

ESTRATTO



Volume 28 - Numero 1
Gennaio 2015

ISSN 0394-9303 (cartaceo)
ISSN 1827-6296 (online)

Notiziario

dell'Istituto **S**uperiore di **S**anità

**Le rickettsiosi in Italia:
diagnosi e sorveglianza**

F. Mancini, G. Rezza, A. Ciervo

Poste Italiane S.p.A. - Spedizione in abbonamento postale - 70% - DCB Roma



www.iss.it

LE RICKETTSIOSI IN ITALIA: DIAGNOSI E SORVEGLIANZA



Fabiola Mancini, Giovanni Rezza e Alessandra Ciervo
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, ISS

RIASSUNTO - Le rickettsiosi, causate da batteri intracellulari obbligati del genere *Rickettsia*, sono, tra le zoonosi, le malattie più antiche e note trasmesse da vettori. Diverse specie isolate dalle zecche, considerate di indeterminata patogenicità, sono ora associate a infezioni umane. Questa nuova informazione è dovuta essenzialmente all'uso di tecniche molecolari in grado di identificare nuove rickettsie nei vettori. Inoltre, la diagnostica molecolare è fondamentale nel riconoscimento della *Rickettsia* patogena da biopsie o da tamponi di escara. In Italia, esiste una sorveglianza passiva basata sulla notifica dei casi umani di rickettsiosi. Il Laboratorio per le Rickettsiosi umane presso il Dipartimento di Malattie Infettive Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità si occupa della raccolta dei dati di notifica nazionali e della diagnostica molecolare delle rickettsiosi.

Parole chiave: *Rickettsia*; malattie trasmesse da vettori; zoonosi

SUMMARY (*Rickettsioses in Italy: diagnosis and surveillance*) - Rickettsioses, caused by obligate intracellular bacteria of the genus *Rickettsia*, are among zoonoses, the oldest known vector-borne diseases. Several species isolated from ticks, that were considered of undetermined pathogenicity, are now associated with human infections. This new information is essentially due to the use of molecular techniques for the identification of novel *Rickettsia* species in vectors. Moreover, the molecular diagnosis is essential to recognize the *Rickettsia* pathogen from biopsies or swabbing of eschar. In Italy, there is a passive surveillance based on the notification of rickettsiosis human cases. The Laboratory for Human Rickettsioses at the Department of Infectious, Parasitic and Immune-Mediated Diseases of the Italian National Institute of Health, is involved in the collection of national notifications and in the molecular diagnosis of rickettsiosis.

Key words: *Rickettsia*; tick-borne diseases; zoonoses

alessandra.ciervo@iss.it

Storicamente, le rickettsiosi sono state considerate come gravi malattie infettive umane, mortali e disabilitanti, tanto da essere classificate come 'la piaga degli eserciti' durante le guerre mondiali. Esistono prove storiche in grado di documentare che le specie altamente patogene potrebbero essere usate intenzionalmente come potenziale arma batteriologica (1). I tassi di morbilità e di mortalità sono gradualmente diminuiti con l'era antibiotica. Tuttavia, le rickettsiosi continuano ad essere un problema significativo di sanità pubblica in tutto il mondo, perché non esiste un vaccino a uso umano e spesso vi è un ritardo nella diagnosi che può compromettere l'efficacia terapeutica.

Le rickettsiosi sono zoonosi appartenenti a un gruppo di malattie infettive "emergenti o riemergenti", endemiche in alcuni Paesi, che richiedono la

presenza di serbatoi e vettori competenti per la loro diffusione. L'agente eziologico che causa la malattia appartiene al genere *Rickettsia*, e la maggior parte delle rickettsiosi sono trasmesse dalla puntura di zecche. Il genere *Rickettsia* si divide in tre gruppi principali: il Typhus Group (TG), le Spotted Fever Group (SFG) e un terzo gruppo che comprende *R. belli* e *R. canadensis*.

Il primo gruppo comprende il tifo esantematico o epidemico, causato da *R. prowzekii* e trasmesso dal pidocchio *Pediculus humanus corporis*, e il tifo murino trasmesso attraverso la pulce del ratto e causato da *R. typhi*. Al gruppo delle SFG appartengono le rickettsiosi, che si manifestano come un gruppo eterogeneo di malattie febbrili acute. La febbre bottonosa del Mediterraneo (Mediterranean spotted fever MSF) ►

è la forma più diffusa nel bacino del Mediterraneo e quindi anche in Italia. L'agente eziologico della MSF è rappresentato da *R. conorii* subspecie *conorii*, trasmessa dal vettore *Rhipicephalus sanguineus* (2). Nella Tabella 1 sono riportate le principali specie di rickettsie presenti in Europa che infettano l'uomo con il relativo vettore, il tipo di patologia e la distribuzione geografica.

Il Laboratorio per le Rickettsiosi umane presso il Dipartimento di Malattie Infettive Parassitarie ed Immunomediate (MIPI) dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) si occupa della raccolta dei dati di notifica nazionali e della diagnostica molecolare delle rickettsiosi.

Diagnosi

Diagnosi clinica

Generalmente, la sintomatologia clinica della MSF e di altre rickettsiosi del gruppo SFG inizia dai 4 ai 10 giorni seguenti al morso della zecca e i segni della malattia possono essere febbre (94-100%), sintomi simil-influenzali (78%), mal di testa e dolori muscolari (64%), rash cutaneo entro 6 o 10 giorni (87-96%), formazione locale di lin-

foadenopatia ed escara (*tache noire*), area ulcero-necrotica nerastra sul sito del morso della zecca (53-77%).

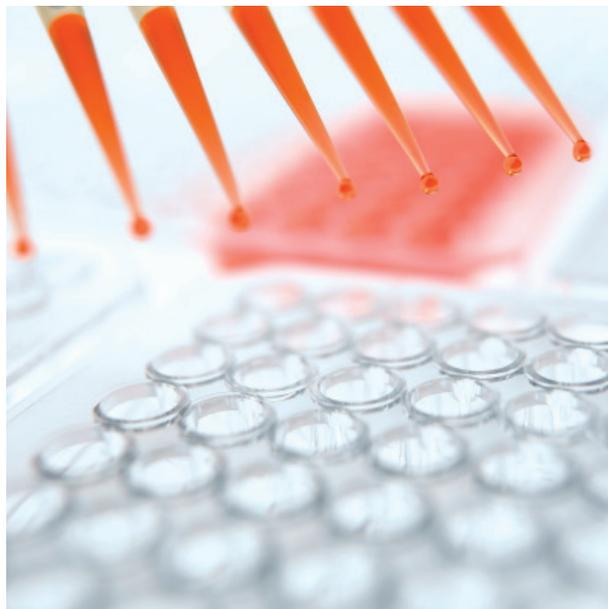
Nella maggior parte dei soggetti, l'esantema è di tipo maculo-papuloso e interessa anche le piante dei piedi e i palmi delle mani. I tipici segni di queste rickettsiosi, con formazione di papule, petecchie e rash, sono diretta conseguenza della colonizzazione e del danneggiamento dell'endotelio vascolare da parte di questi patogeni (3). Tuttavia, questi sintomi variano a seconda della specie di rickettsia coinvolta e talvolta possono essere assenti o passare inosservati a un esame clinico indiretto, rendendo la diagnosi di rickettsiosi spesso complicata.

Negli ultimi anni, nei Paesi del Mediterraneo, sono stati segnalati presentazioni atipiche di MSF con sintomi cardiaci (ectasia delle arterie coronarie, miocardite e fibrillazione atriale), sintomi oculari (uveite, vasculite della retina e retinopatia), sintomi neurologici (infarto cerebrale, meningoencefalite e ipoacusia neurosensoriale), coinvolgimenti pancreatici, rottura splenica e insufficienza renale acuta.

La severità della MSF può essere elevata anche se la letalità è molto bassa (inferiore al 3%). Tuttavia, in soggetti con condizioni di salute già compromesse,

Tabella 1 - Principali rickettsie circolanti in Europa

Specie	Vettore	Patologia	Distribuzione geografica
<i>R. aeschlimanii</i>	Zecca	Febbre bottonosa	Francia, Marocco
<i>R. africae</i>	Zecca	Febbre da morso di zecca africana	Africa Sud-Sahariana, Islanda, India dell'Est
<i>R. conorii subsp. conorii</i>	Zecca	Febbre bottonosa del Mediterraneo	Mediterraneo, Africa
<i>R. conorii subsp. Caspia</i>	Zecca	Febbre dell'Astrakhan	Chad, Kosovo, Russia
<i>R. felis</i>	Pulce	Febbre bottonosa da pulci	Mondiale
<i>R. helvetica</i>	Zecca	Sospettato agente di rickettsiosi	Europa, Giappone
<i>R. massiliae</i>	Zecca	Rickettsiosi	Francia
<i>R. monacensis</i>	Zecca	Febbre bottonosa del Mediterraneo - like	Europa
<i>R. prowazekii</i>	<i>Pediculus humanus corporis</i>	Tifo epidemico	Africa, Russia, Sud America
<i>R. raoultii</i>	Zecca	Tibola o Debonel	Francia, Russia
<i>R. sibirica subsp. sibirica</i>	Zecca	Tifo Siberiano o del Nord Asia	Cina, Russia
<i>R. sibirica subsp. mongolitimonae</i>	Zecca	Rickettsiosi associata a linfagite	Algeria, Cina, Francia, Grecia, Sud Africa
<i>R. slovaca</i>	Zecca	Tibola o Debonel	Europa, Russia
<i>R. typhi</i>	Pulce	Tifo murino	Mondiale
<i>R. rhipicephali</i>	Zecca	Sconosciuta	Africa, Europa, USA
<i>R. heilongjiangensis</i>	Zecca	Rickettsiosi del lontano Oriente	Cina, Russia, Thailandia
<i>R. rhipicephali</i>	Zecca	Sconosciuta	Africa, Europa, USA



la mortalità può essere più alta, come riportato in Portogallo, dove è stato osservato un tasso di letalità del 32,3%, in pazienti con diabete, disidratazione e uremia (4).

Il trattamento prevede solitamente come antibiotico di scelta la doxiciclina (200 mg/die per 7-14 giorni) anche se in casi di severità della malattia possono essere utilizzati fluorochinoloni e altri antibiotici come azitromicina e claritromicina (2).

Diagnosi di laboratorio

La diagnosi di laboratorio si basa essenzialmente sull'indagine sierologica. Un tempo veniva usata la reazione di sieroagglutinazione di Weil-Felix, che si basa sulla reattività immunologica crociata di alcune specie di rickettsia con ceppi di *Proteus* Ox19, Ox2 e OxK. Questa tecnica è oggi considerata superata data la scarsa sensibilità e specificità.

La sierologia è il metodo più semplice per la diagnosi delle rickettsiosi del gruppo SFG. Un primo campione di siero dovrebbe essere raccolto precocemente nel corso della malattia, e un secondo campione deve essere testato due settimane più tardi. Qualora non si osservi un incremento di quattro volte del titolo anticorpale, un terzo campione di siero dovrebbe essere considerato dopo 4-6 settimane.

Il test immunologico di riferimento è il saggio MIF (MicroImmunoFluorescenza) per la ricerca di anticorpi IgM e IgG. Solitamente, titoli per le IgM pari o superiori a 64 e/o titoli per le IgG pari o supe-

riori a 128 sono considerati indicativi di infezione da *R. conorii*, mentre titoli per le IgM pari o superiori a 32 e/o titoli per le IgG pari o superiori a 64 sono considerati indicativi di infezione da parte di altre specie di rickettsia del gruppo SFG. Nella MSF, entrambe le IgM e IgG sono solitamente rilevate tra 7 e 15 giorni dopo l'insorgenza della malattia. Tuttavia, nei pazienti con altre infezioni da rickettsia del gruppo SFG, le risposte anticorpali potrebbero essere rilevate con più ritardo. Infatti, dopo l'insorgenza dei sintomi, i tempi medi di sierconversione possono variare da 6 a 9 giorni per le IgM, e da 25 a 28 giorni per IgG, rispetto alla MSF. L'eventuale test di conferma viene eseguito tramite il test immunologico del Western Blot, che rileva gli anticorpi diretti verso il lipopolisaccaride (LPS) e altre proteine di membrana come OMPA e OMPB (5).

Il test sierologico è il metodo più frequentemente utilizzato, in quanto ampiamente disponibile commercialmente. Tuttavia, i metodi immunologici non permettono di discriminare tra una MSF causata da *R. conorii* e altre rickettsiosi dovute al gruppo SFG.

Le rickettsie possono anche essere isolate da campioni di sangue e biopsie cutanee prima dell'inizio della terapia antibiotica, e coltivate *in vitro* su colture cellulari, utilizzando la tecnica di centrifugazione su *shell vial*. Questi tentativi di isolamento devono essere effettuati solo nei laboratori specializzati con livello 3 di biosicurezza (5).

Per ridurre il ritardo nella diagnosi sono stati messi a punto saggi di biologia molecolare basati sulla reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR) e sul sequenziamento genico, che hanno consentito di sviluppare strumenti diagnostici rapidi, sensibili e specifici in grado di rilevare e identificare le rickettsie su campioni di sangue, da biopsia di escara, su tamponi e brush cutanei ottenuti dalla lesione e, infine, nei vettori (2). A tale scopo, sono stati identificati diversi bersagli genici (*gltA*, *ompA*, *ompB*, *groEL*, 17 kDa, *recA*, *sca4*) e descritte varie coppie di *primer*, che possono essere utilizzati in qualsiasi laboratorio con attrezzature adeguate (2, 5-6).

Un passo in avanti nella diagnosi delle rickettsiosi è stato realizzato recentemente con l'uso della PCR in tempo reale (real time PCR). Questa tecnologia è in grado di misurare l'amplificazione del target genico durante la fase esponenziale della PCR, quando ►

cioè l'efficienza di amplificazione è in minima parte influenzata dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale *endpoint*. Le chimiche principali sono basate sia sul legame di coloranti fluorescenti che si intercalano nella doppia elica di DNA, come il SYBR Green, sia sull'ibridazione di sonde specifiche, come le Taqman.

Rispetto al saggio tradizionale della PCR, la real time PCR possiede le caratteristiche: a) di offrire i risultati qualitativi e quantitativi in tempo reale man mano che si sviluppa la reazione di amplificazione molecolare; b) i prodotti di PCR non devono essere sottoposti a passaggi post-PCR come l'elettroforesi su gel di agarosio; c) ha il vantaggio di ridurre la possibilità di contaminazioni e i fenomeni di *carryover*.

Nell'ambito dell'attività di diagnostica molecolare del Laboratorio per le Rickettsiosi umane dell'ISS, finanziata dal Ministero della Salute nell'anno 2010 con un Progetto CCM sulla sorveglianza di laboratorio dei patogeni batterici atipici, è stato condotto uno studio sulle rickettsiosi umane in collaborazione con l'Unità di Malattie Infettive dell'Ospedale Universitario di Sassari. Lo scopo del lavoro è stato quello di identificare, con tecniche di biologia molecolare, le specie di rickettsie presenti in biopsie cutanee di pazienti che mostravano un quadro clinico di rickettsiosi, confermata dall'indagine sierologica. Questo studio ha permesso di identificare per la prima volta in Italia la specie *R. monacensis* (isolato N72), agente responsabile della MSF-like, in un paziente di 28 anni (7).

Sorveglianza

La maggior parte dei casi di rickettsiosi si verificano in estate, e l'incidenza può aumentare con temperature più elevate, bassa piovosità e una diminuzione del numero di giorni di gelo durante l'anno precedente. In particolare, questa maggiore incidenza durante i mesi più caldi sembra essere correlata alla maggiore aggressività delle zecche nel mordere gli esseri umani.

Recentemente, in Italia sono state identificate alcune rickettsie (*R. aeschlimannii*, *R. massiliae* e *R. monacensis*), che possono determinare un quadro clinico simile alla MSF (MSF-like). Nel resto dell'Euro-

pa sono state ritrovate anche la *R. slovacica* e *R. raoultii*, agenti eziologici della linfadenopatia da zecche, e la *R. sibirica mongolotimonae*, che provoca la rickettsiosi associata a linfangite (2, 4, 7-9).

Secondo i dati della sorveglianza europea (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) rilevati tra il 2000 e 2009, l'Italia (4.609 casi) insieme al Portogallo (2.837 casi) e alla Spagna (651 casi) mostra i più alti casi di rickettsiosi (4).

In Italia, tutte le rickettsiosi sono soggette a notifica obbligatoria secondo le modalità previste dal DM 15 dicembre 1990 e appartengono alle malattie di Classe I e II. La Classe I comprende le malattie per le quali si richiede segnalazione immediata, in quanto soggette al regolamento sanitario internazionale, o di particolare interesse per altre finalità, e in caso di sospetto il medico accertatore deve segnalare il caso entro 12 ore all'Azienda Sanitaria Locale (ASL) di competenza. Alla Classe II appartengono le malattie infettive a elevata frequenza e/o soggette a interventi di controllo, e in caso di sospetto il medico accertatore deve segnalare il caso entro 48 ore all'ASL di competenza. Il tifo esantematico si inserisce tra le malattie di Classe I, mentre tutte le altre rickettsiosi vengono incluse tra le malattie di Classe II.

I dati relativi all'Italia sono rilevati dal Sistema di sorveglianza che si avvale dei Laboratori regionali e del Laboratorio per le Rickettsiosi umane presso il



Dipartimento MIPI dell'ISS. Il flusso informativo è a struttura piramidale e si svolge attraverso: il medico (ospedaliero o di base), che diagnostica la malattia infettiva ed effettua la segnalazione all'ASL di competenza. L'ASL comunica le informazioni alla Regione di appartenenza, che a sua volta trasmette i dati di notifica agli Organismi centrali, ossia al Ministero della Salute e all'ISS.

Il Bollettino Epidemiologico Nazionale del Ministero della Salute mostra che dal 1996 al 2010 sono stati notificati 10.069 casi (Tabella 2). I dati epidemiologici evidenziano un'ampia distribuzione in Sicilia, Sardegna, Lazio e Calabria (Figura). Alcuni studi sierologici hanno mostrato una maggiore prevalenza di anticorpi anti-rickettsia in sieri umani in Sicilia (37% positività) rispetto al Friuli-Venezia Giulia (4% positività), confermando ulteriormente le differenze di rischio umano tra il Nord e il Centro-Sud Italia (4).

Presso il Laboratorio Rickettsiosi e Patogeni Atipici dell'ISS, nell'ambito di un Progetto CCM del 2012 sull'attività di sorveglianza di laboratorio dei patogeni batterici atipici, sono stati condotti due differenti studi sull'identificazione molecolare

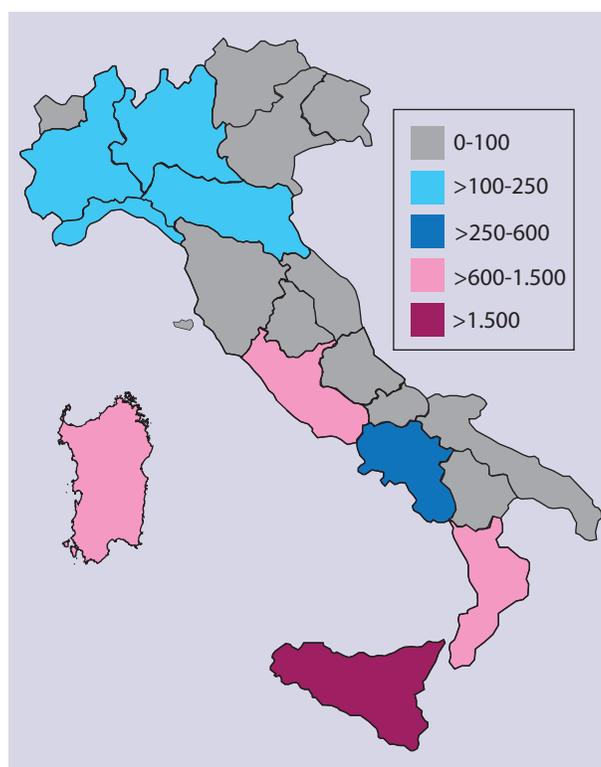


Figura - Distribuzione geografica dei casi di rickettsiosi notificati dal 1996 al 2010. Fonte: Ministero della Salute

Tabella 2 - Numero di casi di rickettsiosi per anno e per Regione

Regioni	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010*	Totale 1996-2010
Piemonte	34	10	13	15	10	9	7	3	7	8	2	4	2	2		126
Valle d'Aosta			1		1		0									10
Lombardia	22	23	22	5	4	13	8	128	7	7	4	1		1	5	223
PA Bolzano	5	2					1									7
PA Trento			3												1	3
Veneto	6	3	3	11		3	10	7	3	4	1	3	2	3		60
Friuli-Venezia Giulia						1	1	1					2			5
Liguria	24	18	1	8	13	9	7	8	19	6	3	4	1	4	1	126
Emilia-Romagna	8	7	9	10	11	11	10	4	2	2	5	6	7	5	5	102
Toscana	12	11	11	8	8	5	7	6	2	5	5	8	3		2	93
Umbria	2	2	7	2		1	1	2		1	2					38
Marche	13	3	10	9	2	4	4	2	1		1		1		1	51
Lazio	185	160	74	151	116	103	84	60	76	41	39	46	30	30		1.195
Abruzzo	10	11	14	7	14	1	10	3	2	5	2	1		1		81
Molise	6	2	2	5	3	7	5	1		6	5			1		43
Campania	72	57	80	102	56	25	43	39	27	13	12	18	10	4		558
Puglia		6	2	7	2	4	1			1				1		24
Basilicata	4		4	2												10
Calabria	128	93	80	145	59	66	68	30	42	29	24	35	38	27		864
Sicilia	561	519	450	629	393	397	498	456	330	298	253	64	6	236		5.090
Sardegna	257	187	127	147	107	80	125	108	37	35	61	34	26	23	3	1.357
Italia	1.349	1.114	913	1.263	799	739	890	858	555	462	419	224	128	338	18	10.069

(*) Dato provvisorio. Fonte: Ministero della Salute



di patogeni difficilmente coltivabili (rickettsie, borrelie, bartonelle, franciselle, erlichie e coxielle) nelle zecche. Nel primo studio, effettuato nella Regione Lazio, sono state analizzate le zecche raccolte su uccelli migratori, appartenenti al genere *Hyalomma spp.*, *Amblyomma spp.* e *Ixodes spp.* L'analisi microbiologica-molecolare ha permesso di caratterizzare le rickettsie presenti in queste zecche, risultate appartenere al gruppo SFG di origine africana (96% *R. aeschlimannii* e 4% *R. africae*), e il 39% di esse presentavano co-infezioni con *Ehrlichia*, *Coxiella burnetii* e *Borrelia spp.* (8).

Il secondo studio è stato condotto su delle zecche libere raccolte nella Riserva Naturale dell'Insugherata, nella zona nord-occidentale di Roma, che rappresenta un settore importante per le attività ricreative umane, ma è anche utilizzato come pascolo per le greggi di ovini. La specie di zecca più abbondante è stata la *Rhipicephalus turanicus* (66%), seguita da *Ixodes ricinus* (26%), *Dermacentor marginatus* (5%) e *Haemaphysalis punctata* (3%). L'indagine molecolare, oltre a *R. conorii*, ha individuato altre rickettsie appartenenti al gruppo SFG patogene per l'uomo e, anche in questo caso, sono state riscontrate delle co-infezioni con altri patogeni responsabili di zoonosi trasmesse da zecche, in particolare con *Borrelia burgdorferi* e *Coxiella burnetii* (9).

Conclusioni

L'aumento della temperatura media potrebbe favorire l'introduzione di vettori non presenti in Europa, con una notevole diffusione di patogeni responsabili di malattie infettive nuove o emergenti. Infatti, l'elemento nuovo che sta attirando l'interesse del mondo medico-veterinario verso queste zoonosi è rappresentato dalla manifestazione della patologia dovuta ad agenti microbici nuovi o non riconosciuti in precedenza.

Altro dato interessante è la circolazione di vettori e patogeni, che è aumentata in relazione ai cambiamenti nella gestione del territorio, e dalla grande plasticità biologica di adattamento delle zecche su diverse specie di ospiti. Queste condizioni espongono sia gli animali selvatici sia quelli domestici a essere serbatoi d'infezione, favorendo così la trasmissione delle rickettsiosi all'uomo non solo in ambito selvatico-rurale, ma anche in ambiente urbano. ■

Dichiarazione di conflitto di interessi

Gli autori dichiarano che non esiste alcun potenziale conflitto di interesse o alcuna relazione di natura finanziaria o personale con persone o con organizzazioni, che possano influenzare in modo inappropriato lo svolgimento e i risultati di questo lavoro.

Riferimenti bibliografici

1. Azad AF, Radulovic S. Pathogenic rickettsiae as bioterrorism agents. *Ann NY Acad Sci* 2003;990:734-8.
2. Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev* 2013;26: 657-702.
3. Sahni SK, Rydkina E. Host-cell interactions with pathogenic Rickettsia species. *Future Microbiol* 2009;4:323-39.
4. European Centre for Disease Prevention and Control. *Epidemiological situation of rickettsioses in EU/EFTA countries*. Stockholm: ECDC; 2013.
5. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, et al. ESCMID Study Group on Coxiella, Anaplasma, Rickettsia and Bartonella; European Network for Surveillance of Tick-Borne Diseases. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:1108-32.
6. Paris DH, Blacksell SD, Stenos J, et al. Real-time multiplex PCR assay for detection and differentiation of rickettsiae and orientiae. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102:186-93.
7. Madeddu G, Mancini F, Caddeo A, et al. Rickettsia monacensis as cause of Mediterranean spotted fever-like illness, Italy. *Emerg Infect Dis* 2012;18:702-4.
8. Toma L, Mancini F, Di Luca M, et al. Detection of microbial agents in ticks collected from migratory birds in central Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2014;14:199-205.
9. Mancini F, Di Luca M, Toma L, et al. Prevalence of tick-borne pathogens in an urban park of Rome, Italy. *Ann Agric Environ Med* 2014;21:725-9.