Il virus della TBE include 3 sottotipi, chiamati *Far-Eastern TBE*, *Siberian* (presenti in Europa orientale) e *Western European* (presente in Italia ed in Europa centrale e meridionale).

I Flavivirus sono virus ad RNA e a simmetria cubica, sono provvisti di envelope ed hanno struttura sferica con un diametro di 50 nm. Il genoma è composto da 10 geni: C-preM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5. Contengono tre differenti strutture proteiche: la proteina C, la sola presente nel capsido, che racchiude l'RNA composto da 11.000 nucleotidi e le proteine M ed E, incorporate nella membrana. La glicoproteina E è la componente principale della superficie virale ed è responsabile della formazione di anticorpi neutralizzanti e di una efficace immunità. Come monomero consiste di tre domini, uno come recettore di legame, l'altro utile per la fusione cellulare e l'ultimo per la partecipazione nello schift virale. La maggior parte delle mutazioni che hanno un risvolto sulla modificazioni delle caratteristiche patogene del virus si verificano a carico della glicoproteina E. NS1 è una proteina non strutturale ma sembra partecipare alla risposta immunitaria causando un effetto protettivo rispetto all'infezioni di altri virus omologhi.

I flavivirus sono rapidamente inattivati a 50°C, e il 50% della loro infettività viene persa in 10 minuti. La totale inattivazione del virus sospeso nel sangue o in altre soluzioni proteiche si verifica a 56°C per 30 minuti.

Epidemiologia

Sebbene il virus sia stato isolato in 15 specie di zecche e in altri parassiti (pulci, zanzare, pidocchi) *Ixodes persulcatus* (ixodidae presente nell'Europa orientale ed in Asia) ed *Ixodes ricinus* rappresentano i maggiori vettori per la trasmissione all'uomo (Chunikhin, 1991; Zlobin e Gorin, 1996). Il virus infetta in maniera persistente le zecche e l'infezione è trasmissibile sia per via trans-tadiale sia per via trans-ovarica e ad ogni pasto di sangue (a cui consegue un passaggio da uno stadio all'altro se le condizioni climatiche sono favorevoli) aumenta la probabilità della zecca di infettarsi cibandosi vicino a zecche infette mediante il fenomeno del co-feeding.

La prevalenza nelle zecche varia dallo 0.5% al 5%, ma in qualche regione della Russia sono state riportate prevalenze fino al 40% (Dumpis et al., 1999).

Il co-feeding, che consiste nella trasmissione del virus da una zecca infetta ad una non infetta qualora si cibino simultaneamente nello stesso ospite, in assenza di una infezione sistemica, è la via di trasmissione principale per il virus, anche in ospiti immuni, poiché il virus della TBE non è in grado di produrre viremie rilevanti nei micromammiferi (Labuda et al., 1993). Il punto di inoculo

infatti rappresenta un sito di replicazione virale dove le cellule migratorie sono in grado di veicolare il virus da una zecca infetta ad una non infetta. Inoltre, poiché il virus provoca una elevata letalità negli ospiti vertebrati, i micromammiferi che sopravvivono sono fondamentali per la persistenza del virus nel ciclo silvestre (Labuda et al., 1997, Randolph et al., 1999) così come l'abbondanza di altri ospiti vertebrati come gli ungulati selvatici che garantiscono la sopravvivenza ed il completamento del ciclo biologico di *Ixodes ricinus*.

Infatti, anche se il capriolo (*Capreolus capreolus*), che è l'ungulato maggiormente diffuso in Europa, non ha dimostrato essere reservoirs non sviluppando una viremia persistente (Labuda et al., 1997), il suo ruolo sembra essere fondamentale nel mantenimento della popolazione delle zecche (Talleklint e Jaenson, 1996).

L'uomo, così come gli animali domestici, si infetta principalmente dal morso di zecche infette, con una maggior frequenza nei mesi di maggio e giugno e tra settembre ed ottobre, quando è maggiore il picco di attività delle ninfe. Un'altra via di infezione è rappresentata dall'ingestione di latte e di formaggi di capra, vacca e pecora non pastorizzati (Grasikova et al., 1975; Anonymous, 1994) poiché il succo gastrico non è in grado di inattivare rapidamente il virus (Pogodina, 1960).

Patogenesi, Sintomatologia e Diagnosi nell'uomo

Il virus penetra principalmente tramite due vie: attraverso il morso di una zecca infetta o per via alimentare, tramite latte o formaggio non pastorizzato. Il virus moltiplica inizialmente nel punto di inoculo e diffonde per via linfatica attraverso le cellule del sistema reticoloendoteliale dei linfonodi, e attraversando il dotto linfatico arriva al sistema circolatorio producendo viremia, che corrisponde genericamente ad un aumento della temperatura corporea. La seconda fase è caratterizzata dalla diffusione del virus al sistema nervoso centrale (SNC), dove alla sua replicazione corrisponde l'infiammazione, la lisi e alla disfunzione delle cellule nervose.

Dopo un'incubazione di 7-14 giorni o di 3-4 giorni nel caso in cui l'infezione sia avvenuta per via alimentare, si osserva una febbre monobasica o bifasica rispettivamente descritte per l'infezione da sottotipo *Eastern* o *Western*. Dopo un periodo senza rialzamento termico inizia la seconda fase che coincide con l'invasione del virus del SNC. I sintomi come mal di testa, nausea, vomito, mialgia corrispondono alla meningite o alla meningoencefalite generate dalla replicazione virale. Tuttavia, la patogenesi e le forme cliniche si differenziano tra il sottotipo dell'ovest europeo (*Western European*) e quello dell'Europa Orientale (*Eastern european*). Nell'infezione causata dal sottotipo *Western* sindromi post-encefaliche dopo un anno dalla guarigione si osservano nel 40% dei casi. I casi di paresi permanente variano dal 2% al 10% e i casi di letalità tra lo 0.5% e il 2% e l'infezione

è meno grave nei bambini rispetto agli adulti (Haglund et al., 1996; Kaiser, 1996). L'infezione del sottotipo *Eastern* è tendenzialmente più grave, poiché i casi di paresi permanente sono tra il 5% e il 30%, la letalità varia dal 5% al 20% e nei bambini la sintomatologia è più grave (Dumpis et al., 1999).

Alcuni autori stimano che la proporzione di forme subcliniche che vengono descritte come simil influenzali si attestino tra il 70% e il 98% (Libikova et al., 1981).

Nell'uomo la diagnosi più sensibile e specifica si basa sulla identificazione, tramite metodica ELISA, di IgM specifiche nel siero o nei tessuti del SNC, poiché l'evidenziazione delle IgG spesso possono portare a risultati falsamente positivi, data la cross-reazione con altri flavivirus (Hoffmann et al., 1984).

L'utilizzo della PCR per l'identificazione dell'RNA, applicata routinariamente per evidenziare l'infezione nelle zecche e negli animali ospiti in corso di viremia (Ramelow et al., 1993) ha un utilizzo nella clinica ancora limitato.

INDAGINE SU AMBIENTI SILVESTRI DEL VENETO E DEL FRIULI VENEZIA GIULIA

Materiali e Metodi

Metodo di raccolta

La raccolta delle zecche è stata effettuata tramite trascinamento sul terreno (dragging) di una coperta di flanella bianca di 1m per 1m lungo transetti di 100m come già descritto da altri autori (De Felici e Luise, 2000; Mannelli et al., 2003). Il trascinamento veniva eseguito su una superficie il più possibile piana per garantire la massima uniformità di campionamento e veniva diviso in 5 intervalli, in modo tale da ispezionare la superficie della coperta al fine di ridurre la probabilità di distacco o di fuga degli individui durante il dragging.

Questo metodica consiste nel raccogliere zecche allo stato libero, non fissate su ospiti, sfruttando il comportamento di molti Ixodidi di attendere il passaggio di un potenziale ospite sui cespugli o sull'erba ("ambushing") e seleziona la raccolta di specie esofile (il cui ciclo vitale si svolge totalmente in ambiente aperto) e telotrope (il cui ciclo vitale si svolge in parte in ambiente chiuso come tane o grotte ed in parte in ambiente aperto).

Le zecche raccolte venivano conservate in provette contenenti una soluzione per la stabilizzazione dell'RNA (RNAlater® solution, Quiagen, Valencia, CA) per la conservazione dell'RNA virale eventualmente contenuto in esse. Venivano poi classificate in laboratorio tramite le chiavi di Manilla e Iori (1982) e divise per specie e per stadi. Gli stadi larvali venivano divisi in pool di 10 individui, gli stadi ninfali in pool di 5 individui e gli adulti venivano divisi per sesso e conservati singolarmente. Tutti gli individui venivano conservati in provette a -20°C fino alle successive analisi di laboratorio.

Area di studio

I campionamenti sono stati effettuati in aree alpine di 5 province, Pordenone ed Udine in Friuli Venezia Giulia e Treviso, Vicenza e Verona in Veneto. All'interno di queste province sono stati scelti cinque siti fissi (Moggio di Sopra in provincia di Udine, Tramonti di mezzo in provincia di Pordenone, Revine Lago in provincia di Treviso, Gauli in provincia di Verona e Sudiro e Chiesa dell'Angelo in provincia di Vicenza) in cui il sopralluogo per la raccolta delle zecche era effettuato mensilmente per evidenziare l'influenza delle stagioni sull'abbondanza delle zecche. In provincia di Vicenza sono stati scelti due siti perché Sudiro è stato sostituito nel 2008 da un altro sito fisso, Chiesa dell'Angelo, poiché il luogo in cui veniva effettuata la raccolta, un prato attorno ad un campo coltivato, è stata estesa la coltivazione per cui era divenuto impossibile effettuare il dragging. Oltre ai siti fissi sono stati campionati dei siti itineranti che venivano visitati una sola volta, con lo scopo di aumentare la variabilità delle caratteristiche orografiche e vegetazionali tra

province e all'interno di esse. In figura 1 sono visualizzate le localizzazioni geografiche dei siti fissi.

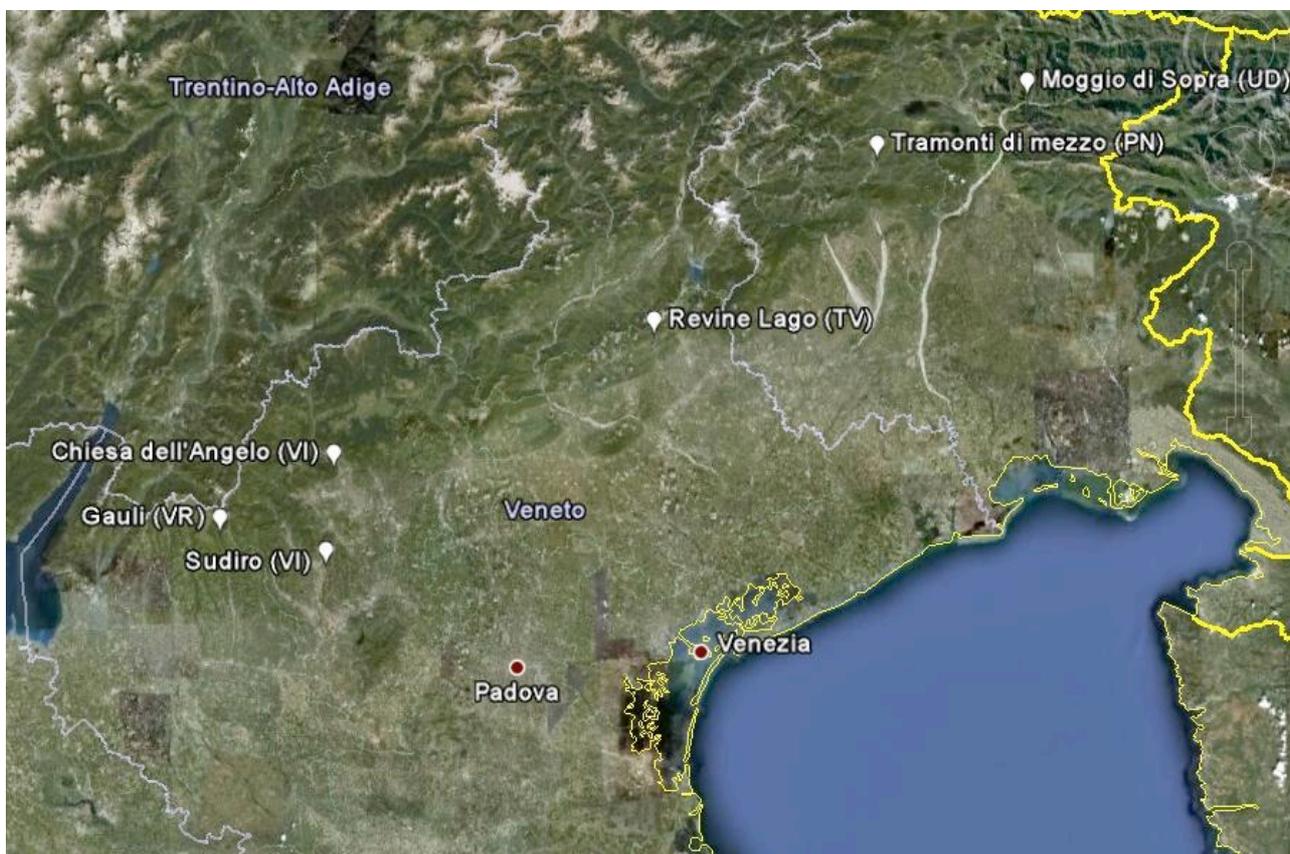


Figura 1. Distribuzione dei siti fissi (da Google Earth)

In tutti i siti ad ogni sopralluogo sono stati registrati la data, l'ora, la temperatura e l'umidità relativa (RH). Per ogni sito è stata inoltre riportata l'altitudine e la copertura vegetativa. I dati relativi alle precipitazioni, alla temperatura massima e all'umidità relativa mensili sono stati ottenuti dalle stazioni meteo più vicine ai siti (<http://www.ilmeteo.it/portale/archivio-meteo>). È stata inoltre considerata l'estensione della superficie forestale provinciale considerandola come somma della superficie boschiva (inventariata come boschi alti, impianti di arboricoltura da legno, aree prive di soprassuolo) e della superficie di altre aree boscate (inventariata come boschi bassi, radi, boscaglie, arbusteti e altre aree boscate non classificate) (Gasparini et al., 2008).

Nella tabella 1 sono riportate le principali caratteristiche fisiche e orografiche di ogni sito. Le temperature e le umidità relative (sia quelle rilevate nel sito sia quelle riportate nell'archivio delle stazioni meteo), così come le precipitazioni medie mensili riportate nella tabella, rappresentano i valori medi di tutti gli anni.

Siti	tipologia vegetazionale	esposizione del transetto	T. ° (°C)	RH (%)	altitudine (m s.l.m.)	sup. for. ° provinciale (ha)	T. massima media mensile (°C)	prec. § medie mensili (mm)	RH mensile (%)
Chiesa dell'Angelo	formazioni mesofile*	est	20.0	59.8	506	63,562	16.1	109.33	95.3
Gauli	bosco conifere-latifoglie	sud-ovest	15.2	63.0	858	31,399	23.8	59.72	71.7
Revine Lago	formazioni mesofile	sud	16.2	61.8	274	20,896	20.6	236.14	73.6
Moggio di Sopra	bosco conifere-latifoglie	sud	16.9	61.8	430	127,012	15.3	161.79	72.1
Sudiro	prato	nord-est	19.4	61.9	143	63,562	17.2	158.73	78.3
Tramonti di mezzo	bosco conifere-latifoglie	sud-ovest	16.2	64.7	418	47,211	20.3	156.08	69.8

Tabella 1. Principali caratteristiche fisiche, vegetazionali e orografiche dei siti campionati.

° **sup. for:** superficie forestale totale (superficie boschiva + altre aree boschive)

§ **prec.:** precipitazioni medie mensili registrate nella stazione meteo più vicina al sito.

ˆ **T:** temperatura

*: le formazioni mesofile sono formate da castagneti, robinieti e acero frassinieti.

Gli ungulati selvatici sono presenti in tutti i siti, con la maggior varietà a Moggio di Sopra e a Tramonti di mezzo, dove il capriolo (*Capreolus capreolus*), il camoscio (*Rupicapra rupicapra*), il cervo (*Cervus elaphus*), il cinghiale (*Suis scrofa*) e il muflone (*Ovis musimon*) sono sottoposti ad attività venatoria. Minor varietà di specie è presente a Sudiro e a Chiesa dell'angelo, dove il cinghiale non è stato segnalato nei censimenti, e ancora inferiore la numerosità di specie di ungulati a Lago (capriolo e cervo) e a Gauli (capriolo e camoscio). I micromammiferi presenti nell'arco alpino sono insettivori appartenenti alle famiglie Erinaceidae (*Erinaceus* spp), Soricidae (*Sorex* spp, *Neomys* spp, *Suncus* spp, *Crocidura* spp), talpidae (*Talpa europea*) e roditori delle famiglie Cricetidae (*Arvicola* spp, *Microtus* spp, *Clethrionomys* spp) e Muridae (*Apodemus* spp.) (Paolucci, 1997; Lapini, 2005).

Analisi di laboratorio

Estrazione del DNA e RNA genomici

L'estrazione del DNA ed RNA totali delle zecche è stata eseguita tramite l'utilizzo di un kit commerciale (All Prep DNA/RNA Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) seguendo le istruzioni della casa produttrice. I campioni, ancora congelati, venivano distrutti e omogenati con piccoli pestelli o

aghi in una soluzione contenente isotiocianato di guanidina, che stabilizza l'RNA e rilascia simultaneamente il DNA, e lisati con una soluzione contenuta nel Kit. Dopo la lisi, la maggior parte delle proteine venivano rimosse tramite precipitazione ed eliminate con la centrifugazione. L'estratto ottenuto veniva caricato in colonnine a scambio ionico contenenti resine che trattengono l'RNA e rilasciano il DNA. Dopo alcune serie di lavaggi con appositi buffer, l'RNA trattenuto dalla colonnina veniva purificato da proteine e polisaccaridi residui, fatto precipitare con isopropanolo ed infine eluito.

Il filtrato contenente il DNA veniva caricato in una seconda colonnina contenente una resina a scambio ionico e dopo una serie di lavaggi con buffer contenuti nel kit veniva fatto precipitare con isopropanolo ed eluito.

Identificazione di *Anaplasma phagocytophilum* e *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Per identificare il DNA di *Anaplasma phagocytophilum* e *Borrelia burgdorferi* è stata utilizzata una multiplex real-time come descritto da Courtney et al. (2004). I primers utilizzati per *Borrelia burgdorferi* sono stati: Bb23Sf (5'-CGAGTCTTAAAAGGGCGATTTAGT-3') e Bb23Sr (5' - GCTTCAGCCTGGCCATAAATAG-3') che generano un frammento di 75 bp che si lega ad una sonda TaqMan identificata come Bb23Sp-FAM (5'-AGATGTGGTAGACCCGAAGCCGAGTG-3') sonda con 2 fluorocromi: FAM (6-carboxy-fluorescein) come reporter che si lega all'estremità in 5' e JOE (27-dimetossi-S'-dichloro-o-carboxy-fluorescein) come quencher che si lega all'estremità in 3'. I primers sono stati disegnati per amplificare una regione del gene 23S rRNA, gene altamente conservato tra le specie di *Borrelia* e non presente in altre specie che potrebbero infettare le zecche (*Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp. ed *Ehrlichia*) o se è presente è altamente divergente (*E.coli*, *Vibrio cholerae* e batteri Gram positivi) (Courtney et al., 2004).

Le sequenze dei primers di *A. phagocytophilum* sono stati identificati come ApMSP2f (5'-ATGGAAGGTAGTGTTGGTTATGGTATT) e ApMSP2r (5'-TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA) che generano un frammento di 77 bp che si lega alla sonda TaqMan ApMSP2p FAM (5'TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG) composta da 2 fluorocromi: FAM e TAMRA (6-carboxy-tetramethylrhodamine) rispettivamente.

I primers utilizzati sono specifici per amplificare una regione del gene *msp2* di *A. phagocytophilum* che codifica una proteina esterna di membrana di 44-kDa ed è altamente specifica per *A. phagocytophilum*. Altre specie di *Anaplasma* come *A. marginale* (il cui gene *msp2* mostra una similarità dal 60 al 66% con *A. phagocytophilum*), *A. ovis* e *A. centrale* (che hanno una limitata omologia con *A. phagocytophilum*) non vengono evidenziate con questa metodica (Courtney et al., 2004). Le reazioni sono state eseguite in triplicato utilizzando lo strumento ABIPRISM 7000 SDS

Detection System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) in un volume totale di 20µl, con una quantità di DNA target pari a 2 µl. La miscela di reazione era composta da FluoCycler II (Euroclone S.p.a., Italia), 0.5µM di primers Bb23Sf e Bb23Sr, 0.6µM di primers ApMSP2f e ApMSP2r, 0.5µM della sonda Bb23Sp-FAM, 0.5µM della sonda ApMSP2p-JOE e acqua sterile. In ogni esperimento sono stati inclusi un controllo positivo di *B. burgdorferi* s.l. e di *A. phagocytophilum* e un bianco (utilizzando acqua al posto del DNA). Come controlli positivi sono stati utilizzati dei plasmidi (pCR II®, Invitrogen) al cui interno è stato inserito l'amplificato ottenuto da ceppi di riferimento ATCC di *B. burgdorferi* s.l. e *A. phagocytophilum*, preventivamente purificati mediante colonnine silicee (JetQuick Plasmid Miniprep Spin Kit, Genomed, St.Louis, MO, USA) e clonati utilizzando TOPOTA clonino Kit (Invitrogen). L'amplificazione del DNA target prevedeva un ciclo di attivazione della Taq polimerasi a 95°C per 10 minuti, seguita da 45 cicli di denaturazione a 95°C per 15 secondi e di annealing-estensione a 60°C per un minuto. Le analisi dei risultati sono state eseguite utilizzando il software 7000 SDS System RQ Study application (Applied Biosystem). La lettura della fluorescenza è stata effettuata durante il passaggio a 60°C. L'esito, positivo o negativo, è stato valutato sui triplicati. Un campione veniva considerato positivo se almeno due replicati risultavano positivi. Qualora un campione risultasse positivo solo su un replicato, l'esito era considerato dubbio e la prova veniva ripetuta una seconda volta. Se era negativo in tutti i replicati il campione era considerato negativo. Al contrario, se risultava ancora positivo anche solo su un replicato, l'esito era positivo.

Identificazione dell'RNA di Tick borne encephalitis (TBE)

Per l'identificazione dell'RNA del virus TBE è stata applicata la metodica della real time RT-PCR come descritto da Schwaiger e Cassinotti (2003). I primers utilizzati erano i seguenti: F-TBE 1 (GGG CGG TTG TTC TCC) e R-TBE 1 (ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT) mentre i probe impiegati erano TBE-Probe-WT (wild type) (TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA). 5 µl di estratto è stato amplificato in una miscela di reazione composta da 12,5 µl di QuantiTect Multiplex RT-PCR2 x master mix (QUIAGEN), 1,5 µl (300 nM) del forward primer (F-TBE 1) 1,5 µl e (300 nM) del reverse primer (R TBE 1), 3,8 µl (150 nM) di TBE-Probe WT. Quindi si è proceduto prima alla trascrizione inversa dell'RNA estratto ad una temperatura di 50°C per 20 minuti, poi ad una denaturazione iniziale 95° per 15 minuti, ed infine all'amplificazione che prevedeva un ciclo di denaturazione a 95°C per 45 secondi ed un ciclo di annealing-estensione a 60°C per 45 secondi per 40 cicli. Come per l'identificazione di *A. phagocytophilum* e *Borrelia burgdorferi* s.l. le analisi dei risultati sono state eseguite utilizzando il software 7000 SDS System RQ Study application (Applied Biosystem).

Analisi statistica

Le analisi statistiche hanno interessato sia i dati riguardanti l'ecologia delle zecche e le caratteristiche fisiche, vegetazionali e orografiche delle aree in cui sono stati effettuati i campionamenti, sia i dati riguardanti l'epidemiologia delle malattie oggetto dell'indagine.

Per stimare l'abbondanza delle zecche è stata utilizzata come misura la densità di ninfe in 100 m² di transetto, calcolata per ogni sito fisso e come valore medio nei siti mobili divisi per provincia. Come misura della densità delle zecche è stata utilizzata quella delle ninfe perché è l'unico valore rappresentativo della distribuzione delle zecche nei siti di campionamento. Infatti, le larve, poco mobili, si aggregano attorno ai punti di deposizione delle uova mentre gli adulti, più resistenti alle escursioni termiche e alla diminuzione dell'umidità relativa, cercano l'ospite in strati vegetazionali superiori rispetto agli stadi immaturi, quindi il dragging non rappresenta il tipo di raccolta ottimale per valutare l'abbondanza di adulti.

Poiché la distribuzione di questi vettori è generalmente sovradispersa, per la stima della densità di tutti gli stadi e per analizzare i fattori biologici e non che influenzano la loro distribuzione, sono stati applicati più modelli binomiali negativi.

Il modello binomiale negativo rappresenta un'estensione del quello di Poisson che viene utilizzato quando la variabile oggetto dell'analisi è rappresentata da conteggi (in questo caso il numero di zecche raccolte), la media dei conteggi uguaglia la varianza e ogni osservazione è indipendente dalle altre. Questi ultimi due assunti vengono violati nell'indagine poiché le zecche non presentano una distribuzione uniforme (quindi la media non uguaglia la varianza) e le osservazioni non sono indipendenti bensì le raccolte delle zecche vengono ripetute più volte negli stessi siti.

La distribuzione di Poisson è descritta dalla seguente equazione, dove Y rappresenta una variabile discreta con una frequenza osservata, y_i , $i=1, \dots, N$ e $y_i \geq 0$:

$$\text{Prob}(Y=y_i) = e^{-\lambda_i} \lambda_i^{y_i} / y_i!, \quad y=0,1, \dots$$

Dove $\ln \lambda_i = \beta' x_i$ e λ_i rappresenta sia la media che la varianza di y_i .

Nel modello binomiale negativo la varianza differisce dalla media per cui:

$$\ln \lambda_i = \beta' x_i + \varepsilon$$

e l'equazione che descrive il modello di Poisson viene modificata come di seguito

$$\text{Prob}[Y=y_i | \varepsilon] = e^{-\lambda_i \exp(\varepsilon)} \lambda_i^{y_i} / y_i!, y = 0, 1, \dots$$

Questa distribuzione è stata utilizzata sia per calcolare la densità media annuale delle ninfe nei siti fissi e nei siti itineranti, applicando un modello binomiale negativo che aveva come intercetta la sola costante senza l'introduzione di variabili esplicative (Mannelli et al., 2003), sia per evidenziare le differenze tra siti fissi, tra siti fissi all'interno delle province e tra province utilizzando un modello univariato che aveva come sole intercette i siti fissi, i siti fissi e i siti mobili e le province rispettivamente.

Per valutare l'influenza delle variabili stagionali (temperatura, umidità, precipitazioni mensili, temperatura massima media mensile, umidità massima media mensile, i mesi di campionamento) e degli anni è stato applicato un modello multivariato che utilizzava i dati relativi solo ai dragging eseguiti solo sui siti fissi, poiché erano i soli che venivano visitati mensilmente.

Infine, per valutare anche le differenze orografiche e vegetazionali oltre che quelle stagionali è stato utilizzato sempre un modello multivariato utilizzando anche i dati relativi ai siti itineranti che presentano una maggior variabilità.

Riguardo alle elaborazioni relative alle infezioni (*A. phagocitophilum*, *Borrelia burgdorferi* s.l. e TBE), poiché le analisi di laboratorio sono state effettuate in pool (divisi in gruppi di 10 larve, di 5 ninfe ed in singolo per gli adulti) è stato calcolato il tasso minimo di infezione, che si basa sull'assunto che se un pool risulta positivo, almeno un individuo del pool è positivo, così come è stato descritto da diversi autori (Steiner et al., 1999; Danielová et al., 2002; Bacon et al., 2005).

Per calcolare il tasso minimo di infezione è stata utilizzata la seguente formula:

$$p = 1 - \sqrt[k]{1 - f}$$

dove k = numero di zecche per pool

f = proporzione di zecche infette

La prevalenza minima di infezione è stata calcolata nei siti fissi e nei siti itineranti (considerati complessivamente per ogni provincia, per evitare eventuali interferenze dovute ai mesi di campionamento), per stadio (larva, ninfa e adulto) e per anno. Sono state poi considerate le eventuali differenze significative con i test del χ^2 e con Fischer's exact test tra siti fissi, tra stadi e fra anni di campionamento, nonché le differenze tra siti fissi ed itineranti all'interno della stessa provincia.

Per valutare simultaneamente l'associazione di alcune variabili quali il sito, l'anno di campionamento, la densità delle ninfe, l'abbondanza delle larve, delle ninfe e degli adulti e dei mesi

di campionamento con l'esito (positivo o negativo) di ogni singola zecca è stato utilizzato un modello di regressione logistica multivariata applicato sia ai siti fissi sia al totale del campione (fissi ed itineranti).

I modelli di regressione logistica, sia univariati, comprendenti una sola variabile esplicativa, sia multivariati, sono utilizzati nel caso in cui la variabile oggetto dell'analisi è dicotomica (nel nostro caso l'assenza di infezione o presenza di infezione) e si basano sulla seguente equazione:

Prob [Y |x] =

Che esprime la probabilità di distribuzione di una variabile dipendente dicotomica y rispetto ad una sola variabile x, nel caso in cui si consideri una sola variabile esplicativa x con coefficiente β .

La scelta delle variabili esplicative da introdurre nei modelli multivariati si è basata sulla significatività dei loro coefficienti, sulla loro influenza rispetto ai coefficienti delle altre variabili e sul valore dell'AIC.

Sia per i modelli binomiali negativi sia per quelli di regressione logistica si è considerata l'effetto del cluster dovuto al campionamento ripetuto negli stessi siti.

Infine, per calcolare il rischio acarologico, ossia la probabilità di trovare almeno una zecca infetta in 100 m² di transetto, sono state utilizzate sia le stime delle densità annuali sia quelle della prevalenza annuali, secondo la seguente equazione, già descritta da Mannelli et al (2003):

$$AR=1-(e^{-(\text{prevalenza delle ninfe} \times \text{densità delle ninfe})})$$

La stima del rischio ed i relativi intervalli di Confidenza al 95% con il metodo del bootstrap sono stati ottenuti solo dai valori riferiti alle ninfe, modificando lievemente l'equazione riportata da Mannelli et al. (2003) che utilizzava i valori delle densità e delle prevalenze anche degli adulti.

Le analisi statistiche sono state eseguite con il programma di elaborazione statistica STATA versione 8.0. (Stata Corp., College Station, TX, USA). Per il calcolo del rischio acarologico è stato invece utilizzato il programma R Statistical Software (R Development Core Team, 2006).

Risultati

Dal 2006 al 2008 sono stati effettuati 184 transetti, 39 nella provincia di Pordenone, 39 in provincia di Udine, 32 in provincia di Treviso, 33 nella provincia di Verona e 41 nella provincia di Vicenza,

tra cui complessivamente 59 transetti effettuati in siti itineranti. Il 51% dei siti aveva una copertura vegetazionale mista, caratterizzata da un bosco misto di conifere e latifoglie, il 39% aveva una vegetazione di tipo mesofilo e solo l'8% era formata da prato. L'altitudine media era pari a 481 metri s.l.m. (range: 143m – 1308m s.l.m.) con un altitudine media più bassa in provincia di Treviso (262 m s.l.m.) e più alta in provincia di Verona (856 m s.l.m.). La temperatura media registrata durante i campionamenti è pari a 17.9°C e complessivamente non si osservano differenze significative tra transetti. L'umidità relativa (RH) media è pari a 62.5% e non si osservano differenze significative tra transetti. La media delle precipitazioni mensili è pari a 122 mm (range: 2.5 mm-567.8 mm); i mesi più piovosi risultati essere gennaio e ottobre e quelli meno piovosi novembre e dicembre. La temperatura media mensile massima registrata è pari a 21.4°C con un range che varia tra 2.4°C e 33.7°C; i valori medi più elevati sono stati osservati in luglio (29.4°C) e i più bassi a dicembre (6.9°C). L'umidità massima media mensile è pari a 69.6% con un range che varia da 60% a 97%.

Sono state raccolte complessivamente 10101 zecche, di cui 5299 larve, 4429 ninfe e 373 adulti, tutte appartenenti alla specie *Ixodes ricinus*, fatta eccezione per un esemplare di *Schaphixodes frontalis*. L'82% delle zecche proveniva da siti fissi ed in particolare dal transetto situato a Moggio di Sopra, da cui è stato raccolto il 52.3% delle totalità delle zecche.

La percentuale di distribuzione delle larve, delle ninfe e degli adulti viene descritta nei grafici 1, 2 e 3. In tutti gli stadi si osserva come la distribuzione sia sovradispersa. In particolare per le larve, la cui distribuzione è strettamente legata ai punti di ovodeposizione, e per gli adulti, che generalmente non aspettano l'ospite a livelli bassi della vegetazione dove vengono effettuati i dragging, la percentuale di osservazioni pari a 0 è quasi pari al 60%.

Le densità medie annuali delle ninfe nei siti fissi vengono riportati nel grafico 4, mentre nel grafico 5 vengono confrontati valori delle densità delle ninfe nei siti fissi rispetto ai siti itineranti, divisi per province. Dal modello binomiale negativo univariato che confronta l'abbondanza nelle ninfe nei siti fissi, risulta che Moggio di sopra presenta una numerosità di ninfe significativamente superiore ($P < 0.001$) rispetto agli altri siti, che invece non mostrano differenze. Con lo stesso tipo di modello confrontando i siti fissi e quelli itineranti si è potuto osservare come i siti fissi in provincia di Treviso (Revine Lago), Verona (Gauli) e Vicenza (Sudiro e Chiesa dell'Angelo) presentino una numerosità di ninfe sovrapponibile a quella dei siti itineranti campionati all'interno delle stesse province, mentre l'abbondanza di ninfe a Moggio di Sopra (UD) e Tramonti di mezzo (PN) siano notevolmente superiori rispetto ad altri siti campionati nelle stesse province. Infine, analizzando le differenze nell'abbondanza di ninfe tra province, mentre Verona e Vicenza sono simili, le altre tre presentano tutte valori significativamente superiori ($P < 0.001$). Per quanto concerne l'abbondanza

stagionale dei singoli stadi, si può osservare dai grafici 6-11 che, fatta eccezione per il sito di Chiesa dell'Angelo, le larve presentano generalmente dei picchi estivi tra luglio e agosto mentre le ninfe siano più abbondanti in primavera, tra aprile e maggio, ed in autunno, tra settembre ed ottobre. Gli adulti sono sempre poco numerosi, e, probabilmente anche perché il dragging non è la metodica di elezione per la raccolta degli adulti, la loro abbondanza non sembra essere influenzata dalla stagione.

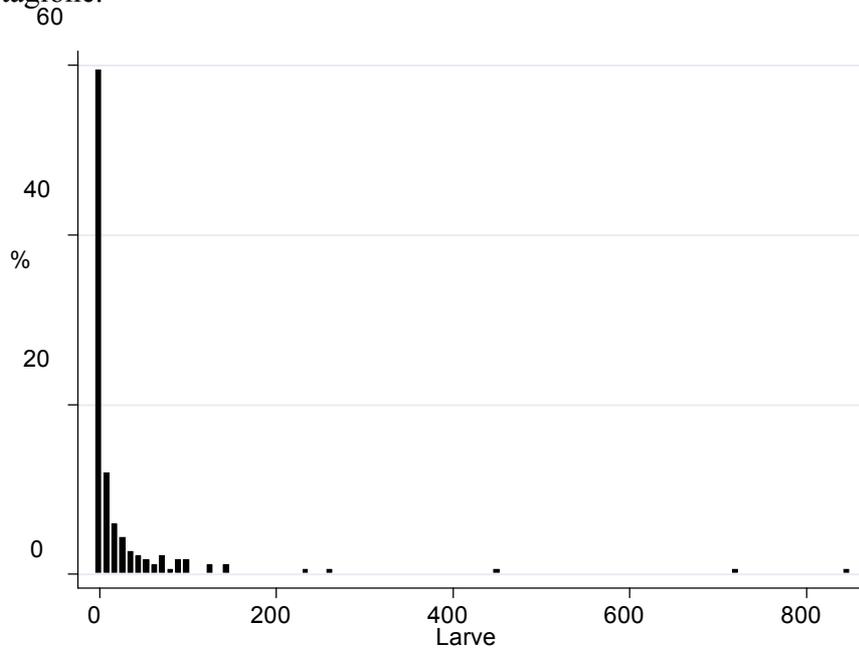


Grafico 1. Distribuzione delle larve (espressa in percentuale) rispetto al totale dei dragging.

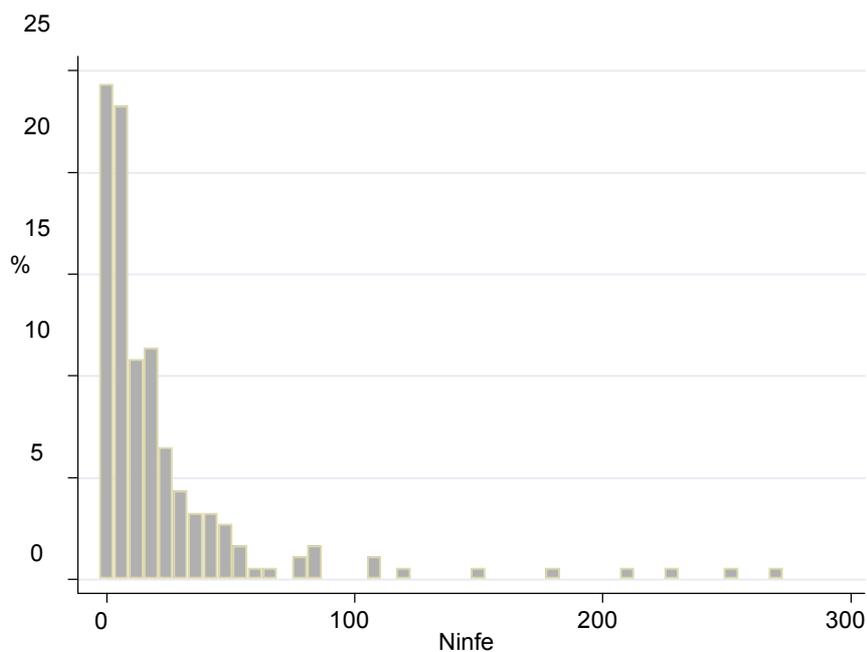


Grafico 2. Distribuzione delle ninfe (espressa in percentuale) rispetto al totale dei dragging.

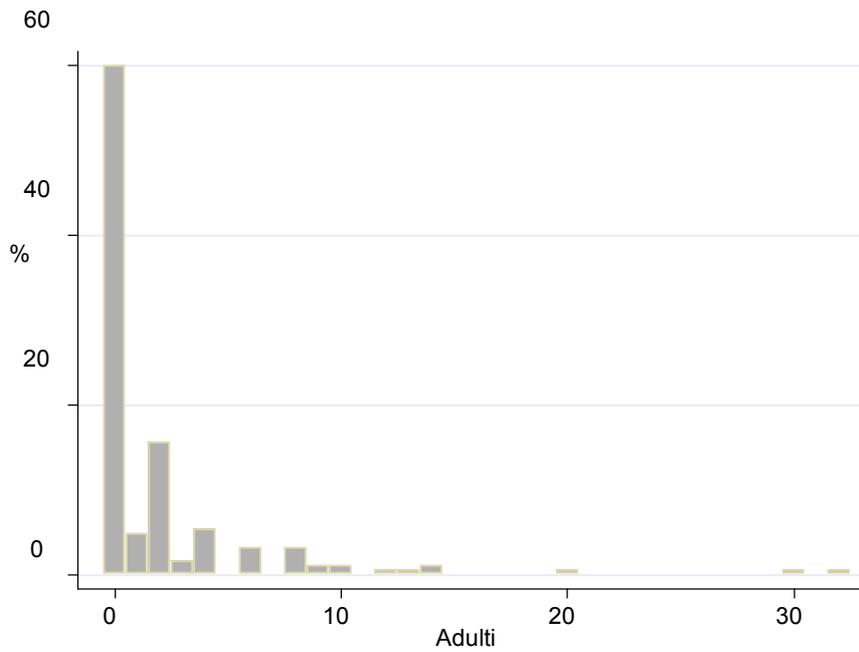


Grafico 3. Distribuzione degli adulti (espressa in percentuale) rispetto al totale dei draggling.

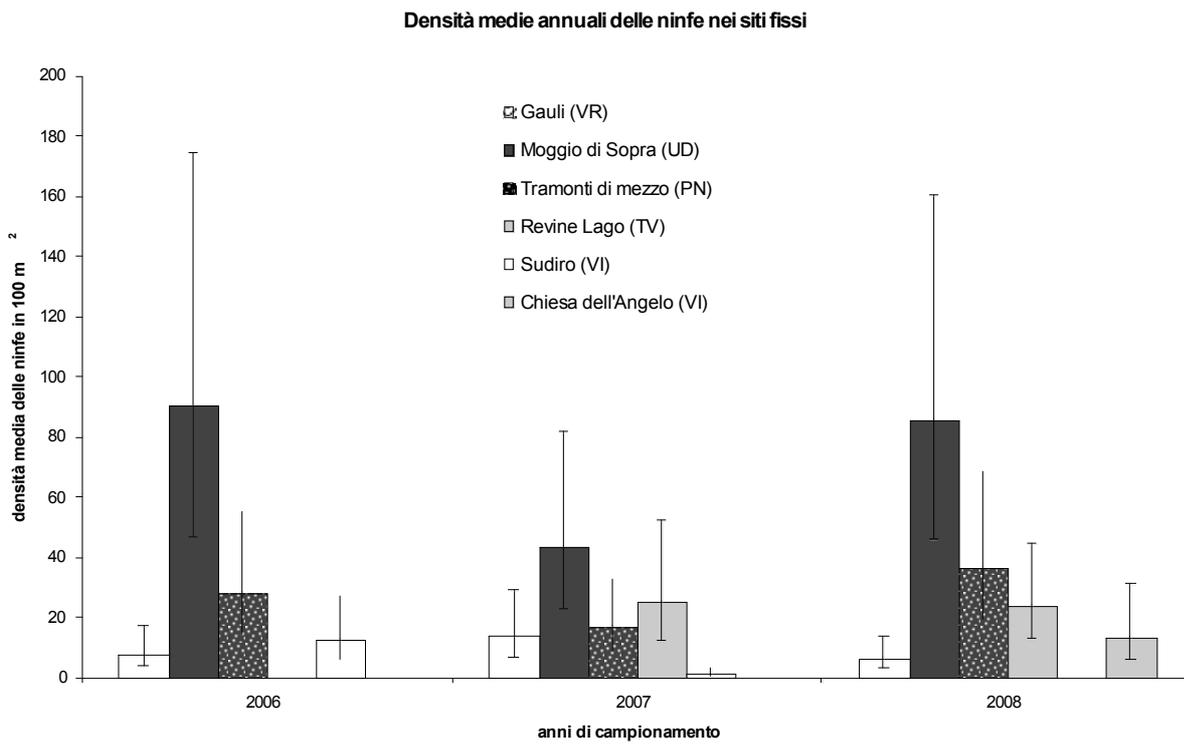


Grafico 4. Densità medie delle ninfe nei siti fissi.

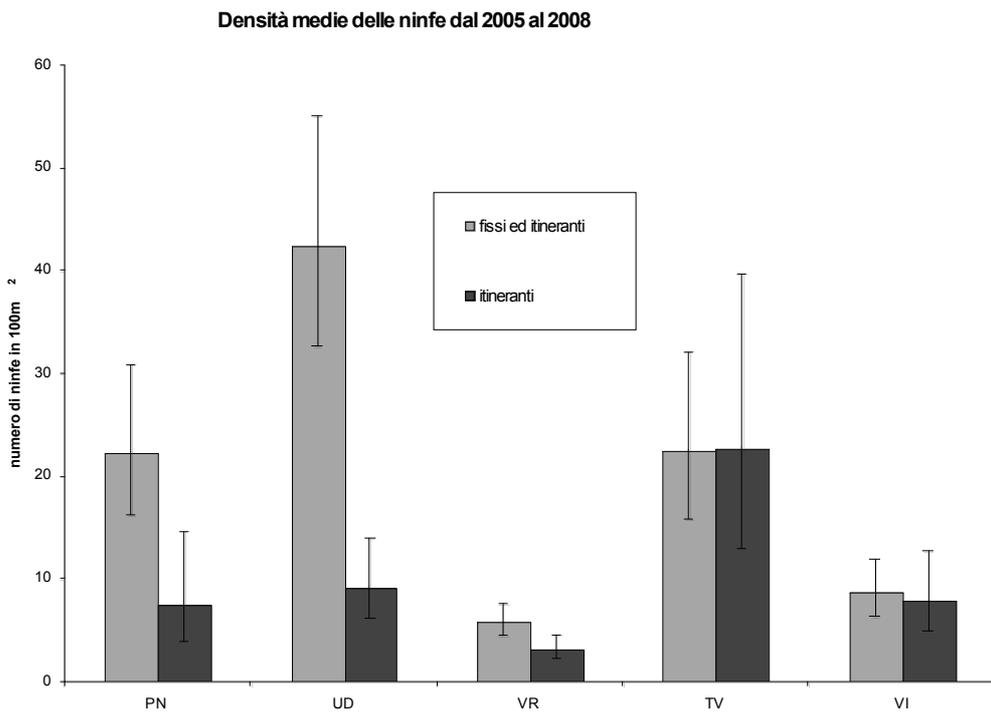


Grafico 5. Densità medie provinciali

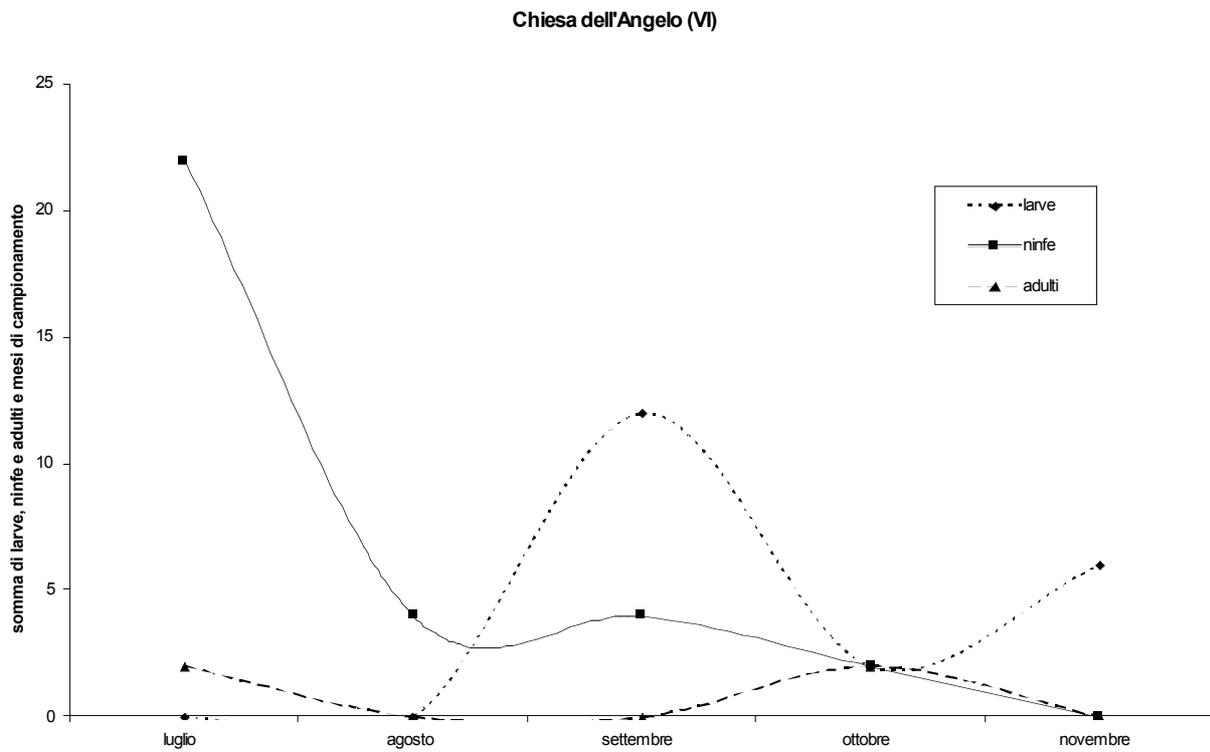


Grafico 6. Somma di larve, ninfe ed adulti rispetto ai mesi di campionamento a Chiesa dell'Angelo (VI)

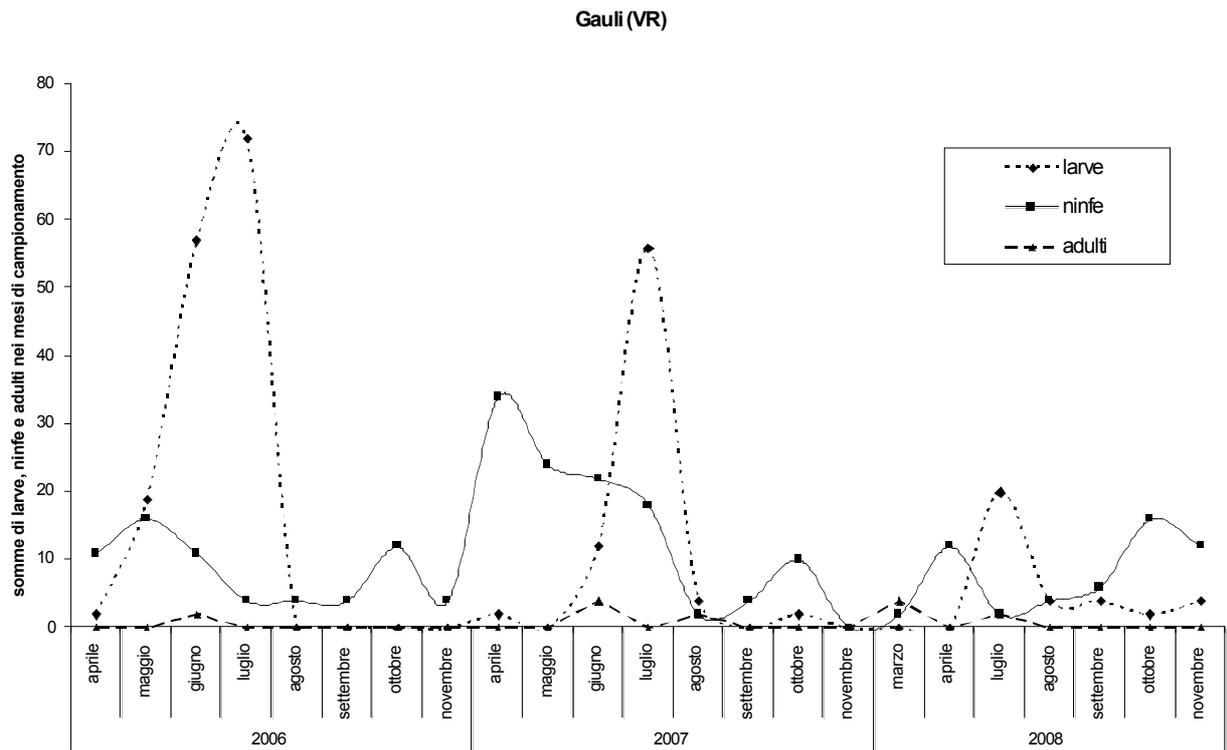


Grafico 7. Somma di larve, ninfe ed adulti rispetto ai mesi ed anni di campionamento a Gauli (VR)

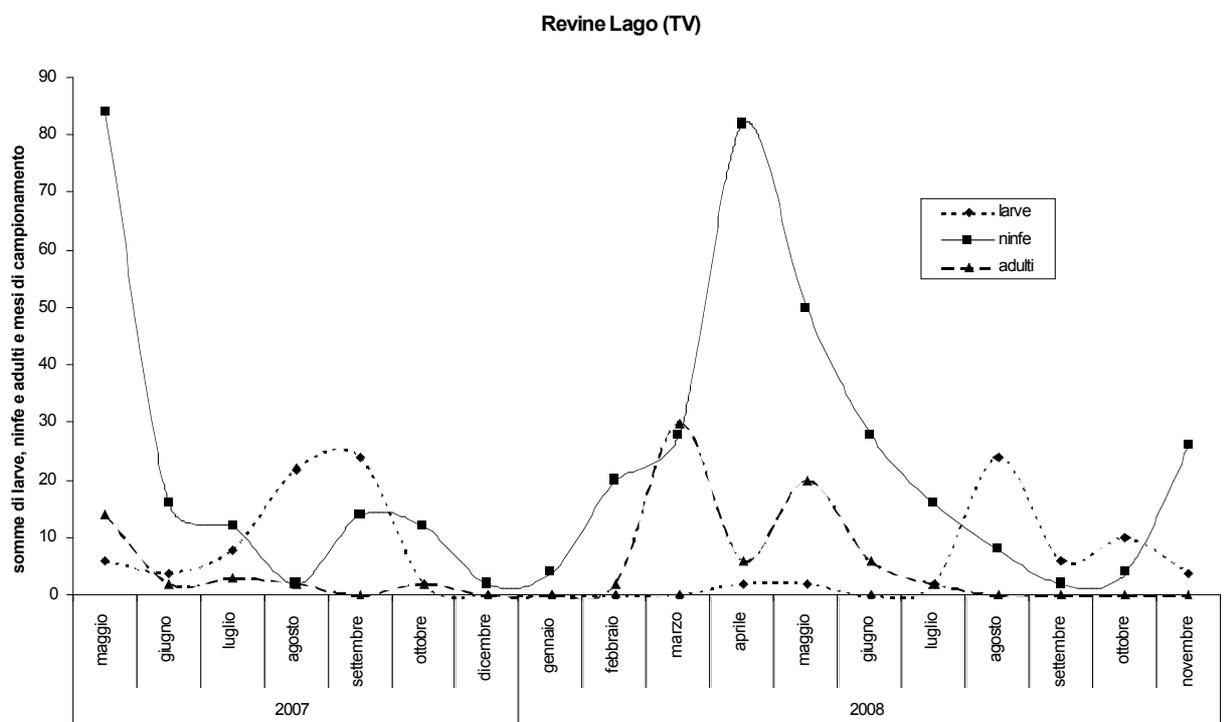


Grafico 8. Somma di larve, ninfe ed adulti rispetto ai mesi ed anni di campionamento a Revine Lago (TV).

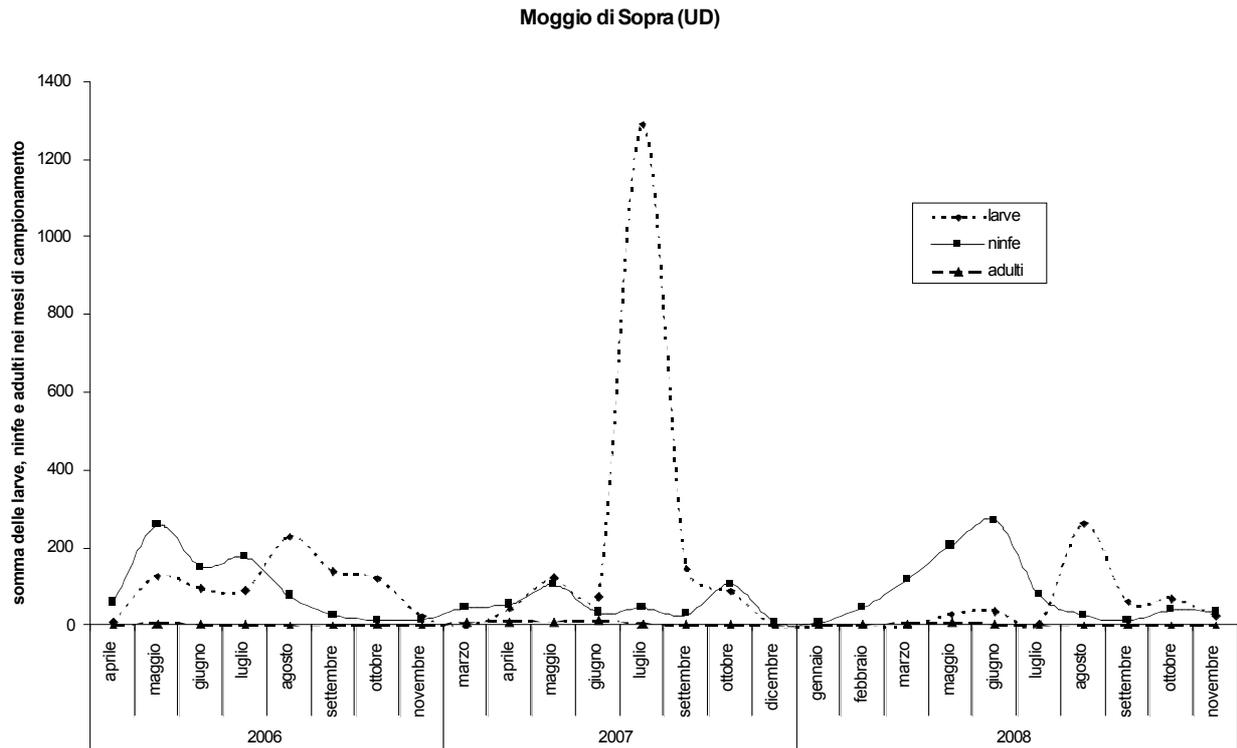


Grafico 9. Somma di larve, ninfe ed adulti rispetto ai mesi ed anni di campionamento a Moggio di Sopra (UD).

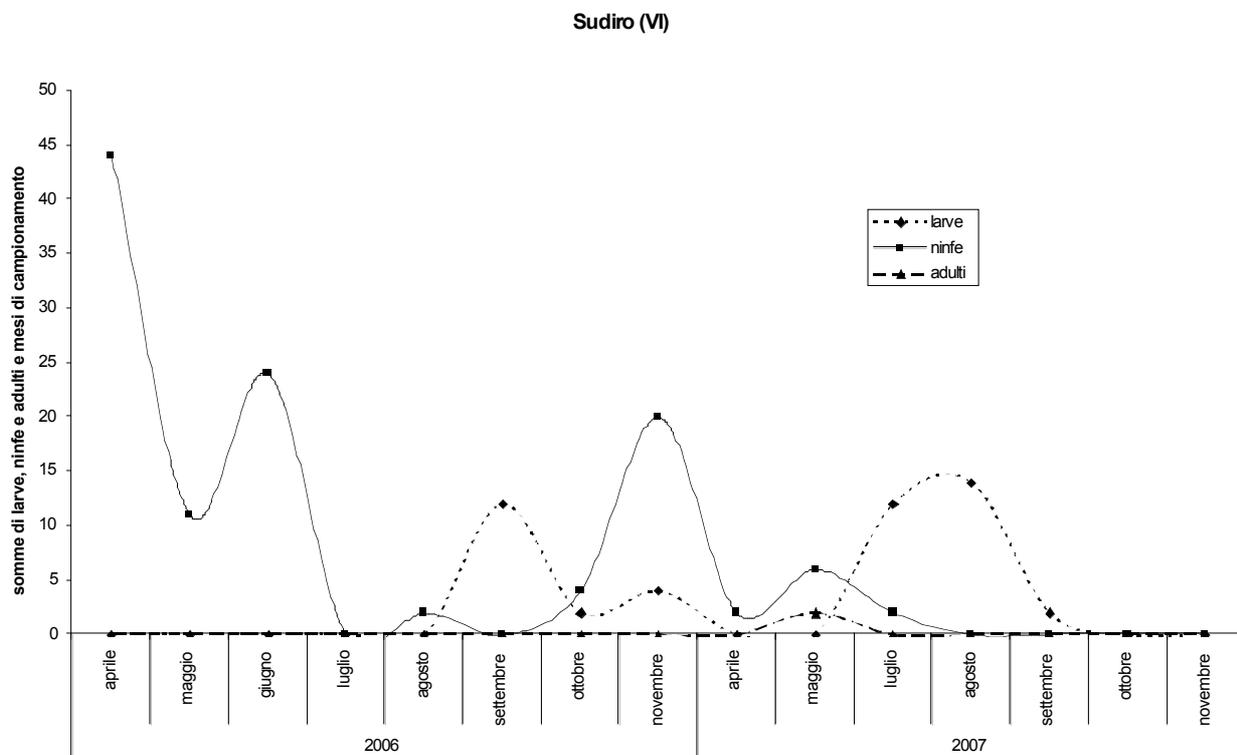


Grafico 10. Somma di larve, ninfe ed adulti rispetto ai mesi ed anni di campionamento a Sudiro (VI).

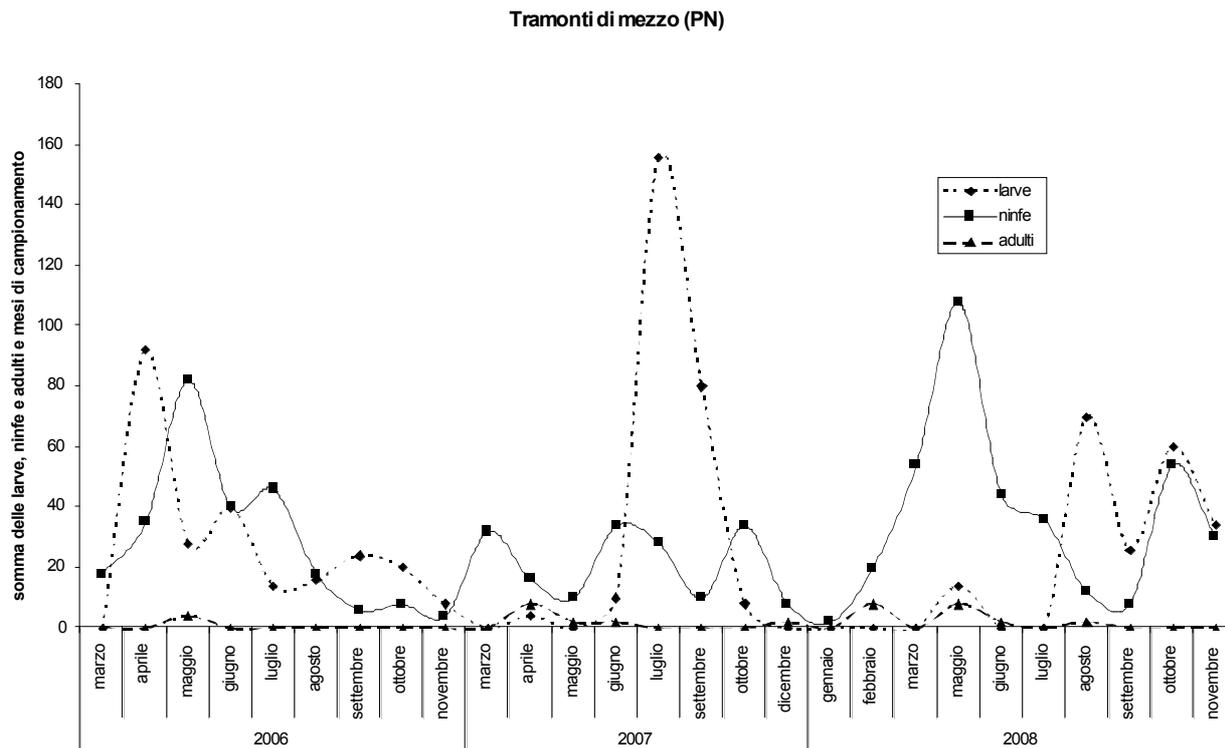


Grafico 11. Somma di larve, ninfe ed adulti rispetto ai mesi ed anni di campionamento a Tramonti di mezzo (PN).

Relativamente alla associazione tra l'abbondanza delle ninfe e le variabili ambientali, come è stato anticipato nel materiale e metodi, sono stati effettuati due modelli binomiali negativi multivariati, uno che includeva solo i dati relativi ai siti fissi, l'altro che comprendeva sia i siti itineranti sia quelli fissi. Da entrambi i modelli sono state escluse le variabili che non risultavano significative e che con la loro introduzione non modificavano i valori dei coefficienti delle altre variabili.

I risultati dei due modelli sono esposti nelle tabelle 2 e 3.

<i>Variabili esplicative</i>	<i>Incidence Rate Ratio</i>	<i>P</i>	<i>Intervallo di Confidenza (95%)</i>	
anno				
2006	anno di riferimento			
2007	0.60	0.02	0.39	0.92
2008	1.10	0.72	0.64	1.89
località				
Chiesa dell'Angelo (VI)	2.88	0.07	0.91	9.10
Gauli (VR)	2.70	0.01	1.23	5.93
Revine Lago (VI)	4.51	<0.001	2.63	7.72
Moggio di Sopra (UD)	11.11	<0.001	6.82	18.11
Sudiro (VI)	località di riferimento			
Tramonti di mezzo (PN)	5.44	<0.001	3.03	9.77
Temperatura massima media mensile	0.96	<0.001	0.94	0.97
Precipitazioni medie mensili	1.002	0.03	1.0002	1.004
Umidità massima media mensile	0.98	0.17	0.95	1.01
mese				
gennaio	mese di riferimento			
febbraio	6.51	<0.001	2.73	15.50
marzo	9.79	<0.001	3.37	28.38
aprile	16.44	<0.001	5.31	50.92
maggio	31.74	<0.001	12.20	82.54
giugno	32.38	<0.001	13.95	75.15
luglio	16.33	<0.001	5.78	46.08
agosto	6.59	<0.001	2.91	14.93
settembre	5.04	<0.001	2.23	11.37
ottobre	10.49	<0.001	4.42	24.89
novembre	5.97	<0.001	2.30	15.46
dicembre	3.03	0.11	0.79	11.55

AIC=8.15

Tabella 2. Modello binomiale negativo applicato sui dati relativi ai siti fissi

Variabili esplicative	Incidence Rate Ratio (IRR)	P	Intervallo di Confidenza (95%)	
anno				
2006	anno di riferimento			
2007	0.74	0.30	0.41	1.31
2008	1.23	0.33	0.81	1.87
mese				
gennaio	mese di riferimento			
febbraio	5.77	<0.001	4.35	7.67
marzo	8.69	<0.001	4.35	17.33
aprile	10.54	<0.001	5.22	21.28
maggio	14.59	<0.001	6.89	30.89
giugno	15.71	<0.001	9.05	27.26
luglio	7.41	<0.001	3.88	14.15
agosto	3.00	<0.001	1.39	6.48
settembre	2.80	0.006	1.59	4.91
ottobre	6.54	<0.001	3.39	12.63
novembre	5.25	<0.001	2.83	9.76
dicembre	2.14	0.219	0.64	7.15
vegetazione				
bosco conifere-latifoglie	tipo di vegetazione di riferimento			
bosco mesofilo	0.32	<0.001	0.18	0.55
prato	0.29	0.003	0.13	0.66
Province				
Pordenone	2.44	<0.001	1.95	3.05
Treviso	5.42	<0.001	2.60	11.32
Udine	5.49	<0.001	3.16	9.56
Vicenza	2.19	0.012	1.19	4.03
Verona	provincia di riferimento			

AIC=7.72

Tabella 3. Modello binomiale negativo applicato sui dati relativi a tutti i siti.

Per quanto riguarda la diffusione dei patogeni, sono stati analizzati 811 pool, formati da un totale di 5426 individui, di cui 2851 larve (52.5%), 2380 ninfe (43.8%) e 195 adulti (3.6%). La maggior parte del campione proveniva da siti fissi (79.6%).

Le prevalenze dei pool dei tre patogeni (*A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l. e TBE) vengono descritte nel grafico 12, mentre le prevalenze minime di infezione nelle ninfe (che rappresenta lo stadio epidemiologicamente più significativo), sia nei siti fissi sia nelle province vengono descritte nei grafici 13 e 14. Le prevalenze minime di infezione di *B. burgdorferi* s.l. divise per stadio, per sito e per provincia vengono descritte nei grafici 15 e 16 rispettivamente, mentre i valori delle prevalenze minime di infezione di *A. phagocytophilum* e TBE divise per stadio e per sito vengono riportati nelle tabelle 4 e 5.

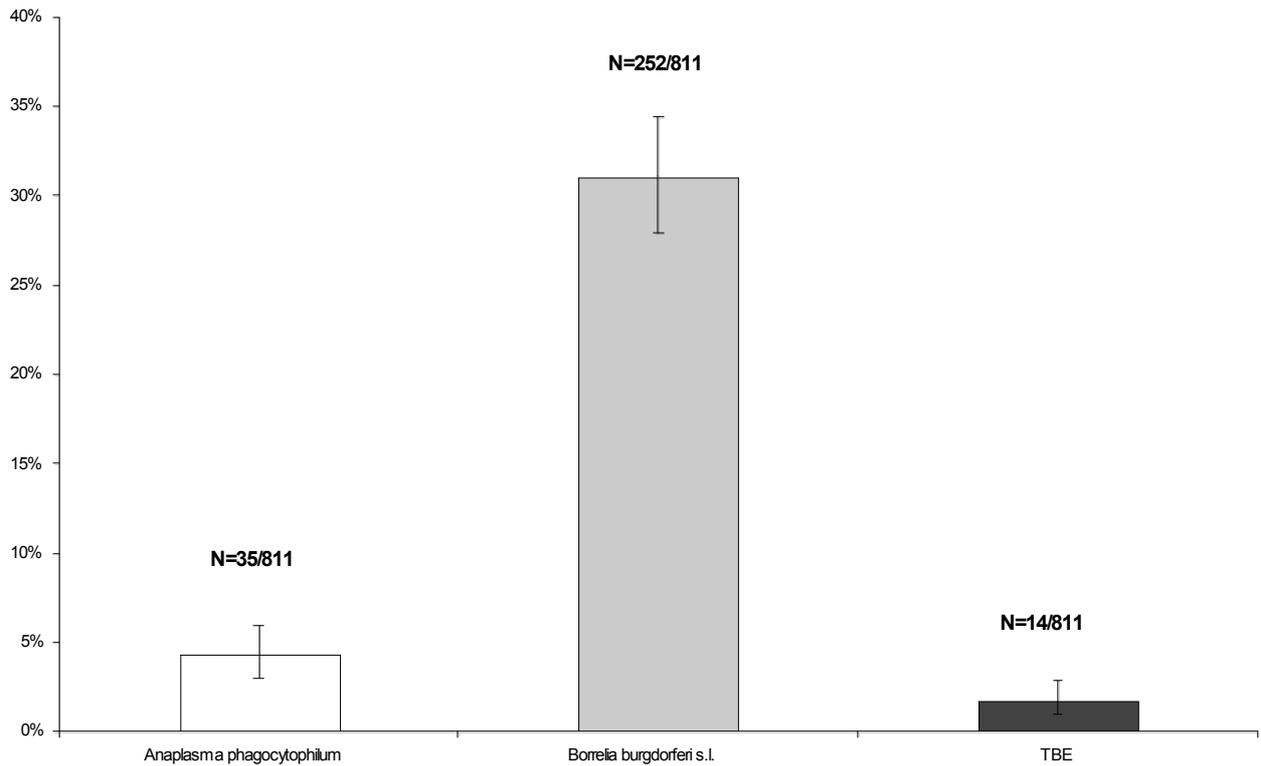


Grafico 12. Prevalenza complessiva nei pool dei 3 patogeni.

prevalenze medie di infezione delle ninfe nei siti fissi

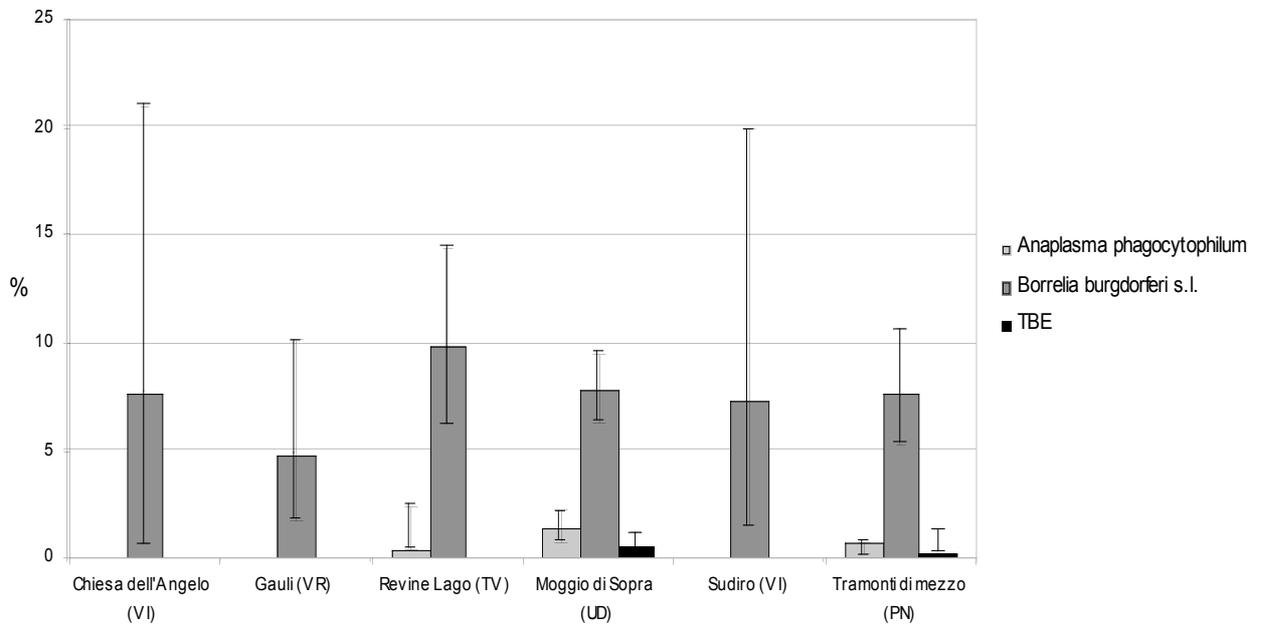


Grafico 13. Prevalenze minime medie nei siti fissi dei 3 patogeni.

prevalenze medie provinciali delle ninfe

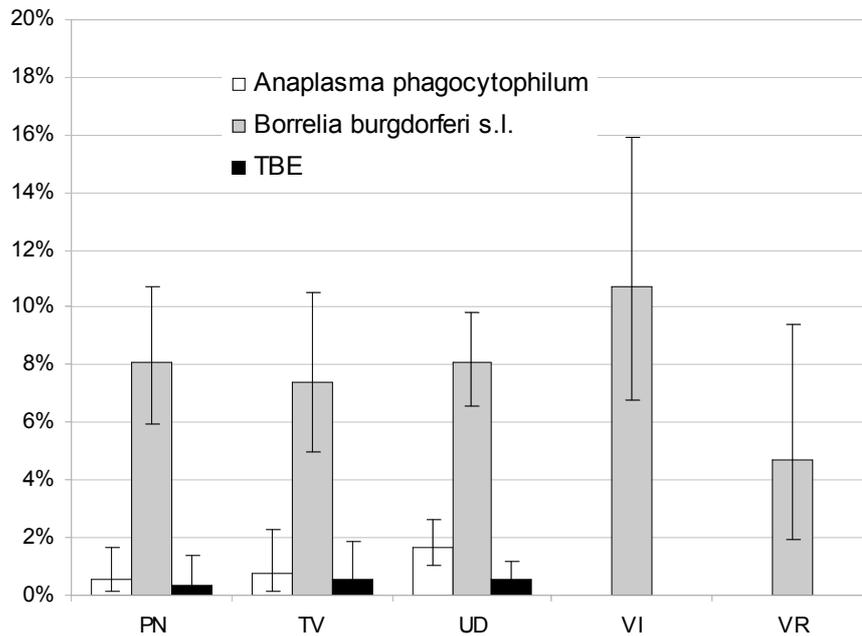


Grafico 14. Prevalenze minime di infezione medie provinciali dei 3 patogeni.

Prevalenze medie di *Borrelia burgdorferi* s.l. nei siti fissi

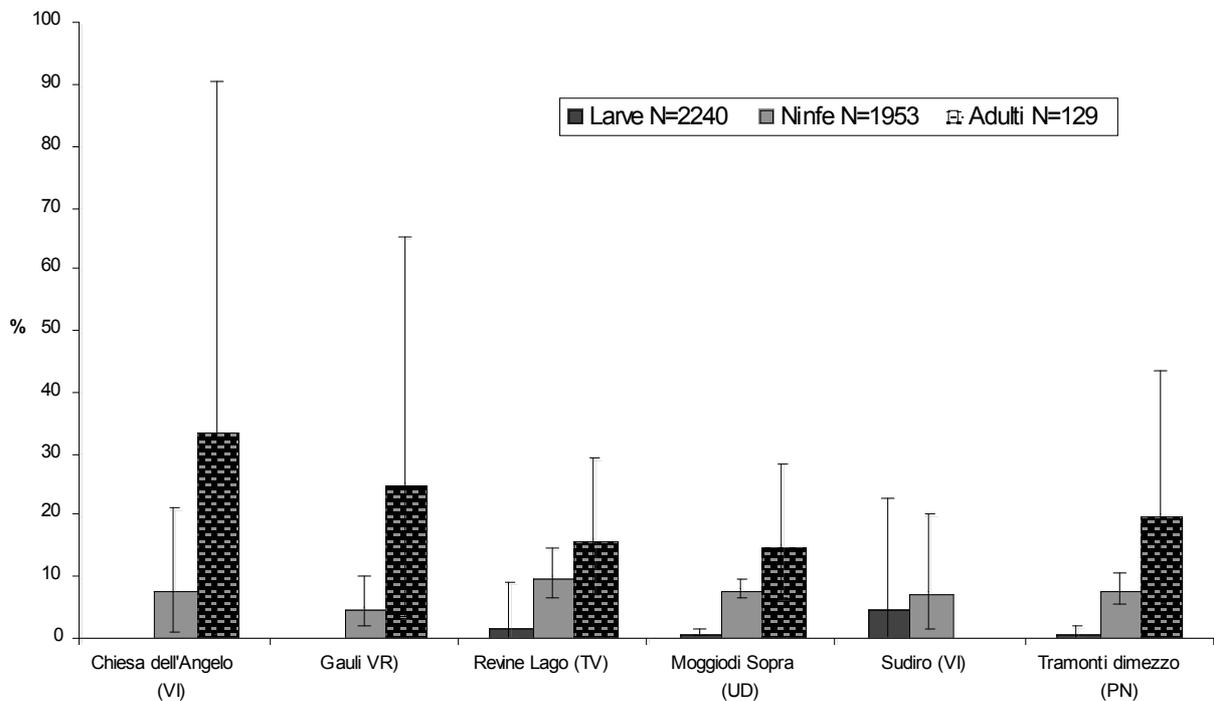


Grafico 15. Prevalenze minime di infezione di *Borrelia burgdorferi* s.l. nelle larve, ninfe e adulti nei siti fissi.

Prevalenze medie di *Borrelia burgdorferi* s.l. nelle province

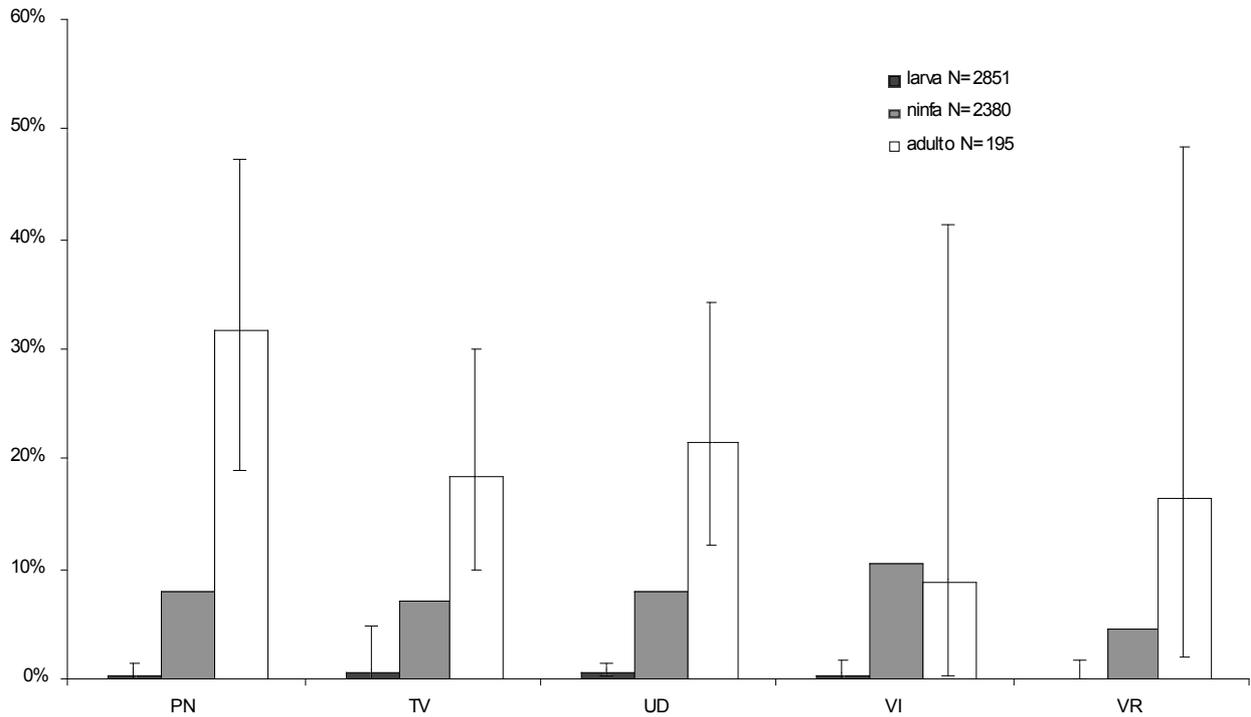


Grafico 16. Prevalenze minime di infezione di *Borrelia burgdorferi* s.l. nelle province divise per stadio.

	2006			2007			2008		
	larve	ninfe	adulti	larve	ninfe	adulti	larve	ninfe	adulti
Chiesa dell'Angelo (VI)	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	0	0	0
Gauli (VR)	0	0.0	n.e.	0	0	0	0	0	0
Revine Lago (TV)	n.e.	n.e.	n.e.	0	0	4.8 (0.1-23.8)	0	0.7 (0.2-4.1)	0
Moggio di sopra (UD)	0	0.7(0.1-2)	0	0	1.7 (0.5-4.4)	18.5 (6.3-38.1)	0	1.8 (0.8-3.5)	0
Sudiro (VI)	0	0	n.e.	0	0	0	n.e.	n.e.	n.e.
Tramonti di mezzo (PN)	0	0	0	0	3.1 (0.6-8.9)	0	0	0	0

Tabella 4. Prevalenze minime di infezione di *A. phagocytophilum* nei siti fissi divise per stadio e anno. Tra parentesi sono specificati gli intervalli di confidenza (IC =95%)

n.e. = non eseguito

	2006			2007			2008		
	larve	ninfe	adulti	larve	ninfe	adulti	larve	ninfe	adulti
Chiesa dell'Angelo (VI)	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	0	0	0
Gauli (VR)	0	0	n.e.	0	0	0	0	0	0
Revine Lago (TV)	n.e.	n.e.	n.e.	0	0	0	0	0	0
Moggio di sopra (UD)	0	0	0	0	0.44 (0.01-2.4)	14.8 (4.2-33.7)	0	1.1 (0.4-2.6)	0
Sudiro (VI)	0	0	n.e.	0	0	0	n.e.	n.e.	n.e.
Tramonti di mezzo (PN)	0	0	0	0	0	0	0	0.5 (0.01-3.0)	0

Tabella 5. Prevalenze minime di infezione di *TBE* nei siti fissi divise per stadio e anno. Tra parentesi sono specificati gli intervalli di confidenza (IC =95%)

n.e. = non eseguito

Per i 3 patogeni non emergono differenze significative delle prevalenza minime di infezione tra siti, mentre esistono differenze tra anni di campionamento ($P < 0.001$) sia per *B. burgdorferi* s.l. sia per il virus della TBE nel sito di Moggio di Sopra (UD).

La regressione logistica multivariata è stata utilizzata solo per evidenziare eventuali associazioni con alcuni fattori di rischio e l'infezione delle ninfe di *B. burgdorferi* s.l. poiché le bassissime prevalenze di infezione di *A. phagocytophilum* e del virus della TBE (presenti solo in alcuni siti e non in tutti gli anni di campionamento) non permettevano l'utilizzo di un modello di regressione.

I risultati delle regressioni logistiche applicate sia ai dati relativi solo ai siti fissi sia alla totalità dei dati, vengono riportati nelle tabelle 6 e 7. In entrambi i modelli i valori dell'abbondanza delle larve, delle ninfe e degli adulti sono stati eliminati poiché non erano significativi e non influenzavano gli odds ratio delle altre variabili. Dalla regressione applicata ai dati relativi a tutti i siti (fissi ed itineranti) è stata eliminata la variabile provincia poiché non risultava significativa e non influenzava gli odds ratio delle altre variabili. In entrambe le regressioni si osserva come l'anno 2006 sia associato positivamente all'infezione, differenza presente sia per il 2007 sia per il 2008 in quella applicata a tutti i siti e solo per il 2008 nel caso di quella riferita solo ai dati relativi ai siti fissi. Anche i mesi di campionamento sono associati all'infezione da *B. burgdorferi* s.l., con una associazione positiva per i mesi invernali di dicembre e gennaio, così come è possibile anche osservare dal grafico 17. Ci sono differenze anche tra siti fissi, con una associazione negativa per i siti fissi in provincia di Verona, Udine e Pordenone.

La densità annuale delle ninfe, considerata solo per i siti fissi, appare associata positivamente all'infezione. Tuttavia l'associazione non è lineare, così come si può osservare dal grafico 18.

Variabili esplicative	Odds Ratio	P	Intervallo di Confidenza (95%)	
anno				
2006	anno di riferimento			
2007	0.47	<0.001	0.30	0.71
2008	0.40	<0.001	0.25	0.64
mesi				
gennaio	22.75	0.002	1.36	31.67
febbraio	1.63	0.44	0.47	5.57
marzo	1.80	0.25	0.65	4.97
aprile	1.78	0.29	0.61	5.15
maggio	2.08	0.18	0.71	6.04
giugno	1.42	0.53	0.48	4.16
luglio	2.19	0.14	0.78	6.16
agosto	2.34	0.14	0.75	7.29
settembre	2.39	0.14	0.74	7.71
ottobre	2.39	0.14	0.77	6.52
novembre	mese di riferimento			
dicembre	6.56	0.02	1.36	31.67
AIC	0.5489			

Tabella 6. Risultati della regressione logistica applicata ai dati relativi a tutti i siti (fissi ed itineranti).

<i>Variabili esplicative</i>	<i>Odds Ratio</i>	<i>P</i>	<i>Intervallo di Confidenza (95%)</i>	
anno				
2006	anno di riferimento			
2007	0.62	0.104	0.35	1.10
2008	0.38	<0.001	0.22	0.64
mesi				
gennaio	13.08	0.003	2.43	70.45
febbraio	mese di riferimento			
marzo	1.28	0.44	0.68	2.42
aprile	1.10	0.80	0.52	2.33
maggio	1.38	0.43	0.62	3.04
giugno	1.02	0.95	0.49	2.10
luglio	1.22	0.63	0.55	2.69
agosto	1.43	0.44	0.58	3.53
settembre	1.81	0.22	0.71	4.64
ottobre	1.62	0.22	0.75	3.53
novembre	0.71	0.561	0.22	2.28
dicembre	4.57	0.027	1.19	17.58
località				
Chiesa dell'Angelo (VI)	località di riferimento			
Gauli (VR)	0.29	0.02	0.10	0.84
Revine Lago (TV)	0.68	0.32	0.32	1.45
Moggio di Sopra (UD)	0.12	0.002	0.03	0.45
Sudiro (VI)	0.37	0.20	0.08	1.67
Tramonti di mezzo (PN)	0.36	0.01	0.16	0.77
densità delle ninfe	1.02	0.016	1.003	1.03
AIC	0.547			

Tabella 7. Risultati della regressione logistica impiegata solo sui dati relativi ai siti fissi.

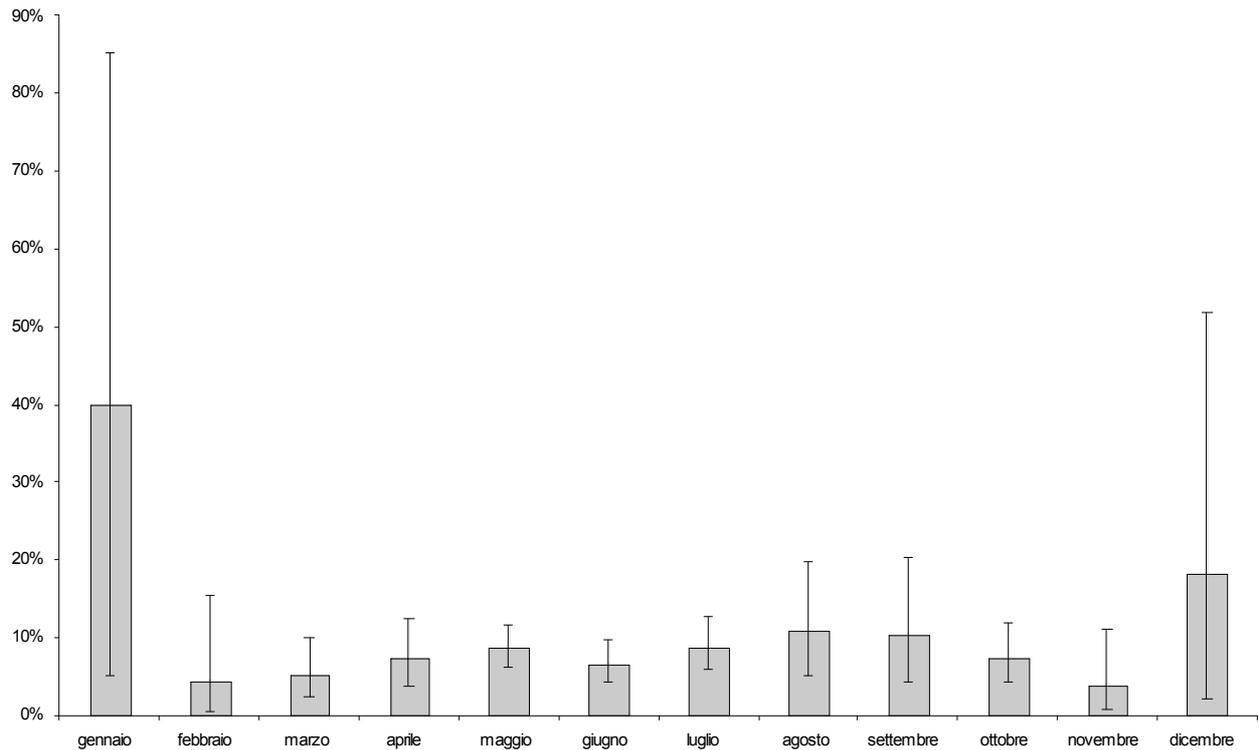


Grafico 17. Infezione minima delle ninfe di *B. burgdorferi* s.l. e mesi di campionamento

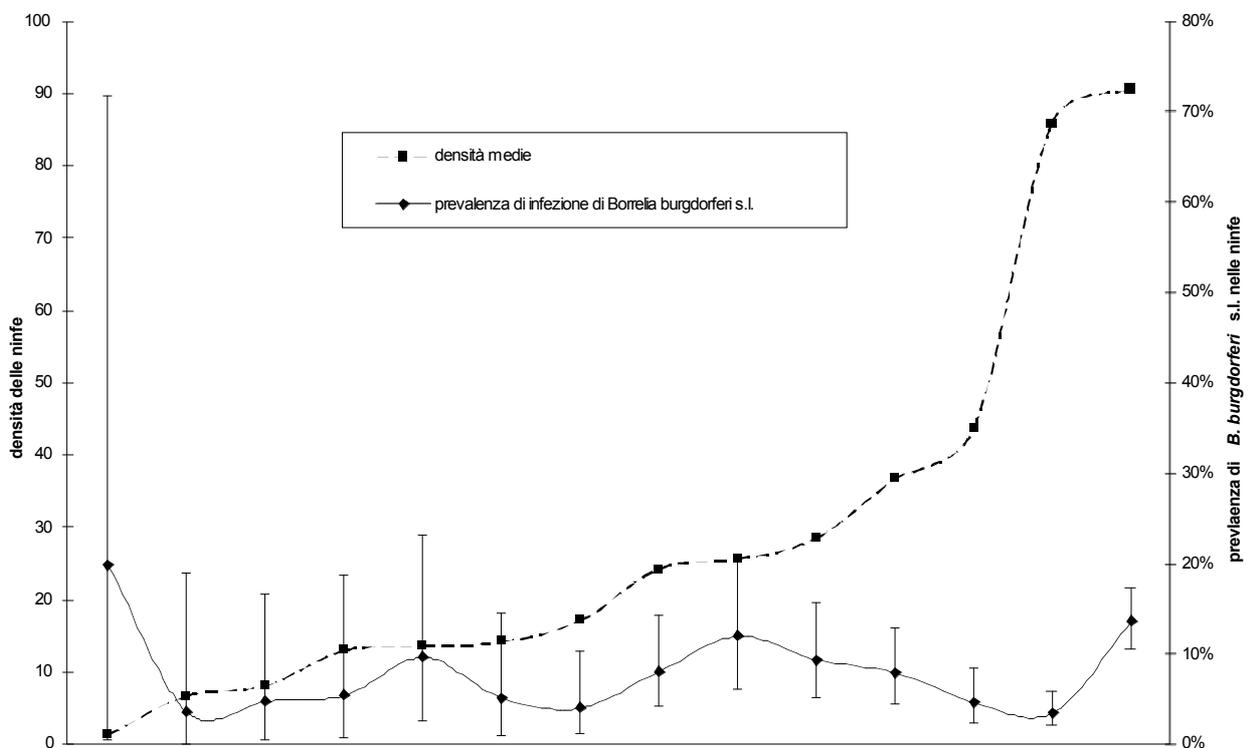


Grafico 18. Densità annuali delle ninfe e prevalenze di infezione delle ninfe di *B. burgdorferi* s.l.

Infine, in tabella 8 vengono riportati i valori del Rischio acarologico (RA) calcolato per i siti fissi e per tutti i patogeni. In due casi non è stato possibile calcolare l'intervallo di confidenza, dati i

valori estremi delle densità (molto alti nel 2006 a Moggio di Sopra e molto bassi nel 2007 a Sudiro).

Rischio acarologico annuale nei siti fissi (%)			
	2006	2007	2008
<i>B. burgdorferi s.l.</i>			
<i>Chiesa dell'Angelo (VI)</i>			68.1 (55 - 77.7)
<i>Gauli (VR)</i>	33.1 (24 - 40.4)	52.8 (44.7 - 59.4)	22.1 (14.4 - 28.8)
<i>Revine Lago (TV)</i>		93.7 (90.9 - 95.7)	86.5 (83.2 - 89)
<i>Moggio di Sopra (UD)</i>	99.9	87.8 (86.3 - 89.1)	95.5 (95.1 - 95.9)
<i>Sudiro (VI)</i>	51.8 (41.9 - 59.4)	24.9	
<i>Tramonti di mezzo (PN)</i>	93.3 (91.5 - 94.8)	51.2 (45.8 - 55.6)	96.8 (94.9 - 96.8)
<i>A. phagocytophilum</i>			
<i>Revine Lago (TV)</i>			16.6 (14.9 - 18.2)
<i>Moggio di Sopra (UD)</i>	46.5 (45.6 - 47.5)	53.5 (51.5 - 55.4)	78.8 (77.8 - 79.8)
<i>Tramonti di mezzo (PN)</i>		36.8 (31.3 - 45.6)	
<i>TBE</i>			
<i>Moggio di Sopra (UD)</i>		17.4 (16.5 - 18.3)	62.1 (60.9 - 63.2)
<i>Tramonti di mezzo (PN)</i>			19.4 (18.1 - 20.5)

Tabella 8. Rischi acarologici annuali nei siti fissi dei tre patogeni.

Discussione

Lo studio dell'epidemiologia delle malattie trasmesse da vettori non può prescindere dalla conoscenza dell'ecologia di quest'ultimi, poiché la loro densità è fortemente condizionata sia da fattori stagionali ed ambientali sia dall'abbondanza e dalla varietà di ospiti.

L'indagine oggetto della discussione mette in luce come *Ixodes ricinus* sia la specie di zecca dura maggiormente diffusa negli habitat silvestri poiché la sua presenza è stata confermata in tutti i siti fissi ed itineranti campionati, nonostante la variabilità stagionale, ambientale e geografica.

La densità delle ninfe è generalmente in linea con valori ottenuti da altri autori italiani (Rizzoli et al., 2002; Mannelli et al., 2003) con la presenza tuttavia di "hot spot" nei siti fissi di Udine e Pordenone, dove il valore dell'IRR è rispettivamente 11 e 5 volte superiore a quello riferibile al sito di Sudiro (VI). Anche se confrontiamo l'abbondanza delle ninfe tra province notiamo che le province di Udine e Pordenone hanno IRR circa 5 volte superiore a quello della provincia di Verona. Tuttavia, questa comparazione è condizionata dalla presenza degli hot spot in queste due province, poiché le densità dei siti itineranti nelle province di Udine e Pordenone non sono superiori mediamente alle densità delle altre province (grafico 5).

Si può supporre che il motivo della disomogeneità sia dovuto ad una maggior densità di micromammiferi e o ungulati selvatici, variabili non quantificate e quindi non introdotte nel modello.

Per quanto riguarda l'influenza delle precipitazioni medie mensili e delle temperature massime medie mensili, l'associazione con l'abbondanza delle ninfe è già stata evidenziata da alcuni autori (Hubalek et al., 2003; Rizzoli et al., 2004) e i dati esposti ne confermano l'importanza.

Le fluttuazioni dell'abbondanza di ninfe è inoltre notevole se confrontiamo i mesi, con un picco a maggio e giugno (IRR rispettivamente del 31.7 e 32.3) ed un secondo picco nel mese di ottobre (IRR=10.4) più evidente per i dragging riferiti solo ai siti fissi, differenza dovuta molto probabilmente alla maggior influenza degli hot spot in provincia di Udine e Pordenone.

I due picchi, primaverile ed autunnale, sono già stati osservati da altri autori e sono conformi alle altre situazioni climatiche italiane e dell'Europa centrale (Perini, 2000; Rizzoli et al., 2000; Walker, 2001; Stanko et al., 2007)

Anche la copertura vegetativa, piuttosto uniforme all'interno delle aree campionate, influenza l'abbondanza delle ninfe, con una correlazione negativa con il prato e i boschi mesofili.

Questo risultato è in parte in disaccordo con altre indagini, dove i boschi formati da conifere presentano una minor abbondanza di ninfe rispetto a boschi decidui (Mannelli et al., 1999; Rizzoli et al., 2002; Ginsberg et al., 2004) poiché questi ultimi hanno un maggior strato di sottobosco in grado di mantenere elevata l'umidità relativa del terreno e garantire una maggior sopravvivenza delle zecche in cerca di ospite.

Tuttavia, nella nostra indagine confrontiamo un bosco mesofilo con un bosco misto, dove la presenza di conifere non è stata precisata. La maggior abbondanza associata a questo tipo di bosco potrebbe essere dovuta ad altre caratteristiche ad essa associate come una maggior biodiversità e densità di ospiti o ad una maggior densità di alberi. Inoltre l'umidità relativa, generalmente influenzata anche dalla quantità di sottobosco, pur essendo stata registrata in ogni dragging, non è stata associata con l'abbondanza delle ninfe, probabilmente perché il nostro range di osservazione è piuttosto uniforme e quindi non differisce significativamente tra coperture vegetazionali.

Infine, l'altitudine che generalmente si associa negativamente all'abbondanza delle zecche (Rizzoli et al., 2002) nel nostro caso è stata eliminata dal modello di regressione multivariata, perché non risulta significativamente associata all'abbondanza delle zecche. Tuttavia anche per questa variabile il range è piuttosto limitato (100-1100 m s.l.m) e quindi non è in grado di influire significativamente sulla fenologia delle zecche.

Per quanto riguarda l'epidemiologia delle malattie trasmesse da questi vettori, il trend è simile alle altre indagini italiane ed europee (Cacciapuoti et al., 1995; Cinco et al., 1997; Cinco et al.,

1998; Ciceroni et al., 1998; Mannelli et al., 1999; Christova et al., 2001; Favia et al., 2001; Hudson et al., 2001, Randolph, 2001; Barral et al., 2002; Rizzoli et al., 2002; Santino et al., 2002; Santino et al., 2003; Mannelli et al., 2003; Piccolin et al., 2006; Bertolotti et al., 2006; Mantelli et al., 2006; Pecchioli et al., 2007), dove si osserva un andamento stabile e uniforme per l'infezione da *B. burgdorferi* s.l., mentre per *A. phagocytophilum* e per il virus della TBE si osservano focolai di infezione.

Le ragioni delle differenze del comportamento epidemiologico dei tre patogeni, nonostante siano presenti nello stesso habitat, abbiano gli stessi ospiti vertebrati e utilizzino lo stesso vettore, dipende principalmente dalle diverse modalità di trasmissione e dalla differente durata di batteriemia o viremia (per il virus della TBE) degli ospiti reservoirs.

Infatti, mentre *B. burgdorferi* può utilizzare più vie di trasmissione (sistemica causando lunghe batteriemie in animali reservoirs e non sistemica nel caso del co-feeding), e quindi mantenere un ciclo di infezione tendenzialmente stabile, al contrario *A. phagocytophilum* genera batteriemie di breve durata negli ospiti (tanto che i reservoirs dell'infezione in Europa sono tuttora sconosciuti) mentre il virus della TBE, causando solo deboli viremie in alcune specie di micromammiferi, si trasmetterebbe solo tramite il co-feeding simultaneo assenza di una infezione sistemica.

Nella nostra indagine, la prevalenza minima di infezione di *B. burgdorferi* s.l. varia dal 4% al 10% mediamente e si conferma un aumento della prevalenza dallo stadio larvale allo stadio adulto, valore che però potrebbe essere in parte condizionato dall'utilizzo dei pool. Dai risultati della regressione logistica si osserva anche come l'appartenenza al sito, non confermato però dall'appartenenza alla provincia, possa essere un fattore di rischio importante per l'infezione nelle zecche. Questo risultato potrebbe essere dovuto a variabili non quantificate e non utilizzate nel modello associate alle aree geografiche.

Emerge inoltre che i mesi di dicembre e gennaio sono associati positivamente alla prevalenza di infezione, valore non correlabile alla abbondanza di ninfe in cerca di ospite che risultano meno numerose proprio in questi mesi.

Questa relazione positiva potrebbe essere in parte spiegata dal ciclo riproduttivo dei micromammiferi che presenta dei picchi di natalità tra la primavera e l'estate e di conseguenza un'elevata presenza di individui non infettanti proprio in queste stagioni, dato anche il rapido turnover che si osserva generalmente in queste specie. Tuttavia, per corroborare queste supposizioni, sarebbero necessarie indagini più approfondite sulla specie di micromammiferi presenti e sulle dinamiche di popolazione e di infezione nelle aree campionate.

Infine, la densità annuale delle ninfe appare associata positivamente all'infezione anche se l'associazione non appare lineare (Grafico 18).

La densità delle ninfe, associata anche alla densità di ospiti oltre che a fattori climatici favorevoli alla loro sopravvivenza, è un probabile fattore di rischio per l'infezione da *B. burgdorferi* discusso da più autori, ottenendo risultati contrastanti (Talleklint e Jaenson, 1996; Randolph, 2001; Rizzoli et al., 2002). Infatti la densità è influenzata sia dall'abbondanza di micromammiferi che ospitano soprattutto gli stadi larvali ed in parte ninfali della zecca e sono ottimi reservoirs di infezione, sia dall'abbondanza degli ungulati, che vengono parassitati soprattutto dalle ninfe e dagli adulti, amplificando la numerosità della popolazione delle zecche ma non costituendo ospiti reservoirs poiché il loro complemento ha un'azione borrelicida contro tutte le genospecie di *B. burgdorferi* s.l. (Kurtenbach et al., 2002).

Infine, considerando i valori del rischio acarologico, possiamo evidenziare notevoli differenze tra siti, condizionate principalmente dalle diverse densità. Infatti, nei siti fissi di Udine (Moggio di Sopra) e Pordenone (Tramonti di mezzo) nonostante la prevalenza di infezione di *B. burgdorferi* s.l. sia risultata inferiore rispetto ad altri siti, si osservano i valori più alti, quasi del 100% nel caso di Moggio di Sopra. Anche per le infezioni da *A. phagocytophilum* e del virus della TBE che presentavano prevalenze molto basse il Rischio acarologico è in proporzione piuttosto alto.

Questo dato conferma che lo studio dell'epidemiologia delle malattie trasmesse da vettori non possono non considerare l'ecologia dei vettori, anche quando lo scopo finale è individuare e quantificare i fattori di rischio per l'uomo.

INDAGINE SU AMBIENTI PERIURBANI DELLA CITTÁ DI IMOLA (BOLOGNA)

Introduzione

La diffusione delle zecche e l'epidemiologia delle malattie di cui esse sono vettori sono state studiate in diversi habitats silvestri Europei, compresa l'Italia (Ogden et al., 1998; Mannelli et al., 1999; Escudero et al., 2000; Christova et al., 2001; Barral et al., 2002; Morozova et al., 2002; Rizzoli et al., 2002; Skotarczak et al., 2002; Christova et al., 2003; Hubalek et al. 2003; Estrada-Pena et al., 2004; Polin et al., 2004; Ferquel et al., 2006; Skarphéðinsson et al. 2007).

Al contrario, pochi studi sono stati realizzati in ambienti urbani o periurbani (Fingerle et al., 1999; Gray et al., 1999; Junttila et al., 1999; Simser et al., 2002; Kosik-Bogacka et al., 2004; Wielinga et al., 2006) e nessuno è stato realizzato in Italia.

In queste indagini la prevalenze in *Ixodes ricinus* di *Borrelia burgdorferi* s.l. varia tra 6.8% al 36.2%, mentre la prevalenze di infezione di *Anaplasma* spp. e di *Ehrlichia* spp. sono più basse del 2%, valori che sono sovrapponibili a quelli riportati nelle indagini effettuate in habitats silvestri. Inoltre, Simser e collaboratori (2002), sempre nelle zecche *Ixodes ricinus* raccolte in un parco urbano di Monaco scoprono la presenza di un altro agente riconosciuto come patogeno per l'uomo da poco tempo (Jado et al, 2007), *Rickettsia monacensis*.

Il rischio per l'uomo di contrarre infezioni da zecche in aree perirubane, che vengono spesso utilizzate nel tempo libero, per il jogging o il gioco, benché sia potenzialmente presente non è stato ancora quantificato.

L'obiettivo della nostra indagine è quindi contribuire alla valutazione del rischio di trasmissione all'uomo di alcune infezioni, come l'anaplasmosi, la borreliosi, le bartonellosi e le rickettsiosi in alcuni parchi urbani e periurbani della città di Imola (Bologna).

Materiali e Metodi

Area di studio

Lo studio ha considerato i quattro parchi più estesi del Comune di Imola (44° 21'11"N 11°43'0" E, altitudine media di 47 m s.l.m.): il *Parco Tozzoni*, il *Parco delle Acque Minerali*, il *Parco del Lungofiume* e la *Riserva Naturale Orientata del Bosco della Frattona*.

Poiché i 4 parchi sono differenti nella copertura vegetazionale e per la presenza e numerosità di animali, vengono di seguito descritte le principali caratteristiche di ognuno.

Parco Tozzoni (T)

Si estende per 0.083 km² a sudovest rispetto al centro storico di Imola. Le principali specie arboree sono la quercia (*Quercus* spp.), l'olmo (*Ulmus* spp.), l'acero (*Acer campestre*), il cipresso (*Cupressus* spp.) e il leccio (*Quercus ilex*). Sono presenti inoltre micromamiferi come il topo

selvatico (*Apodemus sylvaticus*), il riccio (*Erinaceus europeus*), la talpa (*Talpa caeca* e *Talpa europea*) e lo scoiattolo (*Sciurus vulgaris*) (Autori vari, 1990; Nanni e Sabbatani, 2004) (foto 5).



Foto 5. Parco Tozzoni (<http://visitare.comune.imola.bo.it>).

Parco delle Acque Minerali (A)

È un tipico parco all'Inglese, compreso in un'area di 0.11 km² vicina al centro storico. La vegetazione è simile a quella del parco Tozzoni, con querce, pseudoacacie (*Robinia pseudoacacia*), pini, aceri, cipressi e tigli (*Tilia* spp.).

Sono presenti le stesse specie di micromammiferi del Parco Tozzoni (Autori vari, 1990; Nanni, 2004) (Foto 6).



Foto 6. Parco delle Acque Minerali (<http://visitare.comune.imola.bo.it>).

Parco del Lungofiume (L)

Si estende lungo il fiume Santerno per un'area approssimativamente di 0.06 km². la vegetazione è molto diversa da quella dei parchi delle Acque Minerali e Tozzoni, poiché è caratterizzata da pioppeti (*Populus* spp.) e da saliceti (*Salix* spp.) (foto 7). È frequentato da micromammiferi e raramente da volpi (*Vulpes vulpes*) (Nanni, 2004). È l'unico parco in cui vengono ammessi i cani.



Foto 7. Parco del Lungofiume (<http://static.panoramio.com>).

Riserva Naturale Orientata del Bosco della Frattona (F)

Si estende per 0.19 km² ed è caratterizzato da una fitta boscaglia e da una notevole varietà di specie arboree ed animali (foto 8). La vegetazione si compone di cerri (*Quercus petraea*), robinie, aceri, noccioli (*Corylus avellana*), castagni (*Castanea sativa*) e carpini (*Carpinus* spp.). Sono presenti oltre che i micromammiferi, anche il tasso (*Meles meles*), puzzole (*Mustela putorius*), donnole (*Mustela nivalis*), il capriolo (*Capreolus capreolus*), volpi e pipistrelli. Ci sono anche molte specie di uccelli selvatici tra cui il fagiano (*Phasianus colchicus*) (Autori vari 1990; Lombini, 2004).



Foto 8. Bosco della Frattona (<http://visitare.comune.imola.bo.it>).

Raccolta delle zecche

Le zecche in cerca di ospite sono state raccolte da giugno ad ottobre del 2006 tramite dragging, utilizzando una coperta di flanella bianca di 1 m² lungo transetti di 100m, come già descritto per la raccolta delle zecche nelle aree alpine del Veneto e del Friuli Venezia Giulia.

In totale sono stati effettuati 33 dragging con scadenza mensile, di cui 18 nel Bosco della Frattona, poiché il parco presenta una maggior superficie ed una maggior eterogeneità di vegetazione e 5 in tutti gli altri parchi. I dragging sono stati effettuati vicino a stradine e viottoli, per valutare il rischio reale per l'uomo.

Temperatura (T), umidità relativa (RH) e tipo di vegetazione è stata registrata ad ogni dragging. Le zecche raccolte venivano conservate a -20 °C in provette fino alla loro identificazione, tramite le chiavi di Manilla e Iori (1982) e alla estrazione del DNA.

Analisi di Laboratorio

Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto dalle ninfe e dagli adulti in singolo utilizzando un kit commerciale (QIAamp DNA mini kit, Qiagen, Valencia, CA, USA).

PCR screening

Per identificare la presenza di *A. phagocytophilum*, *Bartonella* spp., *Borrelia burgdorferi* s. l., *Rickettsia* spp è stata utilizzata una PCR di screening per tutti gli estratti.

Tutte le reazioni di amplificazione sono state realizzate nello stesso termociclatore Biometra, Goettingen, Germany) e utilizzando i reagenti dell' Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA).

In ciascuna reazione di amplificazione sono stati inclusi almeno un controllo positivo ed uno negativo (utilizzando acqua sterile al posto del DNA). Come controllo positivo, è stato utilizzato il DNA estratto da colture cellulari e fissato su vetrini per IFA (Fuller Laboratories, Fullerton, CA, USA).

I prodotti di amplificazione erano visualizzati con l'elettroforesi in un gel composto dal 2.5% di agarosio, colorato con etidio bromuro (0.5%) ed esaminati con un transilluminatore a luce UV a bassa lunghezza d'onda. Per stimare la grandezza del prodotto in ogni gel è stato incluso un marker (50bp ladder, Fermentas, Burlington, ON, Canada o 20bp DNA ladder, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA).

Anaplasma phagocytophilum

Un amplificato di 151bp viene ottenuto dall'amplificazione di una parte della subunità ribosomale 16S di *A. phagocytophilum* utilizzando la coppia di primers GER3 (5'-TAGATCCTTAACGGAAGGGCG 3') and GER4 (5'AAGTGCCCGGCTTAACCCGCTGGC 3')

come già descritto da Goodman et al. (1996). L'amplificazione, dopo una fase di predenaturazione a 95°C per 5 minuti, consiste in 40 cicli, che prevedono una fase di denaturazione a 95°C per 1 minuto, una fase di appaiamento a 50°C per 1 minuto e una fase di estensione a 72°C per 1 minuto. Nell'ultimo ciclo, la fase di estensione dura 7 minuti (Goodman et al., 1996).

***Bartonella* spp.**

Bartonella spp. è stato identificato come descritto da Jensen et al. (2000) amplificando la regione intergenica (ITS) delle subunità ribosomali 16S-23S rRNA con i primers BarR1 (5'-CTCTTTCTTCAGATGATGATCC-3'), e BarF1 (5'-AACCAACTGAGCTACAAGCCCT-3'). L'amplificazione prevede una predenaturazione di 94°C per 5 minuti seguita da 45 cicli di denaturazione a 94°C per 30 secondi, di appaiamento a 58°C per un minuto ed estensione a 72°C per 30 minuti, fino ad un'ultima estensione finale a 72°C per 7 minuti. L'identificazione delle specie di *Bartonella* si basa sulla grandezza del prodotto di amplificazione. Come controlli positivi sono stati utilizzati i DNA genomici estratti dai *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* ATCC (ceppi 49882 and 51734, rispettivamente)

***Borrelia burgdorferi* s.l.**

Borrelia burgdorferi s.l. è stata identificata amplificando una parte del gene *groEL* utilizzando i primers GF (5'-TACGATTTCTTATGTTGAGGG-3') e GR (5'-CATTGCTTTTCGTCTATCACC-3') come descritto da Lee et al. (2003). La miscela di reazione è stata sottoposta a 30 cicli di amplificazione (30 secondi a 94°C, 45 secondi a 59°C e 45 secondi a 72°C), seguiti da una fase di estensione finale di 5 minuti a 72°C come viene descritto da Lee et al. (2003).

***Rickettsia* spp.**

Il DNA delle rickettsie è stato identificato amplificando una parte del gene che codifica per l'enzima citrato sintasi, utilizzando i primers RpCS.877p (5'-GGGGGCCTGCTCACGGCGG-3') e Rp1258n (5'-ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA-3'), come descritto da Regnery et al. (1991). Questa PCR è stata scelta come screening iniziale poiché è in grado di amplificare tutte le specie di *Rickettsia* (Roux et al. 1997). I campioni positivi venivano sottoposti ad una ulteriore PCR che prevedeva l'utilizzo della coppia di primers Rr190.70p (5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAA-3') e Rr190.601n (5'-AGTGCAGCATTCGCTCCCCT) che si legano ad una parte del gene che codifica per proteina esterna di membrana ompA (Roux et al, 1997). Quest'ultima PCR non amplifica il DNA di alcune *Rickettsia* spp., inclusa *R. helvetica* (Roux et al, 1996), quindi i campioni positivi alla prima PCR ma negativi alla seconda venivano sottoposti ad una nested PCR che ha come target il gene che codifica per la proteina esterna di membrana ompB, come descritto da Choi e colleghi (2005) che è specifica delle *Rickettsiae* che fanno parte del gruppo Spotted- Fever. I primers utilizzati in queste PCR erano Rc.rompB436.2p (5'-GTCAGCGTACTTCTTCGATGC-3'),

Rc.rompB4,836n (5'-CCGTACTCCATCTTAGCATCAG-3'), Rc.rompB4,496p (5'-CCAATGGCAGGACTTAGCTACT-3') e Rc.rompB4,4,762N (5'-AGGCTGGCTGATACACGGAGTAA-3').

Infine, l'identificazione è stata ottenuta mediante il sequenziamento degli ampliconi ottenuti dalle zecche infette. Le sequenze sono state depositate nella GenBank con i seguenti numeri di accesso: FJ919634 – FJ919651

Sequenziamento e relative analisi

I prodotti della PCR sono stati purificati con Jetquick PCR Product Purification Spin Kit (Genomed, Löhne, Germany) come raccomandato dalla casa produttrice.

Il sequenziamento è stato realizzato in un sequenziatore automatico (Applied Biosystems) applicando la tecnologia fluorescence-labelled dideoxynucleotide, mentre per analizzare il cromatogramma e ottenere il consenso delle sequenze è stato utilizzato il software ChromasPro (Technelysium, Baloo St. Holland Park, Australia). Infine, le sequenze sono state confrontate con quelle presenti nel database della GenBank utilizzando il programma BLAST 2.0 (National Center for Biotechnology Information; available from URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Analisi statistica

Per calcolare la densità delle ninfe (numero di ninfe in 100m²) è stato utilizzato un modello log-lineare con l'uso della sola intercetta senza l'introduzione delle variabili esplicative, così come descritto da Mannelli e collaboratori (2003). Lo stesso tipo di modello, che tiene conto della sovradisersione tipica di molti parassiti, è stato utilizzato per quantificare le differenze tra densità tra parchi e tra transetti nel Bosco della Frattona. Come per l'analisi statistica nelle aree del Veneto e del Friuli Venezia Giulia, non è stata valutata né la densità delle ninfe né quella degli adulti, poiché non rappresentano la reale distribuzione delle zecche.

È stata quindi affrontata una ulteriore analisi per valutare le eventuali relazioni tra temperatura, RH, mesi di campionamento e copertura vegetazionale con l'abbondanza delle ninfe utilizzando un modello di regressione binomiale negativo.

La copertura vegetazionale è stata schematicamente divisa in 6 categorie, come viene descritto in tabella 9. Le differenze di T ed RH tra transetti e mesi di campionamento sono state valutate con l'analisi della varianza (one-way analysis of variance) e con il Kruskal-Wallis test.

<i>Riserva orientata Bosco della Frattona</i>	<p>2. Cespuglieto formato da aceri e prugnoli (transetto 1)</p> <p>3. Bosco di querce (transetto 2)</p> <p>4. Carpini and aceri (transetto 3)</p> <p>5. Robiniето (transetto 4)</p>
<i>Parco del Lungofiume</i>	6. Pioppeto

Tabella 9. Descrizione della tipologia di vegetazione nei parchi e nei transetti del Bosco della Frattona.

Per valutare l'associazione tra prevalenze di infezione nelle ninfe e fattori di rischio come l'abbondanza delle ninfe e i mesi di campionamento è stata approntata una regressione logistica, con robust standar error (Hosmer and Lemeshow, 2000) che tiene conto della ripetizione delle misure negli stessi transetti.

Purtroppo, non è stato possibile indagare sull'influenza di alcune variabili come la densità di micromammiferi ed uccelli terricoli sulla prevalenza delle infezione nelle ninfe perché non quantificate. La selezione delle variabili e la valutazione del modello si è basato sul valore dello pseudo log likelihood, come descritto da Hosmer and Lemeshow (2000).

Le differenze nelle prevalenze di infezione tra parchi e tra stadi è stata valutata con il test dell'omogeneità degli odds e con il Fischer's exact test.

Infine, come per le aree del Veneto e del Friuli Venezia Giulia, è stato valutato il rischio acarologico (AR) che rappresenta la probabilità di trovare almeno una zecca infetta per 100 m² di transetto. L'equazione che la descrive è già stata riportata nella descrizione delle analisi statistiche riferite alle aree del Veneto e del Friuli Venezia Giulia.

Gli intervalli di confidenza (95%) sono stati ottenuti utilizzando Il metodo del bootstrap.

Le analisi statistiche sono state realizzate con il programma STATA 8.0 (Stata Corp., College Station, TX, USA) e per l'analisi del bootstrap è stato utilizzato il software di statistica R (R Development Core Team, 2006).

Risultati

Zecche

Complessivamente sono state raccolte 416 larvae, 106 ninfe e 9 adulti di *Ixodes ricinus* e 110 larvae di *Rhipicephalus sanguineus*. Tutte le larvae di *Rhipicephalus sanguineus* e il 98.9% delle *Ixodes ricinus* (415 larvae, 101 ninfe e 8 adulti, di cui 6 femmine e 2 maschi) sono stati raccolti nel *Bosco della Frattona*. Solo 1 larva, 5 ninfe ed una femmina adulta sono state raccolte nel parco delle *Acque Minerali* e nel *Parco Tozzoni*.

Le densità delle zecche nei parchi (con relativi IRR) e le densità nei 4 transetti del *Bosco della Frattona* sono riportate nelle tabelle 10 e 11. Il parco del Lungofiume non è stato incluso nel modello perché non sono state raccolte zecche. Il numero di ninfe raccolte nei Parchi delle *Acque Minerali*, del *Bosco della Frattona* e nel *Tozzoni* sono espote in Tabella 12.

Parco	ninfe/100 m ²	95% CI	IRR	P	95% CI
<i>Acque Minerali</i>	0.60	0.14-2.51	Categoria di riferimento		
<i>Bosco della Frattona</i>	6.31	4.67-8.54	6.63	<0.01	1.97-22.27
<i>Tozzoni</i>	0.80	0.21-2.98	0.50	0.54	0.06-4.57
			Log likelihood -54.37		
<i>Lungofiume</i>	0		Non incluso nel modello		

Tabella 10. Densità delle ninfe e IRR dei 4 parchi campionati

Transetto	ninfe/100 m ²	Intervalli di Confidenza (95%)
1	3.50	1.90-6.44
2	6.25	4.22-9.25
3	7.00	4.14-11.85
4	8.50	4.37-16.51

Tabella 11. Densità delle ninfe nei transetti del *Bosco della Frattona*

	<i>Parco delle Acque Minerali</i>		<i>Bosco della Frattona</i>		<i>Parco Tozzoni</i>	
	ninfe	adulti	ninfe	adulti	ninfe	adulti
Numero di zecche	3	1	101	8	2	0
<i>A. phagocitophilum</i>	0	0	0	0	0	
<i>B. claridgeiae</i> Prevalenza % (CI 95%)	1	0	5 4.9 (1.6-11.2)	0	0	
<i>B. henselae</i> Prevalenza % (CI 95%)	0	1 100 (25-100)	40 39.6 (30.0-49.8)	1 12.5 (0.3-52.6)	2 100 (15.8-100)	
<i>B. burgdorferi</i> s.l. Prevalenza % (CI 95%)	0	0	11 10.9 (5.6-18.6)	1 12.5 (0.3-52.6)	0	
<i>R. helvetica</i> Prevalenza % (CI 95%)	0	0	2 1.98 (0.2-6.9)	1 12.5 (0.3-52.6)	0	
<i>R. monacensis</i> Prevalenza % (CI 95%)	0	0	14 13.9 (7.8-22.2)	0	1 50(12.6-98.7)	

Tabella 12. Numero di individui raccolti e prevalenze delle infezioni divise per stadio e per Parco.

Le temperature e gli RH misurati durante il dragging non mostrano complessivamente differenze significative ($P=0.94$ and $P=0.45$, rispettivamente) ma sono differenti tra mesi di campionamento ($P<0.01$ and $P<0.01$, rispettivamente) che sono stati quindi eliminati dal modello binomiale negativo per il principio di parsimonia (Burnham and Anderson, 1992). Poiché il 98.9% delle zecche proveniva dal *Bosco della Frattona*, solo questo parco è stato incluso nei modelli di regressione (sia quello binomiale negativo sia quello logistico) e nel calcolo del Rischio acarologico. I risultati dei modelli sono esposti nelle tabelle 13 e 14.

Variabili esplicative	IRR	P	95% CI
T	0.92	<0.01	0.89-0.97
RH	0.98	0.16	0.96-1.00
Categorie di vegetazione			
4		Categoria di riferimento	
3	0.83	0.53	0.47-1.47
2	0.45	0.02	0.23-0.88
5	1.29	0.31	0.78-2.15

Log likelihood = -36.78; $P=<0.01$

Tabella 13. Risultati del modello di regressione binomiale negativo

Agenti patogeni	Variabili esplicative	OR (95% CI)	P	Log pseudo-likelihood	P
<i>B. henselae</i>	mesi	0.19 (0.10- 0.34)	<0.01	-48.27	<0.01
	abbondanza delle ninfe	1.14 (0.97-1.33)	0.09		
<i>B. clarridgeiae</i>	mesi	2.27 (1.28- 4.03)	0.01	-18.60	0.01
	abbondanza delle ninfe	0.83 (0.63- 1.08)	0.17		
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	mesi	0.55 (0.43- 0.69)	<0.01	-31.72	<0.01
	abbondanza delle ninfe	1.02 (0.97- 1.07)	0.52		
<i>R. helvetica</i>	mesi	0.52 (0.16-1.71)	0.29	-9.18	0.22
	abbondanza delle ninfe	1.07 (0.79-1.45)	0.65		
<i>R. monacensis</i>	mesi	1.35 (0.50-3.64)	0.55	-39.50	0.82
	Abbondanza delle ninfe	0.95 (0.78-1.15)	0.62		

Tabella 14. Risultati del modello di regressione logistica.

Infezione da *Anaplasma phagocytophilum*

Nessuna zecca è risultata positiva all'implicazione del 16 S DNA

Infezione da *Bartonella* spp.

Cinquanta zecche (48 ninfe e 2 adulti) erano positive all'amplificazione per l'identificazione di ITS di *Bartonella* spp.. In 44 casi è stata identificata come *B. henselae*, in 6 casi come *B. clarridgeia*. Non è stata osservata nessuna confezione. Tutti i pool di *larvae* sono risultati negativi.

Infezione da *Bartonella henselae*

La prevalenza complessiva di *B. henselae* è pari al 38.3 % (95% CI=29.3-47.8) (44 positive/115 zecche). Non è stata osservata nessuna differenza tra parchi e tra stadi. La regressione logistica mostra un decremento della prevalenza di infezione da giugno ad ottobre (tabella 14 e grafico 19).

Il rischio acarologico nel *Bosco della Frattona* è pari al 90.4% (CI 95% = 77.1%-96.0%).

Infezione da *Bartonella clarridgeiae*

La prevalenza in tutti i parchi è pari al 5.2% (CI 95%=1.9-11) ed è simile tra parchi e fra stadi. La regressione logistica mostra un aumento della prevalenza di infezione da giugno ad ottobre e l'abbondanza delle ninfe non è associata all'infezione (tabella 14 e grafico 19).

Il rischio acarologico nel *Bosco della Frattona* è pari a 27.7% (95% CI=18.6%-35.6 %).

Infezione da *Borrelia burgdorferi* s.l.

La prevalenza di infezione di *B. burgdorferi* in 115 zecche è pari a 10.4% (95% CI=5.5-17.5%). Tutte le zecche positive (11 ninfe ed 1 adulto) sono state raccolte nel *Bosco della Frattona*. Non si osserva nessuna differenza significativa tra ninfe e adulti. Otto zecche (7 ninfe ed 1 adulto) erano coinfecte con *B. henselae*, ma l'associazione non è significativa. La regressione logistica mostra un decremento dell'infezione da giugno ad ottobre, mentre l'abbondanza delle ninfe non appare associata all'infezione (tabella 14 e grafico 19).

Il Rischio acarologico nel Bosco della Frattona è pari a 49.7% (CI 95%=35.8%-60.2 %).

Infezione da *Rickettsia* spp.

Diciotto estratti (15.7%; CI 95%= 13.9%-29.4%) sono risultati positive alla PCR di screening, che identifica tutte le specie di *Rickettsia*. Tre di questi sono risultati positivi all'amplificazione del frammento del gene che codifica per la proteina esterna di membrane OmpB, confermando la loro appartenenza al gruppo delle Spotted Fever. Tutte le sequenze amplificate mostravano un'omologia del 100% con le sequenze di *R. helvetica* (GenBank, AF123725).

Le sequenze di 15 campioni mostravano un'omologia del 100% con le sequenze OmpA e OmpB di *R. monacensis strain irR Munich* (GenBank, DQ1001169 e GenBank,EF380356) in 12 e 3 casi, rispettivamente.

Rickettsia helvetica

La prevalenza complessiva di *R. helvetica* è pari al 2.6% (95% CI = 0.5%-7.4%). Tutte le zecche infette sono state trovate nel *Bosco della Frattona*. Non si osservano associazioni tra stadi e parchi, né confezioni con *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Borrelia burgdorferi* s.l. and *R. monacensis*, né associazioni con mesi di campionamento e abbondanza delle zecche (tabella 14).

Il Rischio Acarologico è pari al 11.4% (95% CI= 7.3%-15.5%).

Rickettsia monacensis

La prevalenza calcolata su tutti i parchi è pari al 13 % (95% CI = 7.5%-20.6%). 14 ninfe infette sono state raccolte nel *Bosco della Frattona* e una nel Parco Tozzoni. Non sono state evidenziate differenze significative tra parchi, né confezioni con *B.henselae*, *B.clarridgeiae*, *Borrelia burgdorferi* s.l. and *R. helvetica*. La regressione logistica non mette in luce nessuna associazione con le variabili esplicative considerate (tabella 14).

Il Rischio Acarologico di *Rickettsia monacensis* è del 57.2% (95% CI = 42%-68.6%)

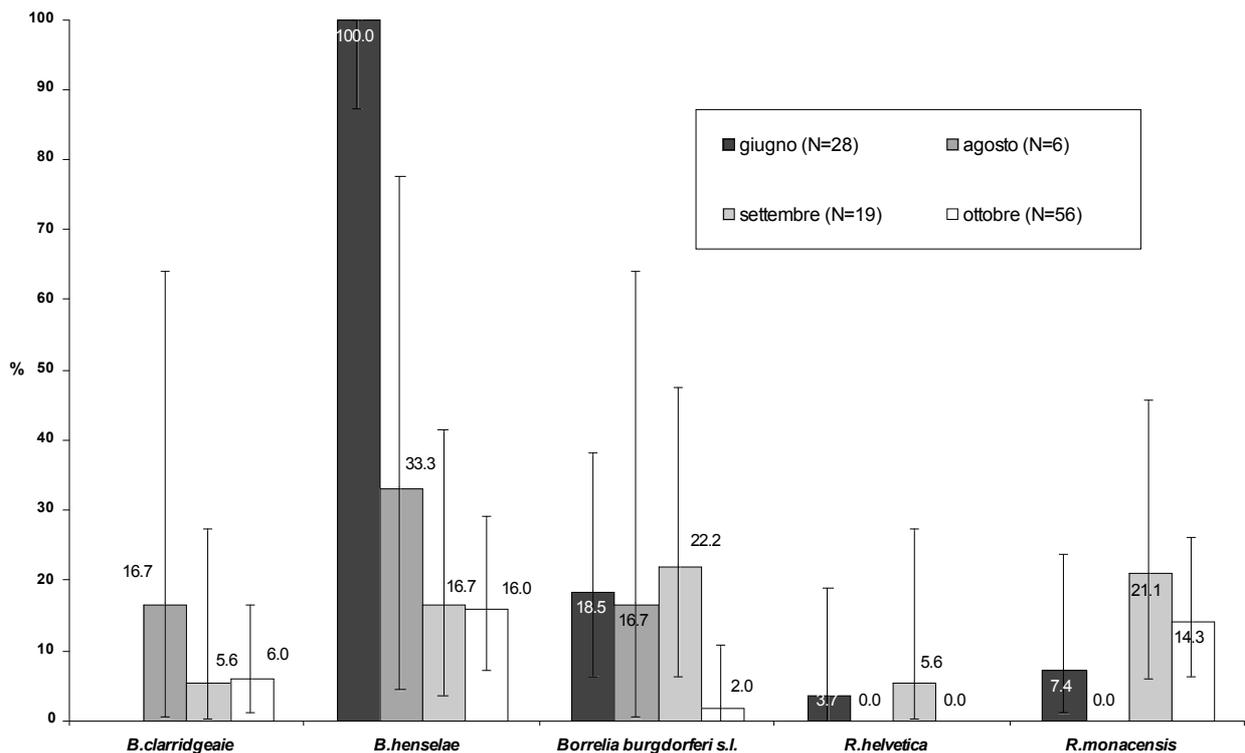


Grafico19. Prevalenza nelle ninfe dei 5 patogeni rispetto ai mesi di campionamento.

Discussione

Indagini sulle zecche e sulle malattie a carattere zoonosico trasmissibili da questi vettori sono già state realizzate in diverse aree periurbane del Nord America (Falco and Fish, 1989; Magnarelli et al., 1995; Lane, 1996; Kramer et al., 1999) e del nord ovest dell'Europa (Fingerle et al., 1999; Gray et al., 1999; Junntila et al., 1999; Kosik-Bogacka et al., 2004; Wielinga et al., 2006) ma risulta complesso compararne i risultati date le notevoli differenze geografiche, per tipologia di parco, per le differenze tra specie di zecche e tra specie ospiti e per le metodologie applicate per la raccolta delle zecche e per l'identificazione dei patogeni.

In Italia, gli habitat silvestri, soprattutto nel nord e nel centro Italia, sono stati oggetto di numerose indagini sia riguardanti la fenologia delle zecche sia l'epidemiologia delle malattie trasmesse (Cacciapuoti et al., 1995; Cinco et al., 1997; Cinco et al., 1998; Ciceroni et al., 1998; Mannelli et al., 1999; Favia et al., 2001; Rizzoli et al., 2002; Santino et al., 2002; Santino et al., 2003; Mannelli et al., 2003; Piccolin et al., 2006; Bertolotti et al., 2006; Mantelli et al., 2006; Pecchioli et al., 2007) ma in letteratura non vengono riportate indagini effettuate su aree urbane e periurbane.

In questa ricerca vengono considerati quattro parchi localizzati nella stessa area geografica, con lo stesso clima ed altitudine e campionati nello stesso periodo. La *Riserva Naturale Orientata del Bosco della Frattona* presenta una densità di zecche paragonabile ad alcune stime in habitat

selvatici del Trentino (Rizzoli et al., 2002), della Liguria (Mannelli et al., 2003) e in alcune aree del Veneto (Corrain, in questa tesi).

Le due specie di zecche trovate, *I. ricinus*, associata generalmente ad ambiente selvatici e *R. sanguineus*, zecca tipicamente parassitante il cane e associata generalmente ad ambienti domestici, sono tra le più diffuse in Italia. Tuttavia, dato che gli esemplari raccolti di *R. sanguineus* sono solo *larvae*, la sua presenza nel Bosco della Frattona può essere considerata sporadica.

L'elevata densità della vegetazione e la biodiversità (micromammiferi, carnivori, uccelli e caprioli) che caratterizzano questo parco sono caratteristiche che possono spiegare la differenza notevole tra il *Bosco della Frattona* e tutti gli altri parchi, anche se non è stato possibile quantificarne gli effetti ed introdurre queste variabili nei modelli di regressione. Quindi, poiché la densità delle zecche negli altri parchi è bassa o nulla (Tabella 10) tutte le analisi sulla fenologia di *I. ricinus* e sui patogeni si riferiscono solo a Bosco della Frattona.

L'abbondanza delle ninfe appare associata sia alla temperatura sia al tipo di vegetazione, come osservato da Mannelli et al., 1999, Estrada-Pena, 2001, Mannelli et al., 2003 and Estrada-Pena and Santos-Silva, 2005, in aree geografiche più ampie. L'associazione negativa con la temperatura conferma il picco di attività delle ninfe verso maggio - giugno come è già stato evidenziato da più autori (Perini, 2000; Rizzoli et al., 2000; Walker, 2001; Stanko et al., 2007) e in questa tesi per le aree del Veneto e del Friuli Venezia Giulia. L'associazione negativa con il tipo di vegetazione 2 (tabella 13) potrebbe essere dovuto ad un ridotto sottobosco che caratterizza questo transetto.

Infine, poiché esistono delle differenze anche tra densità nei transetti (tabella 11) sembra che l'abbondanza delle zecche possa essere condizionata anche da piccole variazioni nel microhabitat.

Gli agenti patogeni identificati nelle zecche sono stati *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. burgdorferi* s.l., *R. helvetica* and *R. monacensis*. Contrariamente ad altre indagini europee, compresa l'Italia, Ogden et al., 1998; Favia et al., 2001; Stuen et al., 2002; Bown et al., 2003; Polin et al., 2004; Mantelli et al., 2006; Piccolin et al., 2006; Stuen et al., 2006) e rispetto anche ai risultati relativi alle aree del Veneto e del Friuli Venezia Giulia esposti in questa tesi nessuna zecca è risultata infetta di *A. phagocytophilum*.

L'infezione da *Bartonella* spp. nelle zecche e nella fauna selvatica è già stata osservata (Schouls et al., 1999; Chang et al., 2001; Bermond et al., 2002; Sanogo et al., 2003a; Engbaek and Lawson, 2004; Halos et al., 2005; Bogumila and Adamska, 2005; Kim et al., 2005). Le specie identificate nel nostro studio sono riconosciuti come agenti della malattia del graffio del gatto (cat scratch disease) e ha tipicamente un ciclo domestico, dove la pulce (*Ctenocephalides felis*) funge da vettore e il gatto rappresenta il reservoir. L'infezione in *I. ricinus* di *B. henselae* è stata riportata raramente (Sanogo et al., 2003a; Podsiadly et al., 2007; Billeter et al., 2008; Podsiadly et al., 2008). Poiché la

sporadica presenza di gatti domestici o sinantropici all'interno del *Bosco della Frattona* non possono sostenere una così elevata prevalenza di infezione nelle zecche, si può supporre l'esistenza di una interfaccia tra l'ambiente domestico e selvatico dove *I. ricinus* fungerebbe da legame tra i due cicli e i micromammiferi, dove l'infezione è già stata riportata (Kim et al., 2005; Engbaek and Lawson, 2004), rappresenterebbero gli ospiti.

Le stesse supposizioni non possono essere estese a *B. clarridgeiae*, data la scarsa prevalenza osservata. Tuttavia, l'infezione da *B. clarridgeiae* nelle zecche *I. ricinus* viene descritta per la prima volta (Billeter et al., 2008). L'assenza di altre specie di *Bartonella*, come la *B. capreoli* e la *B. schoenbuchensis*, tipiche degli habitat selvatici, supportano l'ipotesi della presenza di infezioni originate da animali domestici.

La presenza dell'infezione nelle zecche di *R. helvetica* and *R. monacensis* è un altro dato particolarmente interessante, date le poche indagini italiane su questi due patogeni (Beninati et al., 2002; Sanogo et al., 2003b; Floris et al., 2008) che non comprendevano mai aree periurbane.

La loro presenza conferma la diffusione di nuove forme di rickettsiosi emergenti in Italia, paese in cui fino al 2002 veniva riportata solo l'infezione da *R. conorii* (Beninati et al., 2002, Mura et al., 2008).

La presenza dell'infezione di *B. burgdorferi* s.l. costituisce una ulteriore conferma della sua diffusione in Italia (Ciceroni and Ciarrocchi, 1998; Favia et al., 2001; Rizzoli et al., 2002; Mannelli et al., 2003; Piccolin et al., 2006; Mantelli et al., 2006).

Poiché la presenza degli ungulati è sporadica, per tutti questi patogeni si può ipotizzare il ruolo fondamentale dei micromammiferi, che è stato descritto approfonditamente per l'infezione da *B. burgdorferi* s. l. (Craine et al., 1997; Humair et al., 1998; Kurtenbach et al., 1998; Talleklint et al., 1994), ma che per le rickettsiosi necessita di ulteriori approfondimenti.

L'influenza dell'abbondanza delle ninfe e dei mesi di campionamento rispetto all'infezione dei quattro patogeni è stata stimata tramite la regressione logistica. Nessuna associazione è stata trovata con le infezioni da *R. helvetica* e *R. monacensis*, il cui studio richiede ulteriori approfondimenti sul ruolo di vettori e ospiti vertebrati e sulle possibili interazioni.

Il calo delle prevalenze di *B. henselae* e *B. burgdorferi* da giugno ad ottobre potrebbe essere dovuta alla dinamica di popolazione dei vettori e dei loro ospiti. Amori et al. (2002) descrivono un picco di nascite alla fine primavera-inizio estate. La proporzione di animali giovani, e quindi non infetti, sarebbe più alta in questi mesi, risultando in una più bassa infezione delle ninfe raccolte successivamente a questo periodo e che erano larve nei mesi estivi. Le ninfe raccolte in giugno mostrerebbero una più elevata prevalenza perché si sono cibate nello stadio precedente in una popolazione di individui relativamente più vecchia rispetto a quella estiva, e quindi

presumibilmente formata da una maggior proporzione di individui infetti. Queste ipotesi tuttavia non possono essere estese all'infezione di *B. clarridgeiae*, che presenta un trend opposto rispetto a *B. henselae* e a *B. burgdorferi*. Il diverso andamento temporale delle 3 infezioni potrebbe essere attribuito al fatto che l'infezione da *B. henselae* and *B. burgdorferi* è endemica ed associata ai micromammiferi, mentre l'infezione da *B. clarridgeiae* è sporadica e l'infezione delle zecche potrebbe essere causata dalla saltuaria presenza di animali domestici, in particolare del gatto.

I valori del Rischio acarologico variano da 11.4% per *R. helvetica* fino al 90.4% di *B. henselae*. Il Rischio acarologico di *B. burgdorferi* s. l. (49.7%) è più alto di quello riportato da Mannelli et al. (2003), che in Liguria aveva osservato dei picchi in Aprile ed in Novembre del 20% e 29% rispettivamente. Tuttavia i più alti valori osservati nel nostro studio, sarebbero da attribuire ad una maggior densità di zecche piuttosto che ad una maggior prevalenza.

La *Riserva Naturale Orientata Bosco della Frattona* viene spesso utilizzato per le attività ricreative e visitato da bambini (l'amministrazione del Bosco stima un numero di 3000 visitatori all'anno). Il rischio di rappresentare una fonte di trasmissione per l'uomo e per gli animali delle infezioni da *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. burgdorferi* s. l., *R. helvetica* e *R. monacensis* è quindi reale.

Viceversa, i Parchi delle *Acque Minerali*, *Tozzoni* e *Lungofiume* rappresentano una fonte di trasmissione di infezione quanto meno trascurabile, a causa della bassissima densità di zecche riscontrata in questi parchi.

Conclusioni

Le indagini descritte in questa tesi, sia per l'ecologia delle zecche, sia per l'epidemiologia delle infezioni trasmesse, sono in parte sovrapponibili.

La densità delle zecche, pur mostrando degli hot spot in corrispondenza dei siti del Friuli Venezia Giulia, in altri siti come in provincia di Verona e Vicenza presenta valori simili a quello del Bosco della Frattona, parco alla periferia della città di Imola. Quest'ultimo, nonostante abbia in realtà caratteristiche simili ad un habitat appenninico, non presenta nessuna soluzione di contiguità con ambienti silvestri, dimostrazione di una generale diffusione di *Ixodes ricinus* sia in habitat silvestri sia in quelli periurbani. Le influenze stagionali ed ambientali sono state valutate con un diverso approccio in entrambe le indagini, dimostrando che l'abbondanza delle zecche è influenzata sia dal macrohabitat (per lo studio effettuato in Veneto ed in Friuli Venezia Giulia) sia dal microhabitat (Riserva Naturale Orientata del Bosco della Frattona).

Per quanto riguarda l'epidemiologia dei patogeni, solo le infezioni di *Anaplasma phagocytophilum* e *Borrelia burgdorferi* s.l. possono essere confrontate. Nel caso dell'infezione da *A. phagocytophilum*, mentre nessun positivo è stato riscontrato nell'indagine sulle zecche raccolte dai parchi, nelle aree silvestri è stato osservato qualche focolaio con prevalenze inferiori al 2% nelle province di Pordenone, Treviso e Udine. Si conferma quindi la scarsa diffusione dell'agente dell'Erlichiosi granulocitica umana sia in habitat urbani sia in quelli silvestri.

Borrelia burgdorferi s.l. invece è endemica con prevalenze nelle ninfe del tutto sovrapponibili tra habitat silvestri e quelli urbani, così come i valori dei Rischi acarologici, fatta eccezione per alcuni siti dove le densità elevate condizionano il risultato.

Le similitudini tra habitat, nonostante la fauna e la copertura vegetativa siano differenti fanno supporre un'elevata adattabilità sia di *Ixodes ricinus*, sia dei patogeni trasmessi. In particolare, gli ambienti periurbani poco indagati fino ad oggi, possono essere, se le condizioni ambientali lo permettono, possibili reservoir zoonotici.

Bibliografia

- Adamska M, Skotarczak B (2007). Wild game as a reservoir of *Anaplasma phagocytophilum* in north-western Poland. *Wiad Parazytol* 53:103-107.
- Aguero-Rosenfeld ME, Horowitz HW, Wormser GP, McKenna DF, Nowakowski J, Muñoz J, Dumler JS.(1996) Human granulocytic ehrlichiosis: a case series from a medical center in New York State. *Ann Intern Med* 1, 125, 904-908.
- Amaducci L, Arnetoli G, Inzitari D, Calducci M, Verani P (1976). Tick-borne encephalitis (TBE) in Italy: report of the first clinical case. *Riv Pat Ner Ment*, 97, 77-80.
- Amasategui I, Sainz A, Tesouro MA (2006) Serological evaluation of *Anaplasma phagocytophilum* infection in livestock in northwestern Spain. *Ann N Y Acad Sci*, 1078, 487-490.
- Amori G., L. Corsetti, C. Esposito, 2002. I Mammiferi dei Monti Lepini. Quaderni di conservazione della natura, 11, Ministero dell'Ambiente - Istituto Nazionale per la Fauna selvatica.
- Anonymous (1994). Outbreak of tick bone encephalitis, presumably milk borne. *Wkly Epidemiol Res*, 69, 140-141.
- Arnez M, Petrovec M, Lotric-Furlan S, Zupanc TA, Strle F (2001) First European pediatric case of human granulocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 39,4591-4592.
- Autori vari (1990) Alberi a Imola, eds. Comune di Imola, tipografia Negri, Bologna, Italy.
- Avdikova M, Kontrosova S, Kostanova Z (2005) Occurrence of natural foci zoonoses and selected epidemiological characteristics of tick-borne encephalitis and lyme borreliosis during 1997-2004. Abstracts of Zoonoses, their causative agents and vectors conference, 4-6 April 2005, Smolenice, Cecoslovacchia.
- Bakken JS, Dumler JS (2000). Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 31, 554-560.
- Bakken JS, Dumler JS, Chen SM, Eckman MR, Van Etta LL, Walker DH.(1994) Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *JAMA*. 20, 272, 212-218.
- Bakken JS, Krueth J, Tilden RL, Dumler JS, Kristiansen BE.(1996a) Serological evidence of human granulocytic ehrlichiosis in Norway. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15, 829-832.
- Bakken JS, Krueth J, Wilson-Nordskog C, Tilden RL, Asanovich K, Dumler JS.(1996b) Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. *JAMA* 17, 275, 199-205.
- Baldrige GD, Burkhardt N, Herron MJ, Kurtti TJ, Munderloh UG (2005). Analysis of Fluorescent Protein Expression in Transformants of *Rickettsia monacensis*, an Obligate Intracellular Tick Symbiont. *Appl Environ Microbiol.*, 71, 2095–2105
- Balmelli T, Piffaretti JC (1995). Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Res Microbiol* 146, 329-340.

- Barantika JF, Hurtado A, Garcia-Esteban , Gil H, Escudero R, Barral M, Jado I, Juste RA, Anda P, Garcia-Perez L (2007) Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. *Appl Environ Microbiol* 73, 6166-6171.
- Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M., Grimont PA (1992) Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu strictu*, *Borrelia garinii* sp.nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol*, 42, 378-383.
- Barbour AG (1984). Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med*. 57, 521-5
- Barbour AG, Hayes SF (1986). Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev*. 50, 381-400
- Barral M., A.L. Garcia-Perez, R.J. Juste, A. Hurtado, R. Escudero, R. Sellek, P. Anda (2002) Distribution of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* (Acari:Ixodidae) ticks from the Pasque Country, Spain. *J Med Entomol* 39, 177-184
- Barutzki D, De Nicola A, Zeziola M, Reule M (2006) Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 119, 342-7.
- Bass JW, Vincent JM, Person DA (1997). The expanding spectrum of *Bartonella* infections. II. Cat-scratch disease. *Pediatr Infect Dis J* 16, 163-179.
- Beltrame A, Ruscio M, Arzese A, Rorato G, Negri C, Londero A, Crapis M, Scudeller L, Viale P (2006) Human granulocytic anaplasmosis in northeastern Italy. *Ann N Y Acad Sci* 1078, 106-109.
- Beninati T, Lo N, Noda H, Esposito E, Rizzoli A, Favia G, Genchi C (2002). First detection of Spotted Fever Group Rickettsiae in *Ixodes ricinus* from Italy. *Emerg Infect Dis* 8, 983-986.
- Bermond D, Boulois H-J, Heller R, van Laere G, Monteil H, Chomel BB, Sander A, Dehio C, Piemont Y (2002) *Bartonella bovis* Bermond et al sp.nov. and *Bartonella capreoli* sp.nov. isolated from European ruminants. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 383-390.
- Bertolotti L, Tomassone L, Tramuta C, Grego E, Amore G, Ambrogi C, Nebbia P, Mannelli A. (2006) *Borrelia lusitaniae* and spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Tuscany, central Italy. *J Med Entomol* 43, 159-65
- Billeter SA, Levy MG, Chomel CC, Breithschwerdt EB (2008). Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med Vet Entomol*, 22, 1-5.
- Birtles RJ, Harrison TG, Saunders NA Molyneux DH (1995). Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* com. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp.nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 45, 1-8.
- Bjöersdorff A, Bergström S, Massung RF, Haemig PD, Olsen B.(2001) Ehrlichia-infected ticks on migrating birds. *Emerg Infect Dis* 7, 877-9.
- Blanco JR, Oteo JA (2002) Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 8, 763-772.

- Blaschitz M, Narodoslavsky-Gföller M, Kanzler M, Walochnik J, Stanek G (2008). First detection of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 561-3.
- Bogumila S, Adamska M, (2005). *Capreolus capreolus* and *Ixodes ricinus* as a reservoir of Bartonella in north-western Poland. *Wiad Parazytol* 51, 139-143.
- Boulouis HJ, Chang C, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB (2005). Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res* 36, 383-410.
- Bown KJ, Begon M, Bennett M, Woldehiwet Z, Ogden NH (2003). Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*, 9, 63-70.
- Branz F (2000). Le infezioni trasmesse da zecche: la realtà epidemiologica trentina. In; Zecche e malattie trasmesse. La situazione in Trentino. Report n. 21 del Centro di Ecologia Alpina, pp.112.
- Breitschwerdt EB, Levine JF, Radulovic S, Hanby SB, Kordick DL, La Perle KMD (2005). *Bartonella henselae* and *Rickettsia* seroreactivity in a sick cat population from North Carolina. *Intern J Appl Res Vet Med* 3, 287-302.
- Breitschwerdt EB, Maggi RG, Duncan AW, Nicholson WL, Hegarty BC, Woods CW (2007) Bartonella species in blood of immunocompetent persons with animal and arthropod contact. *Emerg Infect Dis* 13, 938-941.
- Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, Steigerwalt AG (1993). Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. *Int J Syst Bacteriol* 43, 777-786.
- Brouqui P, Dumler JS, Lienhard R, Brossard M, Raoult D. (1995) Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Lancet* 16, 346, 782-3.
- Brunt J, Guptill L, Kordick DL, Kudrak S, Lappin MR (2006) American Association of Feline Practitioners 2006 Panel report on diagnosis, treatment, and prevention of *Bartonella* spp. infections. *J Feline Med Surg* 8, 213-226.
- Bunnell JE, Magnarelli LA, Dumler JS. (1999) Infection of laboratory mice with the human granulocytic ehrlichiosis agent does not induce antibodies to diagnostically significant *Borrelia burgdorferi* antigens. *J Clin Microbiol.* 37, 2077-2079.
- Burnham KP, Anderson DR (1992). Data-based selection of an appropriate biological model: the key to modern data analysis. In: D.R. McCullough and R.H.Barrett (eds.), *Wildlife 2001: populations*. Elsevier, London, U.K.
- Cacciapuoti B, Ciceroni L, Ciarrocchi S, Khoury C, Simeoni J (1995). Genetic and phenotypic characterization of *Borrelia burgdorferi* strains isolated from *Ixodes ricinus* ticks in the Province of Bolzano, Italy. *New Microbiol*, 18, 169-181.
- Canica MM, Nato F, du Merle L, Mazie JC, Baranton G., Postic D. (1993) Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afelii* sp.nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scan J Infect Dis* 25, 441-448.

- Cao WC, Zhao QM, Zhang PH, Yang H, Wu XM, Wen BH, Zhang XT, Habbema JD (2003) Prevalence of *Anaplasma phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes persulcatus* ticks from northeastern China. *Am J Trop Med Hyg* 68,547-550.
- Carithers HA (1985). Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1200 patients. *Am J Dis Child* 139, 1124-1133.
- Caruso G, Mondardini V, Granata C, Mel R, Marcolina D, Bentivecna S, Russino F, Perini G, Chemini C, Benedetti P, Zarattini A, Ciufolini MG (1997). Risultati di un'indagine virologica e sieropedimologica sull'infezione da TBE virus (TBEV) in provincia di Belluno. *Giorn Ital mal Inf* 3, 50-52.
- Castro MB, Nicholson WL, Kramer VL, Childs JE (2001). Persistent infection in *Neotoma fuscipes* (Muridae: sigmodontinae) with *Ehrlichia phagocytophila* sensu lato. *Am J Trop Med Hyg* 65, 261-267.
- Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Romano V, Tietze N (2001). Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. *J Clin Microbiol* 39 (4): 1221-1226.
- Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH (1994) Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol* 32, 589-95.
- Choi YJ, Lee SH, Park KH, Koh YS, Lee KH, Baik HS, Choi MS, Kim IS, Jang WJ (2005) Evaluation of PCR-Based assay for diagnosis of spotted fever group rickettsiosis in human serum samples. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 12, 759-763.
- Chomel B.B., Mac Donald K.A., Kasten R.W., Chang C.C., Wey A.C., Foley J.E., Thomas W.P. and M.D. Kittleson. (2001). Aortic valve endocarditis in a dog due to *Bartonella clarridgeiae*. *J Clin Microbiol* 39, 3548-3554.
- Chomel BB, Kasten RW, Sykes JE, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB (2003). Clinical impact of persistent *Bartonella* bacteremia in humans and animals. *Ann N Y Acad Sci* 990, 267-278.
- Christova I, Dumler JS (1999). Human granulocytic ehrlichiosis in Bulgaria. *Am J Trop Med Hyg* 60, 58-61.
- Christova I, Schouls L, Van De Pol J, Jinho P, Panayotov S, Lefterova V, Kantardjiev T, Dumler JS (2001) High Prevalence of Granulocytic Ehrlichiae and *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in *Ixodes ricinus* Ticks from Bulgaria. *J Clin Microbiol* 39, 4172-4174.
- Christova I, Van De Pol J, Yazar S, Velo E, Schouls L (2003). Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group *Rickettsiae* in ticks from Southeastern Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 22, 535-542.
- Chunikhin SP (1991) Tick borne encephalitis. *Med Parazitol*,3,52-54
- Ciceroni L, Ciarrocchi S, Simeoni J (1998). Antigenic and genomic analysis of a *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strain isolated from *Ixodes ricinus* ticks in Alto Adige-South Tyrol, Italy. *Eur J Epidemiol*,14, 511-517.

- Ciceroni L., S. Ciarrocchi (1998) Lyme disease in Italy, 1983-1996. *Microbiologica*, 21, 407-418.
- Cinco M, Padovan D, Murgia R, Maroli M, Frusteri L, Heldtander M, Johansson K.E, Engvall EO (1997) Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* 35, 3365 - 3366.
- Cinco M, Padovan D, Murgia R, Frusteri L, Maroli M, van de Pol I, Verbeek-De Kruif N, Rijpkema S, Taggi F. (1998). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes ricinus* in central Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 17, 134-135.
- Cinco M., Barbone F, Ciufolini M G., Mascioli M, Anguero Rosenfeld M., Stefanel P., Luzzati R. (2004) Seroprevalence of tick-borne infections in forestry rangers from northeastern Italy. *Clin Microbiol Infect* 10, 1056–1061
- Ciufolini M.G., Verani P., Nicoletti L., Fiorentini C., Bassetti D., Morandini V., Caruso G. (1999). Recent advances in the eco-epidemiology of tick borne encephalitis in Italy. *Alpe Adria Microbiology Journal*, 8, 81-83.
- Cizman M, Avsic-Zupanc T, Petrovec M, Ruzic-Sabljić E, Pokorn M (2000). Seroprevalence of ehrlichiosis, Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis infections in children and young adults in Slovenia. *Wien Klin Wochenschr* 13, 842-5.
- Coleman JL, Gebbia JA, Piesman J, Degen JL, Bugge TH, Benach JL (1997) Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell* 27, 1111-9.
- Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schäfer SM, Vitorino L, Goncalves L, Baptista S, Vieira ML, Cunha C (2004). First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol* 42, 1316-1318.
- Comer JA, Nicholson WL, Olson JG, Childs JE(1999) Serologic testing for human granulocytic ehrlichiosis at a national referral center. *J Clin Microbiol* 37, 558-564.
- Courtney J.W., Kostelnik L.M., Zeidner N.S., Massung R.F. (2004). Multiplex Real-time PCR for *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 42, 3164-3168.
- Craine NG, Nuttall PA, Marriott AC, Randolph SE (1997) Role of grey squirrels and pheasants in the transmission of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, the Lyme disease spirochaete, in the U.K. *Folia Parasitol (Praha)*, 44, 155-160.
- Daniel SA, Manika K, Arvanitidou M, Diza E, Symeonidis N, Antoniadis A.(2002) Serologic evidence of human granulocytic ehrlichiosis, Greece. *Emerg Infect Dis* 8, 643-644.
- Daniels TJ, Battaly GR, Liveris D, Falco RC, Schwartz I.(2002) Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis? *Emerg Infect Dis* 8, 1524-1525.

- De Felici S, Luise R. (2000). Le raccolte di *Ixodes ricinus* in Trentino: Aspetti metodologici. In: Zecche e malattie trasmesse. La situazione in Trentino. Report n.21 del Centro di Ecologia Alpina, pp.112
- De Michelis S, Sewell HS, Collares-Pereira M, Santos-Reis M, Schouls LM, Benes V, Holmes EC, Kurtenbach K. (2000) Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. *J Clin Microbiol* 38, 2128-2133.
- Dehio C., Lanz C., Pohl R., Behrens P., Bermond D., Piemont Y., Pelz K. and A. Sander. (2001). *Bartonella schoenbuchii* sp. nov., isolated from the blood of wild roe deer. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1557-1565.
- Dehio C. (2004). Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 58, 365-390.
- Derdáková M , Halanova M, Stanko M, Stefancikova A, Cislakova L, Pet'ko B (2003) Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from eastern Slovakia. *Ann Agric Environ Med* 10, 269-271.
- Derdáková M, Dudiòák V, Brei B, Brownstein J S, Schwartz I, Fish D (2004) Interaction and Transmission of Two *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto Strains in a Tick-Rodent Maintenance System. *Appl Environ Microbiol* 70, 6783–6788
- Droz S, Chi B, Horn E, Steigerwalt AG, Whitney AM, Brenner DJ (1999). *Bartonella koehlerae* sp. nov., isolated from cats. *J Clin Microbiol* 37, 1117-1122.
- Dumler JS, Dotevall L, Gustafson R, Granström M (1997). A population-based seroepidemiologic study of human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis on the west coast of Sweden. *J Infect Dis.* 175, 720-2.
- Dumler JS, Bakken JS (1998). Human ehrlichioses: newly recognized infections transmitted by ticks. *Annu Rev Med* 49, 201-13
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR (2001). Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:2145-65.
- Dumpis U., Crook D., Oksi J (1998). Tick-Borne Encephalitis. *Clin Infect Dis* 28, 882-890.
- Ebani VV, Cerri D, Fratini F, Ampola M, Andreani E (2007) *Anaplasma phagocytophilum* infection in a fallow deer (*Dama dama*) population in a preserve of central Italy. *New Microbiol*, 30, 161-165.
- Eliasson I. ehrlichiosis, human granulocytic-Sweden. www.heathnet.org/program/promed.html
- Engbaek K, Lawson PA (2004) Identification of *Bartonella* species in rodents, shrews and cats in Denmark: detection of two *B. henselae* variants, one in cats and the other in the long-tailed field mouse. *APMIS*, 112, 336-341

Eremeeva ME, Gerns HL, Lydy SL, Goo JS, Ryan ET, Mathew SS, Ferraro MJ, Holden JM, Nicholson WL, Dasch G.A. and J.E. Koehler. (2007) Bacteremia, fever, and splenomegaly caused by a newly recognized *Bartonella* species. *N Eng J Med* 356, 2381-2387

Escudero R, Barral M, Perez A, Vitutia MM, Garcia-Perez AL, Jimenez S, Sellek RE, Anda P (2000) Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. *J Clin Microbiol* 38, 4026-4033

Eskow E, Rao R.V, Mordechai EE (2001) Concurrent infection of the central nervous system by *Borrelia burgdorferi* and *Bartonella henselae*: evidence for a novel tick-borne disease complex. *Arch neurol* 58, 1357-1364.

Estrada-Pena A., (2001). Distribution, abundance, and habitat preferences of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in northern Spain. *J Med Entomol* 38, 361-370

Estrada-Pena A, Quiez J, Sanchez Acedo C (2004). Species composition, distribution, and ecological preferences of the ticks of grazing sheep in north-central Spain. *Med Vet Entomol* 18, 123-133.

Estrada-Pena A, Santos-Silva MM, (2005). The distribution of ticks (Acari: Ixodidae) of domestic livestock in Portugal. *Exp Appl Acarol*, 36, 233-246.

Fabbi M, Vicari N, Tranquillo M, Pozzi C, Prati P, De Meneghi D, Bertolotti I, Lauzi S, Guiso P, Genchi C (2004) Prevalence of *Bartonella henselae* in stray and domestic cats in different Italian areas: evaluation of the potential risk of transmission of *Bartonella* to humans. *Parassitologia* 46, 127-129.

Falco RC, Fish D (1989). Potential for exposure to tick bites in recreational parks in a Lyme disease endemic area. *Am J Public Health* 79, 12-15.

Favia G, Cancrini G, Carfi A, Grazioli D, Lillini E, Iori A (2001). Molecular identification of *Borrelia valaisiana* and HGE-like *Ehrlichia* in *Ixodes ricinus* ticks sampled in north-eastern Italy: first report in Veneto region. *Parassitologia*, 43, 143-146.

Fernandez-Soto P, Perez-Sanchez R, Encinas-Grandes A (2001) Molecular detection of *Ehrlichia phagocytophila* genogroup organisms in larvae of *Neotrombicula autumnalis* (Acari: Trombiculidae) captured in Spain. *J Parasitol* 87, 1482-1483.

Ferquel E, Garnier M, Marie J, Bernede-Bauduin C, Baranton G, Perez-Eid C, Postic D (2006) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasmatidae* members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. *Appl Environ Microbiol* 72, 3074-3078.

Fingerle V, Goodman JL, Johnson RC, Kurtti TJ, Munderloh UG, Wilske B (1997) Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. *J Clin Microbiol* 35, 3244-7.

Fingerle V, Munderloh UG, Liegl G, Wilske B (1999) Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Med Microbiol Immunol* 188, 145-149.

- Finkelstein JL, Brown TP, O'Reilly KL, Wedincamp J Jr, Foil LD (2002). Studies on the growth of *Bartonella henselae* in the cat flea (*Siphonaptera: Pulicidae*). *J Med Entomol* 39, 915-919.
- Floris R, Yurtman AN, Margoni EF, Mignozzi K, Boemo B, Altobelli A, Cinco M (2008). Detection and identification of Rickettsia Species in the Northeast of Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8, 777-782
- Foil L., Andress E., Freeland R.L., Roy A.F., Rutledge R., Triche P.C. and K.L. O'Reilly. (1998). Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (*Siphonaptera: Pulicidae*) feces. *J Med Entomol* 35, 625-628.
- Földvári, G, Farkas, R, Lakos A (2005) *Borrelia spielmanii* erythema migrans, Hungary. *Emerg Infect Dis* 11: 1794-1795.
- Foley J, Foley P, Jecher M, Swift P, Madigan J (1999) Infection with granulocytic ehrlichia and infestation with the tick vector, *Ixodes pacificus*, in California mountains lions (*Puma concolor*). *J Wild Dis* 35, 703-709.
- Foley J, Kramer V, Weber D (2002) Experimental ehrlichiosis in dusky footed woodrats (*Neotoma fuscipes*) *J Wildl Dis*, 38, 194-198.
- Foley J, Clueit SB, Brown RN (2008). Differential exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in rodent species in northern California. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8,49-55.
- Fournier PE, Grunnenberger F, Jaulhac B, Gastinger G, Raoult D (2000) Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerg Infect Dis*. 6(4):389-92.
- Fournier PE, Allombert C, Supputamongkol Y, Caruso G, Brouqui P, Raoult D (2004). Aneruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. *J Clin Microbiol* 42, 816-8.
- Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey E K, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage A R, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams M D, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Watthey L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fujii C, Cotton M D, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith H O, J. Craig Venter (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390, 580-586.
- Fukunaga M, Hamase A, Okada K, Nakao M (1996) *Borrelia tanukii* sp. nov and *Borrelia turdae* sp.nov found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16 S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol Immunol*, 40, 877-881
- Gasparini P, Di Cosmo L, Gagliano C, Mattiuzzo G, Tabacchi G(2008) INFC – *Le stime di superficie – Risultati per Macroaree e Province*. Inventario Nazionale delle Foreste e dei Serbatoi Forestali di Carbonio. MiPAAF – Ispettorato Generale Corpo Forestale dello Stato, CRA-MPF, Trento
- Gern L(1994) Certainly and uncertainly about ecology, epidemiology and control of Lyme borreliosis. Advances in Lyme borreliosis research. Ceverini R., Sambri V., La Placa M.(eds) *Proceedings of the VI Int. Conf. Lyme borreliosis*, 199-204.

- Gern L, Rais O (1996) Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) *J Med Entomol* 33, 189-192
- Gern L, Rouvinez E, Toutoungi LN, Godfroid E (1997). Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland. *Folia Parasitol (Praha)* 44, 309-314
- Gern L, Hu CM, Kocianova E, Vyrosteckova V, Rehacek J (1999) Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *Eur J Epidemiol* 15, 665-669.
- Ginsberg HS, Zhioua E, Mitra S, Fischer J, Buckley PA, Verret F, Underwood HB, Buckley FG (2004). Woodland type and spatial distribution of nymphal *Ixodes scapularis* (Acari:Ixodidae). *Env Entomol* 33, 1266-1273.
- Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Greene C, Glaus B, Wolfensberger C, Lutz H (1997). Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. *J Clin Microbiol* 35, 2883-2885
- Goodman JL, MDC Nelson, BAB Vitale, JE Madigan, JS Dumler, TJ Kurtti, UG Munderloth, 1996. Direct cultivation of the causative agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *N Engl J Med*, 334, 209-215.
- Grasikova M, Sekeyova M, Stupalova, Necas S (1975). Sheep milk borne epidemic of tick borne encephalitis in Slovakia. *Intervirology*, 5, 57-61
- Gray JS, Kirstein F, Robertson JN, Stein J, Kahl O (1999). *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in a recreational park in south-western Ireland. *Exp Appl Acarol* 23, 717-729.
- Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA (2003). Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res*, 57, 129-146.
- Grzeszczuk A, Karbowski G, Ziarko S, Kovalchuk O (2006). The root-vole *Microtus oeconomus* (Pallas, 1776): a new potential reservoir of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6, 240-243
- Grzeszczuk A, Stanczak J (2006) Highly variable year-to-year prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in northeastern Poland: a 4-year follow-up. *Ann N Y Acad Sci* 1078, 309-11.
- Guerrero A, Losada I, de Lucas S, Oteo JA (2001) Ehrlichiosis infection prevalence in Spain or cross reactions *J Med Clin (Barc)* 116, 315.
- Gundi V.A., Davoust B., Khamis A., Boni M., Raoult D. and B. La Scola. (2004). Isolation of *Bartonella rattimassiliensis* sp. nov. and *Bartonella phoceensis* sp. nov. from European *Rattus norvegicus*. *J Clin Microbiol* 42, 3816-3818.
- Haglund M., Forsgren M., Lindh G., Lindquist L (1996). A 10 year follow-up study of tick borne encephalitis in the Stockholm area and a review of the literature and a review of the literature: need for a vaccination strategy. *Scan J Infect Dis*, 28, 217-224.

- Halos L, Jamal T, Maillard R, Beugnet F, Le Menach A, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M (2005) Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp. *Vet Res* 36, 79-87.
- Hanincova K, Taragelova V, Koci J, Schafer SM, Hails R, Ullmann AJ, Piesman J, Labuda M, Kurtenbach K (2003a). Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. *Appl Environ Microbiol* 69, 2825-30.
- Hanincova K, Schafer SM, Etti S, Sewell HS, Taragelova V, Ziak D, Labuda M, Kurtenbach K (2003b) Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology*, 126, 11-20.
- Heller R, Riegel P, Hansmann Y, Delacour G, Bermond D, Dehio C, Lamarque F, Monteil H, Chomel B, Piémont Y (1998). *Bartonella tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats. *Int J Syst Bacteriol* 48 (4): 1333-1339.
- Heller R., Kubica M., Mariet P., Riegel P., Delacour G., Dehio C., Lamarque F., Kasten R., Boulouis H.J., Monteil H., Chomel B. and Y. Piémont. (1999). *Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits. *Int J Syst Bacteriol* 49, 283-288.
- Higgins J.A., Radulovic S., Jaworski D.C. and A.F. Azad. (1996). Acquisition of the cat scratch disease agent *Bartonella henselae* by cat fleas (*Siphonaptera: Pulicidae*). *J Med Entomol* 33, 490-495.
- Hoffmann H, Kunz C, Heinz FX (1984). Laboratory diagnosis of tick borne encephalitis. *Archiv Virol*, suppl. 1, 153-159.
- Holden K, Boothby JT, Kasten RW, Chomel BB (2006) Co-detection of *Bartonella henselae*, *Borrelia burgdorferi*, and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes pacificus* ticks from California, USA. *Vector Borne Zoonotic Dis* 6 (1): 99-102.
- Horowitz HW, Aguero-Rosenfeld ME, McKenna DF, Holmgren D, Hsieh TC, Varde SA, Dumler SJ, Wu JM, Schwartz I, Rikihisa Y, Wormser GP (1998) Clinical and laboratory spectrum of culture-proven human granulocytic ehrlichiosis: comparison with culture-negative cases. *Clin Infect Dis*. 27, 1314-1317.
- Hosmer DW, Lemeshow S, (2000). Applied Logistic Regression-2nd edition, eds John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Hovius KE, Beijer B, Rijpkema SG, Bleumink-Pluym NM, Houwers DJ (1998). Identification of four *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in *Ixodes ricinus* ticks collected from Dutch dogs. *Vet Q* 20, 143-145.
- Hubalek Z, Halouzka J (1997) Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur J Epidemiol* 13, 951-957.
- Hubalek Z., Halouzka J., Juricova Z (2003). Host-seeking activity of ixodid ticks in relation to weather variables. *J Vector Ecol* 28, 159-165.
- Hudson PJ, Rizzoli A, Rosà R, Chemini C, Jones LD, Gould EA (2001). Tick borne encephalitis virus in northern Italy: molecular analysis, relationships with density and seasonal dynamics of *Ixodes ricinus*. *Med Vet Entomol* 15, 304-313.

- Huegli D, Hu CM, Humair PF, Wilske B., Gern L (2002) *Apodemus* Species Mice Are Reservoir Hosts of *Borrelia garinii* OspA Serotype 4 in Switzerland. *J Clin Microbiol* 40, 4735–4737
- Humair PF, Gern L (1998). Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Trop* 69, 213-227.
- Jacomo V, Kelly P.J. and D. Raoult. (2002). Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 8-18.
- Jado I, Oteo JA, Aldámiz M, Gil H, Escudero R, Ibarra V, Portu J, Portillo A, Lezaun MJ, Garcia-Amil C, Rodriguez-Moreno I, Anda P (2007) *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerg Infect Dis* 13, 1405-1407.
- Jenkins A, Kristiansen B-E, Allum A-G, Aakre R K, Strand L, Kleveland E J, Van De Pol I Schouls L (2001) *Borrelia Burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. in *Ixodes* ticks from Southern Norway . *J Clin Microbiol* 39, 3666-3671
- Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, Kordick DL, Breitschwerdt EB (2000) Rapid Identification and Differentiation of *Bartonella* Species Using a Single-Step PCR Assay. *J Clin Microbiol* 38, 1717-1722
- Johnson RC, Schmid GP, Hyde FH, Steigerwald AG, Berenner DJ (1984) *Borrelia burgdorferi* sp.nov:etiologic agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol* 34, 496-497.
- Junttila J, Peltomaa M, Soini H., Marjamaki M, Viljanen MK, (1999). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. *J Clin Microbiol* 37, 1361-1365.
- Kahl O, Janetzki-Mittmann C, Gray JS, Jonas R, Stein J, de Boer R (1998). Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. *Zentralbl Bakteriol* 287, 41-52
- Kahl O, Gern L., Eisen L, Lane R.S (2002). Ecological research on *Borrelia burgdorferi* sensu lato: terminology and some methodological pitfalls. In: Gray JS, Lane RS, Stanek G (Eds). Lyme borreliosis: Biology, Epidemiology and Control, 29-46
- Kaiser R (1996) Tick-borne encephalitis in southwestern Germany. *Infection* 5, 398-399
- Karlsson U, Bjöersdorff A, Massung RF, Christensson B (2001) Human granulocytic ehrlichiosis—a clinical case in Sweden. *Scand J Infect Dis*, 33, 73-74.
- Kawabata H, Masuzawa T, Yanagihara Y (1993). Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol.* 37, 843-848
- Kelly P.J., Rolain J.M., Maggi R., Sontakke S., Keene B., Hunter S., Lepidi H., Breitschwerdt K.T. and E.B. Breitschwerdt. (2006). *Bartonella quintana* endocarditis in dogs. *Emerg Infect Dis* 12, 1869-1872.
- Ketring KL, Zuckerman EE, Hardy Jr. W.D. (2004). *Bartonella*: a new etiological agent of feline ocular disease. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 40 (1): 6-12.

Kim CM, Kim JY, Yi YH, Lee MJ, Cho MR, Shah DH, Klein TA, Kim HT, Song JW, Chong ST, O'Guinn ML, Lee JS, Lee IY, Park JH, Chae JS (2005) Detection of Bartonella species from ticks, mites and small mammals in Korea. *J Vet Sci* 6, 327-334.

Kitchell BE, Fan TM, Kordick D, Breitschwerdt EB, Wollenberg G, Lichtensteiger CA (2000) Peliosis hepatitis in a dog infected with *Bartonella henselae*. *J Am Vet Med Assoc* 216, 519-523.

Koizumi N, Imai Y (2004). New genomospecies related to *Borrelia valaisiana*, isolated from mammals in Okinawa archipelago, Japan. *J Med Microbiol* 53, 421-426.

Kordick DL, Hilyard EJ, Hadfiel TL, Wilson KH, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Breitschwerdt EB (1997) *Bartonella clarridgeiae*, a new recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). *J Clin Microbiol* 35, 1813-1818.

Kosik-Bogacka D, Kuzna-Grygiel W., Bukowska K (2004). The prevalence of spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks *Ixodes ricinus* and mosquitoes *Aedes* spp. within a selected recreational area in the city of Szczecin. *Ann Agric Environ Med*, 11, 105-108.

Kosoy M., Murray M, Gilmore RD, Bai Y, Gage. K L (2003). *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient. *J Clin Microbiol* 41, 645-650.

Kramer VL, Randolph MP, Hui LT, Irwin WE, Gutierrez AG, Vugia DJ (1999). Detection of the agents of human ehrlichioses in ixodid ticks from California. *Am J Trop Med Hyg* 60, 62-65.

Kurtenbach K, Peacey M, Rijpkema SG, Hoodless AN, Nuttall PA, Randolph SE (1998). Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl Environ Microbiol* 64, 1169-74.

Kurtenbach K, De Michelis S, Sewell HS, Etti S, Schafer SM, Hails R, Collares-Pereira M, Santos-Reis M, Hanincova K, Labuda M, Bormane A, Donaghy M (2001). Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl Environ Microbiol* 67, 4926-4929.

Kurtenbach K, De Michelis S, Etti S, Schfer SM, Sewell HS, Brade V, Kraiczky P (2002a). Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato--the key role of host complement. *Trends Microbiol* 10, 74-9.

Kurtenbach K, De Michelis S, Sewell HS, Etti S, Schafer SM, Holmes E, Hails R, Collares-Pereira M, Santos-Reis M, Hanincova K, Labuda M, Bormane A, Donaghy M. (2002b). The key roles of selection and migration in the ecology of Lyme borreliosis. *Int J Med Microbiol* 291 Suppl 33, 152-154.

Labuda M, Jones LD, Williams T, Danieova V, Nuttall PA (1993). Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between co-feeding ticks. *J Med Entomol*, 30, 295-299.

Labuda M, Kozuch O, Zuffova E., Elekova E., Hails R.S., Nuttall, P.A (1997). Tick borne encephalitis transmission between ticks co-feeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology*, 235, 138-143.

- Lam TT, Nguyen TP, Montgomery RR, Kantor FS, Fikrig E, Flavell RA (1994) Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infect Immun* 62, 290-298.
- Lane RS (1996) Risk of human exposure to vector ticks (Acari: Ixodidae) in a heavily used recreational area in northern California. *Am J Trop Med Hyg* 57, 634.
- Lapini L (2005). Check-list e trattazione delle specie presenti nel Friuli Venezia Giulia. In : Regione FVG. Piano Pluriennale di Gestione Faunistica, eds. Benussi E, 101-113.
- Lappin MR, Black JC (1999). *Bartonella* spp. infection as a possible cause of uveitis in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 214, 1205-1207.
- Lawson PA, Collins MD (1996). Description of *Bartonella clarridgeiae* sp. nov. isolated from the cat of a patient with *Bartonella henselae* septicemia. *Med Microbiol Lett* 5, 64-73.
- Le Fleche A, Postic D, Giradet K, Peter O, Baranton G (1997) Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp.nov. by 16 ribosomal DNA sequenze analysis. *Int J System Bacteriol* 47, 921-925
- Lebech AM, Hansen K, Pancholi P, Sloan LM, Magera JM, Persing DH (1998). Immunoserologic evidence of Human Granulocytic Ehrlichiosis in Danish patients with Lyme neuroborreliosis. *Scand J Infect Dis*, 30, 173-176
- Lee SH, JH Lee, HS Park, WJ Jang, SE Koh., YM Yang, BJ Kim, YH Kook, KH Park (2003). Differentiation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato through groEL gene analysis. *FEMS Microbiol. Lett* 222, 51-57.
- Leuba-Garcia S, Kramer MD, Wallich R, Gern L (1994) Characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from different organs of *Ixodes ricinus* ticks collected in nature. *Zentralbl Bakteriologie*. 280, 468-75.
- Leuba-Garcia S, Martinez R, Gern L (1998). Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks and in the skin of mice. *Zentralbl Bakteriologie*. 287, 475-84.
- Leutenegger CM, Pusterla N, Mislin CN, Weber R, Lutz H (1999) Molecular evidence of coinfection of ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and the human granulocytic ehrlichiosis agent in Switzerland. *J Clin Microbiol*. 37, 3390-1.
- Libikova H (1981). Epidemiological and clinical aspects of tick-borne encephalitis in reaction to multiple viral infections. In: Proceedings of tick-borne encephalitis, an international symposium (Baden) 235-246.
- Lombini A. (2004). La riserva Naturale Orientata Bosco della Frattona. In: Imola, la città verde. Eds. La Mandragola, Imola, Italy.
- Lotric-Furlan S, Petrovec M, Avsic-Zupanc T, Nicholson WL, Sumner JW, Childs JE, Strle F (1998) Human ehrlichiosis in central Europe. *Wien Klin Wochenschr* 23, 894-7.
- Lucey D, Dolan MJ, Moss CW, Garcia M, Hollis DG, Wegner S, Morgan G, Almeida R, Leong D Greisen KS (1992) Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations. *Clin Infect Dis* 14, 683-688.

- Macleod J e Gordon WS (1993). Studies on tick-borne fever in sheep I: transmission by the tick *Ixodes ricinus* and description of the disease produced. *Parasitology*, 25, 273-283.
- Magnarelli LA, Anderson JF, Fish D (1987) Transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). *J Infect Dis* , 156, 234-236.
- Magnarelli LA, Anderson JF (1988). Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 26, 1482-1486.
- Magnarelli LA, Anderson JF, Levine HR, Levy SA (1990) Tick parasitism and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in cats. *J Am Vet Med Assoc* 197, 63-66.
- Magnarelli LA, Denicola A, Stafford 3rd KC, Anderson JF (1995). *Borrelia burgdorferi* in an urban environment: white-tailed deer with infected ticks and antibodies. *J Clin Microbiol*, 33, 541-544.
- Magnarelli LA, Dumler JS, Anderson JF, Johnson RC, Fikrig E.(1995) Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis, and Lyme borreliosis in human sera. *J Clin Microbiol* 33, 3054-3057.
- Magnarelli LA, Ijdo JW, Van Andel AE, Wu C, Padula SJ, Fikrig E (2000) Serologic confirmation of *Ehrlichia equi* and *Borrelia burgdorferi* infections in horses from the northeastern United States. *J Am Vet Med Assoc* 217, 1045-1050.
- Maillard R., Riegel P., Barrat F., Bouillin C., Thibault D., Gandoin C., Halos L., Demanche C., Alliot A., Guillot J., Piemont Y., Boulouis H.J. and M. Vayssier-Taussat. (2004). *Bartonella chomelii* sp. nov., isolated from French domestic cattle (*Bos taurus*). *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 215-220.
- Manilla G, Iori A, (1992). Chiave Illustrata delle zecche d'Italia II. Stadi ninfali della specie della sottofamiglia Ixodidae (Acari, Ixodidae, Ixodidae). *Parassitologia*, 34, 37-45.
- Mannelli A, Cerri D, Buffrini L, Rossi S, Rosati S, Arara T, Innocenti M, Grignolo MC, Bianchi G, Iori A, Tolari F (1999). Low risk of Lyme borreliosis in a protected area on the Tyrrhenian coast, in central Italy. *Eur J Epidem* 15, 371-377.
- Mannelli A, Boggiatto G, Grego E, Cinco M, Murgia R, Stefanelli S, De Meneghi D, Rosati S, (2003) Acarological risk of exposure to agents of tick-borne zoonoses in the first recognized Italian focus of Lyme borreliosis. *Epidemiol Infect* 131, 1139-1147.
- Mansueto P, Di Lorenzo G, Rizzo M, Mazzola G, Affronti M, Battista Rini G, Mansueto S (2003). Bartonellosis. *Recenti Prog Med* 94, 177-185.
- Mantelli B, Pecchioli E, Hauffe HC, Rosa R, Rizzoli A (2006) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Anaplasma phagocytophilum* in the wood tick *Ixodes ricinus* in the Province of Trento, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 25, 737-739.
- Marano N, Jameson P, Marston E, Jones D, Greene C, Regnery RL (1999). A third *Bartonella* species isolated from domestic cats, *Bartonella weissii*, sp. nov. *Unpublished data*
- Maraspin V, Cimperman J, Lotric-Furlan S, Logar M, Ruzić-Sabljić E, Strle F (2006) Erythema migrans in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 15, 42, 1751-1754

- Marconi RT, Liveris D, Schwartz I (1995) Identification of novel insertion elements, restriction fragments length polymorphism patterns and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp.nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp.nov) isolates. *J Clin Microbiol* 30, 2427-2434
- Margileth A.M. (1993). Cat scratch disease. *Adv Pediatr Infect Dis* 8, 1-21.
- Márquez FJ (2008) Spotted fever group Rickettsia in ticks from southeastern Spain natural parks. *Exp Appl Acarol* 45, 185-194.
- Masuzawa T, Takada N, Kudeken M, Fukui T, Yano Y, Ishiguro F, Kawamura Y, Imai Y, Ezaki T (2001). *Borrelia sinica* sp. Nov., a Lyme disease related *Borrelia* species isolated in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1817-1824.
- Matuschka FR, Fischer P, Heiler M, Blümcke S, Spielman A (1992) Stage-associated risk of transmission of the Lyme disease spirochete by European Ixodes ticks. *Parasitol Res* 78, 695-8.
- Matuschka FR, Endepols S, Richter D, Ohlenbusch A, Eiffert H, Spielman A (1996) Risk of urban Lyme disease enhanced by the presence of rats. *J Infect Dis* 174, 1108-1111.
- Matuschka FR, Allgöwer R, Spielman A, Richter D (1999) Characteristics of garden dormice that contribute to their capacity as reservoirs for lyme disease spirochetes. *Appl Environ Microbiol.* 65, 707-711.
- Mexas AM, Hancock SI, Breitschwerdt EB (2002). *Bartonella henselae* and *Bartonella elizabethae* as potential canine pathogens. *J Clin Microbiol* 40, 4670-4674.
- Mingqum L, Rikihisa Y (2003) Ehrlichia chaffensis and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for Lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infect Immun*, 71, 5324-5331.
- Misic-Majerus LJ, Bujic N, Madjaric V, Janes-Poje V (2000) First description of the human granulocytic ehrlichiosis in Croatia. *Clin Microbiol Infect*, 6(suppl 1), 194-195.
- Morales S.C., Breitschwerdt E.B., Washabau R.J., Matisse I., Maggi R.G. and A.W. Duncan. (2007). Detection of *Bartonella henselae* DNA in two dogs with pyogranulomatous lymphadenitis. *J Am Vet Med Assoc* 230, 681-685.
- Morozova OV, Dobrotvorskyy AK, Livanova NN, Tkachev SE, Bakhvalova VN, Beklemishev AB, Cabello FC (2002). PCR detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, tick-borne encephalitis virus, and the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes persulcatus* ticks from Western Siberia, Russia. *J Clin Microbiol*, 40, 3802-4.
- Morozova OV, Cabello FC, Dobrotvorskyy AK (2004). Semi-nested PCR detection of *Bartonella henselae* in *Ixodes persulcatus* ticks from western Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 4, 306-309.
- Mura A, Masala G, Tola S, Satta G, Fois F, Piras P, Rolain J-M, Raoult D, Parola P (2008) First direct detection of rickettsial pathogens and a new rickettsia, “*Candidatus Rickettsia barbarie*”, in ticks from Sardinia, Italy. *Clin Microbiol Infect*, 14, 1028-1033.

- Nanni C (2004) Parchi in città. In: Imola, la città verde. Eds: La Mandragola, Imola, Italy.
- Nanni C, Sabattani C (2004) Parco Tozzoni. In: Imola, la città verde. Eds: La Mandragola, Imola, Italy.
- Nicholson WL, Comer JA, Sumner JW, Gingrich-Baker C, Coughlin RT, Magnarelli LA, Olson JG, Childs JE (1997). An indirect immunofluorescence assay using a cell culture-derived antigen for detection of antibodies to the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 35, 1510-6.
- Nijhof AM, Bodaan C, Postigo M, Nieuwenhuijs H, Opsteegh M, Franssen L, Jebbink F, Jongejan F (2007) Ticks and Associated Pathogens Collected from Domestic Animals in the Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007 Nov 2, in print
- Nilsson K, Lindquist O, Pahlson C (1999). Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet* 354, 1169-1173.
- Nilsson K, Pahlson C, Lukinius A, Erikson L, Nilsson L, Lindquist O (2002). Presence of *Rickettsia helvetica* in granulomatous tissue from patients with sarcoidosis. *J Infect Dis* 185, 1128-1138.
- Noah DL, Bresee JS, Gorenssek MJ, Rooney JA, Cresanta JL, Regnery RL, Wong J, del Toro J, Olson JG, Childs JE (1995). Cluster of five children with acute encephalopathy associated with cat-scratch disease in south Florida. *Pediatr Infect Dis J* 14, 866-869.
- Norris SJ, Carter CJ, Howell JK, Barbour AG (1992). Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect Immun* 60, 4662-4672.
- Nuti M, Serafini DA, Bassetti D, Ghionni A, Russino F, Rombol P, Macri G, Lillini E (1998). Ehrlichia Infection in Italy *Emerg Infect Dis*, 4, 663-665.
- Ogden NH, Bown K, Horrocks BK, Woldehiwet Z, Bennett M (1998) Granulocytic Ehrlichia infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Med Vet Entomol*, 12, 423-429.
- Ohnishi J, Piesman J, de Silva AM (2001) Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16, 98, 670-5.
- Olsen B, Duffy DC, Jaenson TG, Gylfe A, Bonnedahl J, Bergstrom S (1995). Transhemispheric exchange of Lyme disease spirochetes by seabirds. *J Clin Microbiol* 33, 3270-4.
- Oteo JA, Blanco JR, Martínez de Artola V, Ibarra V (2000) First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europe (Spain). *Emerg Infect Dis* 6, 430-432.
- Oteo JA, Gil H, Barral M, Pérez A, Jimenez S, Blanco JR, Martinez de Artola V, García-Pérez A, Juste RA (2001). Presence of granulocytic ehrlichia in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain. *Epidemiol Infect* 127, 353-358.
- Paolucci P (1997). Aspetti ecologici dei micromammiferi negli ecosistemi naturali. Parchi. Rivista del Coordinamento Nazionale dei Parchi e delle Riserve Naturali, 21.

Parola P, Beati L, Cambon M, Raoult D, (1998) First isolation of *Rickettsia helvetica* from *Ixodes ricinus* ticks in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 17, 95-100.

Pecchioli E, Hauffe HC, Tagliapietra V, Bandi C, Genchi C, Rizzoli A (2007) Genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from the Autonomous Province of Trento, Italy. *Int J Med Microbiol*, 297, 53-59.

Perini G (2000). Tre anni di ndagine sull'ecologia della zecca *Ixodes ricinus* ai laghi di Lamar; comune di Terlago, Trento. In: Zecche e malattie trasmesse. La situazione in Trentino. Report n.21 del Centro di Ecologia Alpina., pp.112.

Pet'ko B, Tresova G, Stefancikova A, Peterkova J, Prokopcakova H, Cislakova L, Stanko M, Fricova J, Skardova I, Sesztakova E, Nadzamova D (1998). Epidemiology of Lyme borreliosis in Slovakia. *Wiad Parazytol*, 44, 391.

Petrovec M, Lotric Furlan S, Zupanc TA, Strle F, Brouqui P, Roux V, Dumler JS (1997) Human disease in Europe caused by a granulocytic Ehrlichia species. *J Clin Microbiol*, 35, 1556-1559.

Petrovec M, Sixl W, Schweiger R, Mikulasek S, Elke L, Wüst G, Marth E, Strasek K, Stünzner D, Avsic-Zupanc T. (2003a) Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophilum* in Austria and the Czech Republic. *Ann N Y Acad Sci* 990,103-106.

Petrovec M, Sixl W, Marth E, Bushati N, Wüst G (2003b) Domestic animals as indicators of *Anaplasma* species infections in Northern Albania. *Ann N Y Acad Sci* 990,112-115.

Piccolin G., G. Benedetti, C. Doglioni, C. Lorenzato, S. Mancuso, N. Papa, L. Pitton, M.C. Ramon, C. Zasio, G. Berciato (2006) A study of the presence of *B. burgdorferi*, *Anaplasma* (previously Ehrlichia) *phagocytophilum*, *Rickettsia*, and *Babesia* in *Ixodes ricinus* collected within the territory of Belluno, Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 6, 24-31.

Podsiadly E, Chmielewski T, Marczak R, Sochon E, Tylewska-Wierzbanowska S. (2007). *Bartonella henselae* in the human environment in Poland. *Scand J Infect Dis*, 39, 956-962.

Podsiadly E, Tylewska-Wierzbanowska S (2008) Prevalence of *Bartonella* spp. in the reservoir and vectors in Poland. *Postepy mikrobiol* 47, 275-281.

Pogodina V (1960) Experimental study of the pathogenesis of tick borne encephalitis on alimentary infection. II. Study of pathway s of excretion of virus from white mice. *Prob Virol*, 5, 304-310.

Polin H, Hufnagl P, Haunschmid R, Gruber F, Ladurner G (2004) Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria. *J Clin Microbiol* 42, 2285-2286.

Postic D, Ras NM, Lane RS, Hendson M, Baranton G (1998). Expanded diversity among Californian borrelia isolates and description of *Borrelia bissettii* sp.nov (formerly *Borrelia* group DN127). *J Clin Microbiol* 36, 3497-3504.

Poupon MA, Lommano E, Humair PF, Douet V, Rais O, Schaad M, Jenni L, Gern L (2006) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Ticks Collected from Migratory Birds in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 72, 976-979

Pusterla N, Weber R, Wolfensberger C, Schär G, Zbinden R, Fierz W, Madigan JE, Dumler JS, Lutz H (1998) Serological evidence of human granulocytic ehrlichiosis in Switzerland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17, 207-209

Pusterla N, Leutenegger CM, Huder JB, Weber R, Braun U, Lutz H (1999) Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. *J Clin Microbiol* 37, 1332-1334

Pusterla N, Chang CC, Chomel B, Chae J-S, Foley J, Madigan J (2000) Serologic and molecular evidence of Ehrlichia spp. in coyotes in California. *J Wild Dis*, 36, 494-499

R Development Core Team (2006) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>

Ramelow C.S. J, Berndt D., Roggendolf M., Schreir E (1993). Detection of tick borne encephalitis virus RNA in ticks by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 45, 115-119.

Randolph SE, Gern L, Nuttall PA (1996) Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol Today*, 12, 472-479

Randolph SE, Miklisova D, Lysy J, Rogers DJ, Labuda M. (1999). Incidence from coincidence: pattern of tick infestation on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus. *Parasitology*, 118, 177-186.

Randolph SE (2001). The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Phil Trans R Soc Lond B* 356, 1045-1056

Randolph SE (2008). Dynamics of tick –borne disease systems: minor role of recent climate change. *Rev sci tech Off int Epiz*, 27, 367-381

Raoult D, Roux V (1997). Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious disease. *Clin Microbiol Rev* 10, 694-719.

Rauter C, Hartung T (2004) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe- a Metaanalysis. In: Detection of Borrelia infection in ticks and humans. Dissertation, Università di Constanza, 29-47.

Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD, (1991) Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol*, 173, 1576-89

Regnery RL, Anderson BE, Clarridge JE III, Rodriguez-Barradas M, Jones DC, Carr JH (1992). Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol* 30, 265–274

Richter PJ, Kimsey RB, Madigan JE, Barlough JE, Dumler JS, Brooks DL (1996). *Ixodes pacificus* (Acari:Ixodidae) as a vector of *Ehrlichia equi* (Rickettsiales: Ehrlichiae). *J Med Entomol*, 33, 1-5

Richter D, Schlee DB, Allgower R, Matuschka FR (2004). Relationship of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmanii* sp. nov. with its hosts in central Europe. *Appl Environ Microbiol* 70, 6414-6419.

- Richter D, Matuschka FR (2006) Perpetuation of the Lyme Disease Spirochete *Borrelia lusitaniae* by Lizards. *Appl Environ Microbiol*, 72, 4627–4632
- Rijpkema SG, Tazelaar DJ, Molkenboer MJ, Noordhoek GT, Plantinga G, Schouls LM, Schellekens JF (1997) Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin Microbiol Infect* 3, 109-116.
- Rizzoli A, Tagliapietra V, Chemini C, Lui A, Genchi C (2000). Caratteristiche biologiche e ruolo patogeno delle zecche. In: Zecche e malattie trasmesse. La situazione in Trentino. Report n.21 del Centro di Ecologia Alpina, pp.112
- Rizzoli A, Merler S, Furlanello C, Genchi C (2002) Geographical Information Systems and bootstrap aggregation (Bagging) of tree Based classifiers for Lyme Disease risk prediction in Trentino, Italian Alps. *J Med Entomol*, 39, 485-492.
- Rizzoli A., Rosà R., Mantelli B., Pecchioli E., Hauffe H., Tagliapietra V., Beninati T., Neteler M., Genchi C. (2004). *Ixodes ricinus*, malattie trasmesse e reservoirs. *Parassitologia* 46, 119-122.
- Rizzoli A, Hauffe HC, Tagliapietra V, Neteler M, Rosà R (2009). Forest structure and roe deer abundance predict tick-borne encephalitis risk in Italy. *PLoS ONE* 4 (2):e4336. doi:10.1371/journal.pone.0004336
- Robertson J, Murdoch S, Foster L, Green S (1999) Isolation and species typing of Lyme borreliosis spirochaetes from UK patients with erythema migrans. *Eur J Epidemiol* 15, 499-500.
- Rolain J.M., Chanet V., Laurichesse H., Lepidi H., Beytout J. and D. Raoult. (2003) Cat scratch disease with lymphadenitis, vertebral osteomyelitis, and spleen abscesses. *Ann N Y Acad Sci* 990, 397-403.
- Roux V, Fournier PE, Raoult D (1996) Differentiation of spotted group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. *J Clin Microbiol* 34, 2058-2065.
- Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D (1997) Citrate Synthase Gene Comparison, a New Tool for Phylogenetic Analysis, and its application for the Rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol* 47, 252-261
- Sadziene A, Wilske B, Ferdows MS, Barbour AG (1993) The cryptic ospC gene of *Borrelia burgdorferi* B31 is located on a circular plasmid. *Infect Immun* 61, 2192-2195.
- Sonogo YO, Zeaiter Z, Caruso G, Merola F, Shpynov S, Brouqui P, Raoult D (2003a). *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. *Emerg Infect Dis* 9, 329-332
- Sonogo YO, Parola P, Shpynov S, Camicas JL, Brouqui P, Caruso G, Raoult D (2003 b) Genetic diversity of bacterial agents detected in ticks removed from asymptomatic patients in northeastern Italy. *Ann N Y Acad Sci* 990, 182-190.
- Santino I, del Piano M, Sessa R, Favia G, Iori A (2002) Detection of four *Borrelia burgdorferi* genospecies and first report of human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks collected in central Italy. *Epidemiol Infect*, 129, 93-97.

- Santino I, Iori A, Nicoletti M, Valletta S, Cimmino C, Scoarughi GL, Santapaola D, Sessa R, Del Piano M (2003) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomospecies and of the human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent in *Ixodes ricinus* ticks collected in the area of Monti Lepini, Italy. *Int J Immunopathol Pharmacol* 16, 105-108.
- Santos-Silva MM, Sousa R, Santos AS, Melo P, Encarnação V, Bacellar F (2006) Ticks parasitizing wild birds in Portugal: detection of *Rickettsia aeschlimannii*, *R. helvetica* and *R. massiliae*. *Exp Appl Acarol* 39, 331-338.
- Schouls LM, Van De Pol I, Rijpkema SG, Schot CS (1999) Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 37, 2215-2222.
- Schwaiger M, Cassinotti P (2003) Development of a quantitative real time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol* 27, 136-145.
- Shpynov S, Fournier PE, Rudakov N, Tarasevich I, Raoult D (2006) Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia. *Ann N Y Acad Sci* 1078, 378-383
- Simser JA, Palmer AT, Fingerle V, Wilske B, Kurtti TJ, Munderloh UG (2002) *Rickettsia monacensis* sp.nov., a spotted Fever Group *Rickettsia*, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park. *Appl Environ Microbiol*, 68, 4559-4566.
- Skarphedinsson S, Jensen PM, Kristiansen K (2005) Survey of tickborne infections in Denmark. *Emerg Infect Dis* 11, 1055-1061.
- Skarphedinsson S, Lyholm BF, Ljungberg M, Sagaard P, Kolmos HJ, Nielsen LP (2007) Detection and identification of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia helvetica* in Danish *Ixodes ricinus* ticks. *APMIS* 115, 225-230.
- Skoracki M, Michalik J, Skotarczak B, Rymaszewska A, Sikora B, Hofman T, Wodecka B, Sawczuk M (2006) First detection of *Anaplasma phagocytophilum* in quill mites (Acari: *Syringophilidae*) parasitizing passerine birds. *Microbes Infect*, 8, 303-307.
- Skotarczak B, Wodecka B, Cichocka A (2002) Coexistence DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland. *Ann Agric Environ Med* 9, 25-28.
- Skotarczak B, Adamska M, Rymaszewska A, Suproń M, Sawczuk M, Maciejewska A (2004) *Anaplasma phagocytophila* and protozoans of *Babesia* genus in dogs from endemic areas of Lyme disease in north-western Poland *Wiad Parazytol* 50, 555-561.
- Skotarczak B, Rymaszewska A, Wodecka B, Sawczuk M, Adamska M, Maciejewska A (2006) PCR detection of granulocytic *Anaplasma* and *Babesia* in *Ixodes ricinus* ticks and birds in west-central Poland. *Ann Agric Environ Med* 13, 21-23.

- Sréter T, Kálmán D, Sréter-Lancz Z, Széll Z, Egyed L (2005) *Babesia microti* and *Anaplasma phagocytophilum*: two emerging zoonotic pathogens in Europe and Hungary. *Orv Hetil* 27;146, 595-600
- Sréter-Lancz Z, Sréter T, Széll Z, Egyed L (2005) Molecular evidence of *Rickettsia helvetica* and *R.monacensis* infections in *Ixodes ricinus* from Hungary. *Ann Trop Med Parasitol*. 99, 325-330
- Stańczak J, Gabre RM, Kruminis-Łozowska W, Racewicz M, Kubica-Biernat B (2004) *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann Agric Environ Med* 11, 109-114.
- Stanko M, Krasnov BR, Miklisova D, Morand S (2007) Simple epidemiological model predicts the relationships between prevalence and abundance in ixodid ticks. *Parasitology*, 134, 59-68.
- Steere AC, Malawista SE, Hardin JA, Ruddy S, Askenase PW, Andiman WA (1977). Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis:the enlarging clinical spectrum. *Ann Intern Med* 86, 685-698.
- Stuen S, Van De Pol I, Bergstrom K, Schouls LM (2002) Identification of *Anaplasma phagocytophila* varians in blood from sheep in Norway. *J Clin Microbiol* 40, 3192-3197.
- Stuen S, Moum T, Bernhoft A, Vene S (2006) A parietic condition in a *Anaplasma phagocytophilum* infected roe deer calf. *J Wild Dis*, 42, 170-174.
- Sumption KJ, Wright DJ, Cutler SJ, Dale BA (1995) Human ehrlichiosis in the UK. *Lancet* 2, 346, 1487-8.
- Talleklint L, Jaenson TG (1994) Transmission of *Borrelia burgdorferi* s.l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in Sweden. *J Med Entomol* 31, 880-886
- Talleklint L, Jaenson TG (1996) Relationship between *Ixodes ricinus* density and prevalence of infection with Borrelia-Like spirochetes and density of infected ticks. *J Med Entomol*, 33, 805-811.
- Tarello W (2005) Microscopic and clinical evidence for *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* infection in Italian cats. *Vet Rec* 156, 772-774
- Telford SR, Dawson JE, Katavlos P, Warner CK, Kolbert CP, Persing DH (1996). Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proceeding of Natural Academic Science USA*, 93, 6209-6214.
- Tylewska-Wierzbanowska S, Chmielewski T, Kondrusik M, Hermanowska-Szpakowicz T, Sawicki W, Sulek K (2001) First cases of acute human granulocytic ehrlichiosis in Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20, 196-198.
- Ueno J, Hohdatsu T, Muramatsu Y, Koyama H, Morita C (1996). Does coinfection of *Bartonella henselae* and FIV induce clinical disorders in cats? *Microbiol. Immunol.* 40, 617-620.
- Van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, de Jongh BM, Spanjaard L, Ramselaar AC, Kramer MD, Dankert J (1993) Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis* 17, 708-717.

- Van Dobbenburgh A, Van Dam AP, Fikrig E (1999). Human granulocytic ehrlichiosis in western Europe. *N Engl J Med* 340, 1214-1216.
- Verani P, Ciufolini MG, Nicoletti L (1995). Arbovirus surveillance in Italy. *Parassitologia*, 37, 105-108.
- Walker AR (2001) Age structure of a population of *Ixodes ricinus* (Acari:Ixodidae) in relation to its seasonal questing. *Bull Entomol Res* 91, 69-78.
- Wang G, VanDam AP, Le Fleche A, Postic O, Peter O, Baranton G, de Boer R, Spanjaard L, Dankert J (1997) Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp.nov. *Int J Syst Bacteriol*, 47, 926-932
- Wang IN, Dykhuizen DE, Qiu W, Dunn JJ, Bosler EM, Luft BJ (1999) Genetic diversity of ospC in a local population of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Genetics*. 151, 15-30.
- Welch DF, Carroll KC, Hofmeister EK, Robinson DH, Steigerwalt AG, Brenner DJ (1999). Isolation of a new subspecies, *Bartonella vinsonii subsp. arupensis*, from a cattle rancher: identity with isolates found in conjunction with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* among naturally infected mice. *J Clin Microbiol* 37, 2598-2601.
- Wielinga PR, Gaasenbeek C, Fonville M, de Boer A, de Vries A, Dimmers W, Akkerhuis Op Jagers G, Schouls LM, Borgsteede F, van der Giessen JW (2006) Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 72, 7594-7601.
- Wikswa ME, Hu R, Metzger ME, Eremeeva ME (2007) Detection of *Rickettsia rickettsii* and *Bartonella henselae* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from California. *J Med Entomol* 44, 158-162.
- Windsor JJ (2001) Cat-scratch disease: epidemiology, aetiology and treatment. *Br J Biomed Sci* 58, 101-110.
- Wölfel R, Terzioglu R, Kiessling J, Wilhelm S, Essbauer S, Pfeffer M, Dobler G (2006) *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Bavaria, Germany. *Ann N Y Acad Sci* 1078, 509-511.
- Zangwill KM, Hamilton DH, Perkins BA, Regnery RL, Plikaytis BD, Hadler JL, Cartter ML, Wenger JD (1993) Cat scratch disease in Connecticut. Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test. *N Eng J Med* 329, 8-13
- Zlobin I, Gorin OZ (1996). Tick-borne encephalitis: etiology, epidemiology and prophylactics in Siberia. Nauka, Novosibirsk, 177 pp.

Ringraziamenti

Ringrazio il Laboratorio di Parassitologia dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie per avermi fornito i dati relativi all'indagine sugli habitats silvestri del Veneto e del Friuli Venezia Giulia. In particolare ringrazio Gioia Capelli, Fabrizio Montarsi, Elena Porcellano e Alessandra Lombini.