



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Epidemiologia de les rickettsiosis
del grup de les febres tacades a Catalunya.
Estudi específic de la *Rickettsia massiliae* Bar 29.
Eficàcia de les tècniques diagnòstiques**

Isabel Sanfeliu Sala

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

DEPARTAMENT: FONAMENTS CLÍNICS

HOSPITAL CLÍNIC I PROVINCIAL DE BARCELONA

LÍNIA DE RECERCA: SALUT INTERNACIONAL

**EPIDEMIOLOGIA DE LES RICKETTSIOSIS DEL GRUP DE LES
FEBRES TACADES A CATALUNYA. ESTUDI ESPECÍFIC DE LA
Rickettsia massiliae BAR 29. EFICÀCIA DE LES TÈCNIQUES
DIAGNÒSTIQUES**

TESI DOCTORAL

Isabel Sanfeliu Sala

Sabadell 2018

**EPIDEMIOLOGIA DE LES RICKETTSIOSIS DEL GRUP DE LES
FEBRES TACADES A CATALUNYA. ESTUDI ESPECÍFIC DE LA
Rickettsia massiliae BAR 29. EFICÀCIA DE LES TÈCNIQUES
DIAGNÒSTIQUES**

Isabel Sanfeliu Sala

**Memòria presentada per optar al grau de Doctora per la Universitat de
Barcelona**

**Aquesta tesi doctoral ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Ferran
Segura i Porta a la Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell**

**I com a tutor de la mateixa el Dr. Julià González Martín de l'Hospital
Clínic i Provincial de Barcelona.**

setembre 2018

**Tesi doctoral adscrita al Departament de Fonaments Clínics de la Facultat
de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona.**

Dr. Ferran Segura

Dr. Julià González

Isabel Sanfeliu

Als tres puntals de la meva vida,

el Josep, el Bernat i l'Oriol

AGRAÏMENTS

Aquest treball és per mi el fruit dels anys de dedicació a la meva professió com a microbiòloga. De ben segur que m'hagués agradat que sortís a la llum uns anys abans, però també crec sincerament que les coses van com van i que es fan quan un es sent preparat per fer-ho. Tanmateix, si no fos per molta gent que ha anat creient en mi i que al final ho aconseguiria, segurament no hauria arribat a la seva fi. També val a dir que un fet fonamental per continuar ha estat el compromís amb la docència de la Unitat docent del Parc Taulí i amb la UAB. Aquesta raó ha estat un bon estímul final per aquest treball.

Però, com he esmentat, la raó de més pes ha estat sens dubte tota la gent que m'ha envoltat i m'ha ajudat perquè això fos possible, a qui els ho he d'agrair de tot cor.

És evident que aquest treball es deu sens dubte a l'obstinació i esforç del meu director de tesi, el Dr. Ferran Segura. Sense ell no hauria estat possible ni de lluny. Per a mi és un plaer dedicar-li aquesta tesi i agrair-li l'oportunitat que em va donar de submergir-me en aquest món apassionant i encara desconegut en molts aspectes com és el de les rickettsiosis, que m'hagi encoratjat a seguir i no desanimar-me quan veia que em costava tirar endavant, que hagi cregut en mi tots aquests anys i, a la vegada, que m'ensenyés com d'important és la recerca en general, i en concret en el món de la medicina.

Però aquest treball tampoc no hauria estat mai possible sense la col·laboració o l'ajuda de molta altra gent a qui també vull expressar el més sincer agraïment.

Al meu tutor, el Dr. Julià Gonzalez, que, quan li vaig proposar de ser-ho, no va dubtar ni un moment a acompanyar-me cap a fer realitat aquest projecte, i que m'ha aconsellat en tots els dubtes amb confiança i interès.

A la Dionisia Fontanals, la meva cap i companya de fatiga en el dia a dia de la microbiologia. Crec que juntes hem fet un bon tàndem al llarg dels més de 25 anys que fa que ens coneixem per tirar endavant la nostra feina i anar-la adaptant als canvis que hem anat vivint. Gràcies també per animar-me i encoratjar-me fins el dia d'avui.

A l'Imma Pons, que em va passar, com molts d'altres, la mà per la cara i se'm va avançar en la presentació de la tesi. Imma, estic molt contenta que haguem estat col·laborant aquests anys. El teu esforç per compaginar feina i treball de recerca sempre infatigable ha estat un referent per mi i un estímul per tirar endavant.

A l'Esperança Anton, gran professional, metgessa que ha dedicat bona part del seu temps lliure també al món de les *Rickètsies*, moltes gràcies per la teva ajuda, col·laboració i aportacions a aquest treball.

No puc deixar de mencionar i agrair a l'Anna Ortuño, veterinària de la UAB. Ella ha estat part fonamental d'aquest treball en la part de l'estudi en animals i vectors. Sense la seva aportació no hauria estat possible un treball com aquest.

A la M^a Mercè Nogueras, investigadora nata, que sempre has estat aquí quan ho he necessitat, gràcies per fer-me més fàcil el coneixement de la biologia molecular i per les teves aportacions a tots els meus dubtes.

A la Mariela, que vam començar juntes col·laborant en aquest no gens fàcil camí de la recerca primer en l'estudi de l'*Helicobacter* i després en el de les *Rickètsies*. D'aquí va sorgir una gran amistat que espero que no s'acabi mai. Aquest treball ja saps que en bona part és teu.

A tota l'altra gent que ha col·laborat amb mi en el camp de la recerca, el Sergi, la Mireia, la Vicky, la Xus, etc... això també és vostre.

Als companys de Microbiologia, que no sé si us vau acabar de creure mai que seria possible la meva tesi. Ara sí que m'haureu de dir doctora... bé, no caldrà, són molts anys compartits i us estic agraïda per la vostra paciència amb mi.

A la gent d'infeccioses, amb qui hem compartit moltes reunions, comitès, discussions... M'heu ensenyat moltes coses sobre les malalties infeccioses i també la vostra humanitat en el tracte amb els pacients.

A la Corporació Sanitària Parc Taulí i especialment al Servei de Laboratori per permetre la realització d'aquest treball, un agraïment sincer.

Als meus amics/amigues que, com que som a l'època dels mitjans de comunicació ràpids, us cito pels grups de WhatsApp: *Dinar dimecres*, *Castanyada*, *Nenes gimnàs*, *Sisters*, *4 amigues*, *Ja hi som totes* i *Nenes Vilafranca*. Sense les nostres converses i trobades la vida no seria igual.

A la meva amiga Maria Bernal, perquè cada dia del món des que ens coneixem ha mantingut una insistència admirable i sense defallir perquè aquest treball s'acabés. Maria, ja veus que finalment sí.

A la Rosa Maria, amiga estimada, i a tota la seva família, per estar al meu costat des de fa anys i donar-me sempre un cop de mà quan m'ha calgut. Les nostres converses sempre són un bàlsam per afrontar el dia a dia.

A les corals Agrupació Coral de Sant Fruitós i la Coral Ressò de Sabadell. Heu estat el meu esbarjo quan ho necessitava en dies que la feina m'angoixava. Sou el meu anti-depressiu.

A la meva família, la meva mare Maria i el meu pare Ramon, que malauradament ja no hi són, la meva germana Rosa i el Jaume, els meus nebots i fills dels nebots i a tota la resta de la família, gràcies per ser-hi. Us estimo.

Als meus fills, en Bernat i l'Oriol. Segurament no us he dedicat per la feina tota l'atenció que us mereixíeu però sou una meravella de fills, el millor treball de la meva vida. A més, un agraïment immens per l'Oriol, que ha dedicat una part del seu temps d'esbarjo a fer de revisor del meu incorrecte català escrit. Gràcies, Uri. Us estimo.

I, finalment, i no per això el menys important, al Josep, el meu company dels darrers 35 anys. Sempre has estat aquí aguantant les meves neures i no has defallit en donar-me suport quan ho necessitava. Gràcies per tot, per als bons moments i pels no tan bons. Hem creat una família que segurament no és perfecta però és la nostra i ens l'estimem. Un petonàs, t'estimo.

SUMARI

SUMARI

PREFACI	3
ABREVIATURES	5
1 INTRODUCCIÓ.....	9
1.1 UNA MICA D’HISTÒRIA	9
1.2 AGENT ETIOLÒGIC: EL GÈNERE <i>RICKETTSIA</i>	12
1.2.1 Taxonomia del gènere <i>Rickettsia</i> sp.....	12
1.2.2 Característiques microbiològiques. El bacteri.....	17
1.2.3 Mecanisme de patogenicitat	20
1.3 EPIDEMIOLOGIA. EL VECTOR.....	22
1.3.1 Característiques generals de les paparres	22
1.3.2 Transmissió de rickètsies entre les paparres	25
1.3.3 Transmissió de rickètsies des de la paparra als humans	27
1.4 ELS HOSTES O RESERVORIS.....	29
1.5 MÈTODES DIAGNÒSTICS.....	32
1.5.1 Detecció de les rickètsies per examen directe dels teixits.....	35
1.5.2 Aïllament de rickètsies per cultiu	36
Cultiu biològic.....	36
Cultiu cel·lular.....	37
Cultiu <i>shell vial</i>	38
1.5.3 Proves serològiques. Diagnòstic indirecte	41
Weil Felix o test d'aglutinació.....	41
Fixació del complement	42
Microimmunofluorescència indirecta (MIF o IFI).....	43
Agglutinació en làtex	44
Hemoaglutinació indirecta	45
Enzimoimmunoassaig (ELISA, EIA)	45
Western immunobloting.....	45
Tècniques d’adsorció diferencial (cross-adsorció).....	46
Detecció directa de <i>R. conorii</i> en cèl·lules endotelials (CEC) circulants per IFI	47
1.5.4 Detecció i identificació per tècniques moleculars.....	48
Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	48
1.6 IDENTIFICACIÓ D’ESPÈCIES DE RICKÈTTSIES.....	52
1.7 IDENTIFICACIÓ DE PAPPARRES	54
1.8 RICKETTSIOSIS DEL GRUP DE LES FEBRES TACADES.....	56
1.8.1 Situació epidemiològica	59
1.8.2 Febre Botonosa Mediterrània.....	60
<i>R. conorii</i>	60
<i>R. massiliae</i> Bar 29.....	66
2 HIPÒTESI.....	75

3	OBJECTIUS.....	79
4	MATERIAL I MÈTODES	83
4.1	Estudi de seroprevalença enfront de <i>R. massiliae</i> Bar 29.....	83
4.2	Estudi de les possibles reaccions creuades de <i>Rickettsia</i> Bar 29 amb <i>R. conorii</i>	85
4.3	Estudi en pacients de <i>R. massiliae</i> Bar 29	85
4.4	Aïllament de rickètsies mitjançant cultiu en <i>shell vial</i> a partir de mostres de sang de pacients i identificació per PCR de les soques rickettsials	87
4.5	Estudi de la presència de <i>R. conorii</i> i <i>R. massiliae</i> Bar 29 en animals del cicle silvestre i del cicle domèstic i vectors a Catalunya	90
5	RESULTATS	99
6	DISCUSSIÓ	119
7	CONCLUSIONS.....	137
8	REFERÈNCIES	143
9	ANNEXOS.....	179

PREFACI

PREFACI

Les rickettsiosis són malalties reconegudes des d'antic (1) però en els darrers anys estan tenint més rellevància, ja que algunes d'elles estan considerades dins de les infeccions emergents. Són zoonosis transmeses per artròpodes vectors i la seva incidència va lligada al cicle dels vectors.

Fins el 1984 es coneixien 5 espècies de rickettsies patògenes, però només en els últims 12 anys s'han reconegut 10 noves espècies (2). Les tècniques moleculars com l'anàlisi del gen 16SrRNA ribosomal han estat capaces de determinar les relacions filogenètiques entre espècies i són útils en bacteris intracel·lulars que expressen poc les característiques fenotípiques que s'utilitzen en taxonomia. Aquestes tècniques han servit de base per reclassificar espècies (3).

La Febre Botonosa Mediterrània (FBM) és una de les rickettsiosis més freqüents i importants a Europa (4), present a tota la vessant mediterrània i a la nostra àrea geogràfica en particular (5,6,7). És ben coneguda com a entitat clínica i des del punt de vista del tractament. No passa el mateix en relació als aspectes epidemiològics o de diagnòstic específic, pel fet que el cultiu de rickettsies és laboriós, difícil i es troba limitat a laboratoris de recerca o de referència. És per aquest motiu que els estudis de seroprevalença en la població humana sana i també en animals ens aporten un coneixement més gran sobre els marcadors epidemiològics de la malaltia i a la vegada ens ajuden a valorar la situació en què es troba aquesta malaltia en una determinada àrea (8, 9,10).

L'espècie *Rickettsia conorii* (*R. conorii*) ha estat considerada el principal agent etiològic de la FBM. En els darrers anys, l'aplicació de nous mètodes de cultiu cel·lular i el desenvolupament de tècniques moleculars en el diagnòstic han permès identificar noves soques de rickettsies, algunes d'elles de poder patògen desconegut, aïllades només en paparres, i d'altres en què s'ha confirmat o bé s'han trobat indicis de la seva possible relació

amb malaltia humana (11,12). Moltes soques s'han obtingut i identificat de paparres o d'animals, però només l'aïllament en humans significaria que aquestes rickettsies poguessin ser considerades patògenes.

A Catalunya, la identificació d'una nova soca en paparres capturades a diferents àrees, anomenada en un principi MTU5 i posteriorment Bar 29 (grup *massiliae*), va fer pensar en el seu possible rol com a agent etiològic de la FBM (13).

El poder patogen de la *Rickettsia massiliae* Bar 29 (*R. massiliae* Bar 29) en l'espècie humana va ser confirmat per primera vegada a Sicília, a partir d'una mostra de sang recollida vint anys abans en un pacient diagnosticat inicialment de FBM i que s'havia conservat congelada (14). Posteriorment se n'han descrit alguns pocs casos més arreu del món.

En aquest estudi hem volgut valorar els mètodes de què disposem per al diagnòstic d'aquests microorganismes i a la vegada trobar nous mètodes diagnòstics que ens acostin a un coneixement més gran d'aquests bacteris. També hem volgut confirmar si la *R. massiliae* Bar 29, que es troba en el nostre medi i que és causa de malaltia humana, ho és també de la FBM en la nostra comunitat.

ABREVIATURES

FBM	Febre Botonosa Mditerrània
RMSF	Rocky Mountain Spotted Fever
ADN	Àcid desoxirribonucleic
ARN	Àcid ribonucleic
CoA	Coenzim A
NAD	Nicotinamida adenina dinucleòtid
ATP	Adenosina trifosfat
UV	Ultravioleta
TNF	Factor de necrosi tumoral
IgG	Immunoglobulina G
IgM	Immunoglobulina M
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
RFLP	Polimorfisme en la longitud dels fragments de restricció
IFD	Immunofluorescència directa
MRC5	Línia cel·lular de teixit fetal pulmonar
VERO	Línia cel·lular (cèl·lules epitelials de ronyó de mona verda africana)
WI-38	Línia cel·lular de fibroblasts de pulmó humà
HELA	Línia de cèl·lules neoplàsiques cervicouterines
L-929	Línia cel·lular procedent de teixit subcutani areolar i adipós de ratolí
IFI/MIF	Microimmunofluorescència indirecta
PBS	Buffer fosfat salí

CA	Cross-absorció
WB	Western immunoblot
OMS	Organització Mundial de la Salut
ELISA/EIA	Enzimoimmunoassaig
LPS	Lipopolisacàrid
CEC	Cèl·lules endotelials
EDTA	Àcid etilendiaminotetracètic
SCA	Surface cell antigen
LATE-PCR	Linear after the exponential-Polymerase chain reaction
ATBF	African Tick Bite Fever
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization -Time Of Flying
EDO	Malalties de declaració obligatòria
ITT	Indian Typhus Tick
QTT	Quesland Typhus Tick
TBE	Tris-borat-EDTA
ADS	Associació defensa sanitària
BSA	Albúmina sèrica bovina
NBT-BCIP	Substrat NBT i cromogen BCIP
OR	Odds ratio
SENLAT	“Scalp Eschar and Neck Lymphadenopathy after tick bite”

INTRODUCCIÓ

1 INTRODUCCIÓ

1.1 UNA MICA D'HISTÒRIA

Històricament les rickettsiosis han representat una de les grans plagues de la humanitat. Tucídides, al segle V aC, ja fa referència a un procés febril exantemàtic a la *Història de la guerra del Peloponès*. Més tard, l'any 1862, en l'obra clàssica de C. H. Murchison *A Treatise on the Continued Fevers of Great Britain* es constata que la història completa del tifus és la història d'Europa en els tres segles i mig anteriors. Aquestes epidèmies, doncs, sempre han estat lligades a situacions de fam, misèria i amuntegament.

En el setge de Granada (1483), les tropes dels Reis Catòlics van patir nombroses baixes: prop de 17.000 morts de tifus exantemàtic. Ja en el segle XX, en el curs de la Primera Guerra Mundial, a Sèrbia, més de 150.000 ciutadans van morir de tifus, i a Rússia n'hi va haver més de 30 milions de casos i prop de 3 milions de morts.

El 1899 Edward E. Maxey va fer la primera descripció de la malaltia "Rocky Mountain spotted fever" (RMSF), prototip de les rickettsiosis transmeses per paparres. El 1907 el metge americà Howard Taylor Ricketts fou el primer a descriure el bacteri causant d'aquesta malaltia i del tifus exantemàtic, que en el seu honor van rebre el nom de rickètsies.

El 1919 S. Burt Wolbach va demostrar experimentalment que l'agent de la RMSF *Rickettsia rickettsii* era transmès i mantingut per una paparra del gènere *Dermacentor*. Al llarg del segle XX es van anar caracteritzant rickètsies del grup de les febres tacades a l'Amèrica del Nord: *Rickettsia parkeri* el 1939, *Rickettsia montanensis* el 1963 i *Rickettsia rhipicephali*, el 1978. Aquestes rickètsies es van considerar en principi com no patògenes.

Paral·lelament, en altres continents també es van interessar per l'estudi de les rickettsiosis. Així, les primeres observacions respecte a la FBM van ser fetes per Conor i Bruch a Tunísia el 1910, on parlaven d'un procés febril i anomenaven l'exantema *botó* (15). Simultàniament

a casos descrits a Marsella, el 1917 va esclatar de manera epidèmica a Cannes. Una mica més tard, al 1920, Carducci, a Roma, publica un treball on va recopilar unes 16 observacions en un període de 10 anys.

Ja al 1925, Pieri descriu per primera vegada l'escara "taca negra" en el punt d'inoculació i, juntament amb Olmes i Boinet (1927), indiquen la possible transmissió de la malaltia per la paparra del gos.

Caminopetros i Brumpt (16) assenyalen *R. conorii* com l'agent etiològic i Duran i Coseil identifiquen *Rhipicephalus sanguineus* (*Rh. sanguineus*) com el reservori i vector de la malaltia al nord d'Àfrica. La primera referència a Espanya sobre la infecció humana es remunta al 1928 (17).

Arran del Primer Congrés Internacional d'Higiene Mediterrània el 1932 aquesta malaltia se la va denominar Febre Botonosa Mediterrània (FBM).

Durant dècades es va considerar que *R. conorii* era l'únic agent etiològic de les rickettsiosis transmeses per paparres a Europa i Àfrica. De la mateixa manera que *Rickettsia sibirica* (*R. sibirica*) ho era a l'URSS i la Xina, *Rickettsia australis* (*R. australis*) a Austràlia i *Rickettsia rickettsii* (*R. rickettsii*) al continent americà. (Figura 1).



Figura 1. Primeres espècies de rickettsies considerades patògenes.

Els estudis posteriors van aportar que el 1984 es coneguessin dins el grup de les febres tacades 5 espècies de rickètsies patògenes; el 2005, 14; i el 2012 ja es coneixien 17 espècies diferents de rickètsies patògenes amb 4 subespècies de *R. conorii* i 2 subespècies de *R. sibirica* (18,19).

1.2 AGENT ETIOLÒGIC: EL GÈNERE *RICKETTSIA*

1.2.1 Taxonomia del gènere *Rickettsia* sp.

Hi ha molts problemes i molta feina a fer pel que fa a la taxonomia de les rickètsies. No se sap com anomenar als nous aïllats, si soques, espècies o serotips. Algunes soques es van considerar espècies diferents per serotipatge, i després, en estudis moleculars, es va comprovar que els serotips no tenien una variabilitat tan elevada en la seva seqüència d'ADN com per considerar-les espècies diferents. En els propers anys s'assistirà a un canvi profund en la nomenclatura taxonòmica de les rickètsies. Des del punt de vista pràctic seria necessari poder distingir amb noms diferents els organismes responsables de quadres clínics diferents.

Per a la classificació de les rickètsies disposem en aquest moment de tècniques molt acurades com ara les moleculars, que actualment s'estan aplicant amb bastant èxit a la identificació de les soques ja aïllades anteriorment i a les noves que es van descriuint.

Com bé s'ha dit, la classificació taxonòmica de les rickètsies ha patit grans canvis degut a l'aparició dels mètodes de classificació moleculars, que ha permès un millor coneixement de les característiques filogenètiques de les rickètsies. Taxonòmicament són α -*Proteobacteria*, pertanyen a l'ordre *Rickettsiales*, família *Rickettsiaceae*, tribu *Rickettsieae* i gènere *Rickettsia*.

Inicialment aquest gènere estava subdividit en tres grups: el de les febres del tifus (*Rickettsia typhi* i *Rickettsia prowazeki*), el grup de les febres tacades amb més de 30 espècies diferents i el grup del tifus dels matolls, que incloïa l'espècie *Rickettsia tsutsugamushi*. Posteriorment es va demostrar que aquesta última era diferent del gènere *Rickettsia* i es va incloure en un nou gènere *Orientia* que inclou una única espècie *Orientia tsutsugamushi* (20).

Actualment, doncs, atenent a les bases clíniques i als agents etiològics, es classifiquen en dos grups: el grup de les febres tacades, on les paparres són els seus vectors i reservoris principals a excepció de *Rickettsia felis* (transmesa per puces) i *Rickettsia akari* (transmesa per àcars), i el grup de les febres tíffiques que tenen com a vectors els polls humans (*Rickettsia prowazeki*) i les puces (*Rickettsia typhi*) (Taula 1).

TAULA 1. Taxonomia del gènere *Rickettsia*

Ordre	Família	Tribu	Gènere	Grup
<i>Rickettsiales</i>	<i>Rickettsiaceae</i>	<i>Wolbachieae</i>		
		<i>Rickettsieae</i>	<i>Rickettsia</i>	Febres tacades
				Febres tíffiques
			<i>Orientia</i>	
	<i>Anaplasmataceae</i>			

Dins el grup de les febres tacades, que són les que tractarem en aquest treball, actualment hi ha validades i nominades 26 espècies de rickètsies; en 23 d'elles, a més, es coneix el seu genoma. Entre elles, 17 espècies i 6 subespècies estan considerades patògenes. A part n'hi ha algunes més encara no denominades, de les quals es desconeix el seu paper en infeccions humanes, ja que solament s'han aïllat en paparres o altres animals. En la Taula 2 es descriuen les espècies i subespècies de rickètsies patògenes denominades fins el moment (2).

TAULA 2. Rickèttsies del grup de les tacades denominades i patògenes transmeses per paparres

Espècies	Distribució geogràfica
<i>R. aeschlimannii</i>	Europa, Àsia, nord d'Àfrica, Àfrica subsahariana
<i>R. africae</i>	Amèrica del Nord i Central, Àsia, nord d'Àfrica, Àfrica subsahariana, Illes del Pacífic
<i>R. australis</i>	Austràlia
<i>R. conorii ssp. caspia</i>	Europa, Àfrica subsahariana
<i>R. conorii ssp. conorii</i>	Europa, Àsia, nord d'Àfrica, Àfrica subsahariana
<i>R. conorii ssp. indica</i>	Europa, Àsia
<i>R. conorii ssp. israelensis</i>	Europa, Àsia, nord d'Àfrica
<i>R. heilongjiangensis</i>	Àsia
<i>R. helvetica</i>	Europa, Àsia, nord d'Àfrica
<i>R. honei</i>	Àsia. Austràlia, Pacífic
<i>R. japonica</i>	Àsia
<i>R. massiliae/Bar 29</i>	Amèrica del Nord, Central i del Sud, Europa, Àsia, nord d'Àfrica, Àfrica subsahariana
<i>R. monacensis</i>	Europa, nord d'Àfrica
<i>R. parkeri</i>	Amèrica del Nord, Central i del Sud
<i>R. philipii</i>	Amèrica del Nord i Central
<i>R. raoultii</i>	Europa, Àsia, nord d'Àfrica
<i>R. rickettsii</i>	Amèrica del Nord, Central i del Sud
<i>R. sibirica ssp. mongolitimonae</i>	Europa, Àsia, nord d'Àfrica, Àfrica subsahariana
<i>R. sibirica ssp. sibirica</i>	Àsia
<i>R. slovacae</i>	Europa, Àsia, nord d'Àfrica
<i>R. tamurae</i>	Àsia

L'estudi de diferents gens per la classificació de les rickèttsies ha suposat una autèntica revolució en aquest camp. Les seqüències d'alguns gens s'han utilitzat per definir espècies i subespècies; entre ells, *gltA*, *ompA*, *ompB* i *genD*. (Figura 2) (21).

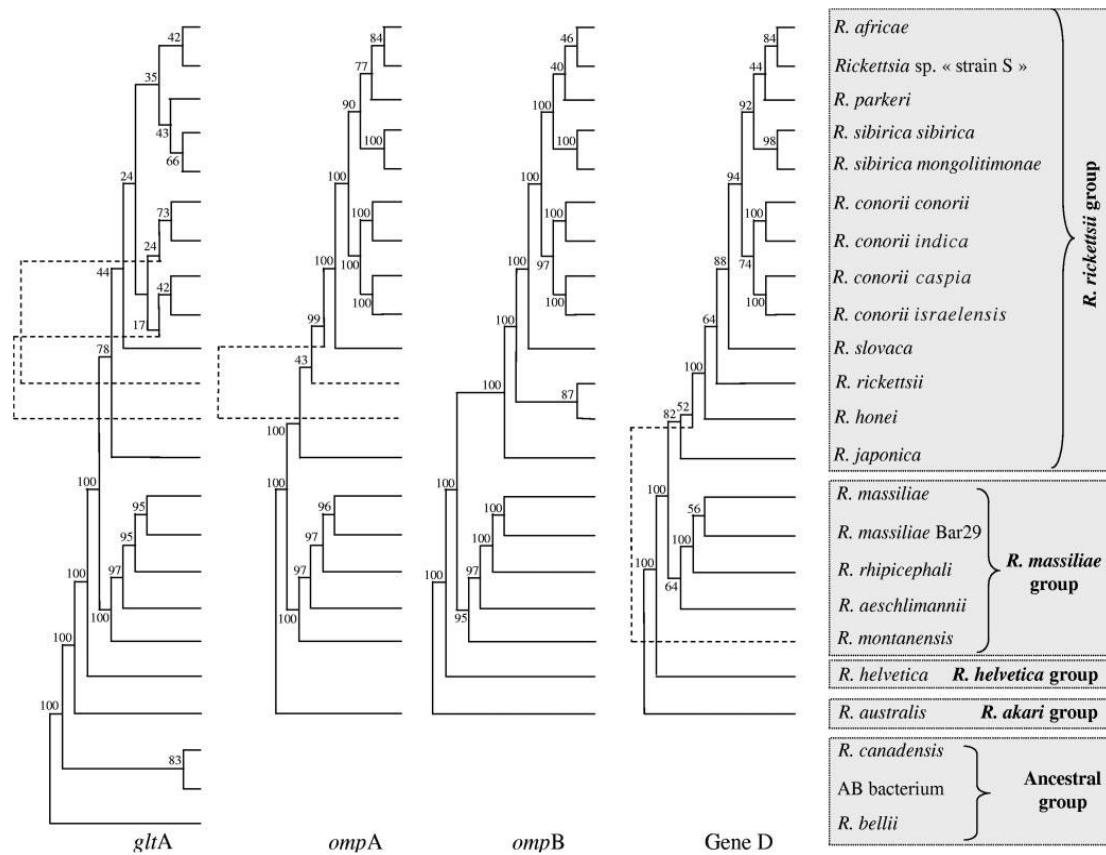


Figura 2. Classificació filogenètica de les rickètsies. “Tick-borne Rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts”. *Clin Microbiol Rev.*2005. (18), 4:719-756.

Una de les principals dificultats en l’estudi de les rickètsies ha estat determinar el cut-off en el percentatge de divergència de la seqüència genòmica per tal de distingir espècie i subespècie. Segons les últimes guies per la classificació d’espècies, es defineix una nova espècie de rickettsia quan la similitud dels gens *gltA*, *ompA*, *ompB* i genD és <99,9%, <98,8%, <99,2% i <99,3% respectivament, i quan la similitud genòmica és més alta però divergeixen en el fenotip, es consideren subespècies diferents. Per aquesta raó hi ha descrites 4 subespècies de *R. conorii* i dues de *R. sibirica* (22).

Com es pot veure, la taxonomia de les rickètsies és controvertida i no hi ha un consens universal en la seva classificació, ja que alguns rickettsiòlegs creuen que hi ha masses espècies reconegudes amb aquests mètodes.

Per altra banda, com que els genomes de les rickètsies són relativament petits, s'han seqüenciat molts gens del seu genoma. En la Figura 3, podem observar l'arbre filogenètic de les espècies amb el genoma seqüenciat (23, 24).

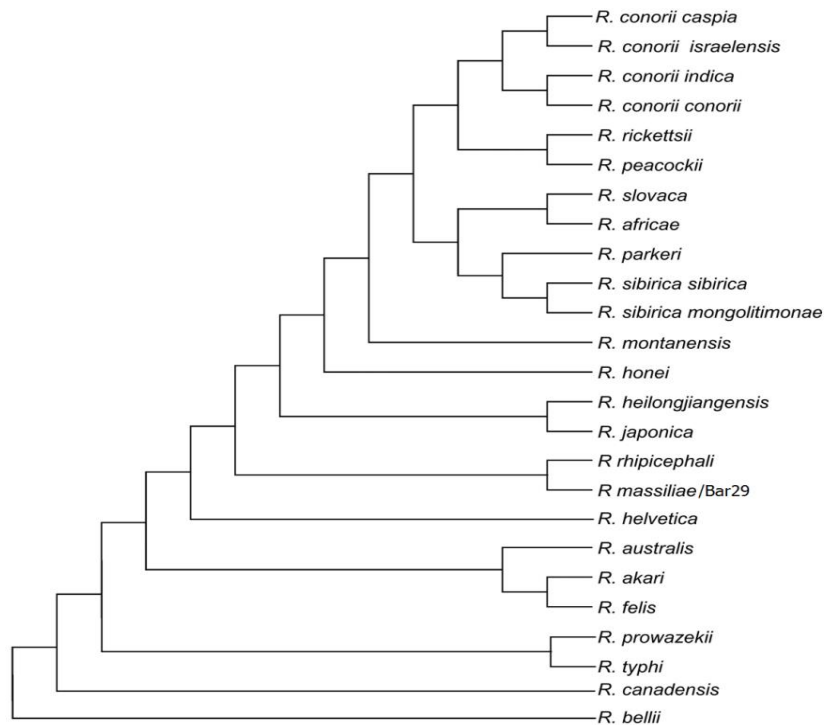


Figura 3. Classificació filogenètica basada en la seqüència genòmica d'espècies de rickètsies. "Update on Tick-Borne Rickettsioses around the world: a geographic approach". *Clin. Microbiol. Rev.* 2013, 26(4):657-700.

1.2.2 Característiques microbiològiques. El bacteri

Les rickètsies són bacteris gram negatius, en forma de coc bacil, de mida petita 0,3-0,6 μm de diàmetre x 0,8-2 μm de llargada, pleomòrfics, immòbils i aerobis. Tenen paret cel·lular i una membrana citoplasmàtica trilaminar, amb ADN i ribosomes i sense una àrea nuclear definida. En algunes espècies s'ha observat en la seva superfície una càpsula externa. (Figura 4, 5).

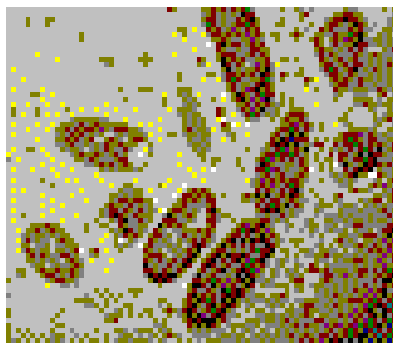


Figura 4. Microfotografia de rickètsies per microscòpia electrònica.

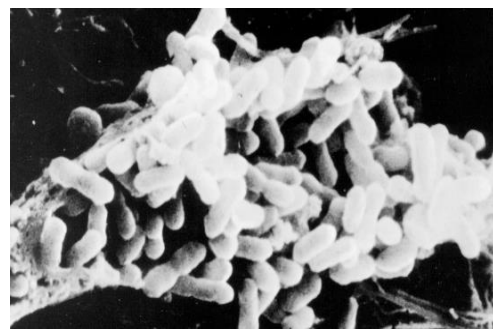


Figura 5. Microfotografia de rickètsies.

Durant anys, ateses les seves característiques, s'havien considerat microorganismes situats entre els bacteris i els virus, però finalment es va veure que en realitat són bacteris perquè:

- Presenten multiplicació per fissió binària.
- Contenen ADN i RNA. La mida del genoma en nombre de bases és comparable al d'altres bacteris de mida similar.
- La seva paret cel·lular està composta d'àcid muràmic i àcid diaminopímelic, característica dels bacteris gram negatius. A la vegada, estudis químics de suspensions purificades de la paret cel·lular de rickètsies han demostrat que està formada de components com carbohidrats, proteïnes i lípids semblants als bacteris gram negatius.

Ara bé, les rickètsies tenen característiques diferencials amb altres grups de bacteris pel fet de ser paràsits intracel·lulars obligats, és a dir, necessiten cofactors, nucleòtids (CoEA, NAD, ATP) de la cèl·lula hoste.

Resideixen lliurement en el citoplasma de les cèl·lules endotelials vasculares i reticuloendotelials humanes i de certs mamífers i també en les cèl·lules de l'epiteli intestinal i de les glàndules salivals dels seus hostes artròpodes, i es multipliquen per fissió binària de forma similar a la resta de bacteris. Fora de la cèl·lula les rickètsies perden la seva capacitat infectiva, s'atura la seva capacitat metabòlica i no poden sobreviure en el medi ambient, ja que requereixen l'energia que els proporciona la cèl·lula que parasiten i no poden fabricar les proteïnes, àcids nucleics i molècules essencials per sobreviure. No creixen, doncs, en cultius axènics, pel seu aïllament cal el cultiu cel·lular i malgrat la seva estructura de gram negatiu no es tenyeixen bé amb la tinció de Gram però sí amb altres tincions com Giemsa, Castañeda i Giménez (25, 26). (Figura 6).

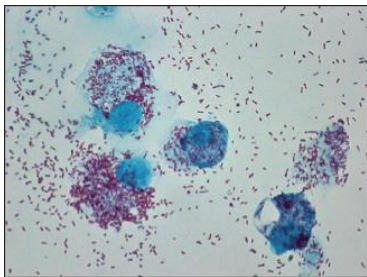


Figura 6. Tinció de Giménez d'un cultiu de rickètsies.

Són organismes molt làbils a les condicions ambientals i són inactivats en el laboratori en condicions adverses, 8% formaldehid, 1% fenol, desinfectants com lleixiu, 70% etanol, raigs UV i a 56°C en 30'. Els títols infectius es perden en poques hores a T^a ambient i en 24 h. a 4°C.

El mecanisme de transmissió es a través d'artròpodes. En ells es multiplica la rickètsia i té lloc el seu cicle vital, on també es produeix transmissió transovàrica i transestradial, poden infectar diferents vertebrats que actuen com a hostes i asseguren la supervivència dels paràsits vectors.

Per altra banda poden accidentalment infectar les persones al produir-se una picada per part de l'artròpode vector. En el cas dels polls, aquests defequen després de la picada, i la persona introdueix la rickètsia dins el seu organisme al rascar-se (27).

1.2.3 Mecanisme de patogenicitat

Després d'ésser introduïdes en l'organisme, les rickètsies infecten l'endoteli vascular a l'adherir-se als receptors cel·lulars per les proteïnes OmpA i OmpB. Aquestes afavoreixen l'entrada a les cèl·lules al provocar alteració de l'actina del citoesquelet i els bacteris es multipliquen en aquestes cèl·lules disseminant-se pel sistema vascular, produint vasculitis dels petits vasos. Les rickètsies contacten amb les cèl·lules endotelials, indueixen la seva pròpia fagocitosi i, un cop dins el citoplasma, surten del fagosoma i proliferen dins el citosol de la cèl·lula infectada i per exocitosi a les cèl·lules contigües. La infecció s'inicia en la zona d'inoculació, i s'estén posteriorment de cèl·lula en cèl·lula per la circulació venosa, la qual cosa facilita l'aparició de múltiples focus de vasculitis multisistèmica. (Figura 7).

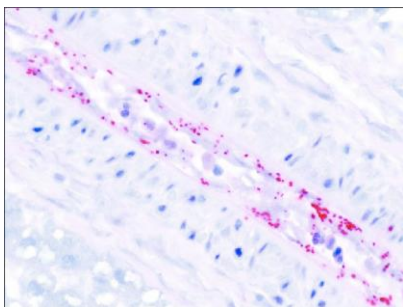


Figura 7. Tinció de Gímenez on s'observen rickètsies en endoteli vascular. Imatge CDC.

Aquestes lesions vasculítiques es poden localitzar a nivell cutani, pulmonar (pneumonitis intersticial), pericardi, meningi, hepàtic, renal, intestinal, etc.

Altres manifestacions com la hipovolèmia, l'edema o la hipotensió es troben relacionades per l'augment de la permeabilitat capil·lar a causa de la infecció de les cèl·lules endotelials (25, 28, 29).

S'han descrit també en alguns pacients complicacions hemorràgiques i trombòtiques relacionades amb trastorns d'alguns factors de la coagulació, encara que són poc freqüents (30).

Les rickètsies activen el factor nuclear KB que inhibeix l'apoptosi i incrementa la producció de citocines proinflamatòries. En alguns estudis realitzats en la nostra àrea geogràfica en pacients amb FBM, s'han analitzat el paper de certes citocines com el factor de necrosis tumoral (TNF) alfa i de la interleukina-6 com a marcadors de gravetat. Sembla que poden exercir un important paper en la defensa enfront de patògens intracel·lulars com les rickètsies. S'ha trobat in vitro que el TNF és alliberat per les cèl·lules mononuclears infectades per *R. conorii* i té una activitat anti-rickettsial directa. S'ha vist que aquestes citocines es troben elevades en el sèrum dels pacients amb la fase aguda de la malaltia i amb una intensitat més gran en les formes més greus (31, 32).

1.3 EPIDEMIOLOGIA. EL VECTOR

Les rickettsies es transmeten per artròpodes vectors, entre ells, les puces, polls, àcars i paparres que es troben infectades per aquests bacteris. La distribució i incidència de la malaltia es troba relacionada amb l'àrea geogràfica, cicles de vida i època d'activitat del seu vector.

En el cas del grup de les febres tacades les paparres són considerades el seu vector principal.

1.3.1 Característiques generals de les paparres

Són artròpodes de la classe *Arachnida*, en la qual trobem tres famílies:

- *Ixodidae* o paparres dures. Presenten una cutícula quitinosa, l'escut.
- *Argasidae* o paparres toves. No presenten la cutícula quitinosa, són flexibles.
- *Nuttalliellidae*

De les tres famílies, la *Ixodidae* és la més àmplia amb 12 gèneres, entre els quals destaquen per la seva importància: *Ixodes*, *Amblyoma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyaloma* i *Rhipicephalus* (33).

A Europa les *Ixodidae* es consideren el principal vector i reservori de malalties infeccioses en les persones. Les seves particularitats ecològiques contribueixen de forma clara en les característiques clínico-epidemiològiques de les malalties transmeses a les persones (34, 35).

Són paràsits hematòfags que realitzen la presa de sang d'una forma continua. Presenten tres fases en el seu cicle biològic: larva amb tres parells de potes, nimfa i adult amb quatre parells de potes. Els cal la ingesta de sang per passar d'un estadi a l'altre. (Figures 8, 9).



Figura 8. Part anterior d'una paparra on s'observen les peces bucals.

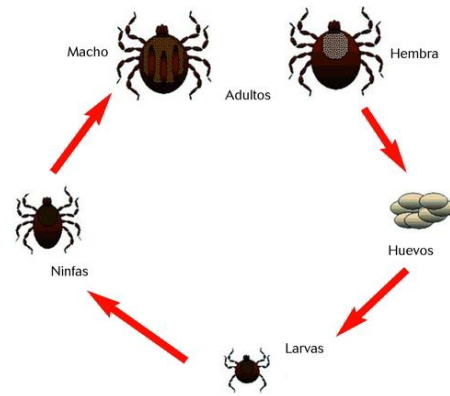


Figura 9. Cicle vital de les paparres.

Una paparra pot arribar a parasitar al llarg de la seva vida una, dues o tres espècies d'hostes, depenent de l'espècie.

Poden transmetre diferents tipus de microorganismes patògens, que inclouen bacteris, virus, protozous i helmints.

En el nostre medi destaquen com a gèrmens productors de malalties transmeses per les paparres:

1. Les borrellies causants de la malaltia de Lyme i la febre recurrent.
2. La *Francisella tularensis*, causant de la tularèmia.
3. Les rickettsies, causants de les rickettsiosis.

Una altra característica de les paparres, a banda de la transmissió de microorganismes, resideix en el fet que poden produir efectes locals i/o sistèmics en els animals i, en alguns casos, també a les persones que parasiten (36), per exemple:

- Pèrdua de sang quan la parasitació és molt elevada.
- Síntomes locals en el lloc de la picada tals com inflamació, picor, alopecia o liquenificació.

- Reaccions tòxiques i al·lèrgiques com a resposta als antígens i altres substàncies presents en la saliva dels artròpodes que inoculen durant la ingesta de sang.
- Paràlisi provocada per la picada de la paparra, no molt freqüent en el nostre medi però sí en països com els EUA i Austràlia, on resideixen les espècies de paparres relacionades amb aquesta afecció (37). Entre les espècies responsables, trobem *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis* i *D. occidentalis* a l'Amèrica del Nord i *Ixodes holocylces* a Austràlia.

1.3.2 Transmissió de rickètsies entre les paparres

La capacitat d'actuar com a vector d'una paparra depèn de diferents factors. La seva condició d'hematòfags obligats, l'ampli ventall d'hostes, l'elevada resistència, la necessitat d'una alimentació perllongada durant dies i la capacitat de transmetre transovàricament determinats patògens són factors que afavoreixen tant la transmissió com la seva propagació (36).

La transmissió de rickètsies entre les paparres es produeix tant per via transestadial, és a dir d'un estadi a l'altre del seu cicle biològic (larva, nimfa i adult), com transovàrica, per via vertical d'una generació a una altre. En aquest últim cas l'èxit no és del 100% i va davallant en les successives generacions, però és essencial per al manteniment de la infecció (38), (Figura 10).



Figura 10. Estadis de les paparres

Altres mètodes de transmissió de rickètsies entre paparres han estat descrits, com és el cas de transmissió sexual de *Rickettsia rickettsii* (*R. rickettsii*) des de paparres mascles infectades a femelles no infectades, i també l'adquisició de la rickètsia en el procés de co-feeding que passa quan diverses paparres s'alimenten properes entre si en el mateix hoste. En aquesta circumstància es pot produir el traspàs del bacteri d'una paparra infectada a una no infectada al picar i alimentar-se en llocs molt propers. Aquest fet ha estat demostrat amb *R. rickettsii*, *R. slovaca* i *R. massiliae* (39, 40).

Tal com va demostrar Burgdorfer, les rickètsies es poden localitzar en molts teixits de la paparra: budell mig, ovari, túbuls de Malpighi. S'han detectat també en les cèl·lules de l'epiteli intestinal, de les glàndules salivals i hemòcits. Es poden eliminar per la femta, fluids coxals i la saliva. Aquesta última és la més important per la transmissió (38).

En la paparra en general la infecció per rickètsies no és perjudicial. Si la parasitació és molt alta pot causar una disminució de l'oviposició. El nivell de rickettsèmia de l'hoste i la quantitat de sang ingerida és la que marcarà el nivell d'infecció que pot tenir la paparra, ja que estarà relacionat amb el nombre de microorganismes ingerits (38).

1.3.3 Transmissió de rickètsies des de la paparra als humans

Els humans no formen part del cicle biològic normal de les rickètsies com sí ho són els hostes vertebrats i les paparres. S'ha demostrat que una sèrie de característiques des del punt de vista ecològic i epidemiològic han d'intervenir perquè això sigui possible, com el major nombre de paparres a l'estiu, així com l'augment d'activitats a l'aire lliure de les persones en el mateix període, i també determinades condicions atmosfèriques que afavoreixen l'augment de vectors en una determinada zona.

Perquè una paparra tingui més possibilitat de transmetre una rickètsia cal que aquesta es trobi a la saliva de la paparra o s'excreti en la femta, que tingui una certa afinitat per picar a les persones, que hi hagi un augment del nombre de vectors i que aquests estiguin infectats en un alt grau (36).

Hi ha moltes espècies de paparres transmissores de rickètsies, totes pertanyents a la família *Ixodidae*. Entre les més importants hi ha el grup del *Rhipicephalus sanguineus* (*Rh. sanguineus*), que inclou tres espècies molt relacionades: *Rh. sanguineus*, *Rh. turanicus* i *Rh. pusillus* transmissors de *R. conorii* ssp. *conorii*, *R. massiliae* i *R. conorii* ssp. *caspia* respectivament. I també *Dermacentor marginatus*, transmissor de *R. slovacica*; *Dermacentor variabilis*, transmissor de *R. rickettsii*; *Amblyoma hebraeum*, *Amblyoma maculatum* i *Ixodes ricinus*, transmissors de *R. africae*, *R. parkeri* i *R. helvetica* respectivament (41), (Figures 11, 12)



Figura 11. Algunes espècies de paparres transmissores de microorganismes patògens.



Figura 12. Paparres adultes, a la dreta després de la ingesta de sang.

Les dues espècies de paparres més relacionades com a vectors de les rickètsies que tracta aquesta tesi pertanyen les dues al grup *Rh. sanguineus* i són:

Rh. sanguineus, la paparra marró del gos. Aquest és el seu hoste principal, que conviu estretament amb l'espècie humana. S'associa a àrees de vegetació mediterrània però té una especial afinitat per les construccions humanes, on pot arribar a constituir una autèntica plaga. L'època de màxima activitat va de febrer a octubre; les formes adultes són actives durant la primavera, mentre que les formes immadures ho són a l'estiu i principis de tardor. Presenta un cicle trifàsic o sigui que per mudar d'un estadi a l'altre fins arribar a adult necessita tres hostes diferents, tot i que aquests poden ser de la mateixa espècie (42).

Aquesta espècie és la que es troba més estretament relacionada en l'epidemiologia de la FBM. La paparra pot transmetre el bacteri en els seus tres estadis, larva, nimfa i adult, però realment són els estadis immadurs els responsables de la majoria dels casos de la FBM en la zona de la Mediterrània. Diferents estudis observen que el 90% dels *Rh. sanguineus* recollits en les persones són formes immadures, i que el pic estacional de la malaltia coincideix amb el moment de màxima activitat dels estadis immadurs i no amb el de les formes adultes, ja que aquestes rarament parasiten l'espècie humana (43).

Rhipicephalus turanicus (*Rh. turanicus*), associada també a la zona mediterrània. Els adults es poden trobar des de principis de març fins el mes de juny. Els estadis més immadurs, en canvi, són actius durant l'estiu.

Rh. turanicus està considerada el principal vector i reservori de *R. massiliae* Bar 29 (40). Aquesta paparra forma part del complex *Rh. sanguineus*. Es tracta d'una espècie àmpliament distribuïda en àrees de climatologia mediterrània, la qual presenta un espectre d'hostes molt ampli. En fase adulta és freqüent trobar-la parasitant remugants domèstics com la cabra, l'ovella, els bòvids; en el cas de les formes immadures, micromamífers. En àmbits silvestres pot parasitar el porc senglar o la guineu.

1.4 ELS HOSTES O RESERVORIS

Són aquells organismes en els quals viuen i es multipliquen els microorganismes. Actuen com a font d'infecció i generalment no es troben afectats per ells. En el cas de les rickettsies hi ha un ampli ventall d'hostes, des de la mateixa paparra, que actua a la vegada de vector, fins a rèptils, aus i diferents mamífers (rosegadors, conills, remugants, gossos, etc...). Per ser un bon reservori la rickettsièmia ha de ser llarga i l'animal ha de ser un bon hoste pel vector. Les persones són hostes ocasionals i no actuen com a reservoris ja que no compleixen cap de les dues condicions anteriors. En els humans la transmissió per la paparra es deu a una exposició accidental, ja sigui ambiental o ocupacional (44, 45).

No disposem de molts estudis que analitzin el paper que juga l'hoste en l'epidemiologia de les rickettsiosis. Per una banda, tot i que les paparres tenen una predilecció per determinats animals (que són el seu hoste principal), davant certs condicionants poden reduir aquesta especificitat i ampliar el nombre d'hostes que poden intervenir en el seu cicle.

L'hoste pot actuar com a reservori de la rickettsia, o bé simplement com a suport tròfic de la paparra vectora. En qualsevol cas, el seu rol en l'epidemiologia serà destacable si és capaç d'amplificar el patogen, ja sigui infectant noves paparres a partir de la rickettsièmia o bé a partir del co-feeding, que constitueix un mecanisme de transmissió observat en *Rh. turanicus* entre d'altres. Aquesta via de transmissió ja esmentada es produeix entre aquelles paparres que es mantenen agregades durant el seu procés d'alimentació sobre l'hoste sense que sigui necessària la infecció d'aquest (40).

Dins l'eco-epidemiologia de les malalties transmeses per paparres intervé un cicle salvatge, que permet la circulació i manteniment de l'agent a la natura, i un cicle domèstic, que generalment acosta el patogen a l'ambient humà i que implica la circulació de l'agent etiològic principalment entre la paparra i els animals domèstics, i que constitueix la font de

contagi més important pels essers humans. Les paparres es troben en el punt d'intersecció entre ambdós cicles (46-49).

En el cas de la FBM, el cicle domèstic està constituït per *Rh. sanguineus* i el seu hoste principal és el gos (Figura 13). Estudis realitzats per Raoult i col. a Marsella, van demostrar que la incidència de la malaltia és superior en les àrees més deprimides, on el contacte amb gossos i la parasitació d'aquests per *Rh. sanguineus* és més alta (43). El gos es considera el principal portador de paparres infectades a l'ambient humà. La seroprevalença en gossos es considera un bon marcador de la infecció per *R. conorii*. En aquest sentit alguns estudis realitzats al nostre país van detectar seroprevalències elevades enfront de *R. conorii* que variaven des del 26% a Catalunya (9) al 56% al nord-est d'Espanya (50).



Figura 13. El gos com un dels principals hostes de les paparres.

Atès que el gos té una resposta immunitària humoral de curta durada, i que, pel que es coneix, no és freqüent que presenti signes de malaltia, se suposa que actuaria tan sols com a portador de paparres infectades (51, 52). Els estudis en gossos ens serveixen com a sentinelles per establir la prevalença del focus de rickettsiosis i constitueixen un bon marcador de l'estat de la FBM en una àrea determinada (53-56).

Seguint en aquesta línia, en estudis realitzats pel nostre grup a Catalunya l'any 2009 que analitzaven les diferències estacionals dels anticossos enfront de *R. conorii* en el gos, aquests van ser seronegatius durant els mesos de gener i febrer, i es va produir una seroconversió a partir del març, resultats que es correlacionen amb els períodes de màxima activitat del vector *Rh. sanguineus* (57).

Quant al cicle salvatge, els rosegadors, els conills i les llebres constitueixen el focus natural de *R. conorii*. Els animals salvatges es troben involucrats en el manteniment i circulació de les rickettsies a la natura. El paper d'aquests hostes és, com en el cas del gos, de fer de disseminadors de paparres infectades. Per aquest motiu la seroconversió enfront de les espècies de rickettsies en animals salvatges també seria un indicador excel·lent de l'activitat rickettsial en el seu hàbitat (45, 58, 59).

1.5 MÈTODES DIAGNÒSTICS

El diagnòstic de la febre botonosa es basa principalment en la clínica del pacient. La malaltia en pacients amb presentacions atípiques i fora de l'època estacional habitual de manifestació de la mateixa pot portar a un diagnòstic incorrecte, i per tant poden aparèixer complicacions clíniques (60-62).

En les rickettsiosis del grup de les tacades, generalment, els símptomes comencen de 4 a 10 dies després de la picada i inclouen febre, mal de cap, dolor muscular, *rash* i en molts casos una escara *d'inoculació* característica en el lloc de la picada. Val a dir però que aquestes manifestacions varien depenent de l'espècie de rickettsia involucrada, i que les manifestacions típiques poden trobar-se absents o no ser observades amb l'examen clínic.

Per altra banda, el diagnòstic de les rickettsiosis pot significar un repte perquè molts dels símptomes trobats en les fases inicials de la malaltia són inespecífics i molts clínics poden no pensar en rickettsiosis al no estar-hi familiaritzats (63, 64).

A la vegada, cal esmentar que les infeccions poden cursar amb complicacions i causar alteracions greus i, a vegades, fatals, i produir-se una lenta recuperació associada a un retard en el diagnòstic al no instaurar un tractament correcte. És per tant molt important un diagnòstic ràpid associat a una teràpia adequada (65-68).

Des de la vessant de diagnòstic de laboratori, molts mètodes diagnòstics s'han assajat i avaluat per a les rickettsiosis, des de la detecció directa en teixits, aïllament de les rickettsies de teixits i serologia. No obstant, fins ara cap tècnica ha estat capaç de donar un diagnòstic precoç que pugui incidir en el tractament de la malaltia. La serologia és el mètode més freqüentment utilitzat. El serodiagnòstic amb dos sèrums d'entre 15-21 dies de diferència, i en què es produeixi seroconversió, sembla per ara el més recomanat. Però per altra banda, les tècniques serològiques presenten importants inconvenients. La producció d'anticossos IgG és tardana, i s'ha d'esperar la seroconversió. La determinació de les IgM pot escurçar el

diagnòstic, però ens trobem que en alguns casos pot donar falsos negatius. També, la similitud de determinats antígens rickettsials entre espècies del grup de les febres tacades fa que es produeixin reaccions creuades entre elles, dificultant el diagnòstic a nivell d'espècie. Philip i col. (69, 70) van observar que inoculant conills porquins amb *R. rickettsii* (rickètsia del grup de les tacades patògena) aquests desenvolupaven una reacció immunitària humoral enfront d'altres rickètsies del grup.

Respecte al cultiu, la principal dificultat es el caràcter intracel·lular de la rickètsia, que impedeix l'aplicació de les tècniques de cultiu convencional. Requereixen pel seu aïllament una metodologia basada en l'aïllament en cèl·lules vives, ja sigui en animals de laboratori, inoculació en embrions de pollastre o bé el cultiu cel·lular. La infecció i el manteniment de línies cel·lulars necessàries per al diagnòstic específic requereixen de determinades infraestructures i de tècniques de laboratori laborioses i costoses, per la qual cosa queden limitades a laboratoris d'investigació molt especialitzats (71, 72).

Des de fa anys, el Centre de Referència de Rickètsies de Marsella ha utilitzat, amb bons resultats per a les rickètsies, el cultiu ràpid *shell vial* aplicat al diagnòstic d'altres microorganismes intracel·lulars com els virus (73-75). Es tracta d'una tècnica més adaptable als laboratoris convencionals i que permet, teòricament, un diagnòstic ràpid en 48-72 hores. Aquesta tècnica, ja utilitzada pel nostre grup, ens ha permès l'aïllament de *R. massiliae* Bar 29 a partir d'hemolimfa de paparres (13) i de *R. conorii* a partir de mostres de sang de pacients clínicament diagnosticats de FBM (76).

En els darrers anys s'han assajat algunes tècniques moleculars per a l'estudi de les rickètsies, s'han aplicat PCR-RFLP, *nested* PCR i seqüenciació a la identificació de soques rickettsials de diferents mostres. Les recents metodologies de PCR a temps real, acoblades a la detecció de gènere i espècie mitjançant sondes d'hibridació, han millorat la sensibilitat i podrien ser útils per al diagnòstic (77, 78).

En una de les últimes revisions realitzades sobre el diagnòstic de laboratori de les rickettsiosis, es descriuen els mètodes disponibles tant inespecífics com específics fins aquell moment, incloent-hi la serologia, el cultiu, la histoquímica, la immunohistoquímica i les tècniques moleculars (21).

Els mètodes de què disposem i que s'han assajat pel diagnòstic de les rickettsiosis es basen en:

- a) Detecció de les rickètsies per examen directe dels teixits.
- b) Aïllament de rickètsies per cultiu de mostres biològiques. Cultiu biològic, cultiu cel·lular i *shell vial*.
- c) Tests serològics.
- d) Detecció i identificació per tècniques moleculars.

Les rickètsies són gèrmens molt contagiosos, responsables d'infeccions en treballadors de laboratori i per tant la manipulació de les mostres per al seu estudi requereix de medis adequats i personal experimentat.

1.5.1 Detecció de les rickètsies per examen directe dels teixits

Es pot realitzar en teixits *post mortem* formalitzats i parafinats (melsa, nòduls limfàtics, pulmó). Es tenyeixen mitjançant anticossos monoclonals específics marcats o bé amb fluoresceïna o amb un enzim. Aquesta tècnica la va aplicar amb bons resultats Walker i Cain, que va detectar rickètsies en ronyó de 7 de 10 pacients que havien mort per sospita de febre de les Muntanyes Rocalloses (79).

També es pot aplicar en biòpsies de lesions de la pell, on es poden observar en el 50% dels pacients mitjançant tincions de Gímenez, Giemsa o fluorescència directa. La tinció de Gímenez, molt utilitzada per les rickètsies, consisteix a tenyir la mostra amb fucsina i utilitzar com a colorant de contrast verd malaquita, mitjançant aquesta tinció, s'observen les rickètsies vermelles sobre un fons verdós. No obstant, es troben falsos negatius en pacients que han rebut antibiòtics i la sensibilitat varia en funció del nombre de mostres estudiades i de la correcta recollida de la mostra (80).

També és possible la visualització directa en hemolimfa de paparra, que s'extreu a l'amputar la part distal d'una extremitat. Consisteix a dipositar una gota d'hemolimfa en un porta i tenyir per Gímenez o per immunofluorescència directa (IFD) (81).

Les rickètsies s'observen en cas de tinció de Gímenez com coc bacils -molt sovint pleomòrfics- que es tenyeixen de color rosa o vermell. Quant a la IFD, es tracta de detectar l'antigen de rickètsia a partir d'un anticòs específic marcat amb fluoresceïna (80).

1.5.2 Aïllament de rickètsies per cultiu

Les mostres humanes més utilitzades per a l'aïllament de rickètsia són la sang heparinitzada i les biòpsies cutànies. La seva manipulació i conservació ha de ser amb molta cura per tal d'evitar les contaminacions externes que poden afectar el cultiu. També és important que les mostres es recullin abans d'iniciar el tractament antibiòtic i el més aviat possible durant el curs de la malaltia.

Cultiu biològic

Es pot realitzar el cultiu biològic en animals. Els millors són el conillet d'Índies i el ratolí blanc. Després de la inoculació als animals, aquests s'han de seguir cada dia durant 14 dies per si s'observa en ells simptomatologia de malaltia. A vegades calen molts subpassos en altres animals i després acabar amb proves de neutralització amb anticossos que són molt laborioses i tedioses. També es poden observar directament dels teixits d'animals infectats per tincions de Giménez o per anticossos fluorescents. A la vegada s'han de realitzar proves serològiques amb els sèrums dels animals infectats a diferents antígens. Per tal d'obtenir sèrums immunes per a la identificació, s'han d'inocular dosis no letals de les diferents espècies de rickètsies a conillet d'Índies i extreure el sèrum immune específic. Després cal fer titulacions per la tècnica d'immunofluorescència indirecta o fixació de complement. Encara que hi hagi reaccions creuades, el títol de les espècies homòlogues serà sovint més alt (82).

El cultiu amb ous embrionats és una tècnica laboriosa i tediosa. Suspensions estèrils de material triturat, melsa, cervell i sang d'animals infectats s'han d'inocular en el sac vitel·lí d'ous embrionats de 5 a 7 dies. S'han d'anar fent passos cada 10 dies i a vegades són necessaris molt passos abans que s'adaptin i s'observi un creixement abundant i suficient. És

necessari un inòcul elevat de 10^6 rickètsies/gr de teixit per visualitzar-les en la tinció de frotis de sac vitel·lí i d'un inòcul d'un mínim de 10^{7-8} rickètsies per preparar antígens.

En tots els passos de cultius s'ha de realitzar sempre un control de contaminació bacteriològic en placa.

Actualment aquests cultius es troben en desús i tan sols es fan servir per treure contaminants dels cultius com els micoplasmes (74, 75).

Cultiu cel·lular

El cultiu cel·lular convencional no és un mètode d'aplicació rutinària i la seva sensibilitat és baixa. Les línies cel·lulars utilitzades més freqüentment són: fibroblasts humans de pulmó - MRC5-, cèl·lules VERO, WI-38, Hela, L-929, en què les rickètsies es multipliquen en el citoplasma de les cèl·lules, però són necessàries diverses setmanes per a la detecció del creixement. La millor mostra per intentar el cultiu de mostres humanes és la sang; l'inconvenient és que la rickettsièmia és curta, només es troba la rickètsia en el període febril durant la primera setmana de la malaltia i abans del tractament antibiòtic. Per altra banda la concentració de rickètsies és baixa, de 10-100 microorganismes/mL de sang, la qual cosa també dificulta el rendiment del cultiu.

La millor mostra és la sang total heparinitzada, però també es pot utilitzar el quall o la part inferior del plasma. És important que si la mostra no es pot processar de seguida es congeli a -70°C perquè no perdi viabilitat.

També es pot utilitzar per al cultiu el material procedent d'autòpsies -vísceres-, l'hemolimfa i triturats de paparres. Aquestes últimes, primerament s'han de descontaminar amb una solució 1 per mil de mertiolat durant 1 hora a temperatura ambient i posteriorment rentar-les amb aigua destil·lada i sèrum fisiològic.

Per tal d'observar si el cultiu cel·lular és positiu, s'han de fer tincions immunofluorescents amb anticossos específics o inocular un extracte del cultiu a conillet d'Índies i realitzar proves serològiques amb antígens específics (75).

El rendiment de la tècnica del cultiu està influenciat pels tractaments previs amb antibiòtics, ja que disminueixen la sensibilitat de la prova. Encara que hi ha pocs estudis sobre la viabilitat de les rickettsies a temperatura ambient o per l'acció congelació-descongelació de la mostra, aquest fet fa que sigui més difícil l'aïllament d'aquests bacteris i encara més si s'hi afegeix la demora en el cultiu. S'ha de tenir en compte també la pèrdua de viabilitat per temperatures elevades (>37°C), contaminació bacteriana i refrigeració a llarg termini, factors que poden comprometre l'aïllament dels bacteris (26).

Cultiu *shell vial*

Des de fa uns anys s'han estat assajant tècniques de cultiu ràpid com el *shell vial*. Aquesta tècnica de cultiu no comporta gaires dificultats, la qual cosa fa que es pugui realitzar en molts laboratoris sense que requereixin estar preparats per al cultiu cel·lular.

Mitjançant la tècnica del *shell vial* es poden detectar en cultiu les rickettsies entre 48 i 72 hores post-inoculació de la mostra. Actualment es disposa de línies comercialitzades que permeten fer un diagnòstic més ràpid. Posteriorment les soques aïllades poden ser identificades, i d'aquesta manera s'obté una informació més clara de l'epidemiologia de les rickettsiosis a la nostra zona. A la vegada amb les soques aïllades es poden realitzar estudis genètics, fisiològics, i tests de sensibilitat dels bacteris. De totes maneres l'aïllament de rickettsies presenta grans dificultats i pocs centres de referència són capaços de realitzar-ho (83).

La millor mostra humana pel cultiu *shell vial*, és la sang heparinitzada que estigui recollida en la fase febril de la malaltia i que si no es pot processar es mantindrà congelada entre -70 i -80°C.

S'utilitzen uns vials que en el fons contenen uns cobreobjectes en els quals s'ha fixat una capa de línia cel·lular, uns 0,3-0,5 mL de sang heparinitzada s'inoculen en el vial, es centrifuga el vial per tal d'afavorir el contacte del bacteri amb la capa cel·lular i s'incuba a 37°C durant 2-6 dies. Després es revela el *shell vial* amb una tècnica d'immunofluorescència indirecta (IFI) que consisteix a rentar el vial amb un fosfat buffer salí (PBS), es procedeix a la fixació de la mostra amb acetona, s'hi afegeix immunoglobulina específica anti-*R. conorii* i es torna a incubar aquest cop 30' a 37°C, es renta amb el PBS i s'hi afegeix immunoglobulina anti-humana policlonal conjugada amb fluoresceïna, s'incuba 30' a 37°C, i finalment es fan rentats amb el PBS i aigua destil·lada.

Es treuen els cobreobjectes i es munten amb glicerina cara avall i es passen a observar al microscopi de fluorescència.

Si una mostra és positiva pot ésser inoculada en un flascó amb medi de cultiu cel·lular per tal de poder disposar de la quantitat d'antigen suficient per poder ser identificada per mètodes moleculars (84).

Aquest mètode és ràpid per poder diagnosticar la malaltia abans que hi hagi viratge serològic, tal com es comenta en diversos estudis realitzats, però té el desavantatge que la seva sensibilitat no és gaire alta (73, 76).

La positivitat dels cultius també es pot observar rasant una mica la capa cel·lular i dipositant-la en un porta per tal de realitzar una tinció de Gímenez o bé una PCR del sobrenedant o de la capa cel·lular. (Figura 14).

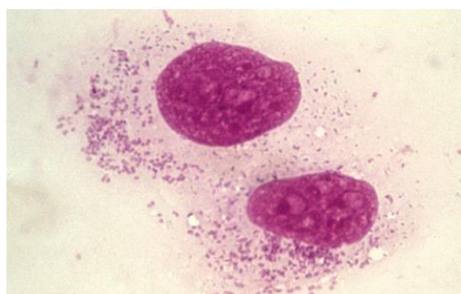


Figura 14. Tinció de Gímenez d'un cultiu *shell vial* positiu a rickettsies.

Aquesta tècnica de cultiu s'ha estat aplicant amb èxit en mostres de pacients i en mostres procedents de triturats o d'hemolimfa de paparres, cosa que ha permès l'aïllament i posterior identificació de rickettsies en aquestes mostres (85-88).

Malgrat que el cultiu és menys sensible que la serologia i la PCR quantitativa (qPCR) per al diagnòstic de les rickettsiosis, recentment s'ha vist que el cultiu de mostres de biòpsies de pell (tant del *rash* i/o l'escara) poden ser positives fins i tot amb resultats negatius per tècniques moleculars i que, per tant, uns resultats negatius per tècniques moleculars no exclouen el diagnòstic de rickettsiosi. S'ha observat també una correlació positiva entre el nombre de còpies de bacteris i l'aïllament en biòpsies de pell i paparres. Per incrementar la sensibilitat del cultiu de les biòpsies de pell, aquestes s'han de recollir abans del tractament en l'inici de la malaltia i inocular el més aviat possible (89, 90).

1.5.3 Proves serològiques. Diagnòstic indirecte

Els tests serològics són relativament fàcils de realitzar i àmpliament emprats i avaluats com a mètodes per al diagnòstic de les rickettsiosis. La microimmunofluorescència (MIF) és considerada com el mètode de referència. Els desavantatges que presenten els tests serològics és que no són de diagnòstic ràpid, cal esperar la seroconversió entre dos sèrums separats entre 15 i 21 dies des de l'inici dels símptomes fins la fase convalescent (25-28 dies per la *R. africae*); si només es disposa d'un sol sèrum, un resultat positiu s'ha de interpretar i valorar juntament amb les dades clíniques i epidemiològiques pel fet que els anticossos després d'una infecció poden persistir durant temps.

S'ha de remarcar que presenten reaccions creuades entre les diferents espècies de rickettsies i els laboratoris assistencials es troben limitats pels tests comercialitzats que ofereixen un ventall poc ampli d'antígens específics (91).

Cal tenir en compte que una antibioteràpia eficaç i instaurada precoçment pot retardar l'aparició dels anticossos o bé donar títols molt baixos.

En aquest context, és important conèixer que malgrat que la MIF és adequada pel diagnòstic de les rickettsiosis de les febres tacades, és insuficient per a la definitiva identificació de l'agent etiològic. Sofisticats estudis serològics com tècniques de cross-adsorció (CA) i Western blotting (WB) poden ajudar a diferenciar les infeccions per rickettsies amb l'avaluació d'anticossos. L'inconvenient d'aquests mètodes és que, per la seva laboriositat, només es poden realitzar en centres de referència (92).

Hi ha hagut moltes tècniques serològiques utilitzades al llarg del temps.

Weil Felix o test d'aglutinació

Va ser la primera tècnica serològica de què es va disposar. Es fonamenta en el fet que durant la infecció per rickettsies es produeixen anticossos capaços d'aglutinar certes espècies de

Proteus sp. ja que presenten antígens comuns i reaccionen creuadament amb antigen del gènere *Rickettsia* amb l'excepció de *R. akari*. La tècnica consisteix a preparar dilucions dobles de sèrum i barrejar-les amb igual proporció de solució antigènica dels diferents antígens de *Proteus* sp. el **OX19**, **OX2** i **OXK**.

Les cèl·lules de *Proteus vulgaris* OX2 reaccionen creuadament amb sèrum de persones afectades de febres tacades excepte *R. rickettsiae* i les cèl·lules de *Proteus vulgaris* OX19 amb persones infectades pel grup del tifus i Muntanyes Rocalloses. *Proteus mirabilis* OXK aglutina amb sèrums de pacients amb tifus dels matolls. Es detecten als 5-10 dies dels primers símptomes. Amb *R. akari* no funciona, és insensible.

La reacció es pot realitzar en tub o en porta i es posa a incubar a 37°C durant 2 hores. Després de tota la nit en nevera es realitza la lectura. Com s'ha comentat, depenent de l'espècie de rickettsies aglutinarà un antigen o un altre.

És una prova poc específica, presenta moltes reaccions creuades, cal un control positiu d'un pacient conegut i un altre negatiu. A la vegada s'han de testar dos sèrums en fase aguda i convalescent i s'ha d'observar un increment de 4 vegades el títol del primer. Els anticossos apareixen entre 5 i 12 dies, s'incrementen en la convalescència i van baixant en els mesos següents (93).

Falsos positius es poden trobar en infeccions urinàries per *Proteus*, infeccions per *Leptospires*, *Borrelia* i en algunes malalties hepàtiques greus.

Per la seva manca d'especificitat i sensibilitat es troba en desús.

Fixació del complement

S'utilitzen antígens de grup extrets dels sacs vitel·lins infectats, encara que es pot augmentar la seva especificitat obtenint antígens més purs. Calen també dos sèrums i observar la seroconversió.

Els anticossos apareixen al final de la segona setmana, augmenten en les dues setmanes posteriors i baixen en 8-11 mesos. Baixos nivells d'anticossos poden persistir durant anys en alguns individus. En pacients que prenguin antibiòtic molt precoçment poden presentar títols molt baixos. El sèrum s'ha de tractar per distingir entre IgG i IgM (71).

Actualment és poc utilitzada per la seva falta de sensibilitat.

Microimmunofluorescència indirecta (MIF o IFI)

És la més usada per la seva facilitat, per ser econòmica, i per trobar-se comercialitzada. Va ser desenvolupada el 1978 i encara és actualment la utilitzada com a referència pel diagnòstic de la FBM. És la tècnica recomanada per l'OMS (WHO 1982). Al principi sols detectava antígens de grup, però amb la microimmunofluorescència (MIF) s'utilitzen antígens més específics però que malauradament, malgrat tot, presenten encara reaccions creuades (74).

És una tècnica sensible i reproduïble que permet determinar classes d'immunoglobulines sense tractar el sèrum. En un estudi comparatiu de tres tècniques serològiques com la MIF, l'hemoaglutinació indirecta i l'aglutinació de làtex, Raoult i col. conclouen que la MIF és la que dona uns resultats millors respecte a la sensibilitat i especificitat (94).

Es pot utilitzar per estudis epidemiològics, enfrontant el sèrum a diferents antígens i malgrat que existeixen reaccions creuades entre les rickètsies del grup de les febres tacades, l'espècie homòloga sol donar títols més alts.

El procediment, consisteix a fixar l'antigen al portaobjectes, posar-hi el sèrum a diferents dilucions, incubar 30' a 37°C, després fer dos rentats amb PBS, i incubar-ho amb anti-immunoglobulina conjugada amb fluoresceïna 30' a 37°C, tornar a fer rentats amb PBS i observar el portaobjectes al microscopi de fluorescència. Es consideren significatius títols de IgM \geq 1/20 i de IgG \geq 1/80. (Figura 15).

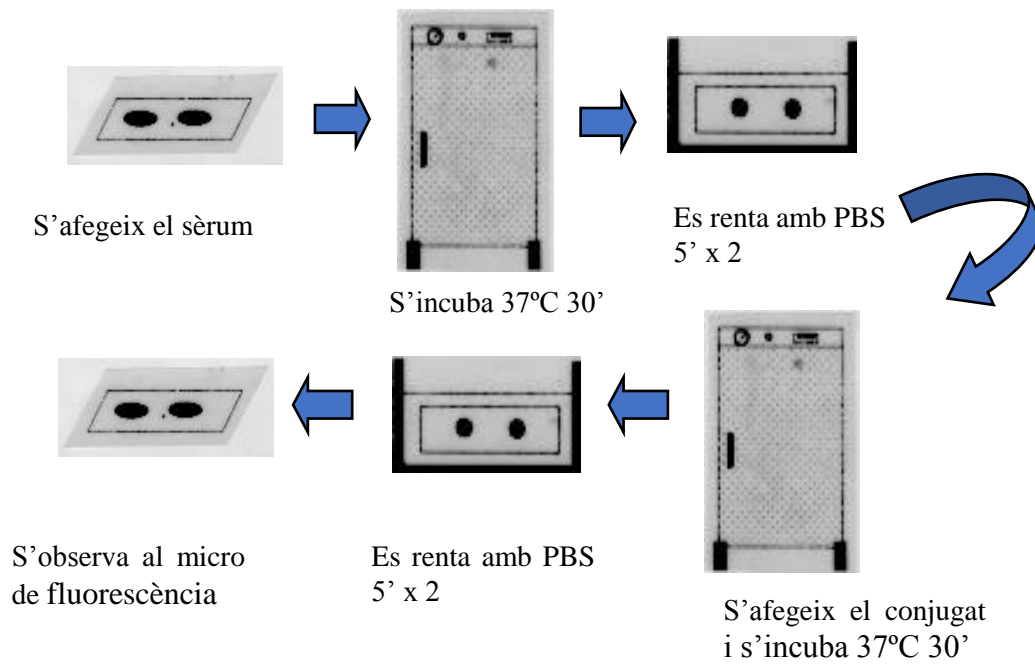


Figura 15. Tècnica de microimmunofluorescència indirecta (MIF).

Presenta l'avantatge de detectar tant IgM que indica infecció recent com IgG. El diagnòstic es pot fer precoçment tan aviat com comencen a produir-se els anticossos més o menys als 7 dies de la infecció.

La detecció d'IgG és de totes formes més una tècnica confirmatòria que de diagnòstic, ja que la detecció d'anticossos específics no s'obté fins als 15-30 dies d'aparició del quadre clínic. La recerca d'immunoglobulines d'aparició més ràpida, com les IgM, presenta l'inconvenient que en alguns casos pot donar falsos negatius i, a la vegada, quan es detecta, la seva permanència quant a temps en el sèrum és a vegades molt elevada (95).

Altres tècniques utilitzades més a nivell de recerca són:

Aglutinació en làtex

Es sensibilitzen amb l'antigen partícules de làtex, s'incuba el sèrum i es procedeix a fer-ne la lectura sobre un fons negre. Detecta principalment IgM, presenta manca de sensibilitat en

pacients en fase convalescent, i no conté tots els antígens, la qual cosa fa que sigui poc sensible.

Hemoaglutinació indirecta

S'utilitzen hematies O humans o d'ovella sensibilitzats amb l'antigen rickettsial. Són aglutinats pels anticossos del sèrum dels pacients. Apareixen a la segona setmana, augmenten durant la tercera i desapareixen entre 3 i 6 mesos. És sensible, barat i menys laboriós que la fixació del complement, però presenta problemes d'estabilitat dels hematies.

Enzimoimmunoassaig (ELISA, EIA)

S'han utilitzat també aquestes tècniques així com dipsticks d'Elisa ràpids fàcils de realitzar, també tests de neutralització en què es barreja una suspensió de bacteris i anticossos i s'injecten a animals susceptibles, després s'ha de veure que no els produeix infecció però no donen tan bons resultats com en el cas dels virus, no s'utilitzen per al diagnòstic (71).

Western immunoblotting

Pot ésser útil com a procediment complementari per guiar cap al diagnòstic de la malaltia en situacions especials com ara, el diagnòstic precoç quan la MIF encara no evidencia resultats positius, ja que detecta anticossos més precoçment que la MIF, per confirmació serològica en pacients amb títols baixos per MIF, i confirmació en estudis seroepidemiològics.

La tècnica de Western immunoblotting (WB) detecta dos tipus d'antígens, el lipopolisacàrid (LPS) de baix pes molecular i dues proteïnes d'alt pes molecular (rOmpA i rOmpB). Aquestes proteïnes són específiques d'espècie i són la base del serotipat. La tècnica consisteix a obtenir antigen purificat de cultius cel·lulars, es realitza una separació electroforètica dels antígens amb gel de poliacrilamida, es transfereixen a una membrana de nitrocel·lulosa, després s'incuba amb el sèrum, més tard s'afegeix el conjugat amb peroxidasa i es torna a incubar, i finalment s'afegeix el substrat. S'obtenen bandes no

específiques de LPS de baix pes molecular i altres específiques de rickètsies d'alt pes molecular. De totes maneres en alguns casos encara és difícil distingir les diferents espècies. Actualment no està comercialitzada i s'ha de realitzar en laboratoris de referència, ja que la preparació de l'antigen és laboriosa i presenta certa dificultat.

Però així i tot es poden produir reaccions creuades amb aquesta tècnica a nivell del LPS i de classe IgM, i és necessària en alguns casos l'aplicació de mètodes de cross-adsorció per diferenciar l'espècie de rickètsia (96, 97).

Tècniques d'adsorció diferencial (cross-adsorció)

S'utilitzen per determinar l'espècie, ja que, com s'ha esmentat, el grup de les febres tacades presenta reaccions creuades entre elles.

El mètode de cross-adsorció consisteix a absorbir el sèrum per separat amb els antígens que han donat reaccions positives i tornar a realitzar la tècnica de MIF o WB. En el sèrum tractat amb l'antigen que causa reaccions creuades només desapareixen els títols d'anticossos enfront d'aquest antigen; si s'absorbeix amb l'antigen causant del quadre clínic, desapareixen tots els anticossos (98). (Figura 16).

La gran limitació és que es necessita gran quantitat d'antigen.

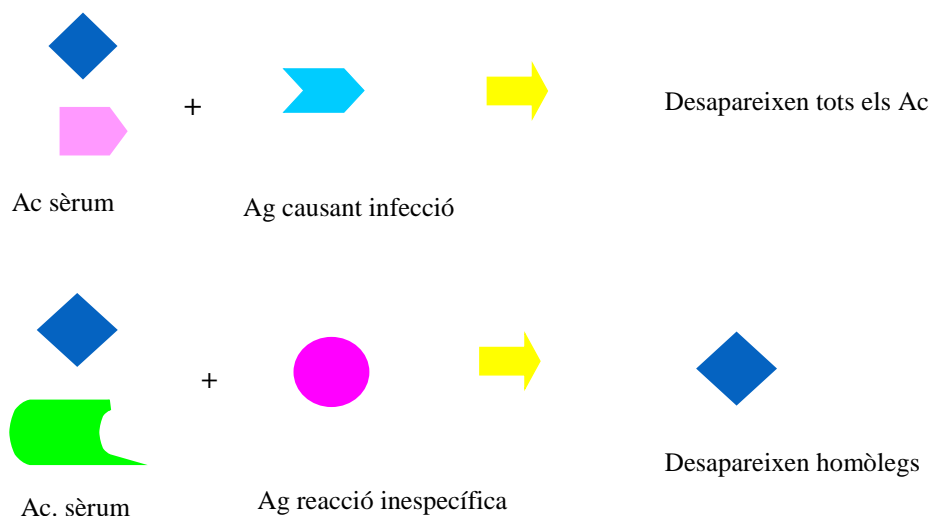


Figura 16. Tècnica de cross-adsorció diferencial.

Detecció directa de *R. conorii* en cèl·lules endotelials (CEC) circulants per IFI

Es separen les CEC mitjançant un anticòs anti-cèl·lules endotelials que va lligat a unes boletes magnètiques, es separen les cèl·lules endotelials de la sang i es tenyeixen amb un sèrum monoclonal anti-*R. conorii* i un conjugat fluorescent (73, 99).

És un procediment limitat al nombre de cèl·lules endotelials que circulin, ja que aquestes es degraden fàcilment.

1.5.4 Detecció i identificació per tècniques moleculars

La utilització de la PCR en la microbiologia en general i òbviament en l'estudi de les rickettsiosis ha aportat una gran ajuda diagnòstica no tan sols en els pacients sinó també en el camp de la identificació de les espècies de rickètsies.

Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Consisteix en l'amplificació *in vitro* d'un fragment d'ADN específic. Per aquesta tècnica és necessari conèixer la seqüència que es vol amplificar (un gen, una part del gen, una regió no codificadora).

Es pot realitzar tant en mostres humanes (sang, biòpsies cutànies, ganglis, etc...) com en artròpodes vectors i hostes (100, 101). La mostra de sang s'ha de recollir amb EDTA, ja que l'heparina inhibeix la PCR. La biòpsia de la taca negra o de l'escara necròtica és la que ha demostrat una major rendibilitat diagnòstica.

Per al diagnòstic molecular els requeriments quant a la mostra no són tan estrictes com en el cas del cultiu, atès que els àcids nucleics són estables encara que el bacteri no sigui viable.

De totes maneres, si no es pot processar la mostra en 24 h s'ha de congelar a -20°C o -80°C fins el moment de la realització de la prova.

La PCR es basa en l'amplificació de diferents gens específics del gènere *Rickettsia*. Els més comunament analitzats són els que codifiquen dues proteïnes de la membrana externa, *rompA* (present a totes les espècies del grup de les febres tacades excepte *Rickettsia helvetica* (*R. helvetica*), *R. australis*, *R. bellii* i *R. canadensis*), i *rompB* (present en totes les espècies excepte *R. helvetica*, *R. bellii*). Altres gens utilitzats són el gen *gltA*, que codifica la citrat sintetasa (comú a totes les rickètsies), el gen que codifica la proteïna 17-kDA (comú a totes les rickètsies del grup de les febres tacades) i el gen D (vàlid per la majoria de les espècies) (102, 103).

A més, altres gens s'han utilitzat per a l'estudi filogenètic, com els que codifiquen les proteïnes transportadores de la família sca (*surface cell antigen*). Sca1 és l'únic dels 17 gens d'aquesta família present en totes les espècies de rickettsia, per la qual cosa se'l considera una de les regions genòmiques de les rickettsies que millor permeten la seva classificació filogenètica.

La biologia molecular ha anat avançant pel camí d'aconseguir tècniques més sensibles i que aportin una major rendibilitat que la PCR convencional. En aquest sentit s'han publicat estudis que demostren la utilitat de diverses tècniques com la *nested* PCR o la PCR suïcida, però per la seva laboriositat calen investigadors experimentats per la seva realització (104).

Actualment la utilització de PCR a temps real permet obtenir resultats en un temps molt curt, unes 2 hores (46, 77).

Estudis realitzats per Sanchez i col. descriuen una nova metodologia de PCR a temps real (105) denominada *linear-after-the-exponential* PCR (LATE-PCR) que permet la detecció de petites quantitats d'ADN utilitzant *primers* en concentracions asimètriques millorant d'aquesta forma la sensibilitat diagnòstica sense haver d'utilitzar la *nested* PCR o la PCR suïcida (106).

Un nou avanç en el diagnòstic de les rickettsiosis s'ha aconseguit amb l'ús de la PCR quantitativa a temps real (qPCR) (107). Estudis genòmics han incrementat recentment el coneixement sobre el gènere *Rickettsia*, i arran d'aquests estudis, una gran quantitat de dades genòmiques s'han conegut i es troben al nostre abast (23, 108). Aquestes dades sobre la seqüència s'han usat per desenvolupar sondes i *primers* més específics.

El 2012, el WHO Collaborative Center for Rickettsioses and Other Arthropod-Borne Bacterial Diseases va publicar dos anys d'experiència amb el diagnòstic rickettsial per a qPCR. Tots els genomes de rickettsia coneguts es van comparar per tal de trobar seqüències específiques per dissenyar sondes i *primers*. L'especificitat es va verificar enfront d'un

panell de 30 espècies diferents de rickètsies. La sensibilitat es va determinar realitzant dilucions 1:10.

Es van preparar grups de *primers* i sondes que podien detectar *R. conorii*, *R. slovaca*, *R. africae*, i *R. australis*. Es va fer un estudi amb 643 mostres clíniques, que es van testar per la presència d'ADN de rickètsia. Comparant-la amb el mètodes tradicionals, la qPCR va permetre detectar 45 mostres positives de biòpsies i/o mostres recollides amb escovilló enfront de 31 per mètodes tradicionals. L'aplicació d'aquesta tècnica va permetre una millora en el tractament de pacients amb sospita de rickettsiosis (77).

De fet l'ús de mostres recollides amb escovilló del pacient en lloc de mostres de biòpsia per estudis de qPCR és una de les altres novetats en el diagnòstic de les rickettsiosis (Figura 17).



Figura 17. Obtenció mostra escara amb escovilló. Clin. Microbiol. Rev. 2013; 26:657-702

L'obtenció de la biòpsia de pell i en particular la biòpsia de l'escara és una tècnica invasiva, que pot ser dolorosa pel pacient i en algunes ocasions arribar a ser difícil de realitzar en certes parts del cos, i que, a la vegada, requereix per a la seva obtenció personal experimentat i condicions d'asèpsia. Per tant no es pot agafar a casa ni en una consulta de medicina general. El 2009, un estudi va descriure la utilitat del frotis amb escovilló de les lesions de la pell en el diagnòstic de 3 casos de *Queensland tick typhus* i 1 cas d'*African tick bite fever* (ATBF) (109).

Per tal de determinar la utilitat de tècniques de recollida de mostres no invasives com el frotis amb escovilló per a la detecció de rickètsies, en un estudi realitzat per Bechah i col. el 2011 es van processar mostres d'escars de la pell procedents de 6 conillets d'Índies i 9

mostres procedents d'humans. Les mostres d'escars dels conillets d'Índies van ser positives per rickètsies mentre les lesions van ser presents, i l'eficàcia i la fiabilitat dels frotis de les lesions de la pell de les persones es va demostrar amb la detecció molecular de 6 espècies de rickètsia. L'òptima temperatura de conservació de les mostres va ser 4°C durant 3 dies (90).

El frotis de l'escara també va ser utilitzat amb bons resultats en 39 mostres de pacients a Oran, Algèria. Els frotis van ser enviats a Marsella per a ser estudiats. En aquest estudi prospectiu, *R. conorii* va ser identificada en el 64% dels pacients amb escars i rash utilitzant aquest procediment. Es va avaluar les opinions dels professionals sanitaris i pacients; com era d'esperar, tant els professionals de la salut com els pacients preferien les mostres recollides amb escovilló en lloc de la biòpsia de la pell. El frotis de l'escara és més fàcil de recollir i menys dolorós (110). Al professional que recull la mostra només li cal el clàssic escovilló i fer-lo rotar amb força en la base de l'escara després de remoure la crosta. Si la lesió de l'escara és molt seca, mitjançant una compresa humidificada amb aigua estèril i posada sobre la lesió 1 minut abans de fer el frotis és suficient per incrementar la quantitat de material que es recull.

Val a dir que també la crosta de l'escara pot ser usada pel diagnòstic de rickètsia. El 2012 la utilitat del frotis de l'escara i de la crosta es va descriure pel diagnòstic de la infecció per *R. africae* en viatgers (111). Finalment, el 2013 es va descriure la utilitat del frotis pel diagnòstic de la infecció per *R. parkeri*. (112).

1.6 IDENTIFICACIÓ D'ESPÈCIES DE RICKÈTTSIES

Un cop tenim aïllades les soques de rickètties en cultiu o bé detectades per tècniques de biologia molecular (PCR), cal identificar-les per poder determinar l'espècie.

Les tècniques d'identificació emprades per a determinar l'espècie a partir de soques són:

Serotipatge

Es realitza amb anticossos específics obtinguts al sensibilitzar el conillet d'Índies. És una tècnica laboriosa, consisteix a buscar similituds entre la soca nova i les soques controls en la titulació del sèrum amb diferents anticossos (113).

SDS-PAGE

S'analitzen les proteïnes de les soques per electroforesi en gel de poliacrilamida, després del revelat amb el colorant Coomassie R-25 es veuen les diferents mobilitats electroforètiques de les proteïnes (113).

PCR-RFLP

Polimorfisme en la longitud dels fragments de restricció. Cal fer una amplificació utilitzant uns determinats *primers* pels gens de la citrat sintasa, i d'altres proteïnes com 190 KD, 120 Kd, i després es fa un tractament amb enzims de restricció i es comparen els diferents perfils. Regnery i col. van descriure la utilitat de les anàlisis de la RFLP dels fragments de PCR amplificats del gen de la citrat sintasa i de la proteïna rOmpA (4). Aquesta tècnica va mostrar ser útil i sensible i va ser aplicada juntament a altres gens com el *rompB* o el de la proteïna 17-kDa. Els productes amplificats eren posteriorment digerits per endonucleases de restricció AluI, RsaI i PstI, seguint el protocol descrit per Eremeeva i col (114).

L'obtenció de nous perfils de RFLP per a cada espècie poden emmagatzemar-se en una base de dades que ens serveix posteriorment per a identificar les noves espècies de rickètsia (115-118).

Electroforesi en camp polsant

S'inclou el purificat de rickètsia en blocs d'agarosa, que manté l'estabilitat de l'ADN, després s'apliquen diferents enzims de restricció i es comparen els perfils amb soques controls (119).

Seqüenciació

La seqüenciació d'alguns gens prèviament amplificats permet identificar espècies de rickètsies. Consisteix a comparar les seqüències obtingudes del microorganisme que es vol identificar amb seqüències pròpies de cada espècie que existeixen en diferents bases de dades accessibles a través d'Internet. Els gens més utilitzats per la seqüenciació són el *gltA* de la citrat sintasa i els *rompA* i *rompB* (120- 122).

1.7 IDENTIFICACIÓ DE PAPPARRES

No és excepcional la troballa de paparres en el cos humà. Algunes espècies són ben conegudes com a vectors de malalties humanes com és el cas de les rickettsiosis (Figura 18).

La identificació de les espècies de paparres quan es troben en els pacients és d'ajuda per al metge per tal d'orientar-lo cap a les malalties que poden transmetre. Aquesta informació caldria tenir-la el més ràpid possible.

Les espècies de paparres poden ser identificades morfològicament mitjançant claus taxonòmiques (123). Val a dir que a vegades la identificació morfològica pot arribar a ser difícil, ja que requereix experts en entomologia. També un espècimen pot ser immadur o trobar-se deteriorat i per tant difícil d'identificar.

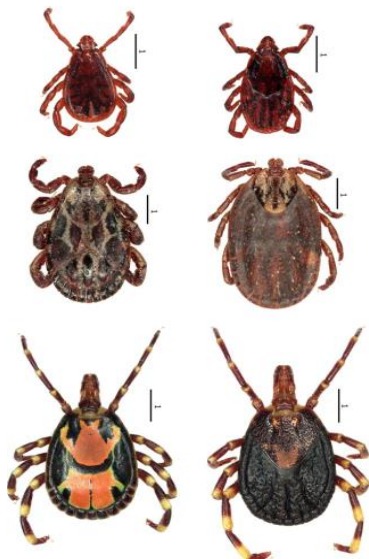


Figura 18. Tres vectors de rickettsiosis del grup de les tacades. De dalt a baix, *Rh. sanguineus*, vector principal de *R. conorii* ssp. *conorii*, agent de FBM; *D. marginatus*, vector de *R. slovaca* i *R. raoultii*; i *Amblyomma variegatum* vector de *R. africae*, agent de l'ATBF. A l'esquerra mascles i a la dreta femelles. Philippe Parola et al. Clin. Microbiol. Rev. 2013; 26:657-702

Mètodes moleculars tals com la seqüenciació de l'ADN mitocondrial podria ser útil per a la identificació, però malauradament en aquests moments no disposem d'un parell ideal de *primers* que per a la tècnica de PCR siguin capaços d'amplificar els fragments d'un gen rellevant per a la identificació de paparres.

Perfils proteics obtinguts mitjançant la metodologia *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) s'estan utilitzant per a la identificació de microorganismes en la microbiologia clínica (124). El MALDI-TOF MS està sent recentment aplicat a la identificació d'artròpodes. Així, un estudi pel MALDI-TOF MS de 7 paparres dona a conèixer que paparres senceres o parts dels seus cossos poden generar uns espectres que són suficients per a la identificació d'espècies (125).

Encara més recentment, s'ha descrit que les potes de les paparres poden ser útils per a la ràpida identificació d'aquests vectors mitjançant MALDI-TOF MS si es disposa d'una base de dades de referència. La resta del cos de la paparra pot ser reservada per altres assajos com la detecció de bacteris patògens. Els beneficis pels clínics que pot suposar el tenir les paparres identificades van des de més precisió en el seguiment dels pacients de cara als símptomes de les malalties potencialment transmeses, a la capacitat de prendre decisions al disposar de més informació, com ara si seria necessari o no administrar un tractament profilàctic post-exposició (126).

1.8 RICKETTSIOSIS DEL GRUP DE LES FEBRES TACADES

Les rickettsiosis tenen una gran incidència i distribució mundial. Causades per diferents espècies de rickettsies amb diferents reservoris i vectors, són causa freqüent de malalties en les persones i font d'importants problemes sanitaris, econòmics i socials (72). El desenvolupament socioeconòmic així com els avenços mèdics experimentats a nivell mundial i concretament a Europa, van fer creure que les malalties causades per rickettsies experimentarien una davallada espectacular i perdrien el protagonisme que tenien i es va creure que es podria arribar fins i tot a la seva erradicació total (34, 127, 128).

A partir de la dècada dels 80, degut a un millor coneixement de la malaltia per part dels metges, a les noves tècniques diagnòstiques i a la dedicació de diferents grups d'investigadors tant a Amèrica com a Europa i en concret a Catalunya amb el seu extens litoral mediterrani, s'han diagnosticat i descrit arreu noves espècies de rickettsies desconegudes fins aleshores com agents etiològics de la malaltia, fet que ha suposat un ressorgiment d'aquestes infeccions, considerades com a malalties emergents (20, 129-137).

L'estudi epidemiològic de les zoonosis transmeses per paparres implica, per una banda, l'estudi de la malaltia en l'espècie humana (138-143), i, per l'altra l'estudi del reservori i del vector (9, 144-147). Una part clínica de casos procedents de medicina humana i una part pròpiament animal en que es contempli el mostreig del vector i del/s possible/s reservori/s permetrà definir millor l'eco-epidemiologia del patogen (148-151).

Les infeccions per rickettsies segueixen una distribució estacional i geogràfica que depèn dels cicles vitals de l'artròpode vector, de la seva activitat i distribució i de la presència de l'hoste adequat perquè pugui entrar en contacte amb les persones (152-154). Per al diagnòstic és fonamental tot el context epidemiològic: àrea geogràfica, antecedents de

viatges a zones endèmiques, contacte amb animals, excursions al camp o acampades a l'aire lliure, activitats de cacera i també l'entorn professional (155-157).

La infecció per *R. conorii* és endèmica a tota la conca mediterrània, Portugal, Espanya, el sud de França, Itàlia, Grècia, Romania, Israel, el Marroc, Argèlia, Tunísia, Líbia i Egipte (158-166). Però també s'han comunicat casos aïllats en zones que no corresponen a la seva distribució típica, com és el cas de Suïssa, on es va declarar un brot de FBM després d'haver-s'hi introduït un gos procedent d'Espanya (167).

La màxima incidència de la malaltia en les persones es presenta durant els mesos d'estiu i començament de la tardor, coincidint amb el moment de màxima activitat de la paparra vectora (168).

En el gos, Espejo i col. (51) observen diferències significatives en la positivitat dels sèrums recollits en els mesos d'hivern (1% 1/97) i d'estiu (36,8% 38/97), conseqüència de la resposta immunitària del gos a la infestació per paparres infectades que persisteix durant períodes de temps curts, on el 75% dels gossos esdevenen seronegatius entre 4 i 10 mesos. La persistència de títols elevats es pot deure a reinfeccions.

El període d'incubació de la malaltia és de 3 a 14 dies i la clínica habitual és de mal de cap, febre, esgarrifances, miàlgies i artràlgies, lesions focals i disseminades com l'exantema per hiperplàsia de les cèl·lules endotelials, inflamació, trombosi i obstrucció dels vasos sanguinis petits i extravasació capil·lar (7, 169). En el cas de la FBM, pot existir una lesió primària o escara (taca negra) en el lloc d'inoculació (Figura 19, 20, 21).



Figura 19. Exantema

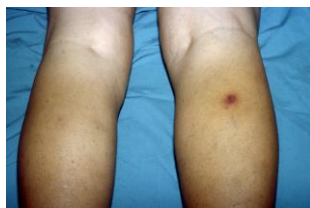


Figura 20. Escara única a la cama



Figura 21. Escara al pavelló auricular

Es pensa que hi pot haver un component tòxic causat per una toxina, però es desconeix el seu paper en la malaltia humana (170, 171).

1.8.1 Situació epidemiològica

ESPANYA. En el període de 2005 a 2009 es van notificar al sistema EDO (malalties de declaració obligatòria) 625 casos de rickettsiosi a Espanya, el 63% dels quals van ser en homes, amb una proporció 1,7:1. Els adults van ser els més afectats amb una mitjana d'edat de 45 ± 23 anys, i més del 25% tenien més de 60 anys i un 10% dels nens eren de menys de 10 anys. Els casos es van presentar amb una marcada estacionalitat amb pics durant els mesos d'agost i setembre. La malaltia es va distribuir al voltant de la conca mediterrània i centre peninsular (dades de l'EDO nacional).

CATALUNYA. És una malaltia de declaració obligatòria però per altra banda es troba infradeclarada, la qual cosa fa que sigui pot significatiu el valor dels casos declarats (Figura 22).

En aquest estudi revisarem les dues espècies de rickettsia, *R. conorii* i *R. massiliae* Bar 29, que es troben relacionades en la nostra àrea amb la FBM.

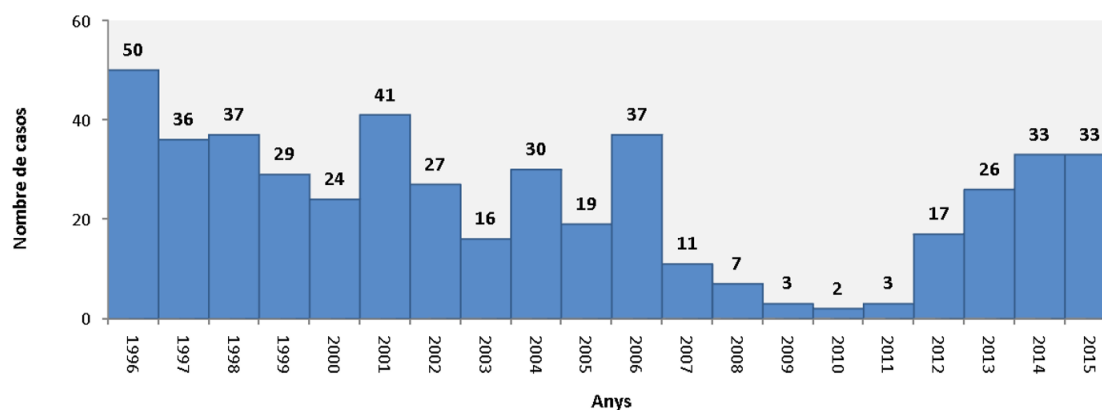


Figura 22. Evolució anual de les *Rickettsia conorii* declarades al SNMC en el període 1996-2015. Dades obtingudes de l'informe de l'Agència de Salut pública de la Generalitat de Catalunya 2015.

1.8.2 Febre Botonosa Mediterrània

R. conorii

El primer cas descrit de Febre Botonosa Mediterrània (FBM) va ser a Tunísia el 1910 (15) i vint anys més tard Brumpt va descriure el paper de la paparra del gos *Rh. sanguineus* en la transmissió de l'agent causal de la FBM, *R. conorii* (16). La típica escara d'inoculació en el lloc de la picada de la paparra va ser descrita el 1925 a Marsella per Boinet i Pieri.

A Espanya es publiquen les primeres descripcions de la malaltia per Tapia el 1930, que van ser revisades per Pedro-Pons el 1945. En l'àrea mediterrània la FBM és una de les rickettsiosis exantemàtiques més freqüents, i és considerada una malaltia endèmica al nord d'Àfrica i sud d'Europa. A finals dels anys 70 i principis dels 80 es va observar un increment d'aquesta malaltia a la conca mediterrània, cosa que va motivar un gran interès pel seu estudi. Aquest increment es va relacionar a la vegada amb canvis climàtics de la zona (8, 123, 140).

Es coneixen 4 subespècies de *R. conorii* que es diferencien per la clínica i la zona geogràfica. Els estudis moleculars van confirmar les diferències entre elles (172). En l'àrea mediterrània, la subespècie *R. conorii ssp. conorii* amb 3 soques diferents és la més comuna. També hi ha la *R. conorii ssp. israelensis*, que causa l'*Israeli spotted fever*, descrita a Israel el 1945. Clínicament es diferencia de la FBM perquè la malaltia és més lleu, de curta durada i en manca la típica escara d'inoculació en més del 90% dels casos (173). La *R. conorii ssp. Caspia* causa la febre d'Astrakhan trobada en la regió de Rússia, prop del mar Caspi. Molts pacients afectats per aquesta malaltia eren adults (94%), homes (61%) i el 85% dels casos es trobaven durant l'estiu, sobretot durant l'agost. La malaltia, molt semblant a la FBM, incloïa febre associada a un *rash* maculopapular (94%), però l'escara només apareixia en el 23% dels casos. És típica la conjuntivitis en el 32% dels casos i no es descriuen casos greus (174-

176). La quarta subespècie descrita va ser la *R. conorii* ssp. *indica* (*Indian Tick Typhus*, ITT), prevalent a l'Índia. Estudis serològics de MIF i cross-adsorció van demostrar una resposta més elevada d'anticossos enfront d'aquesta soca dels pacients afectats d'ITT, que enfront de *R. conorii* (69). Mitjançant els mètodes moleculars es va veure que presentaven diferències antigèniques. En aquesta malaltia, el *rash* es purpúric i l'escara rarament es troba (177, 178).

Quant a la FBM causada per *R. conorii* ssp. *conorii*, recentment s'han reportat casos amb una incidència anual al voltant de l'1,7 i 9,8 per 100.000 habitants a Portugal i Itàlia respectivament (48, 65, 142). També en altres països com Turquia, Bulgària, Ucraïna, Eslovènia, Croàcia, Albània, Malta i Geòrgia s'han diagnosticat casos de FBM (179, 180) i també casos esporàdics que podrien tractar-se més aviat de casos importats al nord d'Europa, a Bèlgica, Suïssa, Holanda i Alemanya (158, 164).

Catalunya va ser una de les àrees on es va registrar un elevat nombre de casos en els anys 70 i 80. Durant aquest anys, a l'àrea del Vallès Occidental es van realitzar molts estudis clínics-epidemiològics i terapèutics que van contribuir a un millor coneixement de la malaltia (7, 9, 64, 181).

Tot i que en els últims anys alguns indicadors epidemiològics, així com el nombre de casos diagnosticats, semblaven indicar una certa regressió de la malaltia, els últims estudis realitzats en la nostra àrea del Vallès Occidental pel nostre grup indiquen que la seroprevalença es troba al voltant del 9%, resultats no gaire allunyats de l'11,6% del 1987 (8, 9).

El vector principal és la paparra del gos *Rh. sanguineus*, que és a la vegada reservori, ja que té la capacitat de transmetre les rickettsies per via transovàrica i transestadial. Els seus hostes són petits mamífers i rosegadors, l'home és un hoste accidental dins el cicle biològic del *Rh. sanguineus* i en la majoria dels casos els pacients refereixen contacte amb gossos.

La infecció per *R. conorii* cursa amb simptomatologia típica. Hi ha un període d'incubació que oscil·la entre 4 i 20 dies i es desenvolupa una lesió ulcerosa al lloc de la picada de la paparra coneguda com a “taca negra” entre el 30-86% dels casos (Figura 23). Seguidament apareix la clínica característica de febre alta en el 100% dels casos, cefalees (70% dels casos), miàlgies (70%) (6) (Taula 4). A continuació apareix l'exantema a les extremitats que es va estenent al tronc, mans i peus (Figura 24).



Figura 23. Lesió “taca negra”. Clin. Microbiol. Rev. 2013; 26:657-702



Figura 24. Exantema típic FBM. Clin. Microbiol. Rev. 2013; 26:657-702

TAULA 4. Clínica FBM	
Manifestacions clíniques	% Pacients
Febre	100
Exantema	99
Cefalea	84
Miàlgies	79
Taca negra	74
Artràlgies	69
Hepatomegàlia	29
Conjuntivitis	9
Esplenomegàlia	9

La malaltia afecta els dos sexes amb un lleuger predomini en els homes, potser pel fet d'un contacte més gran amb gossos parasitats, i s'observa una incidència més elevada en nens d'entre 0 i 9 anys.

En la majoria dels casos la lesió taca negra és única. En els nens es sol trobar al cap i en els adults a les extremitats. La presència de l'exantema generalitzat que afecta els palmells de les mans i plantes dels peus es troba en pràcticament tots els pacients; és, per tant, una de les principals característiques de la malaltia. (Figures 25, 26).



Figura 25. Exantema als palmells de les mans



Figura 26. Exantema a les plantes dels peus

També s'han descrit altres manifestacions atípiques com alteracions neurològiques, oftàlmiques, cardiovasculars, pulmonars, renals o digestives (17, 61, 67).

Es tracta d'una malaltia generalment benigna, però hi ha descrites complicacions greus i alguns casos molt poc freqüents amb evolució fatal (60).

La mortalitat s'estima al voltant del 2,5% i els factors de risc són l'edat avançada, la immunosupressió, l'alcoholisme i el dèficit de glucosa-6-fosfat deshidrogenasa.

El diagnòstic habitual es realitza per serologia mitjançant la tècnica de MIF (26, 71).

Respecte al tractament de les rickettsiosis del grup de les febres tacades, si s'administra precoçment, escurça el període simptomàtic i evita l'aparició de complicacions greus (181, 182).

Estudis *in vitro* mostren una excel·lent activitat de doxiciclina, cloramfenicol i quinolones. Els betalactàmics, aminoglicòsids i sulfamides no presenten activitat (182).

La doxiciclina continua essent el tractament d'elecció d'aquestes infeccions. Aquest tractament es troba associat amb una millor recuperació que amb altres opcions. Malgrat que les tetraciclins no es troben indicades en nens menors de 8 anys, es recomana que podria ser utilitzada en nens que presentin una severa infecció rickettsial en vista de la seva bona tolerància. La telitromicina també sembla altament eficaç *in vitro*, però falten dades *in vivo*. D'altra banda, aquests fàrmacs haurien de ser més avaluats (183).

Les fluoroquinolones han estat considerades com una alternativa a la doxiciclina, però estudis recents han mostrat que les fluoroquinolones estan associades amb una pitjor recuperació durant la infecció per *R. conorii* en humans i en models de cultiu cel·lular, degut potencialment a la desregulació del mòdul d'una toxina-antitoxina (184). Possiblement, l'ús de les fluoroquinolones en altres rickettsiosis hauria de ser valorat. De totes maneres, ja que no es recomana l'ús de fluoroquinolones pel tractament de la FBM, sembla que fer estudis prospectius amb altres rickettsies pot semblar imprudent i contradictori.

El cloramfenicol es actiu però el risc de toxicitat medul·lar el desaconsella.

Quant a la rifampicina, encara que *in vitro* va mostrar una bona activitat, els resultats clínics no han demostrat l'eficàcia esperada (185).

S'han assajat antibiòtics alternatius i diferents estudis han assenyalat la bona eficàcia de l'eritromicina. La josamicina i els nous fàrmacs macròlids tals com claritromicina i azitromicina poden representar alternatives pel tractament d'algunes rickettsiosis.

La josamicina en concret mostra una activitat superior a l'eritromicina i és una bona alternativa sobretot en nens, gestants amb estricte control i absència de malaltia greu, i en pacients al·lèrgics a les tetraciclins (186). Els últims estudis amb els nous macròlids han

demostrat una bona activitat, especialment la claritromicina, que ha passat a ser una bona alternativa enfront de la FBM (187, 188).

En qualsevol cas, un ràpid i empíric tractament ha de ser prescrit davant la sospita d'una rickettsiosi abans de la confirmació del diagnòstic.

***R. massiliae* Bar 29**

R. massiliae Bar 29 pertany al grup de *R. massiliae* dins les rickettsies de les febres tacades que inclou, a més, *R. massiliae*, *R. aeschlimannii*, *R. montanensis* i *R. rhipicephali*.

R. massiliae, de la qual, fins fa molt poc, es desconeixia la seva patogenicitat, ha estat descrita en molts països arreu del món i en diferents continents tant en els seus vectors, les paparres, com en diferents reservoris animals i també en humans (189-191).

A Europa és on primer es va descriure i aïllar *R. massiliae* en paparres de l'espècie *Rh. turanicus* recollides prop de Marsella, França (192). En un principi se les va nominar com Mtu1 i Mtu5, es va veure que eren nous serotips dins el grup de les tacades i la Mtu1 es va proposar com una nova espècie, *R. massiliae*. El 1996, fou aïllada i identificada pel nostre grup en col·laboració amb el grup de Marsella una nova soca idèntica a la Mtu5 en *Rh. sanguineus* capturades a Barcelona, d'on procedeix el seu nom, *R. massiliae* Bar 29 (Bar 29) (13). En aquest mateix estudi no es va aconseguir aïllar de les paparres cap soca de *R. conorii*, que en principi era la coneguda com a agent causal de la FBM en la nostra zona.

Més endavant es va detectar, a part de *Rh. turanicus* i *Rh. sanguineus*, en altres espècies de paparres, *R. pusillus*, *R. bursa*, i *Ixodes ricinus*, en 8 països europeus diferents, incloent-hi 5 illes o arxipèlags, Sardenya, Sicília, les Illes Canàries, Cefalonia i Xipre (193-196). També s'han descrit infeccions mixtes en *Rhipicephalus* entre *R. massiliae* i *Coxiella burnetii* a Grècia i Sèrbia i *R. massiliae* amb *R. conorii* a França (197-199). Paparres infectades per *R. massiliae* s'han recollit de reservoris animals com pardals, gossos, cavalls, gats, eriçons, guineus, llebres, cabres, vaques i també de persones asimptomàtiques (194, 200-202), (Figures 27, 28, 29, 30).



Figura 27. El gos com a reservori de rickètsies



Figura 28. La guineu com a reservori de rickètsies



Figura 29. Les cabres com a reservori de rickètsies



Figura 30. Els bòvids com a reservori de rickètsies

La taxa d'infecció en les paparres oscil·la entre el 2-92% en els diferents estudis (199, 202). Es suggereix que la introducció d'aquesta rickètsia a les Canàries va poder ser deguda a la translocació de les paparres *R. pusillus* infectades, o bé per conills salvatges migrats de la península Ibèrica fa més de 600 anys, considerats un reservori natural d'aquest patògen. Però per altra banda no es va trobar ADN rickettsial en 150 conills salvatges estudiats en aquestes illes (195).

Un estudi portat a terme a Andalusia ha revelat la infecció exclusiva per *R. massiliae* - incloent-hi Bar 29- de *Rh. sanguineus*, sense detectar *R. conorii* en cap dels espècimens capturats (203).

En la Figura 31 es poden observar les diferents espècies de rickètsies patògenes i no patògenes descrites a Europa i els països on s'ha descrit *R. massiliae*.

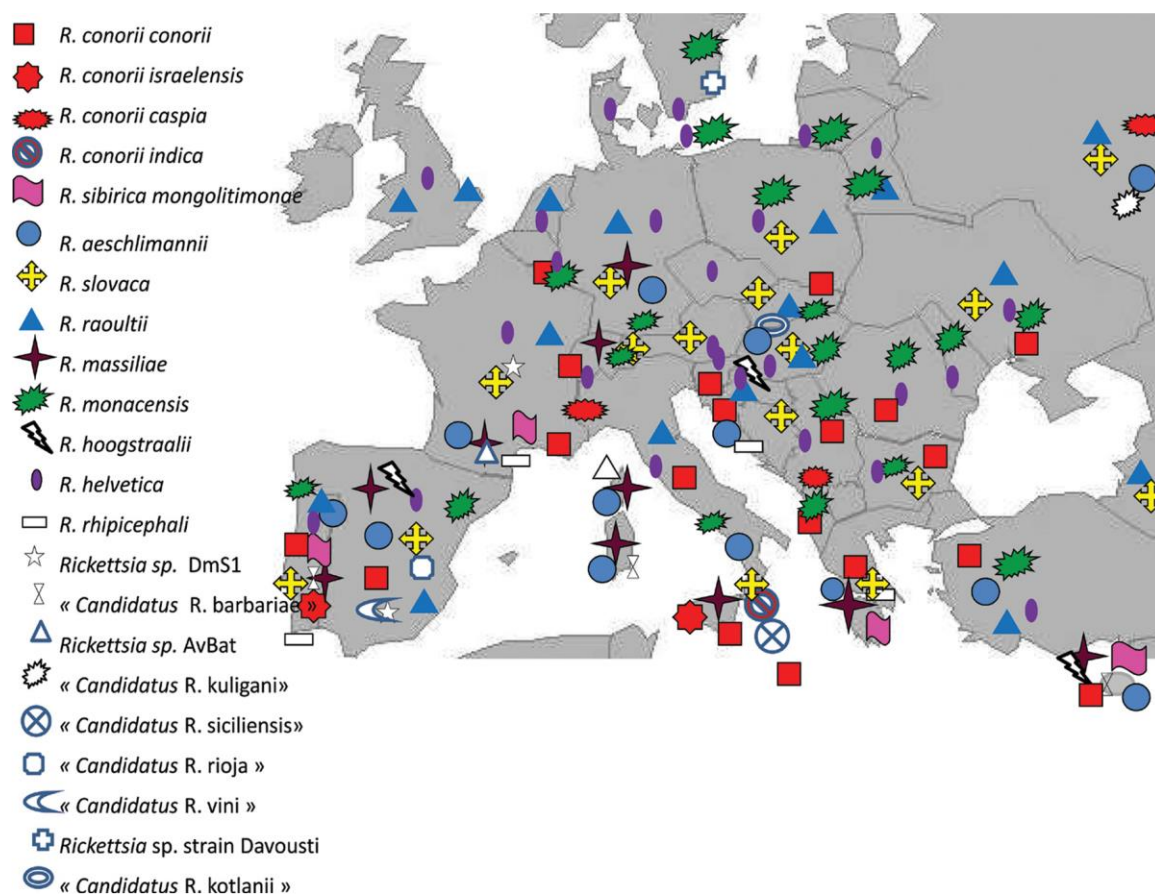


Figura 31. Rickètsies descrites a Europa. Els símbols de colors indiquen rickètsies patògenes, els símbols en blanc indiquen rickètsies de possible patogenicitat o rickètsies de patogenicitat desconeguda. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013, 26(4):657-700.

Estudis més recents realitzats a Itàlia per tècniques moleculars han reportat també la troballa de *R. massiliae* i altres espècies de rickètsies tant en paparres lliures i obtingudes de reservoris, com en paparres recollides de persones (204, 205).

Un estudi publicat el 2017 al territori espanyol troba en paparres de gossos diferents patògens com *Erlíchia* i algunes espècies de rickètsies entre elles *R. massiliae* (206).

El poder patògen de *R. massiliae* en l'espècie humana ha estat confirmat recentment per estudis moleculars a partir del cultiu d'una soca congelada aïllada d'una mostra de sang recollida vint anys abans, en un pacient diagnosticat inicialment de FBM a Sicília (14). A Europa, fins el 2015 se n'havien descrit dos casos més; un cas es va diagnosticar a França per estudis serològics i moleculars de les mostres de l'escara i humor aquós, en un pacient

amb símptomes de FBM amb complicacions de pèrdua de visió i corioretinitis bilateral. El curs clínic va ser favorable però 3 mesos més tard la recuperació de l'agudesia visual va ser incompleta. Es van recollir paparres del lloc on el pacient havia estat picat i un 10% d'elles estaven infectades per *R. massiliae* (153). L'altre cas es va diagnosticar a Itàlia el 2012 en un pacient de 13 anys que presentava una escara al cap amb alopecía i limfadenopaties cervicals. La mostra de l'escara va donar positiva per PCR i seqüenciació a *R. massiliae* (207).

Els últims dos anys s'ha publicat un estudi de Romania on es descriuen dos casos per serologia (208) i un estudi espanyol on un dels casos descrits en un pacient de 4 anys presenta una PCR de l'escara positiva a *R. massiliae* (209).

Aquesta possible patogenicitat ja s'havia plantejat en el passat per Bella i col. (186) per la resistència a la rifampicina o bé per les formes lleus observades en alguns dels casos diagnosticats de FBM (192), que posaven de manifest certes sospites respecte a l'eventual caràcter patogen d'aquestes noves soques. En aquest sentit, alguns autors van suggerir la possibilitat que un indeterminat percentatge de casos diagnosticats de FBM estiguessin causats en realitat per Bar 29 (200).

Recentment un estudi fet a Polònia va demostrar la presència d'anticossos específics enfront de rickètsies del grup de les febres tacades en un 15% de treballadors forestals, i en un 79% d'ells eren específics de *R. massiliae*. Aquests resultats s'han de valorar curosament, ja que la serologia no ens determina exactament les espècies de rickètsia involucrades (210).

A l'Amèrica del Nord la primera descripció de *R. massiliae* va ser l'any 2006 quan va ser detectada en una paparra adulta de *Rh. sanguineus* al sud-oest dels Estats Units, una zona amb un focus hiperendèmic de RMSF (191). Més tard va ser identificada en paparres recollides en gossos a Califòrnia i Carolina del Nord (190). La distribució i freqüència d'aquest bacteri en les paparres marrons del gos a l'Amèrica del Nord i Central ha estat poc

descrita, però estudis preliminars suggereixen que en el Nou Mon és esporàdic i local. No s'han documentat casos humans als Estats Units i l'Amèrica Central, encara que *R. massiliae* s'ha relacionat amb una malaltia lleu o moderada en gossos a Califòrnia (211, 212).

També a l'Amèrica del Sud el 2004 es va descriure *R. massiliae* en paparres de *Rh. sanguineus* a Buenos Aires, Argentina (213, 214). Anys més tard, el 2010, a Espanya, es va diagnosticar en un pacient una febre botonosa aguda, caracteritzada per febre, *rash* purpúric en extremitats superiors i inferiors i escara en cama dreta. Les anàlisis moleculars van confirmar que la malaltia estava causada per *R. massiliae*. El pacient havia acabat d'arribar de Buenos Aires i es va concloure que s'havia infectat a l'Argentina, de manera que es va confirmar el primer cas de rickettsiosi causada per *R. massiliae* a l'Amèrica del Sud (215). Estudis recents han demostrat que la població de *Rh. sanguineus* de l'Amèrica del Sud són genèticament derivats de l'àrea Mediterrània (216, 217). Es creu que és possible que la distribució de *R. massiliae* en la part sud de l'Amèrica del Sud sigui molt més àmplia del que s'ha descrit.

En el continent africà s'ha trobat *R. massiliae* en paparres al nord d'Àfrica. S'ha aïllat de *Rh. turanicus* i *Rh. sanguineus* a Algèria i s'ha detectat en paparres *Rh. sanguineus* i *Rh. bursa* al Marroc. Però no s'havien trobat ni descrit casos en humans (218, 219). El 2016 s'ha publicat un treball realitzat a Tunísia on en mostres de biòpsies o de frotis cutanis s'identifiquen diferents espècies de rickettsies per tècniques moleculars; la més freqüent, *R. conorii*, però també troben, un sol cas de *R. massiliae* identificada per PCR i posterior *reverse lines blot* (RLB) hibridació (220).

A l'Àfrica subsahariana, malgrat que *R. massiliae* s'ha detectat en un 22% de *Rhipicephalus guilhoni* recollides de mones i vaques al Senegal (221) i en un 8% de *Rhipicephalus senegalensis* (*Rh. senegalensis*) a Guinea, no s'han descrit casos en humans (222). Recentment *R. massiliae* s'ha detectat en un 3% de paparres *Rhipicephalus evertsi* recollides

de la vegetació en set llocs de Nigèria, cosa que suggereix que aquests bacteris poden sobreviure i perpetuar-se en la selva (223). A més, un genotip de *R. massiliae* de Guinea es va detectar per mètodes moleculars en un 16% de *Rh. senegalensis* i en un 2% de *Haemaphysalis paraleachi* recollides de gossos a Guinea (222).

A Àsia, *R. massiliae* ha estat regularment identificada en *Rh. turanicus* i *Rh. sanguineus* a Israel (224, 225). També les dues espècies de *Rhipicephalus* es troben àmpliament distribuïdes a l'Àsia Central. L'àrea de distribució de *R. massiliae* pot incloure també aquestes regions, però per altra banda no hi ha estudis recents que ho puguin confirmar (226).

A Oceania (Austràlia i el Pacífic) hi ha un nombre reconegut de rickettsiosis del grup de les febres tacades però la majoria estan limitades a Austràlia (227, 228). Investigacions de la presència de rickettsies en regions fora d'Austràlia han començat des de fa poc i algunes evidències anecdòtiques suggereixen que les rickettsiosis del grup de les febres tacades es troben infra-descrites i més esteses del que es coneixia fins ara. Les rickettsies del grup de les tacades s'han descrit recentment a Nova Zelanda i en altres 20 illes del Pacífic, però calen evidentment més estudis per aclarir la seva presència o absència en aquestes regions.

La primera espècie patògena descrita va ser *R. australis* el 1946 a Queensland, amb dos casos (21), causats per picades de paparres amb una presentació clínica similar al tifus murí. La malaltia és coneguda com Queensland tick typhus (QTT). Les anàlisis serològiques dels aïllats van demostrar que es tractava d'una nova rickettsia que es va nomenar *R. australis*. Les tres espècies de paparres identificades com a vectors de *R. australis* són *Ixodes tasmani* (*I. tasmani*), *I. Holocyclus* i *I. cornuatus*. Altres espècies trobades són *R. africae* i *R. honnei*. En els estudis realitzats fins ara no s'ha trobat cap *R. massiliae* en aquestes regions (229, 230).

HIPÒTESI

2 HIPÒTESI

- La nova espècie *Rickettsia* Bar 29 aïllada de paparres en la nostra àrea causa infecció subclínica en humans, la qual cosa es reflectiria en l'estudi de seroprevalença.
- Aquesta nova espècie és un agent etiològic de la FBM en la nostra àrea i podria marcar alguns aspectes diferencials tant des del punt de vista epidemiològic com clínic.
- El cultiu *shell vial* i la tècnica de la PCR són tècniques útils per la detecció d'altres espècies de rickètsies causants de malaltia.

OBJECTIUS

3 OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball és realitzar un estudi epidemiològic de la presència de la infecció per *R. massiliae* Bar 29 en humans, reservoris i vectors a Catalunya, i avaluar l'eficàcia de les tècniques diagnòstiques.

Objectius més concrets:

1. Estimar la prevalença d'anticossos enfront de *R. massiliae* Bar 29 (Bar 29) en poblacions humanes de la nostra àrea geogràfica del Vallès Occidental. Detectar la possible infecció subclínica i relacionar-la amb diversos factors com ara el nivell social, l'hàbitat, l'edat, el contacte amb animals i els hàbits personals.
2. Detectar les possibles reaccions creuades de *R. massiliae* Bar 29 amb *R. conorii*.
3. Conèixer el nivell d'anticossos enfront de Bar 29 dels pacients afectats de FBM. Aplicació de la tècnica d'immunofluorescència indirecta (MIF) i Western immunoblot per identificar espècies.
4. Aïllar rickettsies mitjançant cultiu en *shell vial* a partir de mostres de sang de pacients i identificació per PCR de les soques rickettsials.
5. Estudiar la presència de *R. conorii* i *R. massiliae* Bar 29 en animals del cicle silvestre i del cicle domèstic i vectors a Catalunya.

MATERIAL I MÈTODES

4 MATERIAL I MÈTODES

Objectiu 1

Estudi de seroprevalença

4.1 Estudi de seroprevalença enfront de *R. massiliae* Bar 29

S'ha determinat la prevalença d'anticossos enfront de *Rickettsia* Bar 29 en la població humana representativa de l'àrea de referència del nostre hospital dins la zona geogràfica del Vallès Occidental.

El Vallès Occidental és un àrea predominantment urbana prop de la costa al nord-est d'Espanya. L'àrea de referència del nostre hospital consta d'11 municipis amb un total de 407.763 habitants. La mostra perquè fos representativa de la població de l'àrea va ser la mateixa d'un estudi previ en què s'havia estimat una prevalença d'entre l'11% i el 3% per *R. conorii* i *Borrelia burgdorferi* respectivament, en què es van recollir 211 sèrums tant de mostres d'adults com de pacients pediàtrics. La mostra es va estratificar per grups d'edat (0-14, 15-29, 30-44, 45-64 i >65 anys) segons la proporció de la població i també tenint en compte la zona demogràfica: rural (<5000 habitants), semiurbana (5000-50.000 habitants) i urbana (>50.000 habitants).

Subjectes d'estudi. Les mostres d'adults es van recollir de pacients als quals s'havia de realitzar una extracció de sang per motiu d'una cirurgia menor. En el cas dels nens, de pacients que eren atesos en l'àrea d'Urgències i que se'ls havia de realitzar una extracció de sang, previ consentiment informat per part dels participants si eren adults o dels pares o tutors legals en els nens, abans de la recollida del sèrum.

Es van excloure els casos de malalties infeccioses relacionades en tots els casos.

A tots els casos de l'estudi se'ls va realitzar una enquesta epidemiològica on es recollien una sèrie de dades d'interès per a l'estudi: dades epidemiològiques, com edat, sexe, àrea demogràfica, ocupació, contacte recent amb gossos, animals de granja o animals salvatges; i dades d'exploració clínica, si recordaven haver patit una malaltia exantemàtica semblant a una FBM amb febre, taca negra, exantema.

Es va extreure un mil·lilitre de sang sense anticoagulant per obtenir sèrum que es va conservar a -80°C fins a la seva anàlisi.

Metodologia

Microimmunofluorescència indirecta (MIF) per a la detecció d'anticossos IgG anti-Bar

29. Es van utilitzar portes fixats amb l'antigen de Bar 29 preparats pel nostre laboratori.

L'antigen va ser obtingut de la soca *R. massiliae* Bar 29 prèviament aïllada de paparres i cultivada en el nostre laboratori.

Obtenció d'antigen. La soca de *R. massiliae* Bar 29 aïllada de paparres obtingudes a Catalunya es va fer créixer en cultiu cel·lular L929, complementat amb el medi d'Eagle's contenint 4% de sèrum boví fetal (SBF) i 2 mM de glutamina a 32°C . Quan el cultiu va estar densament crescut es va recollir la capa cel·lular infectada i es va utilitzar aquest antigen per la MIF.

L'antigen fixat en portes es va enfrontar als sèrums dels pacients de l'estudi a dilucions seriades dobles amb PBS i incubat a 37°C durant 30'. Posteriorment es van realitzar dos rentats amb PBS i es van incubar amb el conjugat marcat amb fluoresceïna (Fluoline H, BioMérieux) durant 30' a 37°C . Es van rentar dues vegades amb PBS i es van observar els portes en el microscopi de fluorescència. La titulació de cada sèrum va ser l'última dilució que va presentar fluorescència. Les mostres es van considerar positives a partir d'una titulació $\geq 1/40$.

Anàlisi estadística. Els resultats es van analitzar utilitzant el test del χ^2 , el test exacte de Fisher, o la *t* de Student. Una *p* d'un valor $<0,05$ es va considerar significativa.

Objectiu 2

4.2 Estudi de les possibles reaccions creuades de *Rickettsia* Bar 29 amb *R. conorii*

Els mateixos sèrums de l'estudi de seroprevalença per la *R. massiliae* Bar 29 prèviament s'havien estudiat per a la detecció d'anticossos enfront de *R. conorii*.

La tècnica utilitzada va ser igualment la MIF usant portes comercialitzats per *R. conorii* de BioMérieux, France. Els sèrums es van enfrontar a l'antigen a les mateixes dilucions que per la Bar 29 i després de la incubació a 37°C 30' es van revelar amb el mateix conjugat.

Es van considerar positius també títols $\geq 1/40$.

Es van comparar els resultats dels dos estudis per tal de detectar les reaccions creuades entre les dues espècies de rickettsies.

Objectiu 3

4.3 Estudi en pacients de *R. massiliae* Bar 29

Per tal de conèixer el possible paper de la *R. massiliae* Bar 29 com a causa de FBM en la nostra àrea, pacients diagnosticats de FBM per clínica o confirmats per serologia amb anticossos enfront de *R. conorii* es van testar enfront de *R. massiliae* Bar 29.

Àmbit d'estudi. Vallès Occidental, àrea de referència de l'Hospital de Sabadell.

Subjectes d'estudi. Es van incloure els pacients, tant adults com pediàtrics, que haguessin estat atesos en el nostre hospital i que complissin els criteris clàssics de confirmació de FBM: febre, *rash* maculopapular o purpúric i almenys taca negra i/o serologia positiva a *R. conorii* (172).

Un pool de quatre sèrums coneguts negatius enfront de *R. conorii* es van utilitzar com a control negatiu.

Es va realitzar un estudi preliminar amb mostres de 15 pacients que complien els criteris establerts. Posteriorment l'estudi es va ampliar amb 136 sèrums de pacients amb sospita de FBM.

Es van determinar les reaccions serològiques d'anticossos IgG i IgM per MIF enfront de *R. conorii* i *R. massiliae* Bar 29 i es va confirmar l'especificitat d'aquestes reaccions en alguns d'ells amb la tècnica de western immunoblot.

Es van revisar i recollir les dades clíniques i epidemiològiques d'aquests pacients.

En aquest cas l'antigen utilitzat per la *R. massiliae* Bar 29 va ser el mateix que per a l'estudi de seroprevalença. Per la determinació d'anticossos enfront de *R. conorii* es van usar els portes comercialitzats per *R. conorii* de BioMérieux.

Amb els sèrums dels pacients, es va procedir a realitzar la tècnica de la MIF tal com s'ha descrit en l'apartat de la seroprevalença.

Estudi per SDS-PAGE i Western immunoblot. La tècnica de MIF presenta reaccions creuades entre les diferents espècies de rickètsies. Per aquest fet, i per tal d'augmentar l'especificitat i confirmar la resposta específica enfront de Bar 29, alguns dels sèrums positius es van estudiar amb la tècnica de Western immunoblot, que detecta anticossos tipus específic i no presenta reactivitat creuada amb altres rickètsies.

Per realitzar aquesta tècnica es va preparar antigen de *R. conorii* (ATCC VR 141) i de *R. massiliae* Bar 29 tal com s'ha descrit en l'estudi de seroprevalença per la soca *R. massiliae* Bar 29. Posteriorment l'antigen obtingut de les dues soques es va procedir a purificar-lo per densitat en gradient de renografia per tal de separar les proteïnes i es va preparar un gel amb sulfat de poliacrilamida (SDS-PAGE) amb les dues espècies de rickètsies. Un cop fet això,

es va transferir a una membrana de nitrocel·lulosa. Es van bloquejar els llocs d'unió no específics amb un tampó Tris salí i després de rentar la membrana i deixar-la assecar es va tallar en tires que contenien els antígens de les dues rickètsies.

Les tires es van incubar amb els sèrums diluïts 1/200 durant 2 hores. Després de tres rentats, les tires es van incubar amb el conjugat anti-human IgG amb peroxidasa. Es van tornar a rentar i finalment es va afegir el substrat per revelar les bandes.

Objectiu 4

4.4 Aïllament de rickètsies mitjançant cultiu en *shell vial* a partir de mostres de sang de pacients i identificació per PCR de les soques rickettsials

En el període de 10 anys des del 1994 al 2003, una mostra de sang total de 59 pacients diagnosticats clínicament de FBM i que presentaven serologia positiva a rickètsia es van cultivar mitjançant la tècnica de *shell vial*.

Tècnica de cultiu *shell vial*

La tècnica consisteix a sembrar la sang total heparinitzada en uns flascons que contenen al fons uns petits cobreobjectes en què hi ha fixada una monocapa de línia cel·lular de fibroblasts pulmonars embrionaris humans (MRC5) tal com s'ha descrit en la introducció (Figura 32).

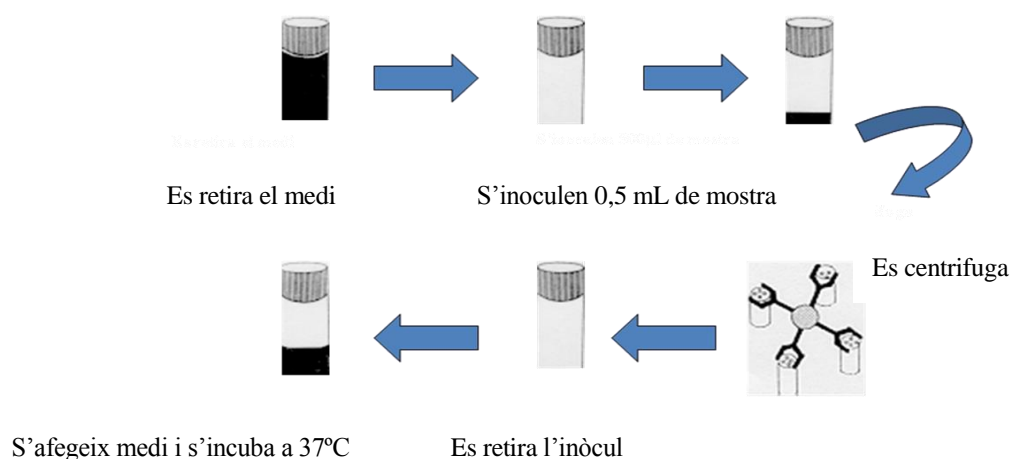


Figura 32. Tècnica *shell vial*. Inoculació mostra.

Les mostres de sang dels nostres pacients van ser cultivades per aquesta tècnica inoculant 0,5 mL de mostra en cada flascó.

Per a cada mostra dels pacients es van realitzar tres tubs de cultiu i es va seguir el següent protocol:

Als 4 dies es va revelar un dels tubs inoculats mitjançant la tinció de Giménez del rascat de la capa cel·lular, o bé per una tècnica d'IFI. En aquest cas, es van realitzar dos rentats amb PBS, després es van fixar en metanol 10 minuts, i seguidament es van incubar 30' a 37° C amb 100 µL d'immunoglobulina humana específica anti-rickettsia. Com a immunoglobulina específica es va utilitzar sèrum policlonal humà positiu a rickettsia diluït 1/200.

Després es van tornar a realitzar dos rentats de 5' amb PBS i posteriorment es van incubar 30' a 37°C amb immunoglobulina anti-humana policlonal conjugada amb fluoresceïna (Fluoline H, bioMérieux) diluïda 1/400 amb PBS i una gota de blau d'Evans. Posteriorment es van realitzar dos rentats de 5' amb PBS i un de final amb aigua destil·lada (Figura 33).

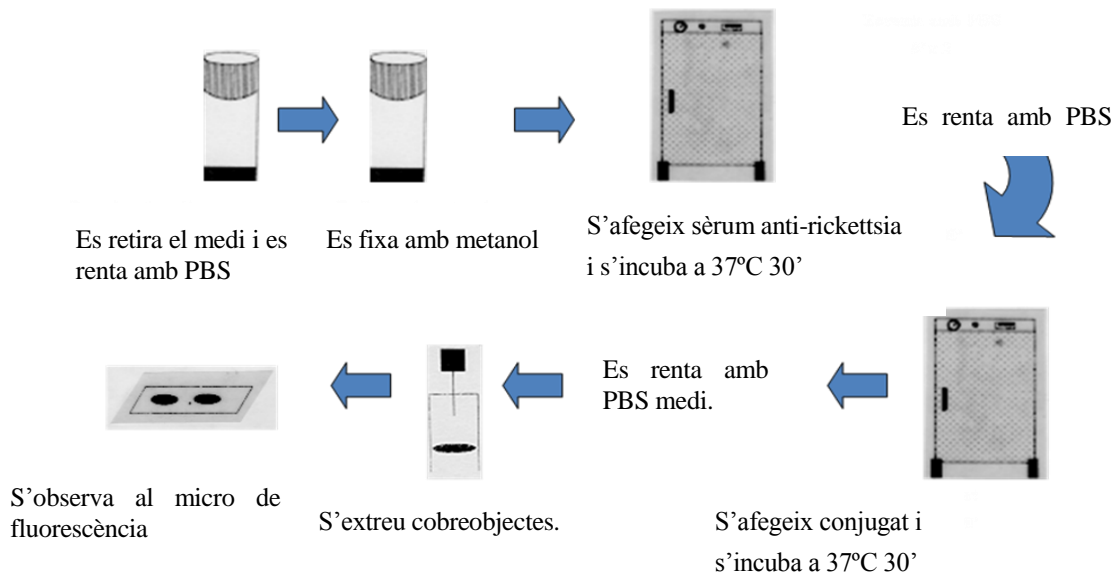


Figura 33. Tècnica *shell vial*. Revelat.

Els cobreobjectes amb la capa cel·lular de cultiu revelada es van dipositar amb glicerina cara avall en un portaobjectes i van ser observats al microscopi de fluorescència.

Es van considerar positius si s'observaven més de 4 organismes fluorescents per cèl·lula.

Si el flascó era negatiu, al cap de 5 dies més es revelava el segons *shell vial* amb el mateix procediment i al cap de 10 dies el tercer.

El sobrenedant dels *shell vials* positius es van sembrar en flascons amb la mateixa línia cel·lular MRC5 per tal d'obtenir soques rickettsials.

Per tal d'augmentar l'eficàcia d'aquesta tècnica de cultiu es van avaluar dues estratègies:

1. Dels cultius *shell vials* positius es va obtenir ADN per realitzar una PCR.
2. En lloc de sembrar només 3 *shell vials* de cada mostra dels pacients tal com es realitzava habitualment, es van sembrar 8,5 mL de sang d'un pacient de l'any 2004 i es va distribuir en 17 *shell vials* per incrementar la sensibilitat.

PCR convencional (reacció en cadena de la polimerasa)

La identificació de les espècies de rickètsia dels cultius *shell vial* positius es va fer mitjançant la tècnica de PCR/RFLP (13).

Es van utilitzar tres tipus de *primers* per a la identificació de rickètsies: un fragment del gen de la citrat sintasa de 381 pb, utilitzant com *primers* RpCS 877p i RpCS 1258n del gen de *R. prowazekii*; un fragment específic del gen *ompA* que codifica l'antigen de 190 KD de *Rickettsia rickettsii*, Rr 190.70p i Rr 190.602n i el BG1-21 i el BG2-20 generat del gen de 120-KDa de *R. rickettsii* (4, 114). Com a controls positius es va usar ADN de *R. massiliae* Bar 29 i de *R. conorii* i, com a controls negatius, aigua, així com ADN d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i ADN extret de sang de 3 nounats.

La PCR es va realitzar amb un termociclador Perkin-Elmer 9600 (Roche Diagnostics, Norwalk, CT), segons el protocol de Regnery i col. (4). L'amplificació dels productes es va analitzar per electroforesi horitzontal en agarosa a l'1,8% en tampó Tris-borat-EDTA (TBE).

Després de migrar (100v durant 1 hora), es va realitzar una tinció amb bromur d'etidi i observar en un transil·luminador UV.

Els productes amplificats van ser digerits amb les endonucleases de restricció *AluI*, *RsaI* i *PstI*, segons el protocol de Eremeeva i col. (114). La separació electroforètica es va realitzar amb un gel d'agarosa de l'1,8% en tampó TBE.

Els fragments d'ADN, van ser visualitzats amb la tinció de bromur d'etidi i les mides dels fragments van ser comparades amb les mides del patró VI de pes molecular d'ADN (Boehringer Mannheim, GmbH, Germany).

Objectiu 5

4.5 Estudi de la presència de *R. conorii* i *R. massiliae* Bar 29 en animals del cycle silvestre i del cycle domèstic i vectors a Catalunya

Dins l'àmbit del cycle silvestre es van estudiar guineus; dins el cycle domèstic, ovins, caprins i bovins; i com a vectors, paparres.

Estudi en reservoris

S'ha realitzat un estudi observacional en l'àmbit de Catalunya.

Subjectes d' estudi

En el marc del cycle silvestre s'han agafat mostres de guineus. Aquest mostreig es va portar a terme en col·laboració amb la Direcció General del Medi Natural, Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya. En el marc de control de depredadors, es van prendre mostres de sang a partir de punció intracardíaca *post mortem*.

Les mostres d'animals del cycle domèstic es van obtenir de remugants domèstics, ramat oví, caprí i boví. La recollida de mostres de sang es va realitzar en coordinació amb Associacions de Defensa Sanitria (ADS). Les mostres procedien exclusivament d'explotacions ramaderes

en règim extensiu, que permeten la pastura de l'animal. Això implica un elevat risc de parasitació per paparres presents en el camp i una eventual circulació del patogen. El mostreig es va realitzar en la província de Tarragona, en concret en les comarques del Montsià, el Baix Ebre, el Priorat i els Ports de Tortosa-Beseit.

El mostreig dels reservoris es va fer entre els mesos d'abril i octubre. Es van obtenir mostres de sèrum per a les tècniques serològiques. Tots els tubs es van congelar a -80°C fins el seu processament.

Mida mostral

Per tal d'aconseguir una precisió del 5,0 % en l'estimació d'una proporció mitjançant un interval de confiança asimptòtic normal amb correcció per poblacions finites al 95% bilateral, i assumint que la proporció esperada és del 10%, es va calcular que seria necessari incloure 138 unitats experimentals en l'estudi (138 guineus, 138 ovins, 138 bovins, 138 caprins).

De cada un dels animals es va procedir a la recollida de dades sobre data de captura, àrea geogràfica, espècie animal, sexe, edat, estat fisiològic, parasitació per paparres, espècie de paparres capturades i localització anatòmica de les paparres capturades.

Metodologia

Estudi serològic. Es va realitzar mitjançant la tècnica de MIF, la determinació d'anticossos enfront de *R. massiliae* Bar 29 i *R. conorii*, tal com hem descrit en l'apartat de l'estudi de seroprevalença en humans. En aquest cas vàrem tenir en compte els diferents anticossos específics per cadascuna de les espècies que es van estudiar. Així com el canvi de diluent del sèrum animal que va ser PBS- 5% BSA (Albúmina Sèrica Bovina).

Anàlisi estadística

Per comparar les prevalences detectades, es va utilitzar el test X^2 en Statcalc, programa Epi-Info v.6 (CDC, Atlanta, USA). Les diferències es van considerar significatives quan $P < 0.05$.

Estudi en vectors

Estudi observacional a l'àmbit de Catalunya.

Subjectes d' estudi. Paparres.

Mida mostral

La mida de la mostra es va calcular a partir d'una prevalença esperada del 15%, una precisió del 5% i un nivell de confiança del 95%. Es va calcular que s'hauria d'incloure 137 paparres procedents de guineus i 117 d'altres hostes.

Recollida de mostra

Sobre l'hoste es van recollir durant el moment de l'obtenció de mostres de sang de les guineus es va procedir a la inspecció del pèl. Les paparres detectades van ser recollides i dipositades en tubs eppendorfs on es va anotar la localització anatòmica en l'hoste i zona geogràfica. Aquelles paparres que es van trobar agregades es van dipositar en el mateix tub eppendorf.

En fase lliure, l'estudi del vector va ser paral·lel al dels reservoris, és a dir, les paparres van ser capturades en les mateixes zones on es va procedir per a l'estudi dels hostes domèstics (comarques del Montsià, el Baix Ebre, el Priorat i els Ports de Tortosa-Beseit).

Es va realitzar mantejant la vegetació mitjançant l'ús d'un llençol blanc d'1 metre x 1 metre. Les paparres adherides a la manta es van recollir en eppendorfs i si va anotar la data i el lloc

de captura. Es van mantegar zones amb elevada càrrega ramadera, és a dir, àrees contigües a les explotacions objecte d'estudi, zones de pastura, etc.

Les paparres van ser capturades mensualment des del mes d'abril fins al mes d'octubre, coincidint amb l'època de màxima activitat de la paparra vectora.

Metodologia

Les paparres capturades es van identificar seguint claus taxonòmiques. Les paparres identificades com del grup *Rh. sanguineus* van ser analitzades per tècniques moleculars.

Es va realitzar una PCR a temps real per a la detecció de Bar 29 directament de la paparra.

Les paparres es van clarificar en 100 µl de solució *brain-heart infusion*. L'extracció d'àcids nucleics es va realitzar amb *MasterPure ADN purification kit* (Epicentre biotechnologies, Madison, USA) seguint les instruccions del fabricant.

Per a la detecció del gen *ompA*, la parella d'iniciadors proposats que es van utilitzar en aquest estudi és el resultat d'una treballada anàlisi i validació de tècniques realitzades en el nostre laboratori. L'amplificació clàssica d'*ompA* amb els primers Rr190.70- Rr190.701 dona un fragment de 632pb (120). Aquesta és una mida molt adequada per la seva seqüenciació, però no és òptima per les plataformes de PCR a temps real. D'aquesta manera el grup va decidir dissenyar un nou parell d'iniciadors sobre el gen *ompA* que amplifiqués menys de 400pb i que fos suficientment informatiu per les espècies del grup de les febres tacades. L'alineament de les seqüències dipositades en Genbank per *ompA* de *R. slovacae*, *R. conorii* i *R. massiliae* Bar 29 amb MegAlign pel mètode ClustalW i la recerca de cebadors amb *PrimerSelect* (ADNStar 5.0) va identificar un fragment de 316pb (sense, Rr190.314: 5'ggg cat tta ctt acg gtg at; revers, Rr190.630: 5'ctt tga cgg agc tgc aga ttg tat). Aquest fragment d'*ompA* va presentar una gran sensibilitat.

La reacció de PCR es va realitzar amb *Sensimix dU kit* (Bioline Reagents, London, UK), que inclou uracil ADN glicosilasa (UNG) i deoxiuracil trifosfat (dUTP) per evitar contaminació. Es va utilitzar 0,2 µl de cada iniciador. Les mostres per la PCR es van preparar en una cabina esterilitzada amb UV i la PCR a temps real es va realitzar amb el termociclador 7500 (Applied Biosystems, CA, USA). Es va incloure en cada assaig dos controls negatiu (PCR reactius i aigua lliure d'ADN) i un positiu (ADN de *R. conorii* o *R. massiliae* Bar 29).

Cada mostra es va assajar dues vegades. Els productes amplificats es van purificar amb ExoSAP-IT (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) i seqüenciar directament utilitzant iniciadors d'avanc i retorn en el *Genetic Analyzer 3130* amb el *BiGDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, CA, USA). Les seqüències obtingudes es van comparar amb les dipositades al GenBank utilitzant el programa *Nucleotide BLAST*.

Amb aquest nou mètode, les mostres positives a rickètsia es van poder seqüenciar correctament, i es va arribar a la identificació fins al nivell d'espècie.

A la vegada es va utilitzar un reactiu nou comercialitzat el *Tick-Borne Bacteria Flow Chip* (Master Diagnostics), per a la identificació de patògens bacterians transmesos per artròpodes. Mitjançant aquesta tècnica es pot detectar simultàniament espècies bacterianes pertanyents als gèneres *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Borrelia*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Rickettsia* i *Francisella*. La tecnologia que utilitza es basa amb l'amplificació de l'ADN bacterià amb una PCR múltiple i posterior hibridació reversa *reversed dot blot* sobre una membrana que té fixada sondes específiques per cada espècie a detectar. La hibridació es porta a terme usant una tecnologia basada en el sistema *Flow-Through* (hybriSpot 12), que incrementa la sensibilitat de la tècnica i escurça significativament el temps de reacció. (Figura 34).

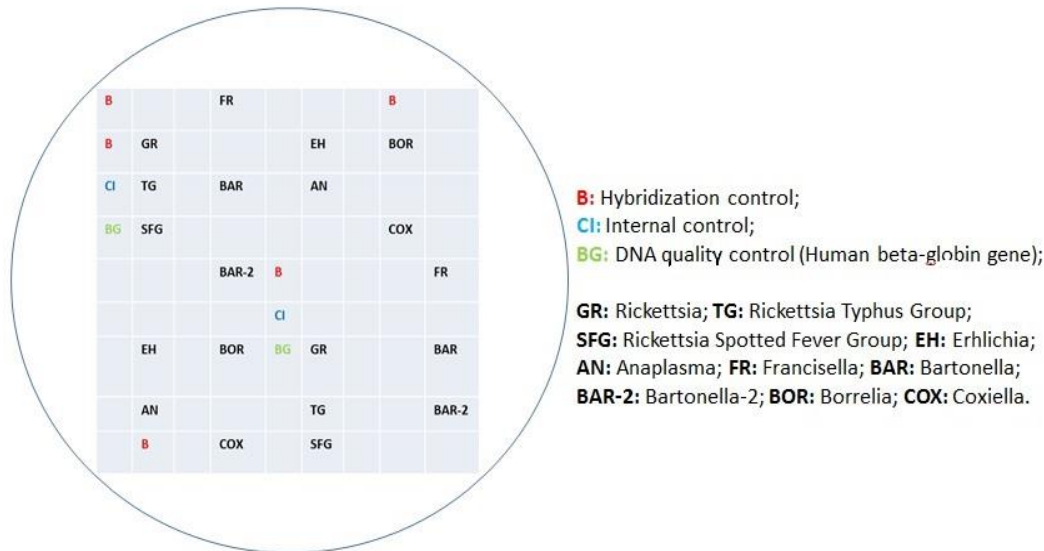


Figura 34. Tècnica Tick-Borne Bacteria Flow Chip (Master Diagnòstica)

Els cebadors i les sondes incloses en aquest reactiu estan dissenyats per detectar regions molt conservades de cadascun del gens diana per cada gènere. Aquest fet fa que es pugui detectar un ampli espectre de patògens per cada gènere inclòs.

Els amplicons biotinitats generats de la PCR s'hibriden en membranes que contenen les sondes específiques per cada gènere bacterià inclòs en el panell, així com sondes control d'extracció d'ADN, d'amplificació i hibridació. Aquesta tecnologia ADN-Flow permet una unió molt ràpida entre el producte de la PCR i la seva sonda específica en un ambient tridimensional porós en contrast amb la hibridació convencional. Un cop s'ha produït la unió amb la sonda el senyal es visualitza amb una reacció immunoenzimàtica colorimètrica amb Estreptavidina-Fosfatasa i un cromogen (NBT-BCIP) que genera precipitats insolubles en la membrana en les zones on hi ha hagut hibridació.

Seqüenciació

Els fragments amplificats del gen *ompA* i les mostres positives per la metodologia *Flow Chip*, es van seqüenciar. La reacció de seqüenciació pel gen *ompA* es va realitzar en els dos sentits, la qual cosa disminueix la taxa d'errors de seqüenciació.

Quant a les seqüenciacions de les mostres positives per *Flow Chip* van ser realitzades per Master Diagnóstica, laboratori que fabrica i comercialitza aquesta tecnologia.

Les seqüències obtingudes es van comparar amb aquelles introduïdes en el GenBank mitjançant el programa BLAST.

RESULTATS

5 RESULTATS

Objectiu 1

Estudi de seroprevalença enfront de *Rickettsia massiliae* Bar 29

Dels 211 sèrums estudiats, 18 sèrums (8,5%) van presentar anticossos enfront de *R. massiliae* Bar 29. Els títols anaven des de 1/40 a >1/1280, entre ells 9 sèrums (4,24%) presentaven títols $\geq 1/80$, 7 de 1/80, un de 1/320 i un altre >1/1280.

En la Taula 5, es poden observar les característiques demogràfiques i la relació entre seropositivitat i les variables estudiades.

L'associació entre la seropositivitat a *R. massiliae* Bar 29 i el contacte amb gossos (tant de gossos domèstics com de carrer) va ser estadísticament significativa ($p=0,018$, OR 3,59 [1,29-10,05]). Mentre que l'associació entre seropositivitat i contacte amb gossos domèstics no va ser significativa, el contacte amb gossos de carrer va estar significativament relacionat amb la infecció per *R. massiliae* Bar 29 $p=0,034$, probablement pel fet que els gossos de carrer tendeixen a estar més parasitats que els gossos domèstics.

Es va observar associació entre seropositivitat i l'edat. La mitjana dels seropositius va ser de $49,89 \pm 18,84$ anys (interval entre 3-82 anys), mentre que en els seronegatius va ser de $32,43 \pm 23,04$ anys (interval entre 0-91), $p=0,001$. La seropositivitat va ser també més elevada en el grup de 45-64 anys comparada amb la del grup de menys de 45 o de més de 64 anys [$p=0,028$, OR 3,49 (1,29-9,46)].

TAULA 5. Característiques demogràfiques de les persones estudiades per *Rickettsia* Bar 29

Variable	Núm. (%) de subjectes (n=211)	Núm. (%) positius (n=18)
Història de FBM	0 (0)	0 (0)
Edat mitjana anys \pm DS	33,92 \pm 23,19	49,89 \pm 18,84
Edat en anys		
0-14	51 (24,2)	1 (5,6)
15-29	49 (23,2)	1 (5,6)
30-44	42 (19,9)	4 (22,2)
45-64	44 (20,9)	8 (44,4) ^a
\geq 65	25 (11,8)	4 (22,2)
Sexe		
Home	114 (54)	13 (72,2)
Dona	97 (46)	5 (27,8)
Àrea residència		
Urbana	141 (66,8)	13 (72,2)
Semirural	57 (27)	4 (22,2)
Rural	13 (6,2)	1 (5,6)
Ocupació (>18 anys)	149	16
Estudiant	11 (7,4)	0 (0)
Jubilat	25 (16,8)	4 (25)
Mestressa de casa	36 (24,2)	4 (25)
Empleat	50 (33,6)	3 (18,8)
Sense feina	26 (17,4)	4 (25)
Desconegut	7 (4,3)	1 (6,3)
Contacte amb animals		
Gos domèstic	34 (16,1)	6 (33,3)
Gos de carrer	4 (1,9)	2 (11,1) ^b
Animal de granja	7 (3,3)	0 (0)
Animal salvatge	2 (0,9)	0 (0)

^a $p=0,028$, OR=3,49 (1,29-9,46)

^b $p=0,034$, OR=12,73 (1,67-96,88)

Objectiu 2

Estudi de les possibles reaccions creuades de *Rickettsia* Bar 29 amb *R. conorii*

Comparant els resultats amb l'estudi previ fet per *R. conorii* (9), 10 sèrums (4,7%) van presentar exclusivament anticossos enfront de *R. massiliae* Bar 29, quatre sèrums van reaccionar al mateix títol enfront de les dues rickètsies (1/40, 1/40, 1/80, 1/80), dos van presentar títols més alts enfront de *R. massiliae* Bar 29 (1/320 vs 1/80 i >1/1280 vs 1/640) i uns altres dos, títols més elevats enfront de *R. conorii* (1/160 vs 1/40 i 1/320 vs 1/80). Si aquests dos últims sèrums no els consideressim positius enfront de *R. massiliae* Bar 29, dels resultats obtinguts de l'estudi anterior de seroprevalença es podria concloure que la Bar 29 està present en la nostra àrea i que la seva seroprevalença pot variar entre 4,7-7,6% segons es tingui o no en compte les reaccions creuades entre les dues rickètsies.

Objectiu 3

Estudi en pacients de la *Rickettsia* Bar 29. Estudi d'anticossos per MIF i confirmació per Western immunoblot

En el primer estudi en què es van analitzar 15 sèrums de pacients enfront de *R. conorii* i *R. massiliae* Bar 29 per la tècnica de MIF, tots els sèrums van presentar títols enfront de *R. conorii* IgG o IgM, excepte un que pertanyia a un pacient que presentava criteris clínics de FBM i per aquest motiu també es va incloure dins aquest estudi de determinació d'anticossos enfront de Bar 29. Els títols de IgG i IgM enfront de les dues rickètsies es poden observar a la Taula 6.

Dos sèrums els 3 i 9, van presentar títols alts de 1/2048 per als dos antígens; 5 mostres van presentar títols \leq a 1/256 per IgG per als dos (sèrums 1,7, 8, 13 i 14); en un sèrum, el 4, els títols de *R. conorii* i *R. massiliae* Bar 29 va ser el mateix de 1/1024 per la resposta a la IgG. En els casos en què la resposta d'anticossos IgG a *R. conorii* va ser \geq 1/256, la resposta a *R.*

massiliae Bar 29 va ser superior en 5 sèrums (2, 5, 6, 10 i 15), i en tots els casos excepte el pacient 2, la resposta de les IgM va ser igual o superior per a *R. massiliae* Bar 29. Per aquest motiu els sèrums, 5, 6, 10 i 15 es van escollir per ser estudiats per immunoblot per tal de confirmar l'especificitat d'aquestes reaccions enfront de *R. massiliae* Bar 29.

TAULA 6. Reactivitat dels sèrums enfront dels dos antígens: *R. conorii* i *R. massiliae* Bar 29

Sèrums	<i>R. conorii</i>		<i>R. massiliae</i> Bar 29	
	IgG	IgM	IgG	IgM
1	1:256	1:256	1:256	1:128
2	1:512	1:2048	1:1024	1:1024
3	1:2048	1:2048	1:2048	1:2048
4	1:1024	1:2048	1:1024	1:128
5	1:512	1:128	1:1024	1:256
6	1:1024	1:128	1:2048	1:128
7	1:256	1:512	1:256	1:512
8	1:128	1:256	1:256	1:256
9	1:2048	1:256	1:2048	1:2048
10	1:256	1:2048	1:2048	1:2048
11	Neg	1:256	1:512	1:256
12	1:128	1:128	1:512	1:64
13	Neg	Neg	1:128	Neg
14	1:256	1:256	1:128	1:256
15	1:512	1:2048	1:2048	1:2048

En l'assaig d'immunoblot, la resposta específica a l'antigen Bar 29 no es va poder confirmar en dos dels 4 sèrums: el 15, que va mostrar una banda molt dèbil localitzada en la regió específica d'alt pes molecular (d'aproximadament 120 KDa), i el sèrum el 6, el qual va mostrar una reacció similar a la mateixa regió tant per *R. conorii* com per l'antigen de *R. massiliae* Bar 29 i que ja presentava títols molt similars per les dues per MIF.

Els altres dos casos (sèrums 5 i 10) amb títols de IgG més alts per *R. massiliae* Bar 29, i en particular en el sèrum 10 amb diferències de 4 vegades el títol de *R. massiliae* Bar 29 respecte al títol de *R. conorii* en les IgG, van mostrar una resposta específica enfront de *R. massiliae* Bar 29 reaccionant amb les proteïnes específiques d'alt pes molecular així com de baix pes molecular de la Bar 29, mentre que amb l'antigen de *R. conorii* les bandes de la reacció només es van observar amb les proteïnes de baix pes molecular en la regió de l'antigen LPS.

Aproximadament el pes molecular de les bandes espècie-específiques de *R. massiliae* Bar 29 es va observar a 140, 120, 104 i 92 KDa respectivament (Figura 35).

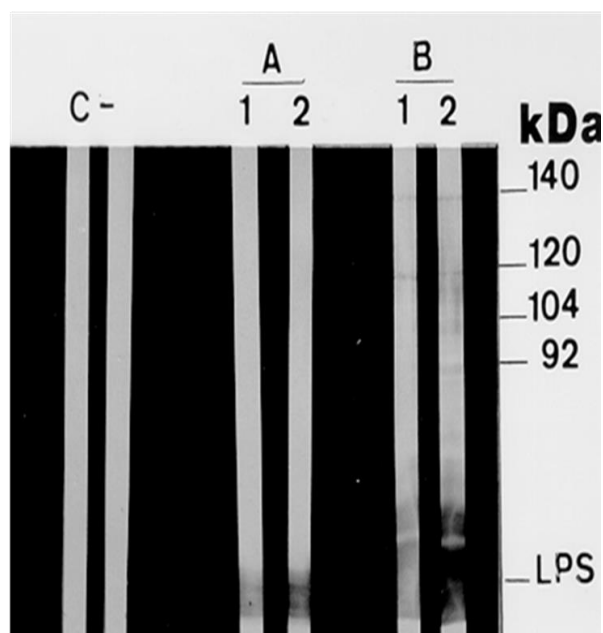


Figura 35 Western blot enfront d'antígens de *R. conorii* (línies A) i Bar 29 (línies B). C-: pool de sèrums negatius enfront d'antígens de *R. conorii* i Bar 29. Línia 1, sèrum 5; línia 2, sèrum 10.

Els aspectes clínics i epidemiològics més rellevants d'aquests pacients els podem observar en la Taula 7. És pertinent destacar que els pacients 5 i 10 van presentar o bé més d'una picada de paparra o bé múltiples escars.

TAULA 7. Característiques clíniques dels pacients

Sèrum	Sexe	Edat	Rash	Escara	Múltiple escara	Epidemiologia
1	Home	15 a	Maculopapular	Si	No	Contacte amb gossos
2	Home	4 a	Maculopapular	Si	No	Recent contacte amb gossos
3	Dona	11 a	Maculopapular	Si	No	Una extracció paparra
4	Dona	5 a	Maculopapular	Si	No	-
5*	Dona	69 a	Maculopapular no afectació palmo-plantar	Si	Dues	Dues picades de paparres. La primera extreta per ell mateix
6#	Home	Adult	Maculopapular	No	No	-
7	Dona	16 m	Maculopapular	Si	No	-
8	Home	Nen	Maculopapular	Si	No	-
9	Dona	52 a	Maculopapular	Si	No	Gos amb paparres
10*	Dona	8 a	Maculopapular	Si	Tres	-
11	Home	26 a	Maculopapular	Si	No	No contacte amb gossos
12	Dona	8 a	Maculopapular	Si	No	Recent contacte amb gossos
13	Home	58 a	Macular	Si	No	Gossos a casa
14	Dona	18 a	Maculopapular	No	No	Contacte amb gossos
15&	Dona	40 a	Rash suggestiu de FBM	Si	No	Contacte amb gossos amb paparres

*Sèrums amb resposta específica enfront d'antígens Bar 29 per immunoblot

#Sèrum amb igual resposta enfront d'antígens *R. conorii* i Bar 29 per immunoblot

&Sèrum amb una dèbil resposta específica enfront d'antígens Bar 29 per immunoblot

En un estudi posterior amb 136 sèrums de pacients amb sospita de FBM es va determinar per MIF la presència d'anticossos IgG enfront de *R. conorii* i *R. massiliae* Bar 29 (Bar 29).

Vam trobar 53 sèrums positius almenys a un dels dos microorganismes, 51 tenien anticossos

enfrent de *R. conorii* i 42 enfront de Bar 29, i 40 sèrums presentaven anticossos enfront dels dos. Catorze pacients presentaven títols superiors a Bar 29. D'aquests, 12 tenien criteris de FBM, i els altres dos casos tan sols tenien anticossos enfront de Bar 29 (pacients 1 i 4), un d'ells presentava una picada per paparra sense símptomes i l'altre una història de febre i *rash*. En la Figura 36, es pot observar la distribució per anys del nombre de pacients segons anticossos per cada espècie de les dues rickètsies estudiades. En la Taula 8 es mostren els títols d'anticossos enfront de les dues rickètsies dels 14 pacients amb títols més alts de Bar 29. En la Taula 9 podem observar les característiques dels dos pacients que presentaven només anticossos enfront de Bar 29.

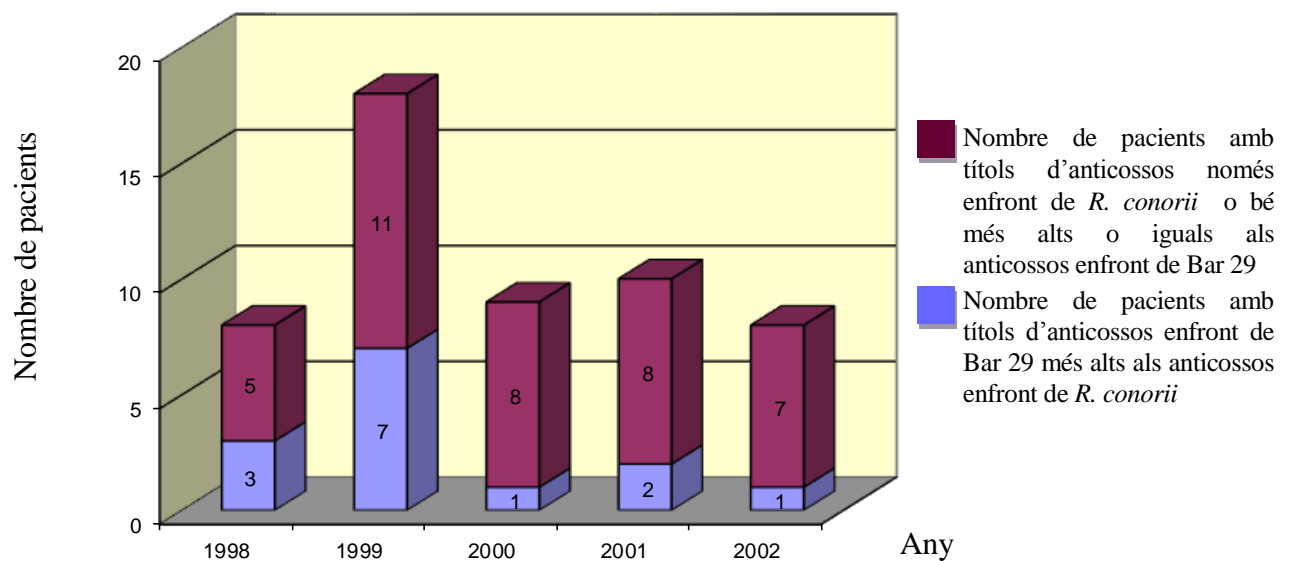


Figura 36. Distribució anual dels pacients amb anticossos enfront de les dues rickètsies.

TAULA 8. Títols d'anticossos enfront de Bar 29 i *R. conorii*

Pacient	Anti-Bar 29	Anti- <i>R. conorii</i>
1	1/320	0
2	1/320	1/160
3	1/640	1/40
4	1/640	0
5	1/320	1/160
6	1/320	1/80
7	1/320	1/80
8	1/320	1/80
9	1/5120	1/2560
10	1/160	1/80
11	1/2560	1/640
12	1/160	1/80
13	1/10240	1/5120
14	1/2560	1/320

TAULA 9. Característiques clíniques dels dos casos amb títols enfront de Bar 29 i negatius per *R. conorii*

	Cas 1	Cas 4
Sexe	Dona	Dona
Edat	74	40
Inici símptomes	Novembre	Abril
Contacte amb animals	Gos	Gos
Picada paparra	Sí	-
Clínica	Cap	Febre, <i>rash</i> , cefalea
Taca negra	No	No
Bar 29 seroconversió	1/40 a 1/320	1/80 a 1/640

Objectiu 4

Aïllament de rickètsies mitjançant cultiu en *shell vial* a partir de mostres de sang de pacients i identificació per PCR de les soques rickettsials

Dels 59 pacients amb sospita de FBM, solament es van obtenir 5 cultius positius per *shell vial* fàcilment reconeguts per la tinció per IFI. (Figura 37)

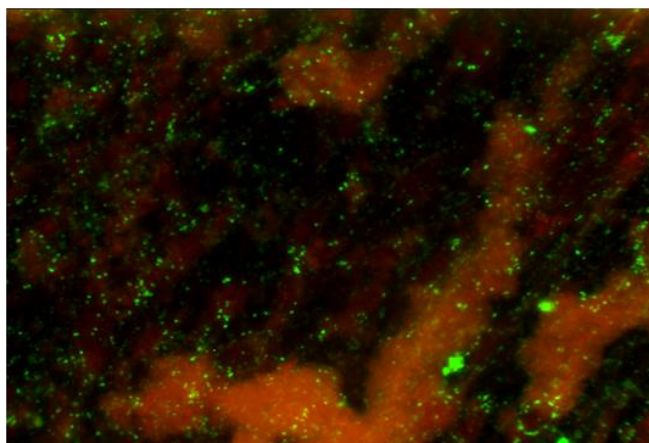


Figura 37. *Shell vial* positiu de la sang d'un pacient i revelat per IFI.

La detecció de la *Rickettsia* sp. es va aconseguir en els 5 casos en el primer *shell vial* revelat al quart dia de la sembra. Posteriorment es van cultivar en flascons de MRC5 el sobrenedant de quatre d'aquests *shell vials* positius; un d'ells no va ser possible cultivar-lo per contaminació del vial. Durant el procés del cultiu, se'n van contaminar tres i es va arribar a identificar una soca com a *R. conorii* (soca Malish 7) per la seqüència d'una part del gen *ompA* (231).

Per aquest motiu, es va procedir a realitzar les dues estratègies comentades en el material i mètodes.

Estratègia A. Malgrat que no vam poder aconseguir les soques en tres casos perquè el cultiu es va contaminar, de l'ADN extret del material al rascar les cèl·lules dels cobreobjectes positius i revelats per IFI, vam poder amplificar els fragments dels gens *gltA*, *ompA* i vam

obtenir PCR positiva per rickètsia, i el posterior estudi de RFLP ens va confirmar les soques com a *R. conorii*.

Estratègia B. Del pacient del 2004, quatre dels 17 *shell vials* van ser fortament positius, 6 van ser dèbilment positius i la resta negatius. Es va procedir al cultiu en 3 flascons (dos de 25 i un de 75 cm²) distribuint-se les alíquotes de la manera següent: un flascó amb el sobrenedant dels 4 *shell vials* positius, l'altre amb el pool dels 6 dèbilment positius i l'últim amb el dels negatius. Es van incubar i es van revelar als 7 dies, i van resultar tots els tres flascons positius. La posterior amplificació i identificació dels fragments per PCR-RFLP ens van donar un perfil idèntic a *R. conorii*, igual a l'obtingut amb els pacients de l'estratègia A.

Objectiu 5

Estudiar la presència de *R. conorii* i *R. massiliae* Bar 29 en animals del cycle silvestre i del cycle domèstic i vectors a Catalunya

S'havia previst recollir 138 mostres de cada grup de reservoris però finalment es van recollir mostres de sang de 135 guineus, 138 vaques braves, 137 ovelles i 98 cabres.

De les 135 guineus estudiades, 27 tenien 1 any o menys i 108 eren adultes \geq a dos anys. 69 eren mascles i 66 femelles. 126 d'elles presentaven bona salut, mentre que 9 es trobaven en estat caquètic, 8 d'elles amb sarna.

Les mostres de sèrum es van considerar positives per rickètsia quan es va observar fluorescència en algun dels dos antígens a partir de la dilució 1/40. Un total de 68 mostres (50,3 %) van ser positives a algunes de les dues rickètsies.

Vam trobar 62 mostres (45,9%) amb anticossos enfront de *R. massiliae* Bar 29 amb títols entre 1:40 a 1/640; 1/40 (n=26), 1/80 (n=17), 1/160 (n=13), 1/320 (n=5) i 1/640 (n=1).

La seroprevalença a *R. conorii* va ser del 25,1% (34 mostres) amb títols entre 1:40 a 1/320; 1/40 (n=10), 1/80 (n=16), 1/160 (n=5), 1/320 (n=3)

28 mostres (20,7%) van donar positives a les dues rickètsies (Taula 10).

TAULA 10. Distribució dels títols d'anticossos en les mostres de guineus positives enfront de *R. massiliae* Bar-29 i *R. conorii*

<i>R. massiliae</i> Bar 29 (n)	<i>R. conorii</i> (n)				
	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
1/40	3				
1/80	3	4	2		
1/160		7	3	1	
1/320	1	1		2	
1/640		1			

n: nombre de mostres

Un 25% (34 mostres) van ser positives enfront de *R. massiliae* Bar 29 i negatives a *R. conorii*; i només un 4,4% (6 mostres) van ser positives a *R. conorii* i negatives a *R. massiliae* Bar 29. (Taula 11).

TAULA 11. Resultats serologia *R. massiliae* Bar 29 i *R. conorii*

	<i>R. massiliae</i> Bar 29+	<i>R. massiliae</i> Bar 29 -
<i>R. conorii</i> +	28	6
<i>R. conorii</i> -	34	67

No es van trobar diferències estadísticament significatives quant a sexe, edat o presència de paparres i seropositivitat.

Pel que fa als reservoris domèstics, en l'estudi en vaques es va obtenir una seroprevalença a rickètsia del 40,5% (56/138).

Es van trobar 55 mostres (39,8%) amb anticossos enfront de *R. massiliae* Bar 29 amb títols entre 1:40 a 1/320; 1/40 (n=24), 1/80 (n=17), 1/160 (n=9), 1/320 (n=5).

La seroprevalença a *R. conorii* va ser de 26% (36 mostres) amb títols entre 1:40 a 1/320; 1/40 (n=14), 1/80 (n=9), 1/160 (n=8), 1/320 (n=5).

35 sèrums (25,3%) van donar positius a les dues rickettsies (Taula 12).

TAULA 12. Distribució dels títols d'anticossos en les mostres de vaques positives enfront de *Rickettsia massiliae* Bar 29 i *R. conorii*

<i>R. massiliae</i> Bar 29 (n)	<i>R. conorii</i> (n)			
	1/40	1/80	1/160	1/320
1/40	8	1		
1/80	5	7		1
1/160		1	7	1
1/320			1	3

n: nombre de mostres

Un 14,4% (20 mostres) només presentaven títols a Bar 29, i un 0,7% (1 sèrum) a *R. conorii* (Taula 13).

TAULA 13. Resultats serologia *R. massiliae* Bar 29 i *R. conorii*

	<i>R. massiliae</i> Bar 29+	<i>R. massiliae</i> Bar 29 -
<i>R. conorii</i> +	35	1
<i>R. conorii</i> -	20	82

En l'estudi en ovelles es va obtenir una seroprevalença a rickettsia del 27,7% (38/137). D'aquests un 20,4% (28/137) van ser positius a *Rickettsia* Bar 29 amb títols entre 1/40 i 1/320; 1/40 (n=17), 1/80 (n=9), 1/160 (n=1) i 1/320 (n=1).

La seroprevalença a *R. conorii* va ser d'un 24,8% (34/137), amb títols entre 1/40 i 1/160; 1/40 (n=23), 1/80 (n=9) i 1/160 (n=2).

24 sèrums (17,5%) van donar positius a les dues rickètsies (Taula 14).

TAULA 14. Distribució dels títols d'anticossos en les mostres d'ovelles positives enfront de *Rickettsia massiliae* Bar 29 i *R. conorii*

		<i>R. conorii</i> (n)			
		1/40	1/80	1/160	1/320
<i>R. massiliae</i> Bar 29 (n)	1/40	9	4	1	
	1/80	5	2	1	
	1/160		1		
	1/320		1		

n: nombre de mostres

Un 2,9% (4 sèrums) només presentaven títols a Bar 29, i un 7,3% (10 sèrums) a *R. conorii* (Taula 15).

TAULA 15. Resultats serologia *R. massiliae* Bar 29 i *R. conorii*

	<i>R. massiliae</i> Bar 29+	<i>R. massiliae</i> Bar 29 -
<i>R. conorii</i> +	24	10
<i>R. conorii</i> -	4	99

I, finalment, en l'estudi de les cabres es va obtenir una seroprevalença a rickètsia del 40,8% (40/98). D'aquests, un 26,5% (26/98) van presentar anticossos a *Rickettsia* Bar 29 amb títols entre 1/40 i 1/1280; 1/40 (n=15), 1/80 (n=5), 1/160 (n=3), 1/640 (n=1) i 1/1280 (n=2).

La seroprevalença a *R. conorii* va ser d'un 39,7% (39/98) amb títols entre 1/40 i 1/1280; 1/40 (n=25), 1/80 (n=6), 1/160 (n=5), 1/320 (n=2) i 1/1280 (n=1).

25 sèrums (25,4%) van donar positius a les dues rickètsies. La distribució de títols la podem observar a la Taula 16.

TAULA 16. Distribució dels títols d'anticossos en les mostres de cabres positives enfront de *Rickettsia massiliae* Bar 29 i *R. conorii*

	<i>R. conorii</i> (n)					
	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
<i>R. massiliae</i> Bar 29 (n)	10	3	1			
	1	3	1			
			3			
				1		
				1		1

n: nombre de mostres

Un 1,1% (1 sèrum) només presentava títols a Bar 29, i un 14,3% (14 sèrums) a *R. conorii* (Taula 17).

TAULA 17. Resultats serologia *R. massiliae* Bar 29 i *R. conorii*

	<i>R. massiliae</i> Bar 29+	<i>R. massiliae</i> Bar 29 -
<i>R. conorii</i> +	25	14
<i>R. conorii</i> -	1	58

Estudi en vectors

Estudi del cicle epidemiològic de *Rickettsia* Bar 29. Estudi molecular en vectors (paparres) de la nostra àrea geogràfica

Paparres adultes del complex *Rh. sanguineus* es van identificar de 84 guineus, *Ixodes ricinus* en dues guineus, i *Dermacentor marginatus* en una guineu.

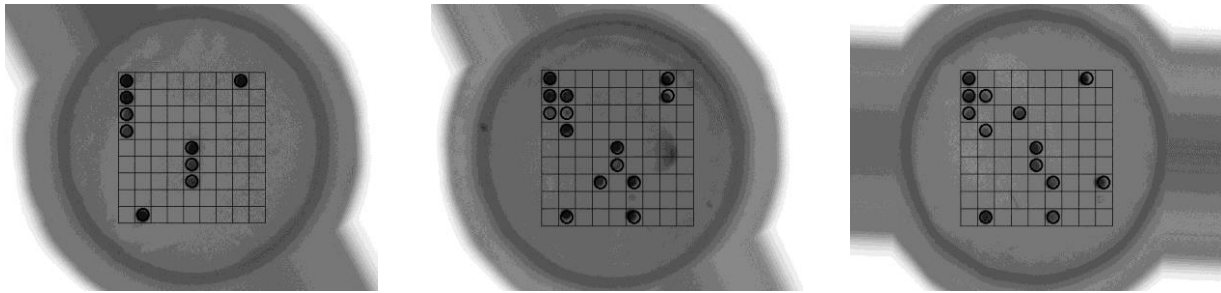
A més a més, dues nimfes d'*Ixodes* sp. es van trobar en una de les guineus.

Es van analitzar les 137 paparres del complex *Rh. sanguineus* per la tècnica de PCR *ompA* i es va detectar ADN de rickètsia en 80 paparres (58,3%). Es va procedir a la seva seqüenciació. 77 d'elles van donar *R. massiliae* Bar 29 amb una similitud >98%. En les altres tres es va detectar *R. aeschlimannii* amb un 99% de similitud. *R. conorii* no va ser identificada en cap cas.

Posteriorment es van analitzar les 137 paparres per la tècnica *Tick-borne Bacteria Flow Chip* (Master Diagnòstica). El 83,2% (114/137) van resultar positives a rickètsia per aquesta tècnica. Un cop seqüenciades se'n van identificar 107 com a *R. massiliae* Bar 29 amb una similitud >98%, 3 com a *R. aeschlimannii*, una com a *R. slovaca* i en les altres tres només es va arribar a la identificació de gènere *Rickettsia* sp.. Totes les mostres positives per *ompA* també ho van ser per aquesta tècnica.

De les paparres infectades amb *R. massiliae* Bar 29 es va detectar *B. henselae* en 19 i *Borrelia* sp. en 12, i en tres es van detectar *R. massiliae* Bar 29, *Bartonella* sp. i *Borrelia* sp. a la vegada. (Figura 38).

No vam observar diferències significatives en seropositivitat entre guineus amb paparres infectades per rickètsia i les que no. Paparres infectades per *R. massiliae* Bar29 es van extreure de 19 guineus seropositives i de 10 seronegatives; no es va detectar rickètsia en paparres extretes de dues guineus seronegatives i d'una seropositiva.



Mostra negativa

Mostra (+) *Rickettsia* sp. i *Borrelia* sp.

Mostra (+) *Rickettsia* sp.

Figura 38. Tècnica *Tick-Borne Bacteria Flow Chip* (Master Diagnòstica).

Es van recollir 117 paparres en fase lliure pel procediment de manteig que es van identificar com del complex *Rh. sanguineus*.

Com que la tècnica *Tick-borne Bacteria Flow Chip* va resultar més sensible que la *ompA* i totes les positives per *ompA* també ho van ser per aquesta tècnica, les 117 paparres procedents de manteig es van analitzar només per aquest procediment. El 94% (110/117) d'elles van resultar positives a rickètsia del grup de les febres tacades. Se'n van poder seqüenciar 85, i se'n van identificar 71 com a *R. massiliae* Bar 29 similitud >98% i 14 com a *Rickettsia* sp., amb co-infecció amb *Borrelia* sp. detectada en 23 paparres.

DISCUSSIÓ

6 DISCUSSIÓ

Les rickettsiosis transmeses per paparres representen un veritable paradigma dins les malalties infeccioses emergents.

R.R. Parker el 1940, ja va comentar, respecte a les rickettsiosis transmeses per paparres, i en particular, a les associades a *Amblyomma*, que “la decisió final de si una infecció és o no és una nova entitat necessita molts estudis posteriors”. De fet, en el seu cas, per la *Rickettsia parkeri*, es va haver d’esperar 65 anys (232). Això és tan sols un exemple de la complexitat que suposa la definició d’una nova espècie de rickettsia patògena (233-235).

Moltes de les espècies que actualment estan identificades com patògenes humanes van ser primer trobades en paparres alguns anys o fins i tot dècades abans de demostrar la seva implicació definitiva en malaltia humana. Així, en aquests últims 25 anys s’han reconegut 12 espècies patògenes més, que anteriorment només s’havien trobat en les paparres vectoros (2).

En el cas de *R. massiliae* Bar 29 coneguda des de la dècada dels 90 també han hagut de transcórrer molt anys fins que es demostrés amb seguretat la seva responsabilitat en patologia humana, tot i que prèviament alguns estudis ja aportaven indicis d’aquest fet. El 1996 el nostre grup feia aportacions de la seva presència en paparres recollides a Catalunya i des de llavors hem seguit fent estudis que demostren que la seva presència a Catalunya no era anecdòtica sinó altament prevalent.

Tot i ser especulatiu, la dificultat en demostrar *R. massiliae* Bar 29 en mostres humanes pot ser deguda a la dificultat de creixement de les rickettsies i especialment de la *R. massiliae* Bar 29 així com, a la poca sensibilitat de les tècniques moleculars que s’han fet servir fins al moment.

Diverses circumstàncies han contribuït al coneixement i expansió de les rickettsiosis transmeses per paparres en les últimes dues dècades. Els esforços dels investigadors i metges han estat crucials per tal de caracteritzar les rickettsiosis que existeixen en les diferents regions en què només s'havia descrit una sola espècie patògena, incloent-hi l'Amèrica Central, l'Amèrica del Sud i Àsia. Les col·laboracions amb investigadors d'arreu i la curiositat dels clínics, combinat amb uns mètodes diagnòstics més potents com les tècniques de cultiu *shell vial* i de biologia molecular, han permès continuar incrementant el coneixement més profund sobre les rickettsies, incloent-hi també els organismes patògens. A la vegada, l'increment de l'ecoturisme i de les activitats relacionades, així com de viatges d'aventura a llocs més exòtics que són cada vegada més populars, ha fet que l'interès per les rickettsiosis hagi augmentat i probablement ho continuï fent en el futur. (236-239).

De totes maneres encara hi ha una sèrie de qüestions que no es troben resoltes del tot en l'estudi de les infeccions causades per rickettsies. Falta un millor coneixement de l'epidemiologia i dels mecanismes patogènics de les rickettsies que inclogui els mecanismes de reactivació en la paparra, el rol i l'efecte de la saliva de la paparra en la infecció i la identificació dels gens de virulència de la rickettsia. Des de la vessant del diagnòstic, caldrien més tests serològics que discriminessin de forma precoç entre les diferents espècies i es pogués arribar per aquesta via a un diagnòstic específic, i també farien falta més estudis epidemiològics que ens permetessin observar la magnitud i distribució d'algunes de les rickettsiosis arreu del món.

Actualment disposem d'un ampli ventall de mètodes diagnòstics que van des de l'examen directe de teixits amb diferents tincions, com Giménez, Giemsa o fluorescència directa, a la detecció de l'ADN per tècniques moleculars, passant per l'aïllament per cultiu cel·lular o *shell vial* com a mètode de referència, i tècniques indirectes com la serologia.

A l'evolució dels mètodes diagnòstics en el camp de les rickettsiosis l'ha seguit paral·lelament l'avanç en el descobriment de noves espècies de rickettsies del grup de les febres tacades, majoritàriament aïllades en paparres, tot i que no se n'ha pogut demostrar en moltes d'elles encara com hem esmentat, el poder patogen en humans.

La majoria de les tècniques serològiques s'han assajat per al diagnòstic de les rickettsiosis o malalties relacionades, des del primer test d'aglutinació, passant per la laboriosa fixació de complement, específica quant a grup o espècie però poc sensible: l'hemoaglutinació indirecta, influenciada per l'estabilitat de l'antigen; l'aglutinació per làtex, que presenta poca sensibilitat; la MIF; l'immunoblot i l'ELISA (26, 71).

Tanmateix, la tècnica MIF continua sent actualment el mètode més utilitzat per al diagnòstic de les rickettsiosis, i continua per tant sent el mètode recomanat per l'OMS per al diagnòstic de les rickettsiosis de les febres exantèmiques, ja que ens permet detectar les diferents classes d'immunoglobulines, és sensible i específic, però amb algunes limitacions, ja que presenta reaccions creuades amb els membres més afins del grup.

En aquest estudi intentem posar una mica més de llum respecte al món de les rickettsiosis en el nostre medi. Ja anteriorment el nostre grup havia realitzat amplis estudis en aspectes clínics de la malaltia, tractament i estudis de seroprevalença en algunes de les espècies de rickettsies, sobretot de *R. conorii* i *R. slovaca* (7, 9, 240).

Per altra banda, en un estudi previ realitzat en la nostra àrea, es van aconseguir aïllar de paparres soques de rickettsia del grup de les tacades, anomenades provisionalment Bar 29, diferents de *R. conorii*, considerada responsable de la FBM, i de les quals es desconeixia el seu poder patogen fins fa poc. Aquesta soca es va veure que era semblant a *R. massiliae*, aïllada uns anys abans en paparres *Rh. turanicus* al Sud de França, i se la va anomenar *R. massiliae* Bar 29.

És conegut que els estudis de seroprevalença ens donen una visió de l'estat de la infecció en una determinada àrea, per això hem realitzat l'estudi de seroprevalença enfront de *R. massiliae* Bar 29, per tal de conèixer l'abast de l'existència d'aquesta nova soca de rickettsia en el nostre entorn. En el nostre estudi hem trobat un 8,5% de sèrums amb anticossos enfront de *R. massiliae* Bar 29. Aquest resultat és superior a l'obtingut en un estudi realitzat al sud d'Espanya enfront de Bar 29, on van trobar una seroprevalença del 3,4% (200). A la vegada hem observat una associació estadísticament significativa entre seropositivitat i l'edat. La mitjana dels seropositius és de $49,89 \pm 18,84$ anys i dels seronegatius de $32,43 \pm 23,04$ anys $p=0,001$ i amb una seropositivitat significativament més elevada en persones d'entre 45-64 anys $p=0,028$, aquesta dada ja va ser observada també en l'estudi esmentat anteriorment al sud d'Espanya (200). Val a dir que aquestes dades concorden també amb un estudi previ nostre (9), i un altre realitzat al sud d'Espanya (10) sobre *R. conorii*, on es va trobar que l'edat de les persones amb anticossos enfront de *R. conorii* era més elevada que les que no en presenten. Aquest resultat es podria explicar pel fet que les persones adultes han estat més temps exposades a la infecció.

També hem trobat una associació estadísticament significativa entre positivitat a Bar 29 i contacte en gossos, en particular en gossos de carrer $p=0,034$.

Al comparar els resultats obtinguts de l'estudi de *R. massiliae* Bar 29 amb els obtinguts en el nostre estudi previ enfront de *R. conorii* realitzat amb els mateixos sèrums (9), hem observat que 10 sèrums (4,7%) han presentat exclusivament anticossos enfront de *R. massiliae* Bar 29, fet que apunta que *R. massiliae* Bar 29 està present en la nostra àrea i la seva seroprevalença varia entre un 4,7 i un 8,5% depenent si considerem o no els sèrums que presenten títols enfront de *R. conorii*. Aquest resultat ens indica que *R. massiliae* Bar 29 podria està implicada en un indeterminat percentatge de casos d'infeccions humanes a

Catalunya, més prevalentment en persones d'entre 45-64 anys, i que el contacte amb gossos sembla ser un factor de risc per adquirir aquesta infecció.

Els tests serològics poden ser d'ajuda per determinar el possible rol patògen de les noves rickettsies aïllades de paparres, encara que la patogenicitat d'una nova soca només pot ser considerada definitiva quan és aïllada de mostres humanes. Així, la identificació d'espècies de rickettsies que causen infecció pot ser possible estudiant els sèrums dels pacients per MIF (70, 241, 242). Quan s'utilitza aquesta tècnica per a la identificació s'ha de tenir en compte que els anticossos enfront de l'espècie homòloga (causant de la infecció) són més alts que l'heteròloga (causant de la reacció creuada), encara que, entre espècies molt semblants, els títols heteròlegs poden arribar a ser tan alts com els homòlegs i cal confirmar-ho (75). En aquests casos la confirmació de la reacció específica es pot fer per Western immunoblot o cross-adsorció (92, 97).

El Western immunoblot dona reaccions espècie-específiques associades a resposta als antigens proteics i LPS, i reaccions no específiques quan només hi ha resposta a l'antigen LPS. És una tècnica reservada per a casos excepcionals, com ja s'ha esmentat en la introducció, ja que és un mètode més específic per aquests casos (243).

Un altre mètode confirmatori és la cross-adsorció dels sèrums amb antigens de les espècies amb les quals es produeixen les reaccions creuades. Si l'adsorció es realitza amb l'espècie causant del quadre clínic, desapareixen els títols d'anticossos de totes les espècies (97).

L'inconvenient que presenten l'immunoblot i la cross-adsorció és la gran quantitat i l'alt grau de purificació d'antigen que precisen, la qual cosa fa que només es puguin portar a terme a nivell de certs laboratoris de referència, i fet que dificulta la seva utilitat per al diagnòstic rutinari d'aquestes malalties.

En els estudis que hem realitzat per tal de conèixer el possible rol patogènic de la soca *R. massiliae* Bar 29 a Catalunya, amb sèrums de pacients amb sospita de FBM enfront de

R. conorii i *R. massiliae* Bar 29 mitjançant la tècnica de MIF, els sèrums de la majoria dels pacients han reaccionat enfront dels dos antígens estudiats *R. conorii* i *R. massiliae* Bar 29 amb seroreactivitats elevades. En aquests casos hem considerat com a espècie probable causant del quadre clínic la que ha presentat uns títols superiors a l'antigen rickettsial específic. Per altra banda 4 sèrums els hem pogut testar per Western immunoblotting i s'ha pogut confirmar una resposta específica enfront de *R. massiliae* Bar 29 en dos d'aquests sèrums. També convé assenyalar que, en un dels estudis, dos pacients només han presentat anticossos a títols alts enfront de Bar 29.

En general les formes de presentació greus de la malaltia en els nostres pacients són més baixes que les observades en altres sèries (7, 244, 245), per això creiem que aquesta nova *Rickettsia* Bar 29 podria estar relacionada amb aquesta entitat clínic que causa una patologia més lleu, fet que explicaria, per altra banda, que molts pacients no són hospitalitzats, la qual cosa té l'efecte que no es disposa de moltes mostres per intentar l'aïllament d'aquesta rickettsia.

A l'analitzar la presentació clínic dels pacients amb una forta reacció enfront de *R. massiliae* Bar 29, (els pacients 5 i 10 del primer estudi, i els 1 i 4 del segon), no trobem unes diferències clíniques rellevants comparats amb altres casos de FBM, però tanmateix és conegut que les diferències entre les diferents rickettsies quant a la clínica són lleus i poden passar desapercebudes pel clínic que registren les dades (20). El cas del pacient 10 presenta tres escarres i el pacient 5 ha estat picat dues vegades per paparres en pocs dies de diferència. En el cas de la febre per picadura de paparra africana, aquesta troballa és crítica a l'hora de diferenciar aquesta entitat de la FBM (11).

Mentre que la paparra *Amblyomma* (vector de la febre per picadura de paparra africana) té afinitat per l'organisme humà i no és infreqüent que piqui més d'una vegada a les persones (155), en el cas del *Rh. sanguineus*, que rarament pica als humans, la probabilitat que piqui

dues vegades és pràcticament nul·la, per això es podria pensar que altres espècies de paparres amb més predilecció per picar persones podrien estar presents en la nostra àrea com a transmissors de la *R. massiliae* Bar 29. De fet, en dos estudis previs fets a Catalunya vam trobar que un 3,6% i un 6,5% respectivament dels pacients presentaven múltiples escares (6, 7).

Amb aquests estudis d'anticossos enfront de Bar 29 de malalts amb febre botonosa hem pogut entreveure el possible rol patògen de la *Rickettsia massiliae* Bar 29. Els nostres resultats ens apunten i recolzen la possibilitat en aquest sentit.

Així doncs podem pensar que la utilitat dels tests serològics no es limita tan sols al diagnòstic de la malaltia i a estudis de seroprevalença, sinó que s'amplia dins el camp de la identificació de les noves espècies i poden ser d'ajuda per determinar el paper patogènic de les noves rickètsies aïllades en els vectors d'una determinada regió. Això té interès per altra banda pel fet que les noves espècies de rickètsies que s'han identificat associades a malaltia humana s'han relacionat amb quadres atípics de la malaltia com *R. africae*, *R. japonica*, *Israeli spotted fever rickettsia* o *R. mongolotimonae* (12, 246-250).

Les tècniques de cultiu cel·lular per rickètsies a partir de sang de pacients, han millorat molt amb la introducció de la tècnica de *shell vial*. És ràpida i fàcil de realitzar, però tot i així la seva sensibilitat és baixa: un 20% en un estudi previ realitzat amb mostres dels nostres pacients (comunicació, VI Reunión Nacional de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Sitges 1995). Per tal de millorar aquesta manca de sensibilitat nosaltres hem provat dues estratègies, per una banda la PCR dels còpuls dels *shell vials* contaminats i per l'altra hem sembrat tota la sang recollida d'un pacient distribuint-la en diferents *shell vials*. Amb aquests dos mètodes hem aconseguit diagnosticar i identificar cinc soques de *R. conorii* en els nostres pacients per cultiu i detecció molecular, demostrant la utilitat de les dues tècniques per a la detecció i identificació d'espècies de rickètsies.

Malgrat els esforços realitzats en aquest estudi, no hem aconseguit cap aïllament de *R. massiliae* Bar 29 en pacients. També Babalis i col. (188) a Grècia observen un fet semblant: descriuen l'aïllament i identificació de la soca GS en paparres *Rh. sanguineus*. Aquesta soca està fortament relacionada amb *R. massiliae* Bar 29. Cap aïllament de *R. conorii* s'obté en aquest estudi malgrat l'alta prevalença obtinguda en humans (46%), sense que tampoc s'aconsegueixi cap aïllament en humans de la nova soca GS. Aquesta situació és bastant similar a la que tenim a Catalunya, encara que la prevalença de FBM és més baixa (9%).

Fins aquest moment la utilització de la tècnica de cultiu *shell vial* per al diagnòstic de febre botonosa, i sempre des de la nostra pròpia experiència, no ens ha donat el rendiment desitjat. La utilització de les tècniques de PCR aplicades directament als portes de *shell vial* ens permet augmentar la seva sensibilitat i a la vegada identificar posteriorment soques dels cultius que se'ns hagin contaminat. També el bon resultat del cultiu de tota la sang del pacient (2 mL) en un nombre important de *shell vials* i posterior cultiu en flascons convencionals ens assenyalen una línia a seguir per a l'estudi de les rickettsiosis en el nostre medi de cara a l'obtenció de soques procedents de mostres humanes.

Val a dir que qualsevol estratègia per tal d'obtenir un major rendiment en el cultiu de rickettsia és útil, ja que ens permet incrementar el nostre coneixement sobre la situació epidemiològica d'aquestes infeccions.

Fins el 2016 tan sols 4 casos d'infecció humana per *R. massiliae* s'havien descrit en tot el món, tres d'ells a Europa i un altre en una pacient de l'Argentina que han confirmat la capacitat patògena d'aquesta espècie. En un sol cas es va obtenir la soca en cultiu, que de fet va ser el primer cas descrit en un pacient que s'havia diagnosticat 20 anys abans de FBM a Sicília per serologia positiva a títols baixos de 1/80 a *R. conorii*. La soca es va mantenir congelada i es va poder identificar 20 anys més tard mitjançant estudis d'amplificació i posterior seqüenciació del gen *ompA* (14). El segon cas es va diagnosticar en un pacient amb

síntomes de FBM amb complicacions de pèrdua de visió i corioretinitis bilateral, mitjançant estudis serològics de MIF, WB i cross-adsorció amb antigen específic de *R. massiliae* i estudis moleculars d'una mostra d'humor aquós i de l'escara, amb una tècnica de PCR suïcida utilitzant *primers* d'una regió específica del gen *pgsA* present en *R. conorii* i *R. massiliae*. Un 10% de les paparres recollides del lloc on el pacient havia estat picat van donar positives a *R. massiliae* (153). En el tercer cas descrit a Europa no es va realitzar serologia específica per *R. massiliae* i es va realitzar només serologia a *R. conorii*, que va donar títols baixos de 1/64. El diagnòstic es va fer per PCR de l'ADN obtingut de l'escara i posterior seqüenciació dels gens *gtlA*, *ompA* i *ompB* (207). L'únic cas descrit fora d'Europa va ser d'una pacient que havia arribat dos dies abans a Espanya des de l'Argentina, en aquest cas tampoc es va realitzar estudi serològic específic de *R. massiliae*, només de *R. conorii*, que va donar negatiu. Al diagnòstic s'hi va arribar per PCR i seqüenciació dels gens *gtlA* i *ompB* de l'ADN obtingut de la mostra de l'escara (215).

Posteriorment el 2016 s'han publicat altres possibles casos de *R. massiliae*, un a Grècia i un altre a Romania, diagnosticats només per serologia. El de Grècia es tracta d'un cas importat d'un pacient que havia estat picat per una paparra en un parc d'Anglaterra un mes abans. El pacient no presentava escara i les mostres que es van recollir van ser sang total i sèrum. La PCR pel gen *gtlA* de les mostres va donar negatiu i es va realitzar serologia enfront de 6 antígens rickettsials donant els títols més elevats a *R. massiliae*. De totes maneres al no haver-se pogut fer estudis de WB comenten que no es pot confirmar que realment es tracti d'una infecció per *R. massiliae* (251). I en l'estudi de Romania de 8 pacients amb sospita de "Scalp Eschar and Neck Lymphadenopathy after tick bite" (SENLAT), dos pacients adults van presentar serologia positiva a *R. massiliae* confirmada per Western blot i cross-adsorció (208).

A Tunísia, en un estudi multicèntric publicat el 2016 en mostres de pacients amb febre i *rash* cutani i/o escara, troben que una de les mostres de biòpsia de pell és positiva a *R. massiliae* aplicant una PCR quantitativa i posterior hibridació per sondes específiques (220).

El 2017 s'ha publicat un estudi a Catalunya en pacients pediàtrics de l'Hospital de Reus amb sospita de rickettsiosis i, en l'escara d'un d'ells aplicant, una tècnica de PCR, detecten *R. massiliae* (209).

En els nostres pacients, malgrat que no tenim confirmació per mètodes moleculars dels casos positius per MIF, sí que tenim casos confirmats per una tècnica més específica de WB. Més recentment, en un estudi realitzat pel nostre grup en 36 pacients amb sospita de rickettsiosis, vam trobar 8 casos positius a *R. massiliae* aplicant la nova tècnica molecular (*Tick-Borne Bacteria Flow Chip, Master Diagnòstica*) ja descrita en l'apartat de material i mètodes i aplicada en l'estudi dels vectors. Dels 8 casos, 5 presentaven clínica de FBM i 3 de SENLAT. (Comunicació al Congres SEIMC 2017, Màlaga).

De totes maneres cal continuar realitzant més estudis en mostres humanes per tal d'aïllar i caracteritzar soques de rickettsies, cosa que ens permetria aprofundir millor en el coneixement d'aquests bacteris.

És evident que l'estudi dels hostes animals i vectors que transmeten un determinat agent infecciós són necessaris per tal de conèixer millor i completar el cicle infecciós cap a les persones d'una determinada malaltia, i ajuden a comprendre millor la seva epidemiologia. Les nostres troballes de l'estudi serològic amb les guineus evidencien l'existència de *R. conorii* i *R. massiliae* Bar 29 en les guineus de Catalunya. També suggereixen que les guineus poden actuar de portadores de les paparres infectades. Des del nostre coneixement, el nostre estudi és el primer descrit respecte a la seroprevalença de *R. conorii* i *R. massiliae* Bar 29 en guineus. Però pel fet de la ja coneguda reactivitat creuada entre les espècies de rickettsies del grup de les tacades, nosaltres només podem dir que les guineus estan

exposades a *Rickettsia* sp.. És totalment lògic pensar que les guineus en la natura poden estar infectades per rickètties del grup de les febres tacades, ja que comparteixen molts dels patògens dels gossos i aquests juguen un paper important en l'epidemiologia de *R. conorii*, actuant com a reservoris (56) i sentinelles (57). A més, les guineus es troben exposades a les paparres vectorres, especialment pel seu hàbit alimentari, com són la majoria de rosegadors i petits mamífers que són considerats reservoris potencials per rickètties (252).

Quant a els resultats de l'estudi en els reservoris domèstics, ens indiquen que les dues rickètties juguen també un paper important en ells, amb unes seroprevalències globals a *Rickettsia* sp. entre el 40,8% i 40,5% en les cabres i vaques respectivament i el 27,7% en les ovelles. El cas de *R. massiliae* Bar 29 és més rellevant en les vaques, amb un 39,8 % de seroprevalença. Aquests animals domèstics es troben en contacte permanent amb els humans i per tant la seva importància en la transmissió de les rickettsiosis és remarcable.

La resposta humoral indica un contacte previ a una infecció per rickèttia i les reaccions creuades serològiques estan ben documentades entre les diferents espècies de *Rickettsia* sp. La MIF és una bona eina en gossos per tal de diferenciar entre els anticossos contra les rickètties del grup de les febres tacades, considerant l'espècie implicada en la infecció la que causa major resposta en anticossos (253). En infeccions experimentals amb ratolins i gossos, el títol més alt es troba enfront de la *Rickettsia* sp. específica utilitzada per provocar la infecció en l'animal d'experimentació (253). Els nostres resultats podrien suggerir que *R. massiliae* Bar 29 és el principal agent infeccions rickettsial en guineus i vaques, encara que els animals en general i les guineus en particular estan exposades en la natura a diverses espècies de paparres i per tant poden haver-se infectat amb més d'una *Rickettsia* sp. Per altra banda, la seropositivitat dels reservoris a les dues rickètties del grup de les tacades mostra una diferència de títols que difereix en no més de dues dilucions, amb l'excepció de tres

individus en les guineus, dos amb les ovelles i un amb les cabres, la qual cosa suggereix que es pot tractar o bé de reaccions creuades o bé d'una infecció mixta per diferents rickettsies.

Val a dir, però, que el valor del *cut-off* en la tècnica de la MIF no es troba totalment estandarditzat en animals salvatges i domèstics. En gossos, una dilució d'*screening* de 1:128 és utilitzada per alguns autors (47, 254), mentre que d'altres utilitzen una dilució de 1:16 com a *cut-off* (255) i Schex i col. utilitzen un *cut-off* de 1:20 per a l'*screening* en petits mamífers (252).

Malauradament no hem pogut analitzar les mostres de sang dels reservoris per biologia molecular al no disposar de mostra suficient. Aquest fet suposa una limitació d'aquest estudi i per aquest motiu no hem pogut confirmar els resultats amb una eventual amplificació del patogen. Així que la demostració final del possible rol dels diferents animals estudiats en l'epidemiologia de *R. massiliae* Bar 29/*R. conorii* com a reservori no es podrà confirmar fins que no es detecti *Rickettsia* sp. per tècniques moleculars en algunes mostres (256, 257).

La majoria de les paparres del grup *Rh. sanguineus* complex positives obtingudes en les guineus en què es va arribar a l'espècie per seqüenciació van ser-ho pel grup de *R. massiliae* (107 *R. massiliae* Bar 29, 3 *R. aeschlimannii*, 3 *Rickettsia* sp., i una *R. slovacica*) i també en les obtingudes de manteig que serien representatives dels altres animals estudiats (71 *R. massiliae* Bar 29 i 14 *Rickettsia* sp), mentre que no es va detectar cap *R. conorii* en elles. Aquesta observació és similar a altres estudis realitzats prèviament (194, 258). Milhanoi col. (259) van observar que *R. massiliae* mostrava una transmissió contínua transestadial i transovàrica en *Rh. sanguineus* sense causar cap efecte citopàtic en les cèl·lules del vector. En contrast, *R. conorii* ssp. *israelensis* sí que tenia un efecte nociu per al vector *Rh. sanguineus* (260), aquest fet podria explicar la seva baixa prevalença en la natura (261).

En aquest estudi, *R. aeschlimannii* ha estat identificada en tres paparres del complex *Rh. sanguineus*. Aquesta rickettsia va ser primer aïllada de *Hyalomma marginatum*, trobada

en una vaca procedent del Marroc (262). De fet les paparres *Hyalomma* són considerades el seu principal vector i reservori. Recentment, *R. aeschlimannii* s'ha detectat en *Rh. turanicus* d'ovelles a la Xina (263). Filogenèticament aquesta rickètsia pertany al grup de les tacades juntament amb *R. massiliae*, *R. massiliae* Bar29, *Rickettsia rhipicephali* i *Rickettsia montanensis* (21).

Per tal de detectar altres bacteris diferents a rickètsia, hem utilitzat la PCR del Sistema *tick-borne bacteria flow-chip*. Quarsten et al. (264) comparen la PCR múltiplex basada en el Sistema *tick-borne bacteria flow-chip* i una basada en una PCR a temps real, i conclouen que la PCR a temps real és lleugerament més sensible per detectar *Borrelia* sp. i *Anaplasma phagocytophilum*. En el nostre estudi, hem utilitzat ambdós mètodes moleculars per les paparres. La PCR múltiplex ha resultat més sensible que la PCR a temps real per *Rickettsia* sp., i totes les positives per la PCR múltiplex s'han confirmat per seqüenciació. Per altra banda la PCR múltiplex ens ha permès detectar ADN d'altres patògens tals com *Borrelia* sp. i *Bartonella* sp. en les paparres del complex *Rh. sanguineus*. Més estudis són necessaris per clarificar el paper del vector del complex *Rh. sanguineus* en la transmissió de la rickètsia, així com poder identificar quines espècies de *Bartonella* i *Borrelia* es detecten en les paparres del complex *Rh. sanguineus*.

Les guineus són un dels carnívors salvatges més comuns a Europa i es troben bastant ben adaptades a les àrees suburbanes i rurals. Per altra banda la població de guineus ha augmentat a Europa incrementant-se la seva proximitat a àrees més urbanes. Això fa que el potencial rol de les guineus en la eco-epidemiologia de les rickètsies de les febres tacades pugui ser rellevant, especialment pel fet que les guineus poden representar una font d'infecció per als gossos, animals domèstics i persones per la seva proximitat a elles, actuant de portadors de paparres infectades, com passa amb els gossos en el cicle domèstic de *R. conorii* (57) o remugants i porc senglar en l'epidemiologia de la *R. slovaca* (58, 59).

Amb les nostres observacions es pot concloure que les guineus i els animals domèstics poden jugar un paper en el manteniment i transmissió de les rickètsies del grup de les febres tacades. Hem trobat que la seroprevalença a *R. massiliae* Bar 29 és més alta que la de *R. conorii* en guineus i vaques. Aquest fet es pot explicar perquè *R. massiliae* Bar 29 va ser detectada en paparres extretes de les guineus i de manteig en zones de pastura dels animals domèstics, mentre que no es va trobar *R. conorii*. Sembla, doncs, que *R. conorii* gradualment va declinant en la població de paparres, com ja s'ha suggerit en altres estudis (258).

Del nostre estudi podem concloure que les rickètsies són de difícil creixement i les tècniques serològiques presenten reaccions creuades que sovint no permeten diferenciar espècies de rickètsia. Només tècniques com el Western blotting i cross-adsorció poden ajudar en aquestes situacions; l'inconvenient és que no es poden realitzar en la pràctica diària i calen laboratoris de referència per la seva realització.

La introducció dels mètodes moleculars ha significat una autèntica revolució en el diagnòstic. La PCR a temps real és utilitzada àmpliament, no és cara i redueix el retard en el diagnòstic de les infeccions rickettsials i pot ser realitzada en laboratoris que treballen en tècniques moleculars (265).

Una altra novetat en aquests últims anys ha estat l'ús de la recollida de mostres amb escovilló de les escares en lloc de la biòpsia de pell. Aquest mètode ha demostrat ser efectiu en el diagnòstic de la infecció per diferents rickètsies: *R. australis*, *R. parkeri*, *R. africae*, *R. conorii*, i *R. sibirica* ssp. *mongolitimonae*. Aquest mètode no traumàtic permet recollir mostres fins i tot de zones sensibles com ulls o genitals i pot contribuir a incrementar el coneixement de l'espectre d'infeccions associades a rickètsies. És pertinent afegir que aquesta tècnica ha tingut una alta acceptació per part dels clínics i dels pacients perquè és fàcil de realitzar i altament menys invasiva que la convencional biòpsia de pell. A més, és fàcil de realitzar per estudis epidemiològics i clínics en països de renda baixa (110).

Referent a les paparres i les rickettsiosis, queden encara molts punts per aclarir. Sembla que en humans moltes rickettsiosis es troben associades amb característiques clíniques i epidemiològiques que els clínics experts haurien de ser capaços d'identificar. Entre aquestes característiques hi ha les manifestacions cutànies que inclouen el tipus i localització del *rash*, l'escara d'inoculació i la limfangitis. L'estacionalitat de la infecció i el nombre de picades canvia depenent de la localització geogràfica i el grau d'agressivitat de les paparres. També el tipus d'hoste i els factors ambientals tals com la temperatura i la humitat influencien en les espècies de paparres, en l'augment del seu nombre i en el de rickettsies implicades (35, 36, 123).

L'espècie de paparra *Rh. sanguineus* sembla ser més propensa a picar als humans quan la temperatura ambient és càlida i rarament pica als humans quan la temperatura és més freda (151). La raó per la qual algunes paparres, com espècies de *Dermacentor*, piquen més durant l'estació més freda a Europa es desconeix. Alguns articles recents sobre la detecció de rickettsies en paparres han generat noves qüestions sobre les associacions i interaccions entre paparra-rickettsia i deixa encara un gran treball a realitzar en aquests afers, particularment en el camp de l'aïllament microbiològic i estudis sobre la transmissió entre animals. Cal definir millor el paper de les paparres com a potencials reservoris i vectors. El paper com a reservoris podria implicar el manteniment de les rickettsies en la transmissió tant transestadial com transovàrica i quines rickettsies no tenen efecte negatiu sobre la viabilitat o la capacitat reproductiva de les paparres (153).

Es fa difícil especular en el fet de si hi ha encara moltes espècies o subespècies de rickettsies per descobrir, incloent-hi patògens humans, o si estem apropant-nos al límit d'aquesta llista. Segurament hi ha encara molts artròpodes en els quals poden residir.

En el passat moltes rickettsies van ser identificades en paparres molt temps abans que fossin trobades en humans pel fet que les còpies d'ADN dels bacteris són més elevades en

artròpodes que en la sang humana. La recerca d'aquests potencials patògens en artròpodes es considera un element essencial pel descobriment de noves rickettsies patògenes en les persones.

Queda realment encara molt camp per a investigar en el món de les rickettsiosis. Els mètodes descrits i els resultats aportats en aquest estudi ajuden a incrementar el nostre coneixement sobre aquests microorganismes, que pel fet de necessitar per al seu desenvolupament la cèl·lula hoste es fa difícil avançar en el seu coneixement.

Els nostres esforços van encaminats a continuar en la línia que les proves serològiques ens han apuntat i poder completar-los amb l'aïllament del bacteri en mostres humanes i de vectors i la seva posterior identificació per tècniques moleculars, per tal de conèixer realment el poder patògen de les noves espècies en una determinada àrea.

Els avenços en el diagnòstic microbiològic han fet augmentar el coneixement de les malalties produïdes per rickettsies però encara queda molta feina per tal de millorar la sensibilitat i especificitat d'aquestes proves diagnòstiques.

En col·laboració amb els clínics, epidemiòlegs i veterinaris podrem arribar a un coneixement de les rickettsiosis inimaginables fa pocs anys.

CONCLUSIONS

7 CONCLUSIONS

De l'estudi de seroprevalença enfront de *R. massiliae* Bar 29 i de les reaccions creuades amb *Rickettsia conorii*, es pot concloure que:

1. La població humana sana de la nostra àrea presenta una seroprevalença enfront de *R. massiliae* Bar 29 del 8,5%. Vuit sèrums (3,8%) van presentar reaccions creuades enfront de *R. conorii*.
2. S'ha observat una associació significativa entre seropositivitat i edat. La mitjana d'edat dels seropositius va ser del $49,89 \pm 18,84$ anys i la dels seronegatius de $32,43 \pm 23,04$ anys $p=0,001$.
3. La seropositivitat ha estat significativament més elevada en persones d'entre 45-64 anys $p=0,028$. El 44,4% de les persones seropositives a *R. massiliae* Bar 29 tenen entre 45-64 anys. La seroprevalença més baixa s'ha trobat entre les franges d'edat més joves de 0-14 anys i 15-29 anys.
4. No s'han trobat diferències significatives segons el sexe, lloc de residència o treball que realitzen. El contacte amb gossos de carrer és un factor de risc per contraure la infecció per *R. massiliae* Bar 29.

De l'estudi en pacients de *R. massiliae* Bar 29 i *R. conorii*, es pot concloure que:

1. En el primer estudi amb 15 pacients, 5 d'ells presentaven títols superiors de les IgG a *R. massiliae* Bar 29 respecte a *R. conorii*.
2. L'estudi per immunoblot ens va confirmar una resposta específica enfront de Bar 29 de dos dels sèrums al reaccionar amb les proteïnes d'alt pes molecular. Els dos pacients van presentar més d'una picada o múltiples escars.
3. En el segon estudi amb 136 sèrums, 14 d'ells van presentar títols superiors a Bar 29, dos dels quals tan sols tenien anticossos enfront de Bar 29.
4. Dels resultats dels dos estudis es pot deduir que un nombre de casos de FBM dels nostres pacients podrien estar causats per *R. massiliae* Bar 29 .

De l'estudi d'aïllament de rickètsies mitjançant cultiu en *shell vial* a partir de mostres de sang de pacients i identificació per PCR de les soques rickettsials aïllades, es pot concloure que:

1. El cultiu *shell vial* és un mètode fàcil i recomanable per obtenir soques de rickètsies a través de la sang de pacients.
2. La seva sensibilitat és baixa però es pot incrementar realitzant PCR dels cultius o bé cultivant tota la sang extreta dels pacients.
3. Mitjançant el cultiu *shell vial* podem arribar a través de PCR i seqüenciació a identificar les diferents espècies de rickètsies de les soques aïllades.

De l'estudi de la presència de *R. conorii* i *R. massiliae* Bar 29 en animals del cicle silvestre i del cicle domèstic i vectors a Catalunya es pot concloure que:

1. En les guineus s'ha trobat una seroprevalença del 45,9% enfront de *R. massiliae* Bar 29 i una seroprevalença a *R. conorii* del 25,1%. Un 20,7% dels sèrums han reaccionat enfront dels dos antígens.
2. La seroprevalença a *R. conorii* ha estat del 26% en les vaques, 24,8% en les ovelles i un 39,7% en les cabres. La seroprevalença a *R. massiliae* Bar 29 ha estat de 39,8% en les vaques, 20,4% en les ovelles i un 26,5% en les cabres.
3. Un 83,2% (114/137) de les paparres extretes de guineus van resultar positives per PCR a rickètsia. La seqüenciació va identificar-ne 107 (93,8%) com a *R. massiliae* Bar 29.
4. El 94% (110/117) de les paparres de manteig van ser positives a rickètsia del grup de les febres tacades. 71 de les 85 (83,5%) que es van seqüenciar es van identificar com a *R. massiliae* Bar 29.
5. La nova tècnica *Tick-Borne Bacteria Flow Chip* ens augmenta notablement la sensibilitat respecte a la PCR *ompA* per a la detecció de rickètsies en els vectors.

REFERÈNCIES

8 REFERÈNCIES

1. Burgdorfer W. Tick-borne diseases in the United States. Rocky Mountain spotted fever and Colorado tick fever. A review. *Acta Trop* 1977;34:103-126.
2. Parola P, Paddock CD, Socolovski C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev* 2013;26(4):657-700.
3. Fournier PE, Raoult D. Current Knowledge on Phylogeny and Taxonomy of *Rickettsia* spp. *Ann N Y Acad Sc* 2009; 1166:1-11.
4. Regnery RL, Spruill CL, Plicyitis BD. Genotypic identification of *Rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two *Rickettsial* genes. *J Bacterio* 1991;173:1576-1589.
5. Oteo JA, Portillo A. Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks Borne Dis* 2012; 3(5-6):271-8.
6. Font-Creus B, Bella-Cueto F, Espejo-Arenas E, Vidal-Sanahuja R, Muñoz-Espin T, Nolla-Salas M, et al. Mediterranean spotted fever: a cooperative study of 227 cases. *Rev Infect Dis* 1985;7:635-642.
7. Font-Creus B, Espejo-Arenas E, Muñoz-Espin T, Uriz-Urzaínqui S, Bella-Cueto F, Segura-Porta F. Fiebre botonosa mediterránea. Estudio de 246 casos. *Med Clin (Barc)* 1991;96:121-125.
8. Espejo E, Font B, Alegre MD, Segura F, Bella F. Seroepidemiological survey of Mediterranean Spotted fever in an endemic area (Vallés Occidental, Barcelona, Spain). *Trop Geogr Med* 1990;42(3):212-216.
9. Segura-Porta F, Diestre-Ortín G, Ortuño-Romero A, Sanfeliu-Sala I, Font-Creus B, Muñoz-Espin T, et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in

- human beings and dogs from an endemic area of Mediterranean spotted fever in Catalonia, Spain. *Eur J Epidemiol* 1998;14:395-398.
10. Bernabeu-Wittel M, del Toro MD, Nogueras MM, Muniain MA, Cardenosa N, Marquez FJ, et al. Seroepidemiological study of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, and *Rickettsia conorii* infection among the population of southern Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25:375-381.
 11. Althaus F, Greub G, Raoult D, Genton B. African tick-bite fever: a new entity in the differential diagnosis of multiple eschars in travelers. Description of five cases imported from South Africa to Switzerland. *Int J Infect Dis* 2010;14(Suppl 3): e274–e276. doi:10.1016/j.ijid.2009.11.021.
 12. Bacellar F, Beati L, Franca A, Pocas J, Regnery R, Filipe A. Israeli spotted fever rickettsia (*Rickettsia conorii* complex) associated with human disease in Portugal. *Emerg Infect Dis* 1999;5:835-836.
 13. Beati L, Roux V, Ortuño A, Castella J, Segura-Porta F, Raoult D. Phenotypic and genotypic characterization of spotted fever group rickettsiae isolated from Catalan *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *J Clin Microbiol* 1996;34:2688-2694.
 14. Vitale G, Mansueto S, Rolain JM, Raoult D. *Rickettsia massiliae*: first isolation from the blood of a patient. *Emerg. Infect. Dis* 2006;12:174-5.
 15. Conor A, Bruch A. Une fièvre éruptive observe en Tunisie. *Bull Soc Pathol Exot Filial* 1910; 8:492-496.
 16. Brumpt E. Longevité du virus de la fièvre boutonuse (*Rickettsia conorii*, n. sp.) chez la tique *Rhipicephalus sanguineus*. *C R Soc Biol* 1932;110:1119.

17. Herrero-Herrero JI, Ruiz Beltrán R, Martín-Sánchez M, Garcia E. Mediterranean spotted fever in Salamanca Spain. Epidemiological study in patients and serosurvey in animals and healthy human population. *Act Trop* 1989;46:335-350.
18. Zhu Y, Fournier PE, Ereemeeva ME, Raoult D. Proposal to create subspecies of *Rickettsia conorii* based on multi-locus sequence typing and an emended description of *Rickettsia conorii*. *BMC Microbiol* 2005; 5:11.
19. Fournier PE, Zhu Y, Yu X, Raoult D. Proposal to create subspecies of *Rickettsia sibirica* and an emended description of *Rickettsia sibirica*. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078:597-606.
20. Raoult D, Roux V. Rickettsiosis as paradigms of new or emerging infectious disease. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:694-719.
21. Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:719-756.
22. Fournier PE, Dumier JS, Greub G, Zhang J, Wu Y, Raoult D. Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. *J Clin Microbiol* 2003;41:5456-5465.
23. Merhej V, Raoult D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2011; 86:379-405.
24. Ogata H, Audic S, Renesto-Audiffren P, Fournier PE, Barbe V, Samson D, et al. Mechanisms of evolution in *Rickettsia conorii* and *R. provazeki*. *Science* 2001;293:2093-2098.
25. Bernabeu-Witel M, Segura-Porta F. Enfermedades producidas por *Rickettsia*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23(3):163-172.

26. Blanco JR, Jado I, Marin M, Sanfeliu I, Portillo A, Anda P, et al. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por patógenos bacterianos emergentes: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Tropheryma whipplei*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26(9):573-580.
27. Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg Infect Dis* 1998;4:179-186.
28. Walker D.H. *Rickettsiae* and rickettsial infections: the current state of knowledge. *Clin Infect Dis* 2007; 45:39-43.
29. Walker DH, Valbuena GA, Olano JP. Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. *Ann N Y Acad Sci* 2003;990:1:11.
30. Davi G, Giammarresi C, Vigneri S, Ganci A, Ferri C, Di Francesco L, et al. Demonstration of *Rickettsia conorii*-induced coagulative and platelet activation in vivo in patients with Mediterranean spotted fever. *Thromb Haemost* 1995;74:631-634.
31. Oristrell J, Amengual MJ, Font B, Casanovas A, Segura F. Plasma levels of tumor necrosis factor alpha in patients with Mediterranean spotted fever: clinical and analytical correlations. *Clin Infect Dis* 1994;19 (6):1141-1143.
32. Oristrell J, Sampere M, Amengual MJ, Font B, Segura F. Plasma interleukin-6 levels in Mediterranean spotted fever. *Eur J Clin Microbiol* 2004;23 (5):417-418.
33. Nava S, Guglielmone AA, Mangold AJ. An overview of systematics and evolution of ticks. *Front Biosci* 2009;14:2857-2877.
34. Heyman P, Cochez C, Hofhuis A, Van der Giessen J, Sprong H, Porter SR, et al. A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010;8(1):33-50.

35. Socolovschi C, Mediannikov O, Raoult D, Parola P. The relationship between spotted fever group *Rickettsiae* and ixodid ticks. *Vet Res* 2009; 40:34. doi:10.1051/vetres/2009017.
36. Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis* 2001; 32:897-928.
37. Diaz JH. A 60-year meta-analysis of tick paralysis in the United States. A predictable, preventable, and often misdiagnosed poisoning. *J Med Toxicol* 2010; 6:15-21.
38. Burgdorfer W, Brinton LP. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever *Rickettsiae* in ticks. *Ann N Y Acad Sci* 1975;266:61-72.
39. Socolovschi C, Bitam I, Raoult D, Parola P. Transmission of *Rickettsia conorii* in naturally infected *Rhipicephalus sanguineus*. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(Suppl 2):319-321.
40. Matsumoto K, Ogawa M, Brouqui P, Raoult D, Parola P. Transmission of *Rickettsia massiliae* in the tick, *Rhipicephalus turanicus*. *Med Vet Entomol* 2005; 19: 263-70.
41. Bacellar F, Regnery R, Nuncio MS, Filipe A. Genotypic evaluation of rickettsial isolates recovered from various species of ticks in Portugal. *Epidemiol Infect* 1995;114: 169-178.
42. Gilot B, Laforge MI, Pichot J, Raoult D. Relationships between the *Rhipicephalus sanguineus* complex ecology and Mediterranean spotted fever epidemiology in France. *Eur J Epidemiol* 1990;6:357-362.
43. Raoult D, Tissot H, Carac P, Brouqui P, Drancourt M, Charrel C. Mediterranean spotted fever in Marseille: Descriptive epidemiologic and influence of climatic factors. *Eur J Epidemiol* 1992;8:192-197.

44. Parola P, Raoult D. Tickborne bacterial diseases emerging infection in Europe. 2001. Clin Microbiol Infect 2001;7:80-83.
45. Davoust B, Mediannikov O, Marie JL, Socolovschi C, Parola P, Raoult D. Are vertebrate's reservoir hosts for *Rickettsia*? Bull Acad Vet France 2010; 163:291-302.
46. Kidd L, Maggi R, Diniz PP, Hegarty B, Tucker M, Breitschwerdt E. Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of spotted fever group *Rickettsia* in dog blood. Vet Microbiol 2008; 129:294-303.
47. Barrett A, Little SE, Shaw E. “*Rickettsia amblyommii*” and *R. montanensis* Infection in dogs following natural exposure to ticks. Vector Borne and Zoonotic Dis 2014;14(1):20-25.
48. Torina A, Vicente J, Alongi A, Scimeca S, Turla R, Nicosia S, et al. Observed prevalence of tick-borne pathogens in domestic animals in Sicily, Italia during 2003-2005. Zoon Publ Health 2007;54:8-15.
49. Nogueras MM, Cardeñosa N, Sanfeliu I, Muñoz T, Font B, Segura F. Evidence of infection in humans with *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in Catalonia in the Northeast of Spain. Ann N Y Acad Sci 2006; 1078:159-161.
50. Solano-Gallego L, Llull J, Osso M, Hegarty B, Breiishwerdt E. A serological study of esposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. Vet Res 2006; 37:231-244.
51. Espejo E, Alegre MD, Font B, Font A, Segura F, Bella F. Antibodies to *Rickettsia conorii* in dogs: seasonal differences. Eur J Epidemiol 1993,9:244-246.
52. Nicholson WL, Gordon R, Demma LJ. Spotted fever group rickettsial infection in dogs from eastern Arizona: how long has it been there? Ann N Y Acad Sci 2006; 1078:519-522.

-
53. Alexandre N, Santos AS, Bacellar F, Boinas FJ, Nuncio MS, de Sousa R. Detection of *Rickettsia conorii* strains in Portuguese dogs (*Canis familiaris*). Ticks Tick Borne Dis 2011; 2:119–122.
 54. Masucci M. Prevalence of antibodies against *Rickettsia conorii*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* antigens in dogs from the Stretto di Messina area (Italy). Ticks Tick Borne Dis 2012; 3:315-318.
 55. Kolo AO, Sibeko-Matjila KP, Maina AN, Richards AL, Knobel DL, Matjila PT. Molecular Detection of zoonotic Rickettsiae and *Anaplasma* spp. in domestic dogs and their ectoparasites in Bushbuckridge, South Africa. Vector Borne Zoonotic Dis 2016;6(4):245-252.
 56. Levin ML, Killmaster LF, Zemtsova GE. Domestic dogs (*Canis familiaris*) as reservoir hosts for *Rickettsia conorii*. Vector Borne Zoonotic Dis 2012; 12:28–33.
 57. Ortuño A, Pons I, Nogueras MM, Castella J, Segura F. The dog as an epidemiological marker of *Rickettsia conorii* infection. Clin Microbiol Infect 2009;15(2):241-242.
 58. Ortuño A, Quesada M, Lopez S, Castella J, Sanfeliu I, Anton E, Segura F. The role of wild boar (*Sus scrofa*) in the ecoepidemiology of *R. slovaca* in Northeastern Spain. Vector Borne Zoonotic Dis 2007; 7:59-64.
 59. Ortuño A, Pons I, Quesada M, Lario S, Anton E, Gil A, et al. Evaluation of the presence of *Rickettsia slovaca* infection in domestic ruminants in Catalonia, Northeastern Spain. Vector Borne Zoonotic Dis 2012;12:1019-1022.
 60. Amaro M, Bacellar F, Franca A. Report of eight cases of fatal and severe Mediterranean spotted fever in Portugal. Ann N Y Acad Sci 2003;990:331-343.

61. Araki M, Takatsuka K, Kawamura J, Kanno Y. Japanese spotted fever involving the central nervous system: two case reports and literature review. *J Clin Microbiol* 2002;40:3874-3876.
62. Cascio A, Maggio MC, Cardella F, Zangara V, Accomando S, Costa A, et al. Coronary involvement in Mediterranean spotted fever. *New Microbiol* 2011; 34:421-424.
63. Angerami RN, da Silva AM, Nascimento EM, Colombo S, Wada MY, dos Santos FC, et al. Brazilian spotted fever: two faces of a same disease? A comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(Suppl 2):207-208.
64. Anton E, Font B, Muñoz T, Sanfeliu I, Segura F. Clinical and laboratory characteristics of 144 patients with mediterranean spotted fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:126-128.
65. De Sousa R, Nobrega SD, Bacellar F, Torgal J. Mediterranean spotted fever in Portugal: risk factors for fatal outcome in 105 hospitalized patients. *Ann N Y Acad Sci* 2003;990::285-294.
66. Kodama K, Senba T, Yamauchi H, Chikahira Y, Katayama T, Furaya Y, et al. Fulminant Japanese spotted fever definitively diagnosis by the polymerase chain reaction method. *J Infect Chemother* 2002;8:266-268.
67. Leone S, De Marco M, Ghirga P, Nicastrì E, Lazzari R, Narciso P. Retinopathy in *Rickettsia conorii* infection: case report in an immunocompetent host. *Infection* 2008; 6:384-386.

-
68. Lledo L, Gonzalez R, Gegundez MI, Beltran M, Saz JV. Epidemiological study of rickettsial infections in patients with hypertransaminemia in Madrid (Spain). *Int J Environ Res Public Health* 2009; 6:2526-2533.
 69. Philip RN, Casper EA, Burgdorfer W, Gerloff RK, Hughes LE, Bell EJ. Serological typing of rickettsiae of spotted fever group by microimmunofluorescence. *J Immunol* 1978; 121:1961-1968.
 70. Philip RN, Casper EA, Ormsbee RA, Peacock MG, Burgdorfer W. Microimmunofluorescence test for the serological study of Rocky Mountain spotted fever and typhus. *J Clin Microbiol* 1976;3:51-61.
 71. Cardeñosa N, Sanfeliu I, Segura F. Diagnóstico microbiológico de las rickettsiosis. *Enf Infecc Microbiol Clin* 1997;15:32-37.
 72. Sanfeliu I, Pons I, Segura F. Rickettsiosis en nuestro entorno. *Jano* 2008;1689: 21-24.
 73. La Scola B, Raoult D. Diagnosis of mediterranean spotted fever by cultivation of *Rickettsia conorii* from blood and skin samples using the centrifugation-Shell Vial technique and by detection of *R. conorii* circulating endothelial cells: a 6-years follow-up. *J Clin Microbiol* 1996;34:2722-2727.
 74. Brouqui P, Bacelar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoersdorff A, Blanco JR, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial disease in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:1108-1132.
 75. La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 1997;35:2715-2727.
 76. Espejo-Arenas E, Raoult D. First isolates of *Rickettsia conorii* in Spain using a centrifugation-shell vial assay. *J Infect Dis* 1989;159(6):1158-1159.

77. Renvoisé A, Rolain JM, Socolovschi C, Raoult D. Widespread use of real-time PCR for rickettsial diagnosis. *Immunol Med Microbiol* 2012;64:126-129.
78. Shpynov SN, Fournier PE, Rudakov NV, Samoilenko IE, Reshetnikova TA, Yastrebov VK, et al. Molecular identification of a collection of spotted fever group rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74:440-443.
79. Walker DH, Cain BG, Olmstead PM. Laboratory diagnosis of Rocky Mountain spotted fever by immunofluorescent demonstration of *Rickettsia rickettsii* in cutaneous lesions. *Am J Clin Pathol* 1978; 69:619-623.
80. Gímenez DF. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain Technol* 1964;39:135-140.
81. Beati L, Kelly PJ, Matthewman LA, Mason PR, Raoult D. Prevalence of rickettsia-like organisms and spotted fever group rickettsiae in ticks (Acari: *Ixodidae*) from Zimbabwe. *J Med Entomol* 1995;32:787-792.
82. Vitale G, Stefano RD, Damiani G, Mansueto S. Characterization of Sicilian strains of spotted fever group *Rickettsiae* by using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1989;27:1081-1085.
83. Vestris G, Rolain JM, Fournier PE, Birg ML, Enea M, Patrice JY, Raoult D. Seven years' experience of isolation of *Rickettsia* spp. from clinical specimens using the shell vial cell culture assay. *Ann N Y Acad Sci* 2003;990:371-374.
84. Gouriet F, Fenollar F, Patrice JY, Drancourt M, Raoult D. Use of Shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 years of experience. *J Clin Microbiol* 2005;43(10):4993-5002.

85. Kelly PJ, Raoult D, Mason PR. Isolation of spotted fever group rickettsias from triturates ticks using a modification of the centrifugation-shell vial technique. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991;85:397-398.
86. Psaroulaki A, Spyridaki I, Ioannidis A, Babalis T, Gikas A, Tselentis Y. First isolation and identification of *Rickettsia conorii* from ticks collected in the region of Fokida in central Greece. *J Clin Microbiol* 2003;41:3317-3319.
87. Peter O, Raoult D, Gilot B. Isolation by a sensitive centrifugation cell culture system of 52 strains of Spotted Fever Group Rickettsiae from ticks collected in France. *J Clinical Microbiol* 1990;28 (7):1597-9.
88. Senneville E, Ajana F, Lecocq P, Chidiac C, Mouton Y. *Rickettsia conorii* isolated from ticks introduced to Northern France by a dog. *Lancet* 1991;337:676.
89. Angelakis E, Richet H, Rolain JM, La Scola B, Raoult D. Comparison of real-time quantitative PCR and culture for the diagnosis of emerging rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6: e1540. doi: 10.1371/journal.pntd.0001540.
90. Bechah Y, Socolovschi C, Raoult D. Identification of rickettsial infections by using cutaneous swab specimens and PCR. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:83-86.
91. Walker DH, Liu QH, Yu XJ, Li H, Taylor C, Feng HM. Antigenic diversity of *Rickettsia conorii*. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47(1):78-76.
92. Teyssere N, Raoult D. Comparison of Western immunoblotting and microimmunofluorescence for diagnosis of Mediterranean spotted fever. *J Clin Microbiol* 1992;30:455-460.
93. Mahara F. Three Weil-Felix reaction OX2 positive cases with skin eruptions and high fever. *J Anan Med Assoc* 1984;68:4-7.

94. Raoult D, Hechemy KE, Chaudet H. Serology of Mediterranean boutonneuse fever. Kinetics of antibodies detected by 3 methods: indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination and latex agglutination. *Pathol Bio* 1985;33:839-841.
95. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis. United States. CDC. MMWR. Vol 62, 2. 2016
96. Eremeeva ME, Balayeva MN, Ignatovich VF, Raoult D. Serologic response to rickettsial antigens in patients with Astrakhan fever. *Eur J Epidemiol* 1995;11:383-387.
97. Raoult D, Dasch GA. Line blot and western blot immunoassays for diagnosis of Mediterranean spotted fever. *J Clin Microbiol* 1989; 27:2073-2079.
98. Hechemy, KE, Anacker RL, Carlo N L, Fox JA, Gaafar HA. Absorption of *Rickettsia rickettsii* antibodies by *Rickettsia rickettsii* antigens in four diagnostic tests. *J Clin Microbiol* 1983; 17:445-449.
99. Drancourt M, Georges F, Brouqui P, Sampl J, Raoult D. Diagnosis of Mediterranean spotted fever by indirect immunofluorescence of *Rickettsia conorii* in circulating endothelial cells isolated with monoclonal antibody-coated immunomagnetic beads. *J Infect Dis* 1992; 166:660-663.
100. Jado I, Escudero R, Gil H, Jiménez-Alonso MI, Sousa R, Gracia-Pérez AL, et al. Molecular Method for identification of *Rickettsia* species in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol* 2006;44:4572-4576.
101. Marquez FJ, Muniain MA, Soriguer RC, Izquierdo G, Rodriguez-Bano J, Borobio MV. Genotypic identification of an undescribed spotted fever group rickettsia in *Ixodes ricinus* from southwestern Spain. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58:570-577.

-
102. Leitner M, Yitzhaki S, Rzotkiewicz S, Keysary A. Polymerase chain reaction-based diagnosis of Mediterranean spotted fever in serum and tissue samples. *Am J Trop Med Hyg* 2002;67:166-169.
 103. Choi YJ, Lee SH, Park KH, Koh YS, Lee KH, Baik HS, et al. Evaluation of PCR-Based Assay for Diagnosis of Spotted Fever Group Rickettsiosis in Human Serum Samples. *Clin Diag Lab Immunol* 2005;6:759-763.
 104. Fournier PE, Raoult D. Suicide PCR on skin biopsy specimens for diagnosis of rickettsioses. *J Clin Microbiol* 2004;42:3428-3434.
 105. Sanchez JA, Pierce KE, Rice JE, Wangh LJ. Linear-after-the exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101:1933-1938.
 106. Pierce KE, Sanchez JA, Rice JE, Wangh LJ. Linear-after-the exponential (LATE)-PCR: primer design criteria for high yields of specific single-stranded DNA and improved real-time detection. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102(24):8609-8614.
 107. Stenos J, Graves SR, Unsworth NB. A highly sensitive and specific real-time PCR assay for the detection of spotted fever and typhus group rickettsiae. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73:1083-1085.
 108. Fournier PE, Drancourt M, Raoult D. Bacterial genome sequencing and its use in infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2007;7:711-723.
 109. Wang JM, Hudson BJ, Watts MR, Karagiannis T, Fisher NJ, Anderson C, et al. Diagnosis of Queensland tick typhus and African tick bite fever by PCR of lesion swabs. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:963-965.

110. Mouffok N, Socolovschi C, Benabdellah A, Renvoise A, Parola P, Raoult D. Diagnosis of rickettsioses from eschar swab samples, Algeria. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:1968-1969.
111. Socolovschi C, Renvoise A, Brouqui P, Parola P, Raoult D. The use of eschar swabs for the diagnosis of African tick-bite fever. *Ticks Tick Borne Dis*. 2012; 3:361-363.
112. Myers T, Lalani T, Dent M, Jiang J, Daly PL, Maguire JD, et al. Detecting *Rickettsia parkeri* infection from eschar swab specimens. *Emerg Infect Dis* 2013; 19:778-780.
113. Beati L, Finidori JP, Gilot B, Raoult D. Comparison of serological typing, dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis protein analysis, and genetic restriction fragment length polymorphism analysis for identification of rickettsiae: characterization of two new rickettsial strains. *J Clin Microbiol* 1992;30:1922-1930.
114. Ereemeeva ME, Yu X, Raoult D. Differentiation among spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. *J Clin Microbiol* 1994;32:603-810.
115. Balayeva NM, Ereemeeva ME, Ignatovich VF, Rudakov TA, Reschetnikova IE, Samoilenko VK, et al. Biological and genetic characterization of *Rickettsia sibirica* strains isolated in the endemic area of the north Asian tick typhus. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55:685-692.
116. Beati L, Peter O, Burgdorfer W, Aeschlimann A, Raoult D. Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp. nov. is a distinct species of the spotted fever group of rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:521-526.
117. Portillo A, Ibarra V, Santibanez S, Perez-Martinez L, Blanco JR, Oteo JA. Genetic characterisation of *ompA*, *ompB* and *gltA* genes from *Candidatus Rickettsia rioja*. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(Suppl 2):307-308.

-
118. Roux V, Rydkina E, Ereemeeva ME, Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:252-251.
 119. Ralph D, Pretzman C, Daugherty N, Poetter K. Genetic-relationship among the members of the family *Rickettsiaceae* as shown by DNA restriction fragment polymorphism analysis. *Ann N Y Acad Sci* 1990;590:541-552.
 120. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microb Rev* 2004;17:840-862.
 121. Roux V, Fournier PE, Raoult D. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and the analysis restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. *J Clin Microbiol* 1996;3:2058-2065.
 122. Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*ompB*). *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1449-1455.
 123. Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis* 2001; 32:897-928.
 124. Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol* 2010; 5:1733-1754.

125. Karger A, Kampen H, Bettin B, Dautel H, Ziller M, Hoffmann B, et al. Species determination and characterization of developmental stages of ticks by whole-animal matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Ticks Tick Borne Dis* 2012; 3:78-89.
126. Yssouf A, Flaudrops C, Drali R, Kernif T, Socolovschi C, Berenger JM, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors. *J Clin Microbiol* 2013; 51:522-528.
127. Hechemy KE, Avsic-Zupanc T, Childs JE, Raoult D. Rickettsiology: present and future directions -preface. *Ann N Y Acad Sci* 2003;990:XVII-XVXX.
128. Rovey C, Brouqui P, Raoult D. Questions on Mediterranean spotted fever a century after its discovery. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1360–1367.
129. Mansueto S, Tringali G, Walker DH. Widespread simultaneous increase in the incidence of spotted fever group rickettsioses. *J Infect Dis* 1986;154:539-540.
130. Bustamente Moreno JG, Pon Méndez A. Actualización en la vigilancia epidemiológica de “rickettsiosis”. Part I. *Epidemiol Bol* 2010;6:1-4.
131. Bustamente Moreno JG, Pon Méndez A. Actualización en la vigilancia epidemiológica de “rickettsiosis”. Part II. *Epidemiol Bol* 2010;7:1-3.
132. Portillo A, Santibáñez S, García-Alvarez L, Palomar AM, Oteo JA. Rickettsioses in Europe. *Microbes and Infection* 2015;1-5.
133. Rovey C, Raoult D. Mediterranean spotted fever. *Infect Dis Clin North Am* 2008; 22:515–530.
134. Segura Porta F. Nuevas rickettsiosis. *Med Clin (Barc)* 2004; 20:784-5.
135. Segura F, Font B. Resurgence of Mediterranean spotted fever in Spain. *Lancet* 1982;2:280.

-
136. Zavala-Castro JE, Dzul-Rosado KR, Leon JJ, Walker DH, Zavala-Velazquez JE. An increase in human cases of spotted fever rickettsiosis in Yucatan, Mexico, involving children. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79:907-910.
 137. Socolovschi C, Mediannikov O, Raoult D, Parola P. Update on tick-borne bacterial disease in Europe. *Parasite* 2009; 16:259-273.
 138. Aquilini D, Parola P, Salvo E, Paladini A. Seroepidemiology of rickettsioses, human granulocytic ehrlichioses, Lyme disease, Q fever and tularemia in forestry workers in Tuscany, Italy. *J Spirochetal Tick-Borne Bacterial Dis* 2001;7:35-41
 139. Bacellar F, Sousa R, Santos A, Santos-Silva M, Parola P. Boutonouse fever in Portugal:1995.2000 data of state laboratory. *Eur J Epidemiol* 2003;18:275-277.
 140. Bartolome J, Lorente S, Hernandez-Perez N, Martinez-Alfaro E, Marin-Ors A, Crespo MD. Clinical and epidemiological study of spotted fever group rickettsiosis in Albacete, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23:194-196.
 141. Bozeman FM, Elisberg BI, Humphries JW, Palmer DB. Serologic evidence of *Rickettsia canada* infection of man. *J Infect Dis* 1970;121:367-371.
 142. Cinco M, Luzzati R, Mascioli M, Floris R, and Brouqui P. Serological evidence of *Rickettsia* infections in forestry rangers in north-eastern Italy. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:493-495.
 143. De Lemos ERS, Alvarenga FBF, Cintra ML, Ramos MC, Ramos CD, Paddock TL, et al. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the state of Sao Paulo. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:329-334

144. Claerebout E, Losson B, Cochez C, Casaert S, Dalemans AC, De Cat A, et al. Ticks and associated pathogens collected from dogs and cats in Belgium. *Parasites & Vectors* 2013; 183:1-9.
145. Horta MC, Labruna MB, Sanguioni LA, Vianna MC, Gennari M, Galvao MA, et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Sao Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71:93-97.
146. Norment BR, Burgdorfer W. Susceptibility and reservoir potential of the dog to spotted fever-group rickettsiae. *Am J Vet Res* 1984;45:1710.
147. Fernandez-Soto P, Perez-Sanchez R, Alamo-Sanz R, Encinas-Grandes A. Spotted fever group rickettsiae in ticks feeding on humans in northwestern Spain: is *Rickettsia conorii* vanishing? *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078:331-333.
148. Billeter SA, Vissotto de Paiva Diniz PP, Jett LA, Wournell AL, Kjemtrup AM, Padgett KA, et al. Detection of *Rickettsia* species in fleas collected from cats in regions endemic and nonendemic for flea-borne rickettsioses in California. *Vector Borne and Zoonotic Dis* 2016;16,3:151-156.
149. Billings AN, Teltow GJ, Weaver SC, Walther DH. Molecular characterization of a novel *Rickettsia* species from *Ixodes scapularis* in Texas. *Emerg Infect Dis* 1998;4:305-309.
150. Bell EJ, Kohls GM, Stoenner HG, Lackman DB. Non-pathogenic rickettsias related to the spotted fever group isolated from ticks *Dermacentor variabilis* and *Dermacentor andersoni* from eastern Montana. *J Immunol* 1963;90:770-781

151. Parola P, Socolovschi C, Raoult D. Deciphering the relationships between *Rickettsia conorii* and *Rhipicephalus sanguineus* in the ecology and epidemiology of Mediterranean spotted fever. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1166:49-54.
152. De Sousa R, Luz T, Parreira P, Santos-Silva M, Bacellar F. Boutonneuse fever and climate variability. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078:162-169.
153. Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier PE, Sotto A, et al. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsiosis. *Plos Negl Trop Dis* 2008;2e 338.
154. Vescio MF, Piras MA, Ciccozzi M, Carai A, Farchi F, Maroli M, et al. Socio-demographic and climatic factors as correlates of Mediterranean spotted fever (MSF) in northern Sardinia. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78:318-320.
155. Caruso G, Zasio C, Guzzo F, Granata G, Mondardini V, Guerra E, et al. Outbreak of African tick-bite fever in six Italian tourists returning from South Africa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:133-136.
156. Fournier PE, Roux V, Caumes E, Donzel M, Raoult D. Outbreak of *Rickettsia africae* infections in participants of an adventure race in South Africa. *Clin Infect Dis* 1998;27:316-323.
157. Jensenius M, Hoel T, Raoult D, Fournier PE, Kjelshus H, Bruu AI, Myrvang B. Seroepidemiology of *Rickettsia africae* infection in Norwegian travellers to rural Africa. *Scand J Infect Dis* 2002;34:93-96.
158. Blanco JR, Oteo JA. Rickettsiosis in Europe. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078:26-33

159. Bolanos-Rivero M, Santana-Rodriguez E, Angel-Moreno A, Hernandez-Cabrera M, Liminana-Canal JM, Carranza-Rodriguez C, et al. Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia conorii* infections in the Canary Islands (Spain). *Int J Infect Dis* 2011;15:e481- e485.
160. Cascio A, Dones P, Romano A, Titote L. Clinical and laboratory findings of boutonneuse fever in Sicilian children. *Eur J Pediatr* 1998;157:482-486.
161. Colomba C, Saporito L, Polara VF, Rubino R, Titone L. Mediterranean spotted fever: clinical and laboratory characteristics of 415 Sicilian children. *BMC Infect Dis* 2006; 6:60. doi:10.1186/1471-2334-6-60.
162. Germanakis A, Psaroulaki A, Gikas A, Tselentis Y. Mediterranean spotted fever in Crete, Greece: clinical and therapeutic data of 15 consecutive patients. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078:263–269.
163. Giammanco GM, Vitale G, Mansueto S, Capra G, Caleca MP, Ammatuna P. Presence of *Rickettsia conorii* subsp. *israelensis*, the causative agent of Israeli spotted fever in Sicilian, Italy, ascertained in a retrospective study. *J Clin Microbiol* 2005;43:6027-6031.
164. Lambert M, Dugernier T, Bigaignon G, Rahier J, Piot P. Mediterranean spotted-fever in Belgium. *Lancet* 1984;ii:1038.
165. Oteo JA, Ibarra V, Blanco JR, Vallejo M, Martinez de Artola V. Epidemiological and clinical differences among *Rickettsia slovaca* rickettsiosis and other tick-borne diseases in Spain. *Ann N Y Acad Sci* 2003;990:355-6.
166. Raoult D, Weiller PJ, Chagnon A, Chaudet H, Gallais H, Casanova P. Mediterranean spotted fever: clinical, laboratory and epidemiological features of 199 cases. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:845-850.

-
167. Peter O, Burgdorfer W, Aeschlimann A, Chatelanat P. *Rickettsia conorii* Isolated from *Rhipicephalus sanguineus* introduced into Switzerland on a pet dog. *Z Parasitenkd* 1984;70:265-270.
168. Espejo-Arenas E, Font-Creus B, Bella-Cueto F, Segura-Porta F. Climatic factors in resurgence of Mediterranean Spotted fever. *Lancet* 1986;1(8493):1333.
169. Centers for Disease Control and Prevention. Spotted fever rickettsioses 2010 case definition. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA;2010. http://www.cdc.gov/osels/ph_surveillance/nndss/casedef/spottedfever_current.htm.
170. Socolovschi C, Audoly G, Raoult D. Connection of toxin-antitoxin modules to inoculation eschar and arthropod vertical transmission in Rickettsiales. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2013; 36:199-209.
171. Gouin E, Egile C, Dehoux P, Villiers V, Adams J, Gertler F et al. The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex. *Nature* 2004;27:457-461.
172. Fournier PE, Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:839-849.
173. Giammanco GM, Mansueto S, Ammatuna P, Vitale G. Israeli spotted fever *Rickettsia* in Sicilian *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Emerg Infect Dis* 2003;9:892-893.
174. Drancourt M, Kelly PJ, Regnery R, Raoult D. Astrakhan fever rickettsia is identical to Israeli tick typhus rickettsia. A genotype of the *Rickettsia conorii* complex. *J Infect Dis* 1992;165:1167-1168.

175. Ereemeeva ME, Balayeva MN, Ignatovich VF, Raoult D. Proteinic and genomic identification of spotted fever group rickettsiae isolated in the former USSR. *J Clin Microbiol* 1993;31:2625-2633.
176. Ereemeeva ME, Beati EL, Makarova VA, Fetisova NF, Tarasevich IV, Balayeva NM, Raoult D. Astrakhan fever rickettsiae: antigenic and genotypic analysis of isolates obtained from human and *Rhipicephalus pumilio* ticks. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51:697-706.
177. Mathai E, Lloyd G, Cherian T, Abraham OC, Cherian AM. Serological evidence for the continued presence of human rickettsioses in southern India. *Ann Trop Med Parasitol* 2001;95:395-398.
178. Parola P, Fenollar F, Badiaga S, Brouqui P, Raoult D. First documentation of *Rickettsia conorii* infection (strain Indian tick typhus) in a traveler. *Emerg Infect Dis* 2001;7:909-910.
179. Kuloglu F, Rolaiin JM, Fournier PE, Akata F, Tugrul M, Raoult D. First isolation of *Rickettsia conorii* from human in Trakya region (European part) of Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:609-614.
180. Samardzic S, Marinkovic T, Marinkovic D, Djuricic B, Ristanovic E, Simovic T, et al. Prevalence of antibodies to rickettsiae in different regions of Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8:219–224.
181. Bella F, Font B, Segura F, Espejo E, Lopez P, Muñoz T. Comparative randomized trial of one-day doxycycline versus 10-day tetracycline therapy for Mediterranean spotted fever. *J Infect Dis* 1987;155:1056-1058.

-
182. Muñoz-Espin T, López-Parés P, Espejo-Arenas E, Font-Creus B, Martínez-Vila I, Traveria-Casanova, et al. Erythromycin versus tetracycline for treatment of Mediterranean spotted fever. *Arch Dis Child* 1986; 61:1027-1029.
 183. Botelho-Nevers E, Socolovschi C, Raoult D, Parola P. Treatment of *Rickettsia* spp. infections: a review. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10:1425-1437.
 184. Botelho-Nevers E, Edouard S, Leroy Q, Raoult D. Deleterious effect of ciprofloxacin on *Rickettsia conorii*-infected cells is linked to toxin-antitoxin module up-regulation. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:1677–1682.
 185. Bella F, Espejo E, Uriz S, Serrano J A, Alegre M D, Tort J. Randomized trial of 5-day rifampicin versus 1-day doxycycline therapy for Mediterranean spotted fever. *J Infect Dis* 1991;164:433-434.
 186. Bella F, Font B, Uriz S, Muñoz T, Espejo E, Traveria J, et al. Randomized trial of doxycycline versus josamycin for Mediterranean spotted fever. *J Antimicrob Agents and Chemother* 1990;34:934-93.
 187. Segura F, Anton E. Clarithromycin for the treatment of Mediterranean spotted fever. *Clin Infect Dis* 2002;34:560.
 188. Cascio A, Colomba C, Antinori S, Paterson DL, Titone L. Clarithromycin versus azithromycin in the treatment of mediterranean spotted fever in children: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 2002;34:154-158.
 189. Babalis T, Tselentis Y, Roux V, Psaroulak AI, Raoult D. Isolation and identification of a rickettsial strain related to *Rickettsia massiliae* in Greek ticks. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50:365-372.

190. Beeler E, Abramowicz KF, Zambrano ML, Sturgeon MM, Khalaf N, Hu R, et al. A Focus of Dogs and *Rickettsia massiliae* Infected *Rhipicephalus sanguineus* in California. *Am J Trop Med Hyg* 2011;84(2):244-249.
191. Eremeeva ME, Bosserman EA, Demma LJ, Zambrano ML, Blau DM, Dasch GA. Isolation and identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks collected in Arizona. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:5569-5577.
192. Beati L, Raoult D. *Rickettsia massiliae* sp. nov., a new spotted fever group rickettsia. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:839-840.
193. Eremeeva ME, Stromdahl EY. New spotted fever group *Rickettsia* in a *Rhipicephalus turanicus* tick removed from a child in eastern Sicily, Italy. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84:99-101.
194. Marie JL, Davoust B, Socolovschi C, Mediannikov O, Roqueplo C, Beaucournu JC, et al. *Rickettsiae* in arthropods collected from red foxes (*Vulpes vulpes*) in France. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2012;35:59-62.
195. Fernandez de Mera IG, Zivkovic Z, Bolaños M, Carranza C, Pérez-Arellano JL, Gutiérrez C, De la Fuente J. *Rickettsia massiliae* in the Canary Islands. *Emerg Infect Dis* 2009;15(11):1869-70.
196. Chochlakis D, Ioannou I, Sandalakis V, Dimitriou T, Kassinis N, Papadopoulos B, et al. Spotted fever group rickettsiae in ticks in Cyprus. *Microb Ecol* 2012; 63:314-323.
197. Psaroulaki A, Ragiadakou D, Kouris G, Papadopoulos B, Chaniotis B, Tselentis Y. Ticks, tick-borne rickettsiae, and *Coxiella burnetii* in the Greek Island of Cephalonia. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078:389-399.

-
198. Tomanovic S, Chochlakis D, Radulovic Z, Milutinovic M, Cakic S, Mihaljica D, et al. Analysis of pathogen co-occurrence in host-seeking adult hard ticks from Serbia. *Exp Appl Acarol* 2013; 59:367-376.
199. Renvoise A, Delaunay P, Blanchouin E, Cannavo I, Cua E, Socolovschi C, et al. Urban family cluster of spotted fever rickettsiosis linked to *Rhipicephalus sanguineus* infected with *Rickettsia conorii* subsp. *caspia* and *Rickettsia massiliae*. *Ticks Tick Borne Dis* 2012; 3:389-392.
200. Bernabeu-Wittel, del Toro MD, Nogueras MM, Muniain MA, Cardeñosa N, Segura F, Pachón J. Presence of human past infections due to the Bar 29 rickettsial strain in Southern Spain. *J Infect* 2006;52:117-9.
201. Socolovschi C, Reynaud P, Kernif T, Raoult D, Parola P. Rickettsiae of spotted fever group, *Borrelia valaisiana*, and *Coxiella burnetii* in ticks on passerine birds and mammals from the Camargue in the south of France. *Ticks tick Borne Dis*. 2012; 3:355-360.
202. Marie JL, Davoust B, Socolovschi C, Raoult D, Parola P. Molecular detection of rickettsial agents in ticks and fleas collected from a European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) in Marseilles, France. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2012; 35:77-79.
203. Márquez FJ. Spotted fever group *Rickettsia* in ticks from south eastern Spain natural parks. *Exp Appl Acarol* 2008;45(3-4):185-194.
204. Scarpulla M, Barlozzari G, Marcario A, Salvato L, Blanda V, De Liberato C et al. Molecular detection and characterization of spotted fever group rickettsiae in ticks from Central Italy. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2016;7:1052–1056 1055.

205. Blanda V, Torina A, La Russa F, D'Agostino R, Randazzo K, Scimeca S et al. A retrospective study of the characterization of *Rickettsia* species in ticks collected from humans. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2017; 8:610–614.
206. Estrada-Peña A, Roura X, Sainz A, Miró G, Solano-Gallego L. Species of ticks and carried pathogens in owned dogs in Spain: Results of a one-year national survey. *Ticks Tick Borne Diseases* 2017;8(4):443-452
207. Cascio A, Torina A, Valenzise M, et al. Scalp eschar and neck lymphadenopathy caused by *Rickettsia massiliae*. *Emerg Infect Dis* 2013; 19:836-7.
208. Zaharia M, Popescu CP, Florescu SA, Ceausu E, Raoult D. *Rickettsia massiliae* infection and SENLAT syndrome in Romania. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2016; 7:759–762.
209. Monterde-Álvarez ML, Calbet-Ferré C, Rius-Gordillo N, Pujol-Bajador I, Ballester-Bastardie F, Escribano-Subías J. Rickettsiosis tras la picadura de una garrapata: una clínica sutil en muchas ocasiones, debemos estar atentos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016;35(2):100-103.
210. Podsiadly E, Chmielewski T, Karbowski G, Kedra E, Tylewska-Wierzbanska S. The occurrence of spotted fever rickettsioses and other tick-borne infections in forest workers in Poland. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11:985-989.
211. Fornadel CM, Smith JD, Zawada SE, Arias JR, Norris DE. Detection of *Rickettsia massiliae* in *Rhipicephalus sanguineus* from the Eastern United States. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013;13:67-69.
212. Wikswo ME, Hu R, Metzger ME, Ereemeeva ME. Detection of *Rickettsia rickettsii* and *Bartonella henselae* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from California. *J Med Entomol* 2007; 44:158-162.

-
213. Galvao MA, Mafra CL, Moron C, Anaya E, Walker DH. Rickettsiosis of the genus *Rickettsia* in South America. *Ann N Y Acad Sci* 2003;990:57-61.
214. Cicuttin GL, Rodríguez VM, Jado I, Anda P. Primera detección de *Rickettsia massiliae* en la Ciudad de Buenos Aires. Resultados preliminares. *Rev Argent Zoonosis* 2004;1:8-10.
215. García-García JJ, Portillo A, Núñez MJ, Santibáñez S, Castro B, Oteo JA. Case Report: A patient from Argentina infected with *Rickettsia massiliae*. *Am J Trop Med Hyg* 2010;82(4):691-692.
216. Moraes-Filho J, Marcili A, Nieri-Bastos FA, Richtzenhain LJ, Labruna MB. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America *Acta Trop* 2011;117:51-55.
217. Nava S, Mastropaolo M, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielmo AA. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Vet Parasitol* 2012;190:547-555.
218. Bitam I, Parola P, Matsumoto K, Rolain JM, Baziz B, Boubidi SC, et al. First molecular detection of *R. conorii*, *R. aeschlimannii*, and *R. massiliae* in ticks from Algeria. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078:368-372.
219. Boudebouch N, Sarih M, Socolovschi C, Amarouch H, Hassar M, Raoult D, Parola P. Molecular survey for spotted fever group rickettsiae in ticks from Morocco. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(Suppl 2):259-260.
220. Khrouf F, Sellami H, Elleuch E, Hattab Z, Ammari L, Khalfaoui M, Souissi J, Harrabi H, et al. Molecular diagnosis of *Rickettsia* infection in patients from Tunisia. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2016; 7:653-656.

221. Mediannikov O, Diatta G, Fenollar F, Sokhna C, Trape JF, Raoult D. Tick-borne rickettsioses, neglected emerging diseases in rural Senegal. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4: e821. doi: 10.1371/journal.pntd.0000821.
222. Mediannikov O, Diatta G, Zolia Y, Balde MC, Kohar H, Trape JF, Raoult D. Tick-borne rickettsiae in Guinea and Liberia. *Ticks Tick Borne Dis* 2012;3:43–48.
223. Reye AL, Arinola OG, Hubschen JM, Muller CP. Pathogen prevalence in ticks collected from the vegetation and livestock in Nigeria. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:2562-2568.
224. Harrus S, Perlman-Avrahami A, Mumcuoglu KY, Morick D, Baneth G. Molecular detection of *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia sibirica mongolitimonae* and *Rickettsia conorii israelensis* in ticks from Israel. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:176–180.
225. Keysary A, Eremeeva ME, Leitner M, Din AB, Wikswo ME, Mumcuoglu KY, et al. Spotted fever group rickettsiae in ticks collected from wild animals in Israel. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 85:919-923.
226. Dupont HT, Cornet JP, Raoult D. Identification of rickettsiae from ticks collected in the Central African Republic using de polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50:373-380.
227. Graves S, and Stenos J. 1999. Rickettsiosis in Australia, p.244-246. In D. Raoult, P. Brouqui (ed.). *Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millenium*. Elsevier, Paris, France;1999. p.244-246.
228. Graves S, Stenos J. Rickettsioses in Australia. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1166:151-155.

-
229. Campbell R, Domrow R. Rickettsiosis in Australia: isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* and *R. australis* from naturally infected arthropods. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1974;68:397-402.
230. Baird RW, Lloyd M, Stenos J, Ross BC, Stewart RS, Dwyer R. Characterization and comparison of Australian human spotted fever group rickettsiae. *J Clin Microbiol* 1992;30:2896–2902.
231. Cardeñosa N, Roux V, Font B, Sanfeliu I, Raoult D, Segura F. Isolation and identification of two rickettsial strains from patients in Catalonia. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62:142-144.
232. Parker RR, Kolhs GM, Cox GW, Davis GE. Observations on an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. *Public Health Rep* 1939;54:1482-1484.
233. Paddock CD, Sumner JW, Comer JA, Zaki SR, Goldsmith CS, Goddard J, et al. *Rickettsia parkeri*: a new recognized cause of Spotted Fever Rickettsiosis in the United States. *Clin Infect Dis* 2004; 38:805-811.
234. Paddock CD, Finley RW, Wright CS, Robinson HN, Schrodt BJ, LaneCC, et al. *Rickettsia parkeri* and its clinical distinction from Rocky Mountain spotted fever. *Clin Infec Dis* 2008; 47:1188–1196.
235. Paddock CD, Fournier PE, Sumner JW, Goddard J, Elshenawy Y, Metcalfe MG, et al. Isolation of *Rickettsia parkeri* and identification of a novel spotted fever group *Rickettsia* sp. from Gulf Coast ticks (*Amblyomma maculatum*) in the United States. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:2689–2696.
236. Kelly PJ, Beati L, Mason PR, Mathewman LA, Roux V, Raoult D. *Rickettsia africae* sp. nov., the etiological agent of African tick bite fever. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:611-614.

237. Jensenius M, Fournier PE, Kelly P, Myrvang B, Raoult D. African tick bite fever. *Lancet Infect Dis* 2003;557-564.
238. Jensenius M, Parola P, Raoult D. Threats to international travelers posed by tick-borne diseases. *Travel Med Infect Dis* 2006; 4:4–13.
239. Jensenius M, Davis X, Von Sonnenburg F, Schwartz E, Keystone JS, Leder K, et al. Multicenter GeoSentinel analysis of rickettsial diseases in international travelers, 1996-2008. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:1791–1798.
240. Anton E, Nogueras MM, Pons I, Font B, Muñoz T, Sanfeliu I, Segura F. *Rickettsia slovaca* infection in humans in the Northeast of Spain seroprevalence study. *Vector Borne and Zoo Dis* 2008; 8:689-694.
241. Garcia A, Nájera E. Estudio epidemiológico de las rickettsiosis en la provincia de Sevilla, basado en las reacciones serológicas de inmunofluorescencia indirecta.. *Rev Sanid Hig Pública (Madrid)* 1984;58:83-98.
242. Uchida T, Tashiro F, Funato T, Kitamura Y. Immunofluorescence test with *Rickettsia montana* for serologic diagnosis of rickettsial infection of spotted fever group in Shikoku, Japan. *Microbiol Immunol* 1986;30:1061-1066.
243. Herrero JI, Ruiz R, Walker DH. La técnica de Western immunoblotting en situaciones atípicas de infección por *Rickettsia conorii*. Presentación de 2 casos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993;11:139-142.
244. Perez-De Pedro I, Macias-Vega IN, Miranda-Candon I, Camps-Garcia MT. Severe *Rickettsia conorii* infection associated with hemophagocytic syndrome. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26:597–598.

-
245. Raoult D, Gallais H, Ottomani A, Resch JP, Tichadou D, De Micco P, et al. Malignant form of Mediterranean spotted fever. 6 cases. *Presse Med.* 1983; 12:2375-2378.
246. Fournier PE, El Karkouri K, Leroy Q, Robert C, Giumelli B, Renesto P, et al. Analysis of the *Rickettsia africae* genome reveals that virulence acquisition in *Rickettsia* species may be explained by genome reduction. *BMC Genomics* 2009; 10:166.
247. McQuiston JH, Paddock CD, Singleton J, Wheelig JT, Zaki SR, Childs JE. Imported spotted fever rickettsioses in United States travelers returning from Africa: a summary of cases confirmed by laboratory testing at the Centers for Disease Control and Prevention, 1999-2002. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70:98-101.
248. Uchida T, Uchiyama T, Koyama AH. Isolation of spotted fever group rickettsiae from humans in Japan. *J Infect Dis* 1988;158:664-665.
249. Ramos JM, Jado I, Padilla S, Masia M, Anda P, Gutierrez F. Human infection with *Rickettsia sibirica mongolitimonae*, Spain, 2007-2011. *Emerg Infect Dis* 2013; 19:267-269.
250. Jado I, Oteo JA, Aldámiz M, Gil H, Escudero R, Ibarra V, et al. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerg Infect Dis* 2007;13(9):1045-1047.
251. Chochlakis D, Bongiorno C, Partalis N, Tselentis Y, Psaroulaki A. Possible *Rickettsia massiliae* Infection in Greece: An Imported Case. *Jpn. J. Infect. Dis* 2016;69,328-330.
252. Schex S, Dobler G, Riehm J, Müller J, and Essbauer S. *Rickettsia* spp. in wild small mammals in Lower Bavaria, South-Eastern Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011;11(5):493-502.

253. Wächter M, Wölfel S, Pfeffer M, Dobler G, Kohn B, Moritz A, et al. Serological differentiation of antibodies against *Rickettsia helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. monacensis* and *R. felis* in dogs from Germany by a micro-immunofluorescent antibody test. *Parasit Vectors* 2015;23(8):126. doi: 10.1186/s13071-015-0745-1.
254. Breitschwerdt EB, Moncol DJ, Corbett WT, MacCormack JN, et al. Antibodies to spotted fever-group rickettsiae in dogs in North Carolina. *Am J Vet Res* 1987;48:1436-1440.
255. Levin ML, Zemtsova GE, Montgomery M, Killmaster LF. Effects of homologous and heterologous immunization on the reservoir competence of domestic dogs from *R. conorii (israelensis)*. *Ticks Tick Borne Dis* 2014;5:33-40.
256. Boretti FS, Perreten A, Meli ML, Cattori V, Willi B, Wengi N et al. Molecular investigations of *Rickettsia helvetica* infection in dogs, foxes, humans, and Ixodes ticks. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:3230-3237.
257. Torina A, Blanda V, Antoci F, Scimeca S, D'Agostino R, Scariano E, et al. A molecular survey of *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia canis* and *Babesia microti* in foxes and fleas from Sicily. *Transbound Emerg Dis* 2013;60:125-130.
258. Socolovschi C, Gaudart J, Bitam I, Huynh TP, Raoult D, Parola P. Why are there so few *Rickettsia conorii conorii*-infected *Rhipicephalus sanguineus* ticks in the wild? *PLoS Negl Trop* 2012;doi:10.1371/journal.pntd.0001697.
259. Milhano N, Popov V, Vilhena M, Bouyer DH, de Sousa R, Walker DH. Quantitative study of *Rickettsia massiliae* in *Rhipicephalus sanguineus* organs. *Ticks Tick Borne Dis* 2014; 5:709-714.

-
260. Levin ML, Killmaster L, Ereemeeva ME, Dasch GA. Effects of *Rickettsia conorii* infection on the survival of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. Clin Microbiol Infect 2009;15(Suppl 2):277–278.
261. Rose J, Nachum-Biala Y, Mumcuoglu KY, Alkhamis MA, Ben-Nun A, Lensky I, et al. Genetic characterization of spotted fever group rickettsiae in questing ixodid ticks collected in Israel and environmental risk factors for their infection. Parasitol 2017; 144:1088-1101.
262. Beati L, Meskini M, Thiers B, Raoult, D. *Rickettsia aeschlimannii* sp. nov.: a new spotted fever group Rickettsia associated with *Hyalomma marginatum* ticks. Int J Syst Bacteriol 1997; 47:548-554.
263. Wei QQ, Guo LP, Wang AD, Mu LM, Zhang K, Chen CF, et al. The first detection of *Rickettsia aeschlimannii* and *Rickettsia massiliae* in *Rhipicephalus turanicus* ticks in northwest China. Parasit Vectors 2015;8, 631.
264. Quarsten, H., Skarpaas, T., Fajš, L., Noraas, S., Kjelland, V., 2015. Tick-borne bacteria in *Ixodes ricinus* collected in Southern Norway evaluated by a commercial kit and established real-time PCR protocols. Ticks Tick-Borne Dis. 6, 538–544.
265. Holland CA, Kiechle FL. Point-of-care molecular diagnostic systems, past, present and future. Curr Opin Microbiol 2005; 8:504-509.

ANNEXOS

9 ANNEXOS

- ☰ Anna Ortuño, Isabel Sanfeliu, M.^a Mercè Nogueras, Imma Pons, Sonia López-Claessens, Joaquim Castellà, Esperança Antón, Ferran Segura. Detection of *Rickettsia massiliae*/Bar29 and *Rickettsia conorii* in red foxes (*Vulpes vulpes*) and their *Rhipicephalus sanguineus* complex ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2018; 9:629–631.

- ☰ N. Cardenosa, M. M. Nogueras, B. Font, F. Segura, T. Muñoz, I. Sanfeliu. Serological evidence of human infection with rickettsial strain Bar29 in Catalonia, northeastern Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006; 25:541–543.

- ☰ Mariela Quesada, Isabel Sanfeliu, Neus Cardenosa, Ferran Segura. Ten Years' Experience of Isolation of *Rickettsia* spp. from Blood Samples Using the Shell-Vial Cell Culture Assay. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006;1078: 578–581.

- ☰ Ferran Segura, Immaculada Pons, Isabel Sanfeliu, María-Mercedes Nogueras. Shell-vial culture, coupled with real-time PCR, applied to *Rickettsia conorii* and *Rickettsia massiliae*-Bar29 detection, improving the diagnosis of the Mediterranean spotted fever. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2016; 7 :457–461.