

Borelije i rikecije u bioptatima kože bolesnika s erythema migrans

Nenad PANDAK¹, prim., dr. med.,
specijalist infektolog
Hein SPRONG², dr. sc., dipl. ing. biologije
Ellen TIJSSE KLASSEN², dipl. ing.
biologije
Biserka TROŠELJ-VUKIĆ³, prof. dr. sc.,
dr. med., specijalist infektolog
Dragutin GOLUBIĆ⁴, dr. sc., dr. med.,
specijalist infektolog
Marijan ŠIŠKO¹, dr. med.,
specijalist infektolog
Božana MIKLAUŠIĆ¹, dr. med.,
specijalizant infektologije
Ivica ČABRAJA¹, dr. med.,
specijalist infektolog
Branka KRIŽANOVIĆ¹, dr. med.,
specijalist infektolog?

¹) Odjel za zarazne bolesti, Opća bolnica
Slavonski Brod

²) National Institute of Public Health and
Environment (RIVM), Bilthoven,
Nizozemska

³) Klinika za infektivne bolesti, Rijeka

⁴) Djelatnost infektologije, Županijska bolnica
Čakovec

Ključne riječi

borelije
rikecije
vrste

Key words

borrelia
rickettsia
species

Primljeno: 2011-07-06

Received: 2011-07-06

Prihvaćeno: 2011-09-07

Accepted: 2011-09-07

Znanstveni rad

Lyme-boreliozna je multisistemska upalna bolest koju uzrokuju spirohete kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato, a najčešće ih prenose krpelji *Ixodes ricinus*. U Hrvatskoj se malo zna o zastupljenosti pojedinih vrsta borelija koje izazivaju boreliozu. Obzirom da je isti vektor odgovoran za prenošenje rikecija na čovjeka, za pretpostaviti je da su moguće koinfekcije borelijama i rikecijama. Ovim se radom nastojalo utvrditi koje su vrste borelija uzrok erythema migrans na našem području, a istovremeno utvrditi koinfekcije rikecijama. Biopsijom kože aktivnog ruba erythema migrans su dobiveni uzorci u kojima su se molekularnim metodama dokazivale borelije i rikecije. Borelije su dokazane u 38/56 uzoraka, od čega je *B. afzelii* nađena u 36 bioptata kože. U 2 uzorka su nađene rikecije: *R. monacensis* i *R. bellii*. Ovaj rad je prvi opis *R. bellii* nađene u čovjeka u svijetu i prvi opis *R. monacensis* u Hrvatskoj. Neuobičajeno homogena zastupljenost *B. afzelii* i pronađene rikecije ukazuju na potrebu dodatnih istraživanja.

Borrelia and rickettsia in skin biopsates of erythema migrans patients

Scientific paper

Lyme borreliosis is a multisystem inflammatory disease caused by spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex which are usually transmitted by *Ixodes ricinus* ticks. In Croatia, little is known about the borrelia species prevalence. As the same vector is responsible for transmitting rickettsia, one should assume the possibility of borrelia and rickettsia coinfections. The purpose of this study was to identify borrelia species present in our environment and to establish if coinfections with rickettsias are present. Skin biopsy of erythema migrans active edge was performed, and samples were analyzed by molecular methods. Borrelia were found in 38/56 samples, out of which 36 *B. afzelii* were detected. In two samples rickettsia were found: *R. monacensis* and *R. bellii*. This paper is the first description of *R. bellii* detected in human tissue in the world and the first description of *R. monacensis* in Croatia. Unusual homogeneous *B. afzelii* prevalence as well as detected rickettsia point out the need for further investigations.

Uvod

Lyme boreliozna (LB) je multisistemska upalna bolest koju uzrokuju spirohete kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.), a najčešće ih prenose krpelji *Ixodes ricinus*. Prema današnjim spoznajama, *B. burgdorferi* s.l. kompleks obuhvaća 18 genotipova, ali nisu sve borelije iz ovog kompleksa patogene za čovjeka. Najčešći uzročnici bolesti u Europi su *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto (*B. burgdorferi* s.s.), *B. bavariensis* (ranijeg naziva *B. garinii* OspA serotip 4), a tek naknadno je dokazano da bolest u čovjeka mogu uzrokovati i *B. valaisiana* te *B. spielmanii*. Patogenost *B. lusitanae* i *B. bissetii* još uvijek nije nedvojbeno dokazana [1]. Premda sve patogene borelije mogu izazvati erythema migrans, kožnu promjenu tipičnu za prvi stadij bolesti, pojedini genotipovi borelija se povezuju s određenim kliničkim manifestacijama borelioze, pa se *B. burgdorferi* s.s. najčešće povezuje s artritisom i neuroboreliozom, *B. garinii* s neuroboreliozom, a *B. afzelii* s acrodermatitis chronica atrophicans [2].

Rikecije su gram-negativne, striktno intracelularne bakterije koje su serološkim i molekularnim metodama svrstane u tri grupe: rikecije osipnih groznica (ROG), rikecije pjegavih tifusa (PT) i arhaične rikecije (AR). Do danas je poznato preko 20 vrsta rikecija koje izazivaju osipne groznice, a njihov vektor je krpelj. U grupu pjegavih tifusa su uvrštene 2 rikecije, a prenose ih buhe i uši. U arhaične rikecije su uvrštene *Rickettsia bellii* (*R. bellii*) i *Rickettsia canadensis* (*R. canadensis*). One su otkrivene samo u krpeljima i do sada nikada nije nedvojbeno potvrđeno da su patogene za čovjeka [3].

Prema epidemiološkim studijama procjenjuje se da u Europi svake godine od borelioze oboli oko 65.000 ljudi. Uspoređujući različite lokalitete, incidencija LB je vrlo različita i kreće se od jednog do 350 novooboljelih na 100.000 stanovnika. Najviša incidencija u Europi se bilježi na području Slovenije, Austrije i Njemačke te na baltičkoj obali Švedske, kao i na nekim finskim i estonskim otocima [4]. Iako je LB u Hrvatskoj bolest koja se prijavljuje, njezina prava učestalost ipak nije poznata. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, godišnje se prijavi 200–450 oboljelih od Lyme borelioze. Bolest se najčešće javlja u sjevero-zapadnom dijelu zemlje, koji se naslanja na područje na kojem je LB u Europi najčešća, pa se na području Međimurske županije bilježi najveći broj bolesnika [5].

Rikecioze su bolesti koje su opisane u cijelom svijetu osim na Antarktici. Ove bolesti prate čovječanstvo kroz cijelu njegovu povijest. U Hrvatskoj su rikecioze zabilježene u Dalmaciji gdje se Mediteranska pjegava groznica javlja tijekom ljetnih mjeseci, a zabilježena je i visoka seroprevalencija na rikecije, uzročnike pjegavih groznica [6, 7]. Seroepidemiološka istraživanja su potvrdila da je i populacija u istočnim dijelovima Hrvatske bila u kontaktu

s rikacijama, kako s *R. conorii*, uzročnikom Mediteranske pjegave groznice, tako i s "novijim" rikacijama, najvjerojatnije *R. slovaca* [8].

U Hrvatskoj se relativno malo zna o zastupljenosti pojedinih vrsta borelija u bolesnika s LB premda je njezina prisutnost u Hrvatskoj dokazana 1992. godine [9]. Kako su pojedine vrste borelija češći uzročnici određenih kliničkih manifestacija borelioze, zastupljenost vrsta bi mogla ukazati u kojem pravcu treba usmjeriti pažnju liječnika. Obzirom da je krpelj zajednički vektor i borelija i rikecija, za pretpostaviti je da su moguće simultane infekcije borelijama i rikacijama. Namjera ovog istraživanja je da se pokuša odgovoriti na ova pitanja te da se upotpune dosadašnja znanja o vektorskim bolestima.

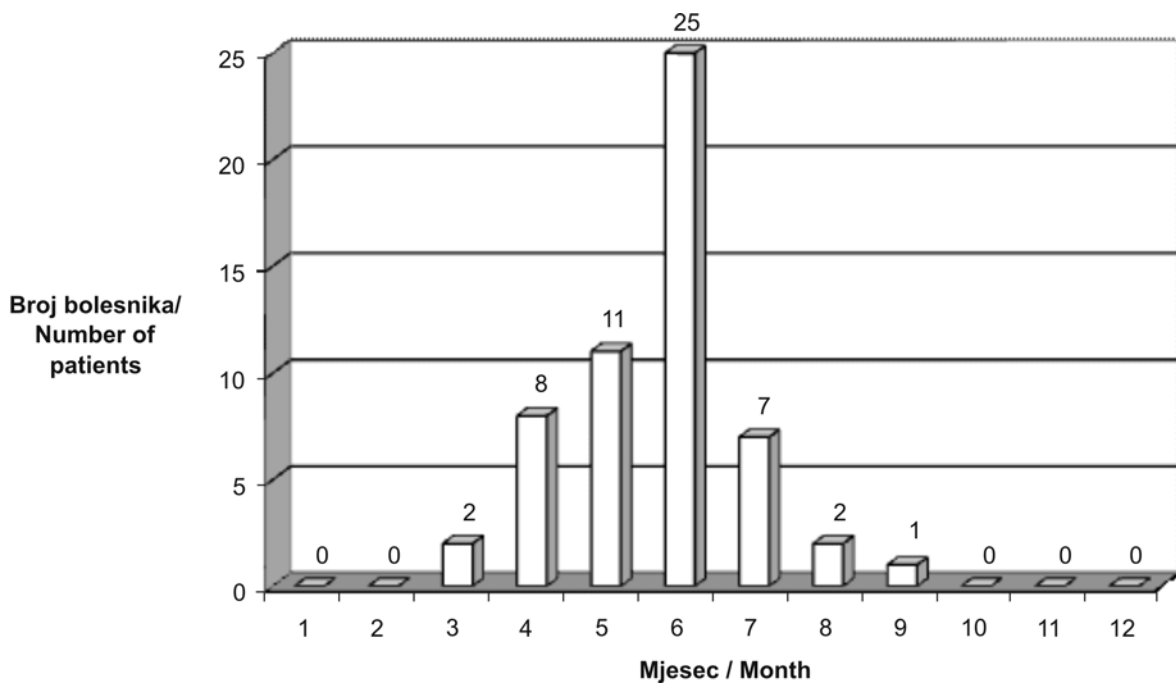
Ispitanici i metode

Plan ispitivanja je odobrilo Etičko povjerenstvo Opće bolnice "Dr. Josip Benčević" u Slavanskom Brodu, nakon čega je u vremenskom periodu 2008. – 2010. godine organizirano provođenje ispitivanja u tri centra: Slavonski Brod, Rijeka i Čakovec. U eksperiment su uključivani bolesnici s erythema migrans (EM), koji su upoznati sa svrhom i načinom ispitivanja te su osobnim potpisom potvrdili svoju suglasnost za uključivanje u studiju.

Dijagnoza EM je postavljena prema kriterijima Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (*Centers for Disease Control and Prevention*) [9]. U bolesnika su evidentirani podaci o starosti, spolu, vremenu nastanka bolesti, tipu kožne promjene te o prisutnosti povišene tjelesne temperature, poremećaja općeg stanja ili lokalnih tegoba tipa svrbeža i/ili peckanja. Svim ispitanicama je učinjena biopsija aktivnog ruba kožne promjene, a dobiveni biopstat je pohranjen u 70 % otopinu etilnog alkohola. Uzorci su pohranjeni na –20 °C gdje su čuvani do transporta u Laboratorij za zoonoze i okolišnu mikrobiologiju Nacionalnog zavoda za javno zdravstvo i okoliš u Bilthovenu, Nizozemska (*National Institute for Public Health and the Environment* (RIVM), *Laboratory for Zoonoses and Environmental Microbiology*). Uzorci su analizirani testom *Brilliant Quantitative PCR core reagent* (Stratagene, La Jolla, SAD) radi određivanja prisutnog genotipa borelija, a testom *Expand High Fidelity plus PCR System* (Roche, Njemačka) je određivana prisutnost rikecija.

Rezultati

U promatranom razdoblju je u ispitivanje uključeno ukupno 56 bolesnika i to 28 u Slavanskom Brodu, 11 u Rijeci te 17 u Čakovcu. Radilo se o podjednakom broju žena (29) i muškaraca (27). Prosječna starost ispitanika je bila 42,5 (raspon 5–82) godine. Na slici 1 je prikazana raspodjela bolesnika prema mjesecu kada se na koži po-



Slika 1. Raspodjela bolesnika prema mjesecu kada se pojavio erythema migrans
Figure 1. Monthly distribution of patients according to erythema migrans onset

javio EM. U 31 (55 %) bolesnika je EM imao prstenastu formu, dok je homogeno crvena kožna promjena zabilježena u 25 (45 %) bolesnika. Najčešće tegobe koje su ispitanici opisivali su bili svrbež i/ili peckanje u predjelu same kožne promjene, na što se žalilo 39 (70 %) bolesnika. Samo dva bolesnika su imala povišenu tjelesnu temperaturu $>38^{\circ}\text{C}$, dok je jedan bolesnik imao i perifernu kljenut ličnog živca. Bez ikakvih tegoba je bilo 14 (25 %) bolesnika.

B. burgdorferi s.l. kompleks je dokazan u 38 (68 %) uzoraka kože od čega je u samo 2 uzorka nađena *B. garinii*, dok je u ostalih 36 nađena *B. afzelii*. U dva biopata kože su nađene rikcije: u jednom *Rickettsia monacensis* (*R. monacensis*), a u drugom *R. bellii*. Obje rikcije su nađene u uzorcima kože u kojima je istovremeno dokazana i *B. afzelii*. Raspodjela vrsta izoliranih borelija prema ispitivačkim mjestima je prikazana u Tablici 1. Obje rikcije su nađene u biopstatima kože bolesnika iz Slavenskog Broda.

Rasprava

Zemljopisna zastupljenost i distribucija pojedinih vrsta borelija u svijetu je različita. U Sjedinjenim Američkim Državama boreliozu izaziva samo *B. burgdorferi* s.s, za razliku od Europe gdje su zastupljene različite patogene vrste borelija [11]. Istraživanja u brojnim zemljama pokazuju da su u Europi najčešće zastupljene *B. garinii* i *B. afzelii*, ali se njihova zemljopisna rasprostranjenost razlikuje, pa je *B. garinii* češće prisutna u zapadnoj Europi, a *B. afzelii* u centralnoj, istočnoj i sjevernoj Europi, uključujući i Skandinaviju [12]. Informacije o zastupljenosti različitih vrsta borelija se gotovo svakodnevno mijenjaju, obzirom da se intenzivno provode brojna istraživanja koja i dalje potvrđuju da su u Europi najčešće zastupljene *B. garinii* i *B. afzelii* s različitim predominacijama na pojedinim ispitivanim područjima [13–15]. Prema dosadašnjim malobrojnim istraživanjima, zastupljenost pojedinih

Tablica 1. Raspodjela broja izoliranih borelija prema mjestu izolacije

Table 1. Distribution of Borrelia species according to isolation site

Mjesto izolacije / Isolation site	Vrsta izolata/Isolate type						Ukupno/Total
	<i>Borrelia afzelii</i>		<i>Borrelia garinii</i>		Bez izolata/No isolate		
	Br./No.	%	Br./No.	%	Br./No.	%	
Slavonski Brod	19	67,86	1	3,57	8	28,57	28
Rijeka	5	45,45	1	9,09	5	45,45	11
Čakovec	12	70,59	0	0	5	29,41	17
Ukupno/Total	36	64,29	2	3,57	18	32,14	56

vrsta borelija u Hrvatskoj je slična onoj u ostalim dijelovima Europe, pa je Golubić utvrdio da je u krpeljima ulovljenim u Međimurju prisutno 64,2 % *B. afzelii*, 26,8 % *B. valaisiana*, 9 % *B. garinii* te 3,6 % *B. burgdorferi* s.s. [5]. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je distribucija vrsta koji su izazvali bolest u naših bolesnika vrlo homogena u korist *B. afzelii*. Premda je u ispitivanje uključeno relativno malo bolesnika, pa se definitivni zaključak o učestalosti vrsta borelija ne može donijeti, uzorkovanje na tri udaljene lokacije donekle osigurava objektivnost zaključcima. Nedvojbeno je potrebno nastaviti ispitivanje da se stekne pravi uvid u distribuciju pojedinih genotipova na našem području. Rezultati ove studije su sukladni s rezultatima dosadašnjih istraživanja provedenih u našem okruženju, koja također ukazuju na značajno češću pojavnost *B. afzelii* [16, 17].

Obzirom da su pojedine vrste borelija povezane s određenim kliničkim manifestacijama u kasnijim stadijima bolesti, rađene su i studije kojima se nastojalo u prvom stadiju boreliozе, kad je prisutna patognomonična kožna promjena EM, utvrditi povezanost određenih epidemioloških i kliničkih pokazatelja s određenim vrstama borelija. Carlsson i suradnici su zaključili da *B. garinii* češće izaziva homogeni tip EM, za razliku od *B. afzelii* koja uzrokuje anularni oblik kožne promjene. Jednako su tako zaključili da su homogeni EM veći i da se brže šire [18]. Drugi su autori uočili da su bolesnici koji imaju EM uzrokovan *B. garinii* stariji, da im se kožna promjena najčešće nalazi na trupu, a ne na ekstremitetima te da se češće žale na lokalne simptome i bol u mišićima [19]. U naših ispitanika je u podjednakom omjeru utvrđen prstenasti odnosno homogeni tip EM, a u samo dva bolesnika je bila prisutna povišena temperatura >38°C. Istovremeno se na lokalne tegobe žalilo 70 % bolesnika. Podatak da je u naših ispitanika bolest gotovo isključivo izazvala *B. afzelii*, govori da se ne bi smjelo na osnovu epidemioloških i kliničkih pokazatelja govoriti o vrsti borelija kao mogućem uzročniku određenog tipa EM.

Do danas je u svijetu otkriveno oko 20 rikecija koje su svrstane u grupu ROG, a karakteristično za ove bakterije je da su im krpelji prenosioci, ali i rezervoari. U Hrvatskoj je u početku dokazana prisutnost rikecija u krpeljima *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus sanguineus* (*R. sanguineus*) i *Hyalomma marginatum*. To su krpelji koji obitavaju na području mediteranske Hrvatske. Pojedine rikecije prenose određeni krpelji, pa je poznato da je *R. sanguineus* vektor *R. conorii*. Stoga se Mediteranska pjegava groznica, koju izaziva ova rikecija, pojavljuje samo na području mediteranske Hrvatske gdje obitava *R. sanguineus* [20, 21]. Kontinentalnu Hrvatsku u najvećem broju obitava krpelj *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) te krpelji roda *Dermacentor*, pa je bilo za očekivati da su druge rikecije prisutne u sjevernim dijelovima Hrvatske. Takve su se pretpostavke i potvrdile kad su *R. helvetica* i *R. slovaca* nađene u krpeljima *Dermacentor reticulatus* [22].

R. monacensis spada u grupu rikecija čiji je vektor *I. ricinus*. Prvi je put otkrivena 2002. godine kad je nađena u krpelju *I. ricinus* ulovljenom u jednom minhenskom parku [23]. Nedvojbeno je dokazano da uzrokuje febrilnu bolest praćenu osipom, a do sada je njena prisutnost dokazana u nekoliko europskih zemalja [24–27]. Ovaj rad predstavlja prvi dokaz *R. monacensis* u Hrvatskoj, a njenu prisutnost na našem području je bilo i za očekivati, obzirom na brojnu populaciju njezina vektora.

R. bellii posjeduje svojstva kojima je nalik na rikecije grupe ROG, ali i onima iz grupe PT. Ipak, molekularnim metodama je dokazano da se radi o pripadniku potpuno zasebne grupe AR, a smatra se da nije patogena za čovjeka [28]. Do sad je pronađena samo u krpeljima, a najčešće ju opisuju u istraživanjima provedenim u Južnoj Americi. Pronađena je u krpeljima *Amblyoma*, kojih nema u Europi, ali i u krpeljima roda *Dermacentor* i *Haemaphysalis* koji obitavaju u Europi [29–31]. Iznimno rijetko se *R. bellii* spominje u Europi, a tu je nađena u krpeljima *I. ricinus*, koji je i najčešći krpelj u kontinentalnoj Hrvatskoj [32]. Dokaz *R. bellii* u biotatu kože našeg ispitanika je iznimno intrigantan jer je to prvi pronalazak ove rikecije u čovjeka u svijetu. Njen dokaz u ispitivanom tkivu otvara mogućnost razmišljanju da je i ova rikecija patogena za čovjeka.

Zaključak

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na značajno homogenu zastupljenost jedne vrste borelija na našem području. Nameće se potreba provjere ovih podataka nastavkom ispitivanja i uključivanjem većeg broja ispitanika u studiju. Jednako tako se nameće mogućnost da su sistemski simptomi bolesti, koji ponekad prate prvi stadij boreliozе, mogući rezultat koinfekcije drugim mikroorganizmima koje zaraženi vektor istovremeno prenese na bolesnika. U ovom radu se prvi puta opisuje infekcija *R. monacensis* u Hrvatskoj, ali i prvi dokaz *R. bellii* u čovjeka uopće, što ukazuje na potrebu dodatnih istraživanja kojima bi se proširila naša saznanja o bolestima koje prenose vektori.

Literatura

- [1] Stanek G, Reiter M. The expanding Lyme Borrelia complex – clinical significance of genomic species? Clin Microbiol Infect 2011; 17: 487–93.
- [2] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Factsheet for health professionals (Lyme disease). Updated 16 June 2010. Dostupno na: http://www.ecdc.europa.eu/en/health-topics/tick_borne_diseases/lyme_disease/basic_facts/Pages/factsheet_health_professionals.aspx
- [3] Dobler G, Wolfel R. Typhus and other rickettsioses. Emerg Infect Dis 2009; 15: 348–54.
- [4] Hubalek Z. Epidemiology of Lyme borreliosis. Curr Probl Dermatol 2009; 37: 31–50.

- [5] Golubić D. Epidemiološke, ekološke i kliničke karakteristike Lyme borelioze u sjeverozapadnoj Hrvatskoj /Doktorska disertacija/. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1997.
- [6] Punda-Polić V, Klismanić Z, Capkun V, and Bradarić N. Demographic and epidemiologic features of Mediterranean spotted fever cases in the region of Split, Croatia. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 990: 143–8.
- [7] Punda-Polić V, Klismanić Z, Capkun V. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in the region of Split (southern Croatia). *Eur J Epidemiol* 2003; 18: 451–5.
- [8] Topolovec J, Puntarić D, Antolović-Pozgain A. i sur. Serologically detected "new" tick-borne zoonoses in eastern Croatia. *Croat Med J* 2003; 44: 626–9.
- [9] Bolanča-Bumber S. Uloga *B. burgdorferi* u etiopatogenezi kožnih manifestacija Lyme bolesti /Doktorska disertacija/. Zageb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1992.
- [10] Centers for Disease Control: Lyme disease surveillance – United States 1989–1990. *MMMR* 1991; 40: 417–21.
- [11] Hildenbrand P, Craven DE, Jones R, Nemeskal P. Lyme neuroborreliosis: manifestations of a rapidly emerging zoonosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 2009; 30: 1079–87.
- [12] Lindgren E, Jaenson TGT. Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. World Health Organization, 2006.
- [13] Kjelland V, Stuen S, Skarpaas T, Slettan A. Prevalence and genotypes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in *Ixodes ricinus* ticks in southern Norway. *Scand J Infect Dis* 2010; 42: 579–85.
- [14] Hulinska D, Votypka J, Kriz B, Holinkova N, Novakova J, Hulinsky V. Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia* spp. isolated from *Ixodes ricinus* ticks by using electrophoretic chips and real-time polymerase chain reaction. *Folia Microbiol (Praha)* 2007; 52: 315–24.
- [15] Cerar T, Ružić-Sabljić E, Glinsek U, Zore A, Strle F. Comparison of PCR methods and culture for the detection of *Borrelia* spp. in patients with erythema migrans. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 653–8.
- [16] Šitum M. Dijagnostika lajmske bolesti pomoću lančaste polimerazne reakcije – istraživanje u Hrvatskoj /Doktorska disertacija/. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1998.
- [17] Ružić-Sabljić E, Strle F, Cimperman J, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Pleterski-Rigler D. Characterisation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from patients with skin manifestations of Lyme borreliosis residing in Slovenia. *J Med Microbiol* 2000; 49: 47–53.
- [18] Carlsson SA, Granlund H, Jansson C, Nyman D, Wahlberg P. Characteristics of Erythema migrans in *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii* infections. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 31–3.
- [19] Logar M, Ružić-Sabljić E, Maraspin V. i sur. Comparison of Erythema migrans caused by *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. *Infection* 2004; 32: 15–9.
- [20] Punda-Polić V, Petrovec M, Trilar T. I sur. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in ticks collected in southern Croatia. *Exp Appl Acarol* 2002; 28: 169–76.
- [21] Sardelić S, Fournier PE, Punda Polić V. i sur. First isolation of *Rickettsia conorii* from human blood in Croatia. *Croat Med J* 2003; 44: 630–4.
- [22] Dobec M, Golubić D, Punda-Polić V, Kaeppli F, Sievers M. *Rickettsia helvetica* in *Dermacentor reticulatus* ticks. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 98–100.
- [23] Simser JA, Palmer AT, Fingerle V, Wilske B, Kurtti TJ, Munderloh UG. *Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group Rickettsia, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 4559–66.
- [24] Sréter-Lancz Z, Sréter T, Széll Z, Egyed L. Molecular evidence of *Rickettsia helvetica* and *R. monacensis* infections in *Ixodes ricinus* from Hungary. *Ann Trop Med Parasitol* 2005; 99: 325–30.
- [25] Floris R, Yurtman AN, Margoni EF. i sur. Detection and identification of Rickettsia species in the northeast of Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8: 777–82.
- [26] Márquez FJ. Spotted fever group Rickettsia in ticks from south-eastern Spain natural parks. *Exp Appl Acarol* 2008; 45: 185–94.
- [27] Radulović Z, Chochlakis D, Tomanović S, Milutinović M, Tselentis Y, Psaroulaki A. First detection of spotted fever group Rickettsiae in ticks in Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11: 111–5.
- [28] Stothard DR, Clark JB, Fuerst PA. Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from the spotted fever and typhus groups of Rickettsia and antiquity of the genus Rickettsia. *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44: 798–804.
- [29] Sabatini GS, Pinter A, Nieri-Bastos FA, Marcili A, Labruna MB. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an Atlantic rain forest reserve in the State of Sao Paulo, Brazil. *J Med Entomol* 2010; 47: 913–6.
- [30] Carmichael JR, Fuerst PA. Molecular detection of *Rickettsia bellii*, *Rickettsia montanensis*, and *Rickettsia rickettsii* in a *Dermacentor variabilis* tick from nature. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; 10: 111–5.
- [31] Labruna MB, Pacheco RC, Richtzenhain LJ, Szabo MP. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of Sao Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 869–73.
- [32] Sprong H, Wielinga PR, Fonville M. i sur. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne Rickettsia species. *Parasit Vectors* 2009; 2: 41.