

**VETERINARIA
ITALIANA**

COLLANA DI MONOGRAFIE

Heartwater
Idropericardite infettiva dei ruminanti

Ilaria Pascucci - Gianluca Pressi

Monografia **21**



Istituto Zooprofilattico
Sperimentale
dell'Abruzzo e del Molise
"G. Caporale"
Campo Boario
64100 Teramo – Italia
Tel. +39 0861 3321
Fax +39 0861 332251
www.izs.it



*Questa rivista
è nata nel 1950 con il
nome di Croce Azzurra.
Dal 1954 si chiamerà
Veterinaria Italiana.*

Direttore responsabile

Vincenzo Caporale

Segreteria di redazione

Monica Bucciarelli, Rossella Lelli, Carlo Turilli

Amministrazione

Istituto Zooprofilattico Sperimentale
dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale',
Campo Boario, 64100 Teramo, Italia

Progetto grafico e impaginazione

Paola Di Giuseppe, IZS A&M

Stampa

Giservice srl, Teramo, Italia

http://www.izs.it/vet_italiana/index.html

© 2007 Istituto Zooprofilattico Sperimentale
dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" (IZS A&M),
Campo Boario, 64100 Teramo, Italia

ISBN 88-9017-257-6

Stampato su carta ecologica TCF

Aut. Trib. Teramo n. 299 del 16/05/1990 –
Sped. In Abb. Post. Art. 2 comma 20/c –
L. 662/96 DCB/DC Abruzzo Pescara

Monografia **21**

Introduzione	5
Definizione	5
Importanza economica e sanitaria	6
L'agente eziologico	6
Il vettore	10
L'ospite	14
Epidemiologia	16
Sintomatologia	18
Prognosi	20
Lesioni anatomico-patologiche	20
L'immunità	22
La diagnosi	23
Controllo e terapia	27
Prevenzione	28
Heartwater: un possibile rischio per l'Italia?	29
Ringraziamenti	41
Bibliografia	42

Special issue **21**

Introduction	49
Definition	49
Health and economic significance	49
Aetiology	50
Vector	54
Host	58
Epidemiology	60
Clinical signs	62
Prognosis	63
Post mortem findings	64
Immunity	66
Diagnosis	66
Control and treatment	70
Prevention	71
Heartwater: a possible risk for Italy?	72
Aknowledgments	83
References	84

Introduzione

Le malattie trasmesse da zecche o *Tick Borne Diseases* (TBD) in Africa rappresentano dal punto di vista economico forse la più importante causa di perdite nel settore dell'allevamento del bestiame ed in particolare in quello dei ruminanti.

Questo gruppo di malattie assume ancor maggior rilevanza se inserito in una prospettiva di miglioramento ed espansione del settore zootecnico.

La cowdriosi o idropericardite infettiva dei ruminanti ovvero heartwater è una rickettsiosi infettiva, non contagiosa, trasmessa da zecche che colpisce i bovini, le pecore, le capre ed alcuni ruminanti selvatici, inserita nella ex lista B dell'OIE. È una patologia tipica, anche se non esclusiva, del continente africano dove il suo impatto economico sui ruminanti domestici è secondario solamente a quello dell'*East Coast fever* e delle tripanosomi. Se i ruminanti selvatici svolgono spesso il ruolo di *reservoir* sviluppando la

forma asintomatica, sono soprattutto i bovini domestici ed in particolare le razze esotiche di nuova introduzione ad essere maggiormente suscettibili alla malattia, che rappresenta così uno dei maggiori ostacoli al miglioramento genetico della popolazione animale nei paesi a sud del Sahara.

L'interesse che i ricercatori internazionali hanno prestato a questa affezione è giustificato non solo dall'impatto economico sulle produzioni zootecniche, ma anche dalla sua complessa epidemiologia che la rende un potenziale pericolo anche per paesi indenni.

Se l'origine eziologica è da tempo conosciuta, rimangono a tutt'oggi da chiarire molti aspetti riguardanti la complessa epidemiologia di heartwater; d'altro canto l'utilizzo di tecnologie altamente innovative quali i GIS (*Geographic Information System*) può fornire un nuovo approccio allo studio delle malattie esotiche trasmesse da vettori a rischio d'introduzione in aree indenni.

Definizione

Heartwater è un'infezione trasmissibile e non contagiosa che colpisce ruminanti domestici e selvatici, causata da una rickettsia e trasmessa da zecche.

L'agente causale è *Ehrlichia ruminantium* già

conosciuta come *Cowdria ruminantium* ed ancora precedentemente come *Rickettsia ruminantium*, mentre le zecche responsabili della trasmissione sono Ixodidi appartenenti al genere *Amblyomma*.

Importanza economica e sanitaria

L'importanza assunta da heartwater nel continente africano è legata a diversi aspetti:

- si presenta come uno fra i maggiori ostacoli all'introduzione di animali esotici ad elevata produzione utilizzabili per il miglioramento o la sostituzione di mandrie locali (85);
- è uno dei principali problemi sanitari che devono affrontare popolazioni animali autoctone quando, spesso per scarsità di pascolo, si spostano da zone libere a zone infette (15);
- è una costante minaccia per i gruppi di

animali che si spostano da zone "free" in aree di endemia. Gli effetti dei bagni anti-parassitari (*dipping*) e dei cambiamenti ambientali possono influenzare la stabilità endemica della malattia (90, 92);

- è una minaccia per aree, come il continente americano, dove vettori potenziali (zecche del genere *Amblyomma*) sono presenti o anche per zone dove il vettore non è presente, ma dove potrebbe essere introdotto e stabilirsi qualora esistano condizioni favorevoli al suo insediamento (8, 67, 100).

L'agente eziologico

La sistematica

Ehrlichia ruminantium è un batterio intracellulare appartenente all'ordine *Rickettsiales*, famiglia *Ehrlichiae*, tribù *Ehrlichiae*, fino a poco tempo fa assegnato al genere *Cowdria* (tabella I).

Attualmente, in base a studi condotti sulla sequenza del gene codificante la subunità 16S dell'RNA ribosomiale, è stata proposta una riclassificazione dell'ordine. Le indagini, tuttora in corso, hanno distinto all'interno dell'ordine *Rickettsiales* cinque geno-gruppi, schematizzati nella figura 1:

Tabella I. Precedente classificazione di *Cowdria ruminantium*.

Regno	Proteobacteria
Classe	Rhodospirilli
Ordine	Rickettsiales
Famiglia	Ehrlichiae
Genere	Cowdria

Geno-gruppo 1 al quale appartengono: *Cowdria ruminantium*, *Ehrlichia canis* (agente dell'ehrlichiosi monocitaria canina), *Ehrlichia ewingii* (agente dell'ehrlichiosi granulocitica canina), *Ehrlichia chaffensis* (agente dell'erlichiosi monocitaria umana) ed *Ehrlichia muris*. La correlazione genetica tra le specie di questo geno-gruppo è superiore al 97,7%, anche in virtù di ciò *Cowdria ruminantium* è stata rinominata *Ehrlichia ruminantium* ed il genogruppo è andato a costituire il genere **Ehrlichia**.

Geno-gruppo 2 al quale appartengono: *Anaplasma marginale* (parassita delle emazie, agente dell'anaplasmosi dei ruminanti), *Ehrlichia equi* (agente dell'ehrlichiosi degli equini), *Ehrlichia phagocytophila* (agente dell'ehrlichiosi granulocitica dei ruminanti) e l'ehrlichia agente dell'ehrlichiosi granulocitica umana (*Human Granulocytic Ehrlichiosis*); queste ultime tre attualmente sono considerate come un'unica specie

denominata *Anaplasma phagocytophilum*. A queste si aggiungono *Ehrlichia platys* ed *Ehrlichia bovis*. Tutto il geno-gruppo è andato a costituire il genere **Anaplasma** (40).

Geno-gruppo 3 al quale appartengono *Wolbachia pipiens* ed altri endosimbionti di artropodi.

Geno-gruppo 4 al quale appartengono *Neorickettsia helmitotoeca* agente, nel continente americano, dell'avvelenamento da salmonidi del cane, nonché due agenti patogeni che, in base alla sola morfologia, erano stati precedentemente classificati come *Ehrlichia*: *Ehrlichia risticii*, agente della "Potomac horse fever" ed *Ehrlichia sennetsu*, agente della febbre Sennetsu. Attualmente, in base a caratteristiche genetiche nonché a strette affinità antigeniche e biologiche (riconoscono non artro-

podì come vettori, ma trematodi parassiti di molluschi), esse sono state riclassificate nel genere **Neorickettsia**.

Geno-gruppo 5 al quale appartiene il genere **Rickettsia**, trasmesso da artropodi, importante principalmente in medicina umana, tra cui *Rickettsia prowazekii* trasmessa dai pidocchi del corpo (*Pediculus humanus corporis*) ed agente del tifo petecchiale, *Rickettsia typhi* trasmessa dalle pulci, principalmente da *Pulex irritans*, e le Rickettsie appartenenti al gruppo "Spotted fever" tra cui *Rickettsia rickettsii* patogena anche per il cane nonché l'unico rappresentante del genere **Orientia**: *Orientia tsutsugamushi* (58).

Resistenza

Ehrlichia ruminantium è un organismo estremamente fragile. Scompare dall'animale

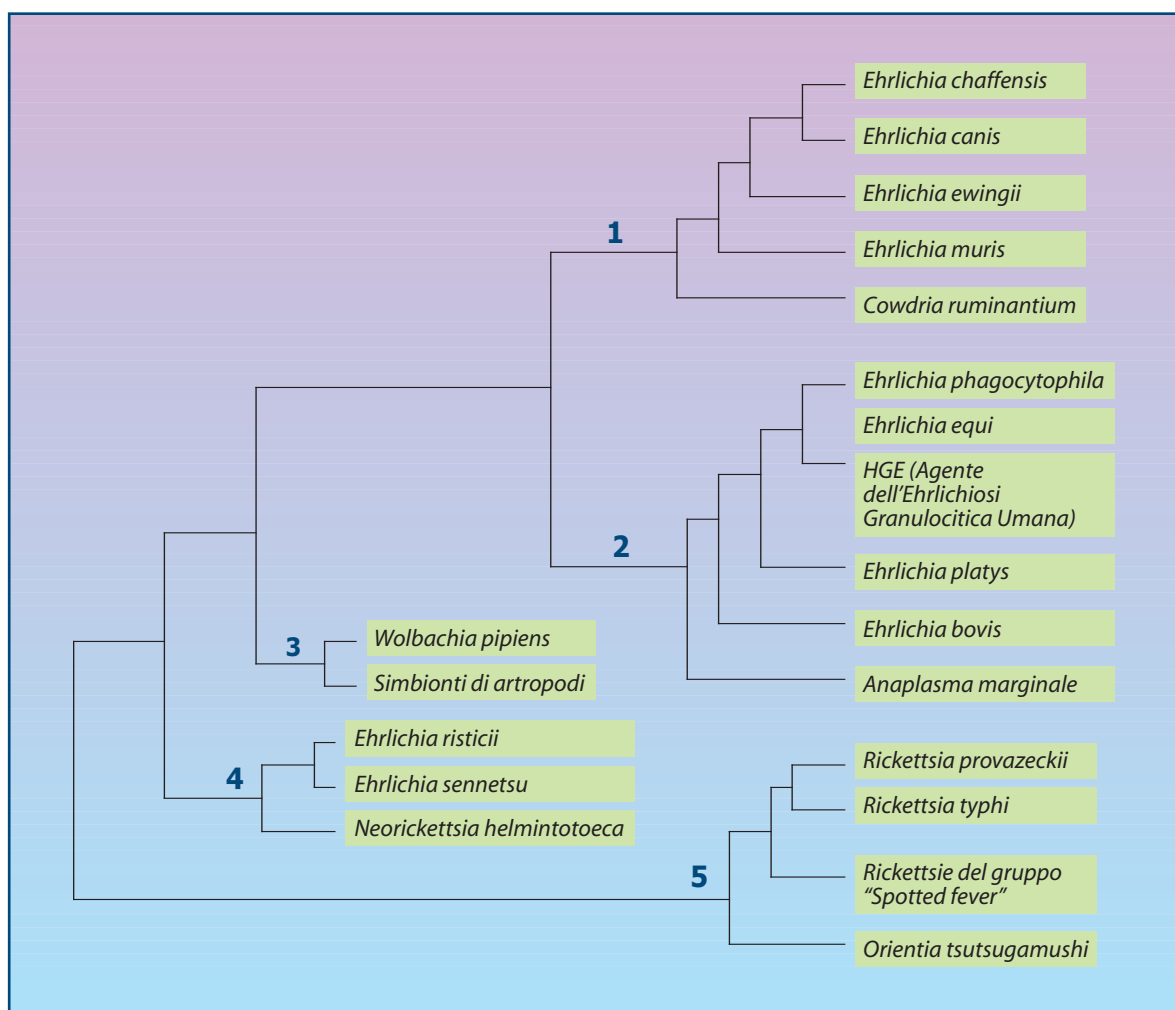


Figura 1. Classificazione dell'ordine Rickettsiales (60).

morto circa 6 ore dopo il decesso (30); all'instaurarsi dei processi putrefattivi, il sangue perde il suo potere infettante se esposto al sole per 5 minuti (31), mentre nel cervello dell'animale morto si mantiene per 5 ore a 5°C e 3 giorni a 4°C (46).

Lo stoccaggio a temperature molto basse è il metodo di elezione per la conservazione del microorganismo al di fuori della zecca (24).

Struttura e caratteristiche genetiche

Ehrlichia ruminantium è un microorganismo parassita intracellulare obbligato, dotato di notevole pleomorfismo. Esso si localizza principalmente nelle cellule endoteliali dei ruminanti sebbene venga riportato anche nei leucociti circolanti degli stessi durante la fase febbrile, nonché nei macrofagi peritoneali di topo (solo per alcuni isolati).

Lo studio dell'ultrastruttura di *Ehrlichia ruminantium* condotto tramite l'uso del microscopio elettronico a trasmissione sulle cellule dell'ospite e sulle cellule del vettore, ha dimostrato che la moltiplicazione di *Ehrlichia ruminantium* avviene all'interno di vacuoli intracitoplasmatici bordati di una doppia membrana (morule) (figura 2).

Come per le altre specie di *Ehrlichia* lo studio al microscopio elettronico rivela la presenza di due principali forme: una, considerata la forma infettante, definita "corpo elementare" che aderisce e penetra, probabilmente attraverso fenomeni di fagocitosi, nelle cellule endoteliali e che si moltiplica all'interno del

vacuolo dando origine alla morula; l'altra, considerata la forma vegetativa, definita "corpo reticolato" di maggiori dimensioni e meno elettrondensa rispetto alla prima. È stata spesso riscontrata una terza forma, definita "corpo intermedio", di dimensioni e caratteristiche intermedie tra le precedenti.

Gli studi condotti *in vitro* su colture cellulari evidenziano circa 2-3 giorni dopo l'infezione la comparsa di corpi reticolati, 3-5 giorni dopo la comparsa di corpi intermedi e, quindi, a distanza di 4-6 giorni, la rottura della cellula ospite con la conseguente fuoriuscita di centinaia di corpi elementari pronti per infettare nuove cellule (15, 71, 85).

La dimensione del genoma di *Ehrlichia ruminantium* è stimata attorno alle 1500kb; sebbene il totale sequenziamento dello stesso non sia ancora completo, la sequenza di due tra i più importanti geni è oramai da tempo conosciuta: una codificante per RNA della subunità ribosomiale 16S e l'altra codificante per il gene MAP1. Il gene 16S è stato sequenziato per precisare la posizione tassonomica di *Ehrlichia ruminantium* e per sviluppare test di diagnostica molecolare. Il gene MAP1 codifica la maggiore proteina immunodominante di superficie. Esso è costituito da sequenze che si conservano costanti in tutti gli isolati e da tre regioni ipervariabili diverse tra gli stessi; quindi, se da un lato la struttura costante della proteina la renderebbe un ottimo candidato allo sviluppo di test per la sierodiagnosi, lo studio dei polimorfismi risulta utile per la tipizzazione molecolare degli isolati (28, 33). Nel caso di *Ehrlichia ruminantium* è più corretto parlare di isolati o di stocks e non di ceppi in quanto la caratterizzazione non è sufficientemente precisa, ciò nonostante in molti lavori presenti in bibliografia i termini ceppo, isolato o stock vengono usati indifferentemente.

La presenza di diversità antigeniche, testimoniata dalla mancanza d'immunità crociata tra i diversi isolati, è confermata sia da prove di laboratorio (infezione sperimentale) che da studi di campo. Durante il corso degli anni sono stati isolati numerosissimi ceppi identificati con il nome del paese o dell'allevamento di origine e caratterizzati in base a patogenici-

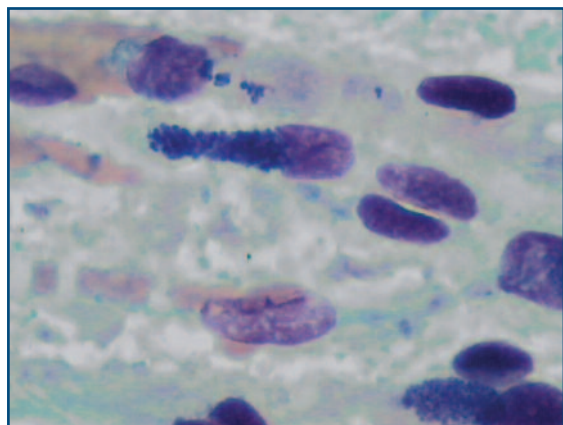


Figura 2. Morula all'interno di cellule endoteliali di bovino (100x May Grunwald-Giemsa).

tà ed infettività verso gli ospiti naturali e verso i topi di laboratorio.

La caratterizzazione delle diversità antigeniche è il primo e fondamentale passo da compiere per lo sviluppo di un vaccino in grado di fornire cross-protezione nei confronti di tutti gli isolati (17).

Localizzazione

Nell'ospite

Ehrlichia ruminantium è in grado di infettare le cellule endoteliali, le cellule della linea mieloblastica e di quella monoblastica dei ruminanti e, sperimentalmente, del topo (40). È stata rinvenuta con facilità all'interno delle cellule endoteliali dei capillari dei glomeruli renali e nella corteccia cerebrale (30), nelle cellule del sistema reticolo-endoteliale (36); inoltre, è stata segnalata anche in molti altri organi.

Nel vettore

Nella zecca il microorganismo è stato evidenziato, in assenza di lesioni (30), nelle cellule epiteliali dell'intestino, nei tubuli di Malpighi (13), nelle ghiandole salivari e nel sistema nervoso (99). Uno studio sperimentale effettuato utilizzando una sospensione di organi di zecche infette con lo stock *Ball 3* ha dimostrato, in pecore suscettibili, l'infettività di tutti gli organi ad eccezione del sistema nervoso, dell'emolinfa e delle ovaie (13).

Il ciclo vitale dell'agente eziologico

L'evidenziazione di diverse forme del microorganismo ha suggerito l'esistenza di un suo ciclo vitale con diversi stadi di sviluppo.

Nell'ospite naturale

Il reperto del microorganismo nei linfonodi qualche giorno prima della sua comparsa a livello cerebrale (35), ha lasciato supporre la presenza di una replicazione a livello linfonodale regionale immediatamente dopo la trasmissione. Dai linfonodi, attraverso la via linfatica, *Ehrlichia ruminantium* arriverebbe al torrente circolatorio (fase rickettsiemica con picco febbrile) tramite il quale, libera nel plasma o trasportata all'interno dei neutrofili

(55), raggiungerebbe l'endotelio vascolare per continuare la moltiplicazione. La diffusione nelle cellule endoteliali può avvenire anche per contiguità (25). L'occasionale reperto di forme diplococciche prima (30) e la microscopia elettronica poi, hanno messo in evidenza la possibilità di replicazione per scissione binaria dei corpi elementari ed intermedi di *Ehrlichia ruminantium* e qualche episodio di endosporulazione (71).

La trasmissione verticale nell'ospite naturale

Uno studio condotto su 12 vitelli meticcii, nati da madri residenti in un'area di endemia in Zimbabwe, ha dimostrato la possibilità di trasmissione verticale dell'infezione in condizioni naturali. In questo lavoro i nuovi nati sono stati testati attraverso l'utilizzo di zecche non infette del genere *Amblyomma*, allevate in laboratorio e nutrite su questi soggetti. Successivamente i vettori utilizzati sono stati trasferiti su animali suscettibili (piccoli ruminanti) o testate tramite la PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Cinque dei dodici soggetti in esame sono stati considerati positivi grazie alla trasmissione dell'infezione ai soggetti recettivi, mentre 11 su 12 test di PCR sulle zecche nutrite sui nuovi nati hanno confermato la positività all'infezione. Un ruolo nella trasmissione dell'infezione da madre a figlio sembrerebbe averlo il colostro (34).

Nell'ospite sperimentale

Anche nel topo *Ehrlichia* ha mostrato un ciclo bifasico, con un'iniziale replicazione a livello delle cellule reticolo-endoteliali seguita da una seconda fase di moltiplicazione in quelle endoteliali (38).

Nel vettore

La conoscenza dello sviluppo di *Ehrlichia ruminantium* nella zecca presenta ancora alcune lacune. In un primo momento, data la bassa infettività delle secrezioni salivari (11), il rigurgito è stato considerato come il più probabile mezzo di trasmissione dell'infezione. Successivamente, sospensioni di ghiandole salivari di zecche infette hanno in più occasioni dimostrato una maggior infettività per ani-

mali sensibili rispetto all'inoculazione di preparati intestinali (13). L'utilizzo della microscopia elettronica (5, 53, 54) e della metodica ELISA (62, 98) hanno poi chiaramente dimostrato la presenza di *Ehrlichia ruminantium* nelle ghiandole salivari delle zecche, i cui acini sarebbero invasi dal microrganismo dopo un iniziale sviluppo all'interno delle cellule epiteliali dell'intestino (75). Questo passaggio sarebbe veicolato dagli emociti (39). Dall'ingestione di sangue infetto alla comparsa delle ehrlichie nelle cellule intestinali sono necessari 15 giorni (54).

Le zecche possono venire a contatto con *Ehrlichia ruminantium* durante i tre stadi del loro sviluppo - larva, ninfa e adulto - ma soltanto gli ultimi due sembrano in grado di trasmettere la malattia ad ospiti sensibili. Bezuidenhout (20), utilizzando una sospensione di 75 larve infette e ingorgate, non è stato in grado di trasmettere per via endovenosa l'infezione ad alcuni ovini probabilmente perché la maturazione o la replicazione del microrganismo nello stadio larvale del vettore non lo rendono sufficientemente patogeno. Al contrario è stato possibile infettare una pecora con una sola ninfa ingorgata. La trasmissione trans-stadiale è stata chiaramente dimostrata (5), mentre quella trans-ovarica, pur se riportata in condizioni sperimentali da alcuni autori, è

da considerarsi pressoché assente e, in ogni caso, non ricopre un ruolo di rilievo nell'epidemiologia della malattia (11).

Coltivazione *in vitro*

Nel 1985 per la prima volta *Ehrlichia ruminantium* è stata coltivata *in vitro* su cellule ombelicali di bovino (16) e successivamente in colture cellulari di neutrofili purificati di capra. L'utilizzo, in particolare, di linee E5 di cellule endoteliali bovine in monostrato, irradiate con raggi gamma per ritardarne l'accrescimento unitamente alla centrifugazione dell'inoculo per facilitare il contatto tra cellule del monostrato cellulare e rickettsie, ha permesso la coltivazione di diversi ceppi di *Ehrlichia ruminantium*. L'*Eagles Minimal Essential Medium (Glasgow modificato)*, contenente brodo triptosio fosfato e siero bovino, viene comunemente usato come mezzo di coltura. Su cellule endoteliali bovine l'*Ehrlichia ruminantium* ha un tempo di generazione di circa 5 o 6 giorni (18, 55, 105).

Patogenicità

Le forme cliniche variano notevolmente in base allo stock di *Ehrlichia ruminantium* coinvolto, all'animale recettivo e alle condizioni naturali o sperimentali dell'infezione.

Il vettore

Attualmente 13 specie di zecche appartenenti al genere *Amblyomma* sono considerate vettori competenti per la trasmissione di *Ehrlichia ruminantium* in condizioni naturali o sperimentali.

Le zecche del genere *Amblyomma*, appartenente alla famiglia *Ixodidae*, sono diffuse in tutto il mondo, ad eccezione del continente europeo, nella fascia compresa tra i quarantesimi paralleli.

La morfologia

Gli esemplari appartenenti a questo genere

sono generalmente di dimensioni importanti, riccamente ornati e possiedono occhi orbitati e spine coxali appuntite. Come tutti gli Ixodidi, sono dotati di uno scudo rigido che ricopre completamente la faccia dorsale nel maschio, mentre nella femmina lo scudo è di dimensioni più ridotte permettendole una notevole distensione della parete corporea durante il pasto di sangue.

In alcune specie sullo scudo sono presenti smaltature dai colori vivaci. Il rostro, molto sviluppato, è ben visibile dorsalmente (figura 3).

Il ciclo biologico

Tutte le specie del genere *Amblyomma* sono trifasiche; ciascuno stadio compie il pasto su un ospite diverso e, successivamente, una muta lontano dall'ospite. Le femmine possono, dopo il pasto di sangue, produrre migliaia di uova (anche 40.000 per *Amblyomma variegatum*). La durata del ciclo è molto variabile e può andare dai 5 mesi sino ai 4 anni per completarsi (secondo le condizioni ambientali e la disponibilità di ospiti). I principali vettori di heartwater sono zecche che si adattano a molti ospiti (bassa specificità parassitaria) e durante i loro quattro stadi di sviluppo (larva a sei zampe, ninfa e adulto maschio e femmina ad otto zampe) possono nutrirsi su diverse specie di bestiame, di ungulati selvatici, uccelli terrestri, piccoli mammiferi, rettili e anfibi (63, 70).

La trasmissione trans-ovarica di *Ehrlichia ruminantium* è un fatto eccezionale, generalmente l'acquisizione di *Ehrlichia ruminantium* avviene tramite il pasto su un ospite rickettsiemico, la trasmissione trans-stadiale permette il mantenimento dell'infezione nelle zecche per le quali *Ehrlichia ruminantium* non è patogena (63).

Habitat

Amblyomma hebraeum e *Amblyomma variegatum* (*Tropical Bont Tick*) sono i due vettori di maggiore importanza nell'epidemiologia della malattia. Le due specie sono presenti in aree geografiche diverse, ma sono adattate allo stesso tipo di habitat; generalmente la loro pre-



Figura 3. *Amblyomma* sp. maschio.

senza è condizionata dal clima e dall'ambiente circostante in relazione anche al loro stadio di sviluppo. Sebbene gli esemplari di entrambe le specie di zecche siano attivi durante tutto il corso dell'anno, è possibile definire, negli areali di distribuzione africani, una certa stagionalità del ciclo biologico: in generale gli adulti tendono ad essere più numerosi durante la stagione delle piogge, mentre le larve e le ninfe sono maggiormente attive a partire dalla fine della stagione delle piogge. Questa stagionalità, che è maggiormente definita per *Amblyomma variegatum*, permette un controllo strategico dell'infestazione; il trattamento effettuato all'inizio del periodo di attività degli adulti e protratto, ad intervalli regolari, durante tutta la stagione delle piogge, riduce il numero degli adulti e quindi di larve e ninfe nella stagione successiva.

In generale, fatta eccezione per *Amblyomma lepidum*, adattato anche ad ambienti secchi presenti nel suo areale di diffusione (Africa orientale), i principali vettori di heartwater prediligono le zone calde, temperate e ricche di vegetazione, mentre i climi più aridi tendono a limitarne l'attività; allo stesso modo la competizione interspecifica è spesso causa di una minore attività delle specie contemporaneamente presenti in un determinato ambiente.

La specie *Amblyomma pomposum*, vettore di minor importanza nella diffusione della malattia, presente soprattutto in Angola e Zambia, ha la caratteristica di trovarsi in zone di savana e foresta ad altitudini elevate. Questa specie in Angola presenta un ciclo con il picco di attività di larve e ninfe durante la stagione umida (63, 70).

Diffusione

Pur essendo il genere *Amblyomma* diffuso praticamente in tutto il mondo ad esclusione dell'Europa, la diffusione dell'heartwater è particolarmente legata alla distribuzione dei 5 principali vettori naturali dell'infezione, tutti di origine africana. Tra questi *Amblyomma variegatum*, il vettore con l'areale di distribuzione più ampio, originario dell'Africa subsahariana, fu introdotto per la prima volta nei

Caraibi intorno al 1828 da bestiame infestato proveniente dal Senegal, diffondendosi successivamente, tramite gli spostamenti degli uccelli, in molte altre isole dell'arcipelago. Sempre dal continente africano, con meccanismo simile, ha invaso anche la Penisola Arabica e le isole Mauritius (68).

Gli altri vettori naturali (*Amblyomma hebraeum*, *Amblyomma pomposum*, *Amblyomma gemma* e *Amblyomma lepidum*) sono confinati ad aree del continente africano. In particolare *Amblyomma hebraeum* rappresenta il principale vettore dell'Africa meridionale, in alcune zone dello Zambia *Amblyomma hebraeum* ed *Amblyomma variegatum* sono contemporaneamente presenti.

Il rischio rappresentato per il continente americano dalla presenza del vettore e dell'agente eziologico di heartwater nell'arcipe-

lago caraibico è enorme ed è ancor più grave se si considera che altre 3 specie di zecche endemiche nel territorio americano (*Amblyomma maculatum*, *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dissimile*) sono vettori potenziali della malattia. In particolare è elevato il rischio rappresentato dalla capillare diffusione in tutti gli stati che si affacciano sul Golfo del Messico di *Amblyomma maculatum*, la cui capacità vettoriale in condizioni sperimentali sembra essere paragonabile a quella di *Amblyomma variegatum*.

La figura 4 rappresenta la diffusione dei vettori di heartwater nel continente Africano (da notare la mancanza di *Amblyomma gemma* che per alcuni autori sudafricani non rappresenterebbe un vettore di heartwater) (17). La tabella II riassume alcune caratteristiche biologiche dei vettori naturali e sperimentali di heartwater (58).

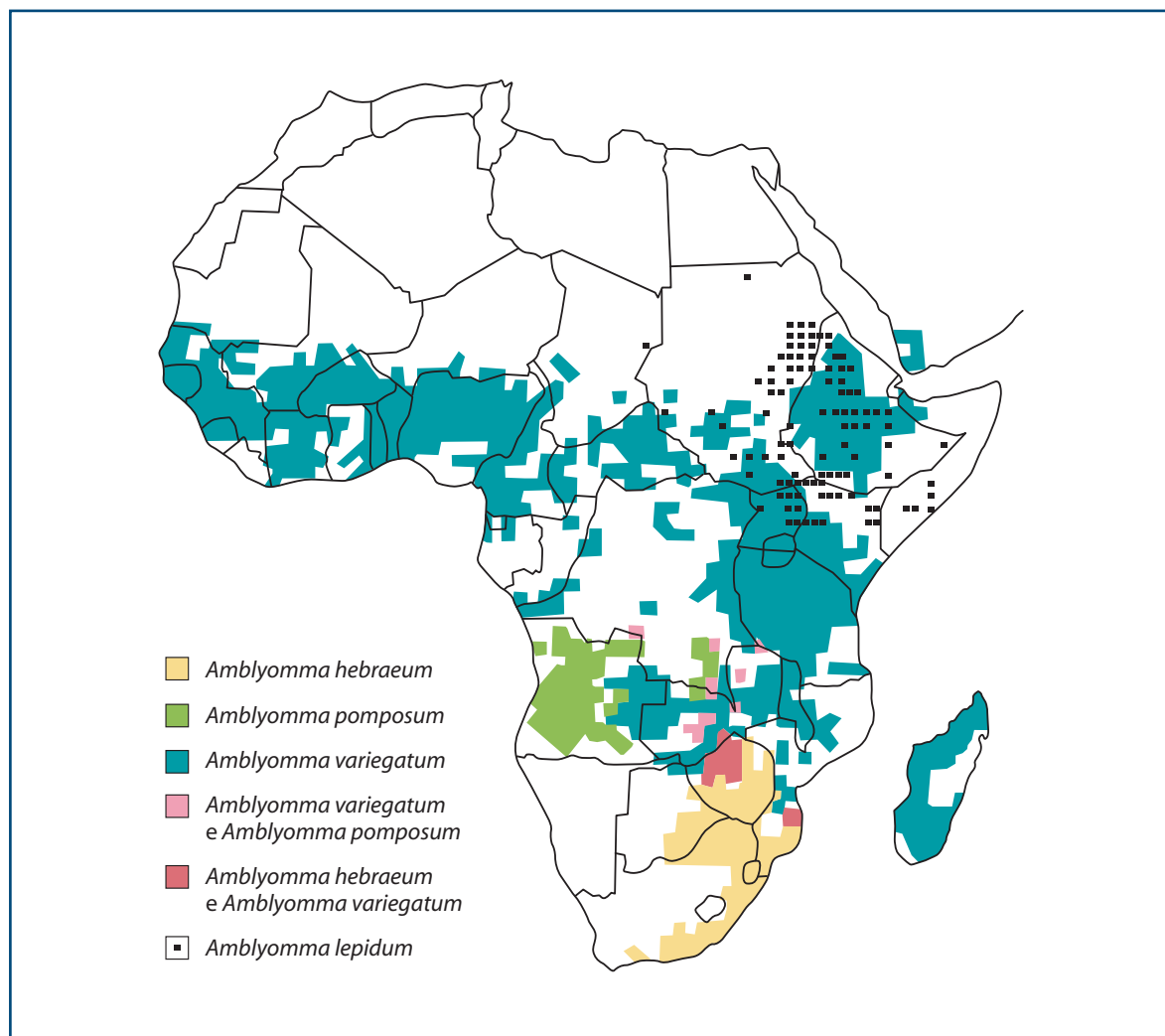


Figura 4. Distribuzione dei vettori di heartwater nel continente africano (17).

Tabella II. Caratteristiche biologiche dei vettori naturali e sperimentali di heartwater (58).

Specie	Ospiti	Importanza e distribuzione
Zecche del genere <i>Amblyomma</i> africane (vettori naturali)		
<i>Amblyomma hebraeum</i>	Adulti sul bestiame domestico, grandi erbivori selvatici, facoceri (<i>Phacochoerus africanus</i>). Larve e ninfe su uccelli, piccoli mammiferi e rettili.	Ottimo vettore. Il principale in Sudafrica e Sud-est Africa.
<i>Amblyomma variegatum</i>	Adulti sul bestiame domestico, animali selvatici di media e grande taglia. Larve e ninfe su uccelli, carnivori, piccoli mammiferi e rettili.	Ottimo vettore, il più diffuso. Presente in tutte le savane aperte africane (ad eccezione dell'Africa meridionale dove c'è <i>Amblyomma hebraeum</i>).
<i>Amblyomma gemma</i>	Adulti sul bestiame domestico e grandi erbivori selvatici. Larve e ninfe su uccelli, lagomorfi e primati.	L'areale comprende le savane dell'Africa orientale: dall'Etiopia orientale fino alla Tanzania centrale.
<i>Amblyomma pomposum</i>	Adulti sul bestiame domestico ed artiodattili selvatici. Larve e ninfe su rettili e primati.	Africa equatoriale; pianure dell'Angola, Zambia e sud della Repubblica Democratica del Congo (ex Zaire).
<i>Amblyomma lepidum</i>	Adulti sul bestiame domestico, sui carnivori, sui grandi erbivori selvatici. Larve e ninfe su uccelli, carnivori e primati.	Corno d'Africa dal Sudan orientale alla Tanzania centrale.
Zecche del genere <i>Amblyomma</i> africane (vettori sperimentali)		
<i>Amblyomma tholloni</i>	Adulti quasi esclusivamente sugli elefanti (<i>Loxodonta africana</i>) o su altri pachidermi. Larve e ninfe su uccelli e rettili	Africa equatoriale; esclusivamente dove sono presenti elefanti.
<i>Amblyomma astrion</i>	Adulti sul bufalo africano (<i>Syncerus caffer</i>), a Sao Tomè presente sui bovini ed ovini.	Angola, Repubblica Democratica del Congo (ex Zaire), Rep. Centro-africana, Sao Tomè.
<i>Amblyomma cohaerens</i>	Adulti principalmente sui bufali africani, ma anche sul bestiame domestico.	Tanzania, Kenia, Angola.
<i>Amblyomma sparsum</i>	Adulti principalmente su bufali africani e pachidermi (rinoceronte nero - <i>Diceros bicornis</i>), ma anche su rettili (tartarughe e varani), rari sul bestiame domestico. Ninfe e larve sui rettili.	Africa equatoriale orientale: Tanzania, Kenya, Uganda.
<i>Amblyomma marmoreum</i>	Adulti principalmente su rettili (tartarughe e varani). Larve ninfe sui ruminanti domestici.	Africa meridionale: Zambia, Zimbabwe, Mozambico meridionale e Sudafrica.
Zecche del genere <i>Amblyomma</i> americane (vettori sperimentali)		
<i>Amblyomma maculatum</i>	Adulti sul bestiame domestico.	Eccellente vettore. Costa del Golfo del Messico fino a Nord del Venezuela.
<i>Amblyomma cajennense</i>	Bestiame domestico e capibara (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>).	Cattivi vettori. Largamente distribuiti dal nord del Messico sino al nord dell'Argentina.
<i>Amblyomma dissimile</i>	Sui rettili ed anfibi.	

Gli animali domestici

Tutti ruminanti domestici appartenenti alla famiglia Bovidae sono sensibili alla malattia compreso il bufalo domestico o asiatico (*Bubalus bubalis*).

Gli animali selvatici

Le informazioni presenti in letteratura riguardo al range di ospiti selvatici suscettibili di infezione da *Ehrlichia ruminantium* sono, in molti casi, considerate non completamente attendibili per la mancanza di una diagnosi certa e per l'assenza di dati clinici ed epidemiologici.

A causa del tropismo per le cellule endoteliali *Ehrlichia ruminantium* è difficilmente reperibile negli strisci di sangue e quindi l'unico metodo sicuro di diagnosi rimane l'identificazione delle colonie negli strisci di materiale cerebrale. Anche in quest'ultimo caso le ehrlichie sono facilmente ritrovabili solo in corrispondenza dei livelli più elevati di rickettsiemia che si verificano nelle prime settimane post-infezione in corrispondenza del rialzo termico. Negli animali selvatici la sintomatologia clinica spesso non è presente a causa di un'innata resistenza alla patologia e, comunque, qualora presente, risulta difficile da evidenziare. La mancanza nella fauna selvatica di lesioni macroscopiche caratteristiche incrementa l'incertezza diagnostica. Inoltre, anche nel caso di heartwater, le performance dei test diagnostici per la maggior parte delle specie selvatiche rimangono ancora non del tutto conosciute. Ad ulteriore complicazione è da segnalare la presenza in numerosi animali selvatici di agenti patogeni, spesso poco conosciuti, dalla struttura genica ed antigenica simile ad *Ehrlichia ruminantium* che rende praticamente inutilizzabili, su queste specie, i test sierologici e di diagnostica molecolare già messi a punto per i ruminanti domestici.

I dati riguardo alla gamma di ospiti di

Ehrlichia ruminantium che possono essere considerati inequivocabilmente attendibili, sono quelli provenienti da infezioni sperimentali ben documentate, controllate e confermate dall'esame dallo striscio di materiale cerebrale, o mediante xenodiagnosi con verifica delle caratteristiche dell'inoculo (ceppo contenuto, dose e virulenza). Possono essere considerati come conclusivi anche i dati provenienti da casi naturali di heartwater in cui sia stata evidenziata microscopicamente post-mortem *Ehrlichia ruminantium* purché la veridicità di tale reperto sia supportata da informazioni di carattere epidemiologico. Sulla base di questi principi l'infezione da *Ehrlichia ruminantium* è da considerarsi provata in 12 ruminanti africani, 5 ruminanti non africani e in 2 roditori africani. La dimostrazione dello status di "carrier subclinico" in 8 specie di ruminanti selvatici africani rafforza l'ipotesi che la persistenza di heartwater nell'ecosistema sia dovuto proprio a questi ultimi (58, 69). Esistono alcune segnalazioni di casi sospetti in pachidermi; reperto di colonie simili ad *Ehrlichia ruminantium* nello striscio di materiale cerebrale proveniente da un elefante africano (*Loxodonta africana*) morto di carbonchio ematico e positività sierologiche in un rinoceronte nero (*Diceros bicornis*) ed in un rinoceronte bianco (*Cheratotehrum simum*); nessuno dei casi è però da considerarsi confermato per la mancanza della conferma tramite xenodiagnosi e la mancata esclusione di false positività dovute ad infezioni concomitanti.

Per i carnivori non esistono segnalazioni né certe né sospette, mentre è presente in letteratura un caso sospetto in un cercopiteco grigioverde (*Chlorocebus aethiops*) assegnato successivamente all'infezione con una rickettsia trasmessa dalla zecca *Boophilus decoloratus*. Quest'ultimo caso conferma le difficoltà di diagnosi sui selvatici provocate dalla contemporanea presenza di rickettsie poco conosciute.

Due roditori selvatici africani, *Praomys coucha* in cui si sviluppano sintomi clinici e *Rhabdomys pumilio*, si sarebbero dimostrati sensibili ad heartwater a seguito d'infezione sperimentale e successiva trasmissione ad ospite sensibile, mentre mancherebbero i dati sull'eventuale infezione di vettori competenti. Alcune notizie incomplete si hanno anche sulla faraona (*Numida meleagris*), la tartaruga leopardo (*Geochelone pardalis*) e la lepre

da cespuglio (*Lepus saxatilis*) descritte come specie sensibili, ma senza dettagli sulle sperimentazioni.

La tabella III riassume le segnalazioni certe o sospette di heartwater nelle specie domestiche e selvatiche (24, 58, 69).

Gli animali da laboratorio

L'unico nel quale è stato possibile ricreare la malattia è il topo (*Mus musculus*) (74).

Tabella III. Segnalazioni certe o sospette di heartwater nelle specie domestiche e selvatiche (24, 58, 69).

Famiglia	Sottofamiglia	Nome comune	Nome scientifico	Tipo d'infezione	
Ruminanti domestici					
Bovidae					
	<i>Bovinae</i>	Bovino	<i>Bos taurus</i>	Naturale	Confermata
		Zebù	<i>Bos taurus indicus</i>	Naturale	Confermata
		Bufalo asiatico	<i>Bubalus bubalis</i>	Naturale	Confermata
	<i>Caprinae</i>	Pecora	<i>Ovis aries</i>	Naturale	Confermata
		Capra	<i>Capra hircus</i>	Naturale	Confermata
Ruminanti selvatici					
Cervidae					
		Cervo dalla coda bianca	<i>Odocoileus virginianus</i>	Sperimentale	Confermata
		Cervo pomellato	<i>Axis axis</i>	Naturale	Confermata
		Cervo rusa	<i>Cervus timorensis</i>	Naturale	Confermata
Bovidae					
	<i>Bovinae</i>	Bufalo africano	<i>Syncerus caffer</i>	Sperimentale	Confermata
		Nilgai* o Antilope azzurra	<i>Boselaphus tragocamelus</i>	Naturale	Non confermata
		Kudu maggiore	<i>Tragelaphus strepsiceros</i>	Sperimentale	Confermata
		Sitatunga*	<i>Tragelaphus spekii</i>	Naturale	Confermata
		Antilope alcina	<i>Taurotragus oryx</i>	Sperimentale	Confermata
	<i>Caprinae</i>	Mufone	<i>Ovis musimon</i>	Sperimentale	Confermata
		Mufone asiatico	<i>Ovis orientalis</i>	Sperimentale	Confermata
		Capra berbera	<i>Ammotragus lervia</i>	Naturale	Non confermata
		Antilope nera	<i>Hippotragus niger</i>	Sperimentale	Confermata
		Tahr dell'Himalaya	<i>Hemitragus jemlahicus</i>	Naturale	Non confermata
	<i>Antilopinae</i>	Springbok*	<i>Antidorcas marsupialis</i>	Naturale	Confermata
		Steenbok*	<i>Raphicerus campestris</i>	Naturale	Confermata
	<i>Alcelaphinae</i>	Blesbok*	<i>Damaliscus pygargus sb. albifrons</i>	Sperimentale	Confermata
		Gnu dalla coda bianca	<i>Connochaetes gnou</i>	Sperimentale	Confermata
		Gnu striato	<i>Connochaetes taurinus</i>	Sperimentale	Confermata
	<i>Reduncinae</i>	Kafue lechwe*	<i>Kobus leche kafuensis</i>	Naturale	Confermata
Giraffidae					
		Giraffa	<i>Giraffa camelopardalis</i>	Sperimentale	Confermata
Roditori					
		Topo domestico	<i>Mus musculus</i>	Sperimentale	Confermata

*si riportano i nomi comuni nella lingua originale dal momento che molti di essi non hanno un corrispettivo nella lingua italiana segue

Tabella III. Segnalazioni certe o sospette di heartwater nelle specie domestiche e selvatiche (24, 58, 69).

Famiglia	Sottofamiglia	Nome comune	Nome scientifico	Tipo d'infezione	
		Southern multimammate mouse*	<i>Praomys couchua</i>	Sperimentale	Confermata
		Stripped grass mouse*	<i>Rhabdomys pumilio</i>	Sperimentale	Confermata
Pachidermi					
<i>Elefantidi</i>		Elefante africano	<i>Loxodonta africana</i>	Naturale	Non confermata
<i>Rinocerotidi</i>		Rinoceronte bianco	<i>Ceratotehrium simum</i>	Naturale	Non confermata
		Rinoceronte nero	<i>Diceros bicornis</i>	Naturale	Non confermata
Lagomorfi					
		Lepre da cespuglio	<i>Lepus saxatilis</i>	Sperimentale	Non confermata
Uccelli					
		Faraona	<i>Numida meleagris</i>	Sperimentale	Non confermata
Rettili					
		Tartaruga leopardo	<i>Geochelone pardalis</i>	Sperimentale	Non confermata

*si riportano i nomi comuni nella lingua originale dal momento che molti di essi non hanno un corrispettivo nella lingua italiana

Epidemiologia

Heartwater è segnalata esclusivamente laddove sono presenti specie di *Amblyomma* capaci di trasmettere *Ehrlichia ruminantium*, l'esistenza quindi di un vettore è la condizione limitante la presenza di heartwater in un territorio.

L'epidemiologia dell'heartwater, nonostante sia da anni oggetto di studio, rimane tuttora solo parzialmente conosciuta; la ragione di ciò va cercata nel condizionamento esercitato da fattori ancora non tutti perfettamente individuati, alcuni legati all'agente eziologico, altri all'ospite ed altri al vettore e quindi all'ambiente. Questi includono le differenze immunologiche e patogenetiche dei diversi ceppi di *Ehrlichia ruminantium*, la disponibilità di specie *reservoir* naturali, l'età degli ospiti recettivi presenti, la loro suscettibilità genetica, cui si sommano i fattori che influenzano la dinamica di popolazione dei vettori, la prevalenza di infezione nella popolazione di zecche nonché la presenza e l'intensità dei trattamenti antiparassitari.

Dei dieci vettori presenti sul territorio africano i principali sono *Amblyomma variegatum*,

la specie con il più ampio areale di diffusione, e *Amblyomma hebraeum*, maggiormente coinvolta nella trasmissione nell'Africa Meridionale. Le altre specie sono generalmente vettori di secondaria importanza, ma localmente ed in condizioni particolari possono giocare un ruolo di rilievo (99).

L'importanza nella trasmissione di heartwater di ciascuna specie di zecca non dipende solamente dalla competenza vettoriale ma anche dalla distribuzione ed adattamento ai ruminanti domestici di ciascun vettore, mentre l'attività e l'abbondanza sono influenzati da parametri ambientali, principalmente temperatura ed umidità. Nella maggior parte del territorio africano le puntate epidemiche presentano una ricorrenza stagionale: generalmente si assiste ad un incremento dei casi di heartwater al picco di attività delle zecche.

La stagionalità della malattia non è però sempre così definita, infatti, in alcune zone dell'Africa a clima mite e ai Caraibi, dove le stagioni delle piogge non sono così nettamente definite, i casi si distribuiscono durante tutto l'arco dell'anno.

La durata del periodo di tempo durante il quale il pasto che il vettore compie sull'ospite rickettsiemico risulta infettante per il vettore stesso varia per ciascuna specie ospite:

- negli ovini le zecche che si alimentano su pecore affette da heartwater possono infettarsi nel periodo di tempo che va dai 2 giorni dopo l'inizio del rialzo termico sino ai 2 giorni dopo l'eventuale trattamento antibiotico specifico contro *Ehrlichia ruminantium*;
- per i caprini esistono dati solamente per quelli di razza creola dove l'infettività durerebbe da 2 giorni prima dell'inizio del rialzo termico fino a 3 giorni dopo il rientro nella norma della temperatura;
- nei bovini tale periodo può durare oltre i 361 giorni.

Nel vettore probabilmente l'infezione si amplifica: è sufficiente la puntura di una singola zecca infetta allo stadio di ninfa o di adulto per trasmettere *Ehrlichia ruminantium* ad un grosso ruminante.

Durante il picco febbrile, infatti, è sufficiente una quantità di sangue compresa tra 2,7 µl e i 5,5 µl per infettare esemplari di *Amblyomma*. Ciò nonostante studi epidemiologici condotti per oltre 7 anni in aree endemiche hanno evidenziato che la prevalenza d'infezione in una determinata popolazione di zecche è generalmente bassa, pur variando da luogo a luogo e risentendo delle variazioni stagionali. La ragione di questa bassa prevalenza d'infezione va cercata nella biologia di *Amblyomma*; larve e ninfe dei principali vettori di heartwater, infatti, presentano generalmente una bassa specificità d'ospite per cui solo una parte si alimenta su ospiti rickettsiemici. Inoltre, anche se effettuato su un ospite infetto, non sempre il pasto esita nell'infezione della zecca; al momento del pasto la rickettsiemia può, infatti, non raggiungere la soglia infettante per il vettore (17).

La capacità vettoriale di ciascuna specie di *Amblyomma* coinvolta nella trasmissione di heartwater è variabile ed è influenzata dal ceppo di *Ehrlichia ruminantium* coinvolto, questa variabilità è stata particolarmente evidenziata in *Amblyomma variegatum*.

Per zecche appartenenti a questa specie, infatti, l'infezione sperimentale con ceppi di *Ehrlichia ruminantium* presenti nell'areale di distribuzione di *Amblyomma variegatum* avviene con un successo maggiore rispetto ai ceppi originari di aree in cui il vettore è *Amblyomma hebraeum* (58).

Prove sperimentali condotte sul topo ed osservazioni di campo hanno permesso di identificare differenze di patogenicità tra i diversi ceppi. Queste oltre che al ceppo sono legate alle differenti sensibilità di specie e, nel topo, alle varie vie di somministrazione.

Tutti i ceppi di *Ehrlichia ruminantium* sono patogeni per le pecore e, probabilmente, per le capre mentre, di tutti i ceppi conosciuti, solo il ceppo *Kumm* non è patogeno per i bovini.

La differente patogenicità dei vari ceppi di *Ehrlichia ruminantium* si riflette in un differente corredo antigenico degli stessi. Tali differenze sono così marcate che, a parte talune eccezioni, non esiste cross-protezione anticorpale. Nella maggior parte dei casi l'introduzione di capi di bestiame immuni per un particolare ceppo di *Ehrlichia ruminantium* in un'area di endemia per un differente ceppo esita nel manifestarsi di nuovi casi di heartwater.

L'insorgenza della forma clinica di heartwater, piuttosto che di una forma asintomatica dipende però, oltre che dal ceppo coinvolto, anche dalla specie, dalla razza e dallo stato immunitario dell'animale sensibile infettato. I giovani vitelli, gli agnelli e i capretti possiedono una resistenza alla patologia inversamente proporzionale all'età ed indipendente dallo stato immunitario della madre; tale resistenza non è assoluta e, in ogni caso, di breve durata: in media 4 settimane nei vitelli ed una settimana nei capretti e negli agnelli (17).

Le differenze di sensibilità tra le razze bovine sono marcate, ma in generale si può affermare che le razze di origine bovina europea (*Bos taurus*) sono maggiormente sensibili all'heartwater rispetto alle razze bovine di origine zebuina africane (*Bos taurus indicus*); ciò va interpretato come esito di una selezione naturale generata dalla maggiore durata della convivenza tra ospite e parassita che esita nel raggiungimento di uno stato di equilibrio all'interno dell'ecosistema. Gli ovini sono in

genere più sensibili alla patologia dei bovini, ma le differenze tra le razze sono minori.

Tra le capre la razza angora è particolarmente sensibile e l'immunità dei capretti di questa razza è di breve durata, mentre è stato dimostrato che la capra di razza guadalupiana possiede una resistenza alla patologia legata ad un gene recessivo la cui espressione è condizionata dal sesso (17).

In ogni caso la resistenza alla patologia non previene l'infezione. Nei bovini il livello di conglutinine sieriche sembra essere coinvolto nello sviluppo di una resistenza non specifica; osservazioni analoghe sono state condotte su bovidi selvatici tenuti in cattività.

L'ipotesi che il ruolo di serbatoio dell'infezione sia giocato dagli animali selvatici è rafforzata dalle osservazioni condotte in campo a Guadalupe, Madagascar e Sao Tomè, isole prive di popolazioni stabili di ruminanti selvatici (17).

Il concetto di stabilità endemica

Per "stabilità endemica" o "stabilità enzootica" si intende uno stato di equilibrio nel quale l'ospite, l'agente eziologico ed il vettore coesi-

stano in una virtuale assenza di casi clinici e l'infezione di tutti gli animali giovani avviene durante il loro periodo di protezione, grazie ad una frequente trasmissione del patogeno. Questo scenario si verifica quando è presente con alti livelli di prevalenza l'infezione nel vettore e contemporaneamente l'immunità colostrale o legata all'età, come nel caso dell'heartwater. Accade, cioè, che gli animali giovani vengono a contatto con l'infezione durante il periodo di copertura immunitaria prolungando così il loro stato di protezione. Successivamente, in considerazione dell'elevata prevalenza nel vettore, l'infezione si ripete durante tutto il corso della vita così da generare un continuo "booster" immunitario. Nel caso della Theileriosi della Costa Mediterranea (*Theileria annulata*) e dell'East Coast fever (*Theileria parva*) tale situazione non si manifesta proprio per la mancanza di questo tipo di immunità (91).

A livello teorico è possibile che si verifichi una condizione di stabilità anche con bassi livelli di prevalenza, sebbene in questo caso sia elevato il rischio di puntate epidemiche (102).

Sintomatologia

Nei bovini

Incubazione

Il periodo d'incubazione è piuttosto variabile, con un range compreso tra i 9 e i 29 giorni ed una media calcolata di 18 giorni (1). Tale variabilità è legata anche allo stadio di maturazione della zecca vettore, con un'incubazione più vicina alle due settimane se la malattia è trasmessa da una ninfa, periodo che si allunga se la rickettsia è veicolata da un individuo adulto.

Forma iperacuta

Il decesso sopraggiunge molto rapidamente, in poche ore dopo un iniziale picco febbrile. Il decorso può essere completamente asinto-

matico oppure presentare prostrazione, collasso, convulsioni, difficoltà respiratorie e saltuariamente diarrea subito prima della morte (3, 7, 41).

Forma acuta

È la forma più comune che colpisce soprattutto gli animali tra i 3 e i 18 mesi, con una durata media compresa tra i 2 e i 6 giorni. È caratterizzata da un iniziale picco febbrile, superiore ai 40°C che può anche permanere per tutto il decorso, con minime fluttuazioni. L'animale si presenta ansioso, con lo sguardo fisso, la respirazione si fa superficiale ed è presente tachicardia. L'edema polmonare e il versamento pericardico causano dispnea. Il polso è flebile.



Figura 5. Ovino nella fase terminale della malattia. Arti, collo e testa in estensione (24).

La sintomatologia nervosa compare nella seconda fase con intensità variabile: si possono notare difetti di coordinazione, movimenti di maneggio e di suzione, atteggiamenti di rigidità sino a quando l'animale non si regge più e giace sul terreno. A questo punto si manifestano vere e proprie convulsioni con pedalamento fino alla completa paraplegia. Anche in questa fase rimangono segni d'ipersensibilità alla luce e al riflesso pupillare, nistagmo e opistotono. La lingua spesso protrude dalla cavità boccale. La morte sopraggiunge durante una crisi o in una fase di remissione tra un accesso e l'altro, subito dopo un crollo termico.

La diarrea, spesso segnalata in particolari razze (es: Jersey), si presenta con caratteristiche che vanno da mucoide ad emorragica ed è segno di prognosi infausta (3, 23, 27, 32, 89, 95).

Forma subacuta

Si presenta con lo stesso quadro della forma acuta, ma con una maggior durata, fino a 10 giorni e con sintomi meno pronunciati. La mor-

talità è più bassa e a volte è dovuta a complicazioni secondarie, respiratorie o digestive (3).

Forma subclinica

È la forma più subdola, molto difficile da riconoscere soprattutto in condizioni di campo. Febbre, leggera apatia e tachipnea possono passare inosservate fino alla guarigione che interviene dopo pochi giorni (23, 89).

Complicazioni secondarie

Polmonite da ipostasi, atonia del rumine, enterotossitemia, torcicollo, alopecia e cecità (32, 95) rappresentano le più frequenti complicazioni secondarie.

Nei piccoli ruminanti

La sintomatologia, la durata del periodo di incubazione, così come le caratteristiche delle 4 forme cliniche sono sovrapponibili a quelle dei bovini. Le differenze maggiori sono a livello gastroenterico e neurologico: mentre la diarrea è un sintomo più incostante, le forme nervose sono più comuni e meglio definite (32, 65, 90) (figura 5). Le capre sono state osservate in atteggiamento ansioso con frequenti caratteristici movimenti della coda e brevi belati (58).

Nel topo di laboratorio

Periodo d'incubazione medio che si aggira sui 10 giorni.

Il quadro sintomatologico è caratterizzato da aumento della frequenza respiratoria, piloerezione, letargia, incoordinazione occasionale ed ipotermia che compare dalle 12 alle 72 ore prima della morte.

Prognosi

È molto difficile stabilire una prognosi della malattia poiché molteplici sono i fattori che condizionano l'esito della patologia. Se come regola generale è possibile affermare che le forme iperacuta e acuta presentano un tasso di letalità molto elevato, anche fino al 100%, le variazioni percentuali da focolaio a focolaio sono notevoli in considerazione della razza e

dell'età dell'animale, del ceppo di *Ehrlichia ruminantium* coinvolto, della stabilità endemica, del periodo dell'anno (in Sudafrica è stata segnalata una variabilità stagionale). È da ricordare che la maggior parte dei dati in letteratura riguarda le razze esotiche importate che rappresentano solo una minoranza del patrimonio animale africano (83, 84).

Lesioni anatomico-patologiche

Lesioni macroscopiche

Le lesioni macroscopiche sono simili in tutte le specie con differenze in relazione alla virulenza del ceppo (3, 80). Se si esclude il reperto di colonie di *Ehrlichia ruminantium* nelle cellule endoteliali dei capillari non esistono lesioni patognomiche (86).

Cavità del corpo

La raccolta di liquido, tipica delle forme acute e subacuta, può essere:

- peritoneale, evidenziata soprattutto nei bovini;
- pleurica, reperto frequente nei bovini nei quali può raggiungere i 2 litri, mezzo litro invece nelle pecore e nelle capre (figura 6);
- pericardica, presente in quantità maggiori nei piccoli ruminanti piuttosto che nei bovini (figura 7).

Il liquido presente è generalmente trasparente o leggermente torbido con occasionale presenza di sangue, di colore giallo pallido,

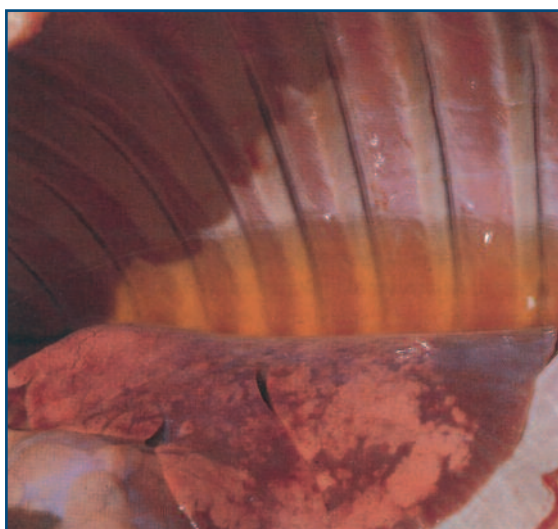


Figura 6. Versamento toracico (17).

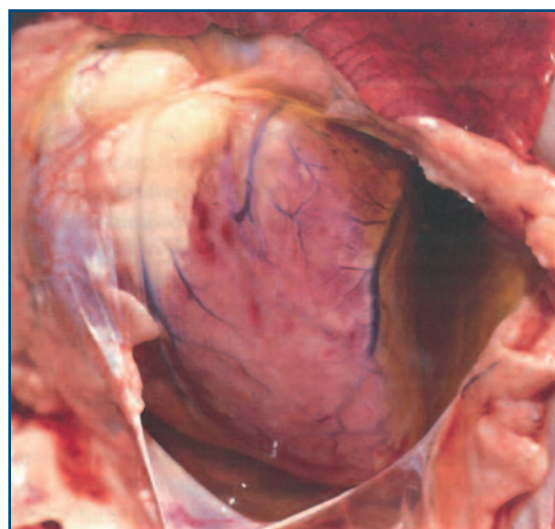


Figura 7. Versamento pericardico (17).

che spesso coagula all'esposizione all'aria per l'alto contenuto di fibrina (3, 81).

Apparato cardiovascolare

Pericardio ed endocardio, almeno nella maggioranza dei casi, non presentano lesioni evidenti a parte occasionali petecchie. A livello del miocardio si possono rilevare emorragie e degenerazioni.

Apparato respiratorio

La trachea ed i bronchi spesso contengono materiale schiumoso, fibrinoso e la mucosa si presenta congesta con petecchie ed emorragie. L'edema, la congestione del parenchima polmonare e dei setti interlobulari sono un reperto comune, soprattutto nelle forme a decorso più rapido e spesso sono la causa della morte per soffocamento. La pleura è ispessita, brillante e lucente con focolai emorragici (88, 95).

Apparato gastro-intestinale

La mucosa abomasale può apparire congesta e ispessita, soprattutto nei casi acuti, con piccole emorragie a livello pilorico in particolare nei bovini. Nella razza Jersey in particolare è comune l'enterite anche emorragica che coinvolge piccolo e grosso intestino, sino al retto (50, 88). Il fegato spesso si presenta congesto con distensione della glissoniana e a volte sono rilevabili emorragie della cistifellea. Frequente è anche la degenerazione del parenchima (88).

Apparato emolinfatico

La presenza o meno di splenomegalia sembra strettamente dipendente dal ceppo coinvolto. La superficie di taglio della milza si presenta rosso scuro e di consistenza polposa (45, 51, 88). I linfonodi si presentano generalmente ipertrofici con emorragie focali, ben visibili sulla superficie di taglio. Particolarmente colpiti i mesenterici, i retrofaringei, cervicali, bronchiali e i sottomascellari (3).

Apparato urinario

Il reperto principale, a livello renale, è la congestione. Nelle capre angora, in particolare, i

reni sono pesantemente coinvolti con nefrosi ed ischemie (47, 74).

Sistema nervoso

Non sono presenti lesioni particolari a parte la congestione delle meningi e l'edema cerebrale, responsabili della sintomatologia correlata e spesso difficilmente evidenziabili ad un esame macroscopico. Occasionalmente l'edema può essere molto grave e coinvolgere tutto il cervello con conseguente prolasso parziale del cervelletto attraverso il *foramen magnum*. Il liquido si accumula a livello dello spazio sub aracnoideo e il plesso coroideo s'ispessisce assumendo aspetto opaco e grigiastro. Ecchimosi e petecchie possono rilevarsi a carico del midollo, del cervello e del cervelletto (47).

Lesioni microscopiche

Polmoni

Presenza di edema alveolare ed interstiziale, ma non sempre distinguibili.

Reni

Sono presenti nefrosi di grado variabile con edema perirenale, petecchie nella corticale e la dilatazione dei tubuli contorti, dei dotti collettori e degli spazi di Bowmann.

Sistema nervoso

Si rilevano lesioni cerebrali compatibili con l'edema. Allargamento degli spazi perivascolari all'interno dei quali sono reperibili oltre a fluidi e proteine anche elementi cellulari come macrofagi o neutrofili. È presente, inoltre, edema delle guaine assoniche, mentre microcavitazioni multifocali e foci di necrosi si evidenziano nella corteccia cerebellare e cerebrale. È presente anche degenerazione necrotica della neuroglia con occasionali emorragie.

Cellule endoteliali colpite

Nelle cellule endoteliali parassitate si osserva: formazione di granuli PAS positivi e globuli nel citoplasma, leggero rigonfiamento mitocondriale e del reticolo endoplasmatico,

distensione e deformazione meccanica del nucleo (74).

Cellule endoteliali non colpite

A volte si presentano edematose o anche in stato di necrosi, ben separate dalla loro membrana basale (74).

Patogenesi

Al momento esistono varie ipotesi per descrivere i differenti meccanismi che intervengono nella patogenesi dell'heartwater.

Lesioni cellulari

La presenza di *Ehrlichia ruminantium* a livello degli endoteli dei capillari sembrerebbe provocare un'alterazione della permeabilità, consentendo il passaggio di liquido attraverso le membrane, mentre un'azione lesiva diretta spiegherebbe i foci emorragici a livello cerebrale e le lesioni gliali, per la vicinanza della neuroglia all'endotelio (72).

Il ruolo di una tossina

È stato ipotizzato, ma mai dimostrato, il ruolo di una tossina come causa dell'aumento della permeabilità e dei sintomi nervosi (47), il cui

coinvolgimento, in alternativa all'ipotesi della formazione di immunocomplessi (19), potrebbe anche giustificare le lesioni renali nelle capre angora. È stata dimostrata, tramite infezione sperimentale, l'attività di un lipopolisaccaride senza però che ne sia stato chiarito il ruolo patogenetico (94).

Alterazioni biochimiche

L'aumento di secrezione di corticosteroidi è la causa della leucopenia e dell'eosinopenia, mentre una possibile ipocalcemia, non dimostrata, potrebbe essere alla base della sintomatologia neuromuscolare (47).

La morte

Le cause del decesso possono essere ascrivibili a differenti quadri, da un gravissimo edema polmonare ad insufficienza cardiaca per distensione pericardica, o per collasso circolatorio da vasocostrizione periferica (27, 65).

Nel topo di laboratorio

Si è supposto il rilascio di amine vaso-attive, in particolare di istamina, come risultato di una degranulazione mastocitica (37).

L'immunità

Il meccanismo immunitario è poco conosciuto, ma la risposta sembra essere di tipo cellulare più che umorale. Siero prelevato da animali infetti o alte quantità di immunoglobuline provenienti da soggetti immuni, inoculati in animali suscettibili, contemporaneamente all'infezione sperimentale o nella fase d'incubazione della malattia, non influenzano l'in-

staurarsi della stessa. Nel topo di laboratorio il trasferimento di cellule spleniche da donatori immuni ad ospiti suscettibili, conferisce protezione (3, 35, 38). Numerosi riscontri portano ad ipotizzare un importante ruolo dei linfociti T la cui risposta proliferativa sembra scatenata da frazioni proteiche a basso peso molecolare, da 11 a 23 kDa dell'ehrlichia (97).

La diagnosi

Clinica ed Autoptica

La presenza di alcuni sintomi caratteristici quali ipertermia, presenza di liquidi endotoracici e segni nervosi (es. nistagmo), associati ad un decorso rapido della patologia e alla contemporanea presenza di zecche possibili vettori dell'infezione può far emettere un sospetto diagnostico che dovrà però essere confermato. Neanche la presenza di idrotorace ed idropericardio, come reperti autoptici, può essere considerata sufficiente per l'emissione di una diagnosi certa.

Inoculazione in animale di specie sensibile

Inoculazione di un surnatante di zecche in animale recettivo

Il surnatante di un omogenato di zecche raccolte da uno o più gruppi di animali sospetti ed inoculato in ospiti sensibili può permettere l'individuazione della presenza di *Ehrlichia ruminantium* in una mandria (7).

Inoculazione di sangue in animale recettivo

Un quantitativo di sangue variabile tra i 5 e i 10 ml prelevato da un animale sospetto può essere iniettato in una pecora o in una capra sana. Lo sviluppo di una sintomatologia caratteristica e la dimostrazione degli agenti patogeni nelle cellule endoteliali porterà alla diagnosi di heartwater (24).

Diagnosi di laboratorio

Ematologia

Il rilievo di leucopenia (eosinopenia e neutropenia), anemia, aumento dell'uremia e variazioni di colore del plasma possono essere di ausilio per l'emissione di una diagnosi (24).

Diagnosi diretta

Isolamento su colture cellulari

Non è certamente il metodo diagnostico di

prima scelta per la complessità delle procedure di laboratorio. È sicuramente importante per caratterizzare il ceppo di *Ehrlichia ruminantium* coinvolto.

Dimostrazione delle rickettsie nelle cellule endoteliali

Il reperto e l'identificazione delle colonie di *Ehrlichia ruminantium* nelle cellule dei capillari cerebrali degli animali sospetti presenta elevati livelli di specificità (69) mentre mano a mano che ci si allontana dal momento dell'infezione diminuisce la probabilità di ritrovare *Ehrlichia ruminantium* (22, 83). Anche per questo motivo il metodo presenta evidenti limiti di sensibilità.

Strisci su vetrino per la ricerca delle morule di *Ehrlichia ruminantium*, possono essere ottenuti dalla *tunica interna* dei grossi vasi (48) anche se il metodo migliore è il prelievo di corteccia cerebrale. Un campione delle dimensioni di una testa di cerino deve essere pressato e strisciato tra due vetrini porta-oggetto (76).

Per evitare di aprire il cranio, soprattutto in condizioni di campo, è possibile ottenere un campione di corteccia cerebellare, di buon valore diagnostico, passando dal foro occipitale con una "curette" (79) (figura 8). I campioni opportunamente colorati possono essere osservati al microscopio ottico a basso ingrandimento (10x) per individuare i capillari cerebrali, mentre l'osservazione in immersione, partendo da un ingrandimento di 50x, è utile per identificare le colonie di *Ehrlichia ruminantium*. Le possibilità diagnostiche tendono a diminuire notevolmente 6 ore dopo il trattamento antibiotico per la tendenza delle colonie a fondersi; in ogni caso non è una diagnosi semplice, infatti, richiede anche 30-40 minuti di osservazione del vetrino.

Tecniche di colorazione

I vetrini con gli strisci possono essere fissati

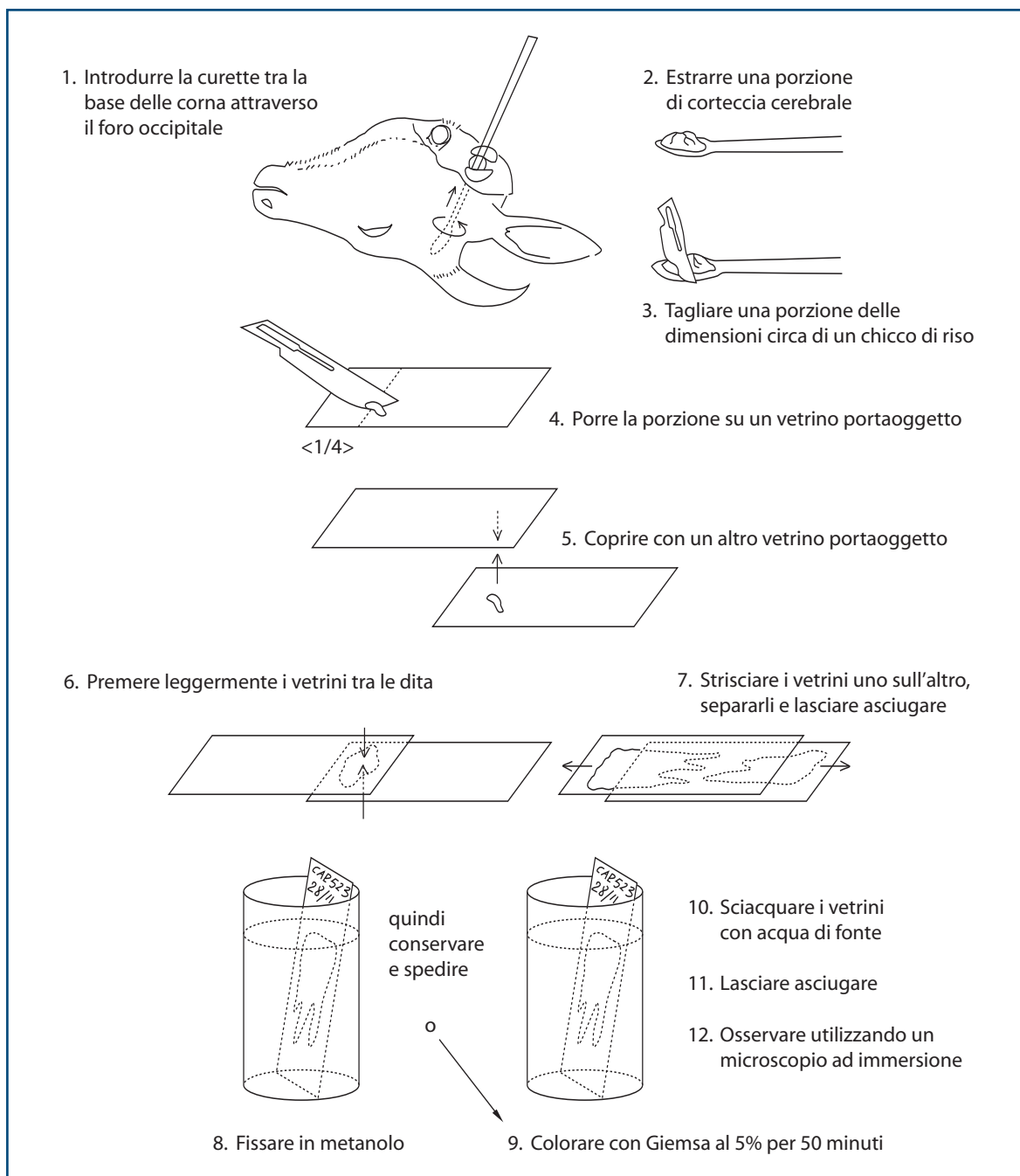


Figura 8. Tecnica del prelievo cerebrale post-mortem (24).

con metanolo per 5 minuti e poi colorati con la metodica Giemsa o May Grunwald-Giemsa. Nelle diagnosi di campo possono essere utilizzati, con ottimi risultati, i kit di colorazione rapida (es. Diff Quick, RAL555). La colorazione con arancio di acridina è utile per l'osservazione al microscopio a fluorescenza. Una volta fissati i vetrini possono essere colorati anche dopo lungo tempo.

Biotechnologie

La messa a punto di nuove tecniche diagnostiche [es.: *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, *Reverse Line Blot (RLB)* e *DNA hybridization*] ha permesso di caratterizzare con precisione l'agente causale della malattia, l'Istituto che si sta occupando del sequenziamento al momento è il *Wellcome Trust Ranger Institute, Cambridge (U.K.)*. La dimensione del genoma è approssimativamente stabilita in 1576 kb (33)

con un contenuto di Guanina + Citosina corrispondente a circa il 29,5%. Al 2003 nel database dell'istituto sono contenuti 3139 kb, circa l'86,3% del genoma completo, ottenuti attraverso la frammentazione del DNA con l'utilizzo degli enzimi di restrizione.

I geni utilizzati come target comprendono SSUrRNA (16S), pCS20 e MAP1. Il pCS20 è il più sensibile e specifico per l'agente eziologico dell'heartwater, ma non è in grado di distinguere i diversi genotipi. Il gene MAP1 è stato anche usato per la diagnosi, anche se il suo notevole polimorfismo lo rende più adatto alla caratterizzazione dei differenti genotipi di *Ehrlichia ruminantium* nonché all'identificazione di nuove specie del genere *Ehrlichia* (28).

Le tecniche di PCR si sono dimostrate efficaci nel diagnosticare l'infezione sia nelle zecche che negli animali durante la fase clinica della malattia o dopo la morte. Al contrario, poche informazioni si hanno sull'effettivo valore nell'individuare portatori sani. *Ehrlichia ruminantium* può essere facilmente reperita nel sangue degli animali infetti subito dopo l'inizio del periodo febbrile fino a pochi giorni dopo la guarigione, ma successivamente sembra scomparire dal circolo sanguigno. Rimane da chiarire se il mancato riscontro dell'*Ehrlichia ruminantium* nella maggior parte degli animali "carrier subclinici" sia dovuto ad un'insufficiente sensibilità del metodo a fronte di bassi livelli di rickettsiemia, oppure ad un'effettiva oscillazione dei livelli di *Ehrlichia ruminantium* nel circolo sanguigno fino alla sua scomparsa. Una tecnica utilizzabile per confermare lo status di portatore subclinico nel caso di animali PCR negativi è alimentare gruppi di zecche non infette sugli animali sospetti e quindi testare le stesse mediante PCR (64).

Diagnosi indiretta

Durante l'infezione naturale o sperimentale gli anticorpi compaiono da 2 a 3 settimane raggiungendo un picco tra le 4 e le 6 settimane e restano riconoscibili per un periodo molto variabile a seconda della specie animale coinvolta e del ceppo:

- nei bovini sono rilevabili per un periodo che varia, a seconda degli autori e soprat-

tutto delle tecniche utilizzate, tra 1 e 6 mesi. Alcuni studi epidemiologici longitudinali hanno recentemente dimostrato che un numero significativo di bovini in zone di endemia non producevano affatto anticorpi e, se anche presenti, erano molto fugaci;

- negli ovini gli anticorpi persistono per circa 39 mesi;
- nei caprini tale periodo è molto variabile essendo compreso tra i 3 e i 24 mesi.

Queste differenze nella durata della persistenza degli anticorpi si riflettono nelle medesime condizioni in una minore sieroprevalenza nelle popolazioni di bovini rispetto a quelle di ovini e caprini (58).

In generale i test usati per la sierodiagnosi di heartwater presentano tutti dei limiti di specificità legati alla presenza di antigeni di superficie comuni a diverse specie del genere *Ehrlichia*. Di seguito i test principalmente utilizzati.

Immunofluorescenza indiretta- antigeni *in vivo* (MIFA test)

I macrofagi di topo hanno il vantaggio di essere molto sensibili e il loro utilizzo necessita di un laboratorio specializzato.

L'impiego di neutrofili provenienti da capre infette fornisce risultati poco riproducibili e non può essere utilizzato di routine.

Immunofluorescenza indiretta - antigeni *in vitro* (CIFA test)

Gli antigeni prodotti *in vitro*, cresciuti su colture cellulari, possono essere utilizzati anche da laboratori non specializzati anche se presentano l'inconveniente di reazioni falsamente positive e quindi una ridotta specificità.

Immunoenzimatica

Sono state messe a punto due metodiche ELISA basate sull'utilizzo di antigeni ricombinanti MAP1 con l'obiettivo di risolvere il problema causato dalle cross reazioni con le altre specie di *Ehrlichia*: la prima è una metodica ELISA indiretta che utilizza una regione immunogenetica della proteina MAP1 (chia-

mata MAP1 B) la quale fornisce un esiguo numero di cross reazioni con gli altri appartenenti al genere *Ehrlichia* (MAP1-B ELISA). La seconda è una metodica ELISA competitiva che utilizza il gene MAP1 clonato in un baculovirus ed anticorpi monoclonali prodotti verso la proteina MAP1 (MAP1 C-ELISA). Con entrambe le metodiche i livelli di specificità sono migliorati sensibilmente, anche se rimangono ancora irrisolti i problemi legati alle cross-reattività con sieri ad alto titolo anticorpale verso *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffensis* e un non ancora classificato agente patogeno del cervo a coda bianca americano (*Odocoileus virginianus*) (64).

Diagnosi differenziale

Nei bovini

Babesiosi

Babesia bovis, nella forma cerebrale dell'infezione, causa sintomatologia nervosa simile che è possibile differenziare tramite l'evidenziazione dei parassiti all'interno degli eritrociti (41, 87).

Theileriosi

Theileria parva agente causale dell'*East Coast fever* e *Theileria taurotragi* che provoca una grave affezione cerebrale ("Ornilo" in lingua Maasai) possono essere confuse con l'heartwater e la diagnosi su vetrino è importante per la differenziazione.

Tripanosomosi trasmesse da tse-tse

Confondibile la forma iperacuta, ma facilmente distinguibili sono i parassiti nel sangue (24).

Altre rickettsiosi

L'infezione da *Ehrlichia bovis* è sintomatologicamente simile, ma gli organismi si repertano nei monociti circolanti (78).

Nei piccoli ruminanti

Endoparassitosi

Strongili gastrointestinali e infestazioni da *Oesophagostomum* sp. possono causare ipo-

natremia con idropericardio in animali cachettici ed anemici. La progressione lenta, l'assenza di sintomatologia nervosa, di febbre e il reperto dei parassiti permettono di differenziare le patologie (24).

Bluetongue

Malattia che si manifesta spesso nelle aree di epidemia dell'heartwater e che può provocare idropericardio, le lesioni boccali e podaliche la rendono facilmente distinguibile (24).

Tetano, intossicazione da stricnina, da acaricidi e ingestione di piante velenose. Meningoencefaliti batteriche e ascessi dell'ipofisi (soprattutto nelle capre)

La sintomatologia è confondibile con casi iperacuti di heartwater. Un'attenta anamnesi può essere d'aiuto (17, 24), ma è il reperto di *Ehrlichia ruminantium* negli strisci di materiale cerebrale che permette di confermare con certezza la presenza di heartwater.

Carbonchio ematico

Causa morte improvvisa susseguente ad un innalzamento della temperatura. La diagnosi differenziale è semplice a livello autoptico per i caratteristici reperti (24). Inoltre è possibile evidenziare le capsule di *Bacillus anthracis* mediante colorazioni specifiche.

Polmoniti

La sintomatologia polmonare ha un rilievo maggiore che nell'heartwater (17, 24).

Altre rickettsiosi

Ehrlichia ovina provoca una sintomatologia simile, ma gli organismi si repertano nei monociti circolanti. La sua presenza può facilitare l'infezione da parte di *Ehrlichia ruminantium* (24, 44).

Nei piccoli ruminanti e nei bovini

Coccidiosi e Botulismo

Confondibili con forme acute o subacute dell'heartwater (24), nel primo caso il rinvenimento delle caratteristiche oocisti nelle feci permette una diagnosi certa.

Rabbia

La sintomatologia nervosa, nonché il carattere zoonotico della rabbia, sono alla base della necessità di differenziare le due patologie. Importante è a tal fine l'indagine epidemiologica e la raccolta dell'anamnesi (eventuali morsi di carnivori).

Chlamydiosi

La differenziazione morfologica tra *Chlamydia*

sp. e *Ehrlichia ruminantium* non è semplice sia nei vetrini che nelle sezioni tissutali. Entrambi gli organismi sono pleomorfi e presentano corpi elementari, intermedi e reticolati, tuttavia nelle colonie di chlamydie, a differenza di quelle di ehrlichie spesso omogenee, si riscontrano più frequentemente tutte le varie forme. Le due infezioni sono anche distinguibili per le differenti lesioni istopatologiche cerebrali (17).

Controllo e terapia

Trattamento della patologia

Molti farmaci sono utilizzati per la cura dell'heartwater; ad oggi il trattamento di elezione è rappresentato dall'utilizzo di antibiotici appartenenti alla famiglia delle tetracicline che, per sviluppare la maggiore efficacia, devono essere somministrati il più precocemente possibile, con un certo anticipo rispetto all'insorgenza della sintomatologia clinica ed in particolare di quella nervosa. L'ossitettraciclina fornisce un'ottima risposta sia nella formulazione normale sia in quella ad azione prolungata (20 mg/kg, unica somministrazione), senza peraltro impedire lo sviluppo dell'immunità, ma non sterilizzando l'animale dall'infezione (17). In condizioni di campo il trattamento tempestivo è un obiettivo di non facile realizzazione.

Terapia di sostegno

Diuretici

Utili per il trattamento dell'edema cerebrale. Ne è suggerito l'utilizzo in combinazione con antinfiammatori e antibiotici (94).

Simpaticomimetici, elettroliti, calcio, plasma o sangue intero

Può esserne preso in considerazione l'utilizzo

come trattamento di sostegno, per ridurre l'acidosi, contrastare l'atonìa ruminale e la sintomatologia neuro-muscolare (3, 27, 47).

Terapie tradizionali

Le popolazioni pastorali dell'Africa, come del resto del mondo, possiedono un bagaglio culturale tradizionale di fondamentale importanza per il mantenimento e la gestione del loro patrimonio animale. I Masai rappresentano non certamente l'unico, ma forse il più conosciuto esempio di tale sapere che riguarda non soltanto le malattie più frequenti ma anche i periodi dell'anno più rischiosi, l'associazione con vettori o parassiti, la presenza di pascoli infestati e quindi a rischio, fino all'utilizzo di terapie tradizionali per il controllo e la cura delle malattie.

Il Sudafrica non fa eccezione ed, infatti, uno studio condotto con le tecniche di apprendimento rapido partecipato (*Rapid Rural Appraisal*) in una provincia del nord-est (Madikwe Area) ha messo in evidenza la capacità, da parte della popolazione locale, di utilizzare 45 piante appartenenti a 26 famiglie differenti per la cura del bestiame. Tali sostanze sono usate da sole o in associazione per 29 indicazioni diverse tra le quali ritenzione placentare, diarrea, fratture, infiammazioni oculari, problemi di fertilità, endo ed ectoparassiti e, appunto, l'heartwater (96).

Chemioprofilassi

Questa procedura consiste in una serie di iniezioni di tetracicline utilizzate per proteggere gli animali suscettibili quando vengono introdotti in aree dove l'heartwater è endemica (42).

Nelle capre si consigliano somministrazioni di tetracicline ad azione rapida ad un dosaggio di 3 mg/kg di peso vivo, ai giorni 10, 20, 30, 45 e 60 dopo l'introduzione, ma gli animali non devono essere trattati con bagni antiparassitari ("dipping") nei primi due mesi (59).

Nei bovini iniezioni di tetracicline ad azione prolungata, a dosaggi di 10-20 mg/kg di peso vivo, ai giorni 7, 14 e 21 proteggono dall'infezione, consentendo anche lo sviluppo di un'immunità acquisita (77).

Il concetto alla base di questa procedura è che gli animali si infettino naturalmente durante il periodo di protezione consentito dal farmaco. La variabilità del grado di infestazione da zecche può inficiare l'efficacia di questa pratica.

Strategie vaccinali

Controllo tramite vaccini

Numerosi tentativi sono stati fatti o sono in corso per lo sviluppo di vaccini vivi attenuati o inattivati anche se attualmente non è disponibile alcun prodotto in commercio. Fra i migliori risultati si può annoverare una preparazione che utilizza un'emulsione di corpi elementari inattivati in olio adiuvante di Freund, che conferisce una buona protezione a capre suscettibili (59) e a bovini (86) unicamente per il ceppo di *Ehrlichia ruminantium* incluso nel vaccino mentre nelle pecore è in grado di fornire cross-protezione anche per diversi ceppi (56).

Controllo tramite infezione controllata

Metodo anche definito come "vaccino crudo" o "infezione e trattamento". Consiste nella somministrazione di una dose calibrata di sangue infetto o di omogenato di zecche infette in ani-

mali suscettibili, seguito da un trattamento con tetracicline ai soggetti che reagiscono (64). Dai 2 ai 10 ml di sangue infetto o 100 µl di surnatante di omogenato di zecche infette possono essere iniettati endovena, lentamente, per prevenire reazioni anafilattiche usando, in certi casi, anche la vena auricolare. All'instaurarsi di una risposta febbrile (in genere tra i 12 e i 22 giorni), deve essere somministrato il trattamento antibiotico ad azione rapida, sistematicamente a tutti gli animali di età superiore ai 21 giorni al dosaggio di 510 mg/kg di peso vivo per 3 giorni o fino a quando la febbre scende oppure ad effetto protratto al dosaggio di 20 mg/kg di peso vivo in unica somministrazione. In Sudafrica, ogni anno, decine di migliaia di animali vengono trattati con questo metodo, utilizzando il ceppo Ball 3, moderatamente patogeno.

Entrambi i metodi conferiscono una protezione rispetto alla manifestazione clinica della patologia, ma non preservano dall'infezione.

Controllo immunologico della zecca

Al momento non è disponibile, e neanche in fase sperimentale, un vaccino protettivo nei confronti del vettore, come invece è stato sviluppato per alcune specie del genere *Boophilus*.

Controllo attraverso la ricerca della stabilità endemica

In alcuni casi, sebbene con pareri controversi, si è cercato di raggiungere un equilibrio tra ospite, vettore e parassita per ridurre le ingenti perdite dovute alle epidemie della malattia. In questo senso va interpretata la strategia attuata in aree endemiche che prevede la riduzione progressiva fino ad un livello costante dei trattamenti antiparassitari esterni, ciò fa sì che la frequenza di contatti tra ospite suscettibile e zecche infette permetta l'acquisizione di livelli di immunità idonei al raggiungimento ed al mantenimento dello stato di stabilità endemica (101).

Heartwater: un possibile rischio per l'Italia?

Abbiamo visto come l'epidemiologia dell'heartwater sia assai complessa e condizionata da caratteristiche legate sia all'agente patogeno, sia all'ospite nonché al vettore.

Tali caratteristiche rappresentano in alcuni casi fattori favorenti la diffusione della patologia ed altri fattori limitanti l'insorgenza e la diffusione della stessa.

L'agente eziologico

Per quanto riguarda l'agente eziologico possono essere considerati fattori favorenti:

- l'elevata patogenicità, in particolare nei confronti delle razze esotiche;
- la diversa patogenicità dei diversi ceppi per le differenti specie sensibili;
- la possibile assenza di sterilizzazione dell'animale guarito clinicamente;
- la possibilità di trasmissione verticale nell'ospite;
- la presenza di cross-reazioni nei test sierologici.

Mentre possono essere considerati fattori limitanti:

- l'incapacità di sopravvivere al di fuori dell'ospite e/o del vettore;
- la necessità di un vettore competente per la trasmissione (zecche del genere *Amblyomma*).

L'ospite

Analogamente, per quanto riguarda l'ospite, possono essere considerati fattori favorenti:

- l'ampia gamma di specie sensibili all'infezione con specie selvatiche (quindi di difficile controllo) che fungono da *reservoir*;
- la possibilità di avere portatori asintomatici;
- la trasmissione verticale.

E, al contrario, fattori limitanti:

- l'elevata letalità con prevalenza di forme iperacute nei focolai di prima insorgenza;
- la presenza di immunità colostrale.

Il vettore

Infine, per il vettore, possono essere considerati fattori favorenti:

- la bassa specificità parassitaria almeno per i due principali vettori (*Amblyomma variegatum* ed *Amblyomma hebraeum*);
- la possibilità per le forme immature di essere veicolate da uccelli migratori;
- la trasmissione trans-stadiale;
- la possibilità di mantenere l'infezione nell'ambiente anche per lunghi periodi (in relazione alla durata del ciclo di sviluppo del vettore).

E, al contrario, fattori limitanti:

- la sopravvivenza del vettore condizionata dalla presenza di un determinato habitat (clima caldo umido con presenza di vegetazione);
- l'assenza di trasmissione trans-ovarica.

Possibili vie d'introduzione dei vettori e di heartwater in aree indenni

Introduzione di ruminanti selvatici e/o domestici infetti e/o infestati da *Amblyomma sp.*

Attualmente la normativa internazionale che regola il commercio di animali vivi rende improbabile l'introduzione, tramite gli scambi legali di ruminanti domestici e/o selvatici, di heartwater e/o di esemplari di *Amblyomma* vettori in un paese indenne. In passato tali scambi hanno permesso l'introduzione nel continente americano di *Amblyomma variegatum* e di heartwater (68).

L'invasione delle isole caraibiche

Esemplari di *Amblyomma variegatum* sono stati introdotti nelle Regione Caraibica all'inizio del diciannovesimo secolo attraverso l'importazione di bestiame infestato dal Senegal alle Antille francesi (Guadalupa 1828). Successivamente la zecca ha invaso il territorio diffondendosi ad altre isole dell'arcipelago (68).

Nel 1980 heartwater è stata confermata per la prima volta nel continente americano nell'isola di Guadalupa (6). Attualmente nell'arcipelago sono presenti sia la sintomatologia clinica di heartwater sia positività sierologiche per *Ehrlichia ruminantium*.

La diffusione di *Amblyomma variegatum* nell'arcipelago caraibico è stata facilitata dall'arrivo, nel 1877 (29), attraverso l'Atlantico, dell'airone guardabuoi (*Bubulcus ibis*) (figura 9), anch'esso di origine africana, e dalla sua successiva diffusione a tutta l'area centro-americana.

Alcune caratteristiche etologiche peculiari di questo uccello appartenente alla famiglia degli Ardeidi hanno fatto sì che esso fungesse da veicolo di *Amblyomma variegatum* nell'arcipelago caraibico:

- specializzazione nell'associarsi agli animali che pascolano in ambienti aperti (figura 10);
- alimentazione basata su artropodi che si posano sul corpo degli animali, sui loro parassiti oppure sugli insetti che si sollevano al passaggio degli stessi (figura 11);
- adattabilità a vari ambienti (è il meno "acquatico" degli aironi); è una specie in espansione, originario dell'Africa, infatti è oramai presente in tutti i continenti (corologia subcosmopolita) (29).

In considerazione delle gravi perdite da *Amblyomma variegatum* indotte all'industria zootecnica a fronte dell'ingente quantitativo di importazione atto a soddisfare l'industria turistica, nel 1995 ha preso il via un imponente programma di eradicazione chiamato "Caribbean *Amblyomma* Programm" (CAP). Dal 1995 al 2005 i partner del CAP, cioè il dipartimento dell'Agricoltura del governo federale degli Stati Uniti (*USDA - United States Department of Agriculture*), il governo france-

se, la *FAO (Food and Agriculture Organization)*, il fondo internazionale per lo sviluppo agricolo (*IFAD - International Fund for Agricultural Development*), l'Istituto Inter-Americano per la cooperazione in agricoltura (*IICA - Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture*) ed i governi delle isole caraibiche, hanno lavorato alacremente per ottenere l'eradicazione di *Amblyomma variegatum*.



Figura 9. Airone guardabuoi (*Bubulcus ibis*).



Figura 10. Airone guardabuoi e ruminanti selvatici.



Figura 11. Airone guardabuoi e ruminanti domestici.

Grazie a questi sforzi, durante questo periodo di tempo *Amblyomma variegatum* è stata eradicata da Anguilla, Montserrat e St. Vincent ed inoltre, i livelli di infestazione di Barbados, St. Kitts, Nevis, Dominica e Santa Lucia si sono significativamente ridotti. Nonostante ciò, a dicembre 2005, i partner del programma hanno preso consapevolezza che l'eradicazione dell'*Amblyomma variegatum* dalla regione caraibica non era un obiettivo raggiungibile e, pertanto, il CAP è stato convertito da programma di eradicazione in un grande programma di controllo interessante tutte le isole Caraibiche. Questa nuova evoluzione del programma dovrebbe concentrare i suoi sforzi principalmente sulla messa in atto di un sistema di sorveglianza e di misure di controllo di *Amblyomma variegatum* nell'area caraibica (25).

Introduzione di animali esotici diversi dai ruminanti infestati da *Amblyomma* sp. eventualmente infetti

L'importazione di animali esotici diversi dai ruminanti da aree di endemia aggravata dalla possibilità che tali scambi seguano vie illegali, rappresenta una via ad alto rischio d'introduzione di esemplari di zecche esotiche. Suggestivo a riguardo è ciò che avvenuto alla fine degli anni novanta in Florida.

Il caso della Florida

L'aumento di importazioni di animali selvatici ed in particolare di rettili esotici da aree di ende-

mia unito alla vicinanza della Florida alla regione caraibica, ha naturalmente intensificato le possibilità di introduzione di heartwater negli USA; dal 1997 al 2000 sono stati segnalati 500 esemplari di zecche vettori di heartwater introdotti con l'importazione di animali selvatici. Nell'agosto 1997 in un rettilario è stata segnalata l'infestazione da parte di *Amblyomma marmoreum* (figura 12), specie africana vettore sperimentale di heartwater parassita di rettili. Il ritrovamento di esemplari ai vari stadi di sviluppo testimoniava che *Amblyomma marmoreum* era in grado in quel microhabitat di compiere l'intero ciclo e che quindi l'infestazione era presente nel rettilario da tempo.

Successivamente la presenza di *Amblyomma marmoreum* è stata confermata in altre 7 contee della Florida. In tutti i casi l'introduzione della zecca è stata attribuita al commercio di rettili vivi (4, 101).

Nel novembre 1999, 15 esemplari di *Amblyomma sparsum* raccolti da esemplari di tartaruga leopardo (*Geochelone pardalis*) (figura 13) importate dall'Africa sono risultati positivi alla PCR per *Ehrlichia ruminantium* (20).

Nel 1999 l'insieme di questi fatti ha portato le autorità sanitarie della Florida ad attuare sulle importazioni di animali esotici un piano di sorveglianza nei confronti dell'introduzione di zecche esotiche.

La Florida è inoltre compresa nelle rotte migratorie del continente americano (figura 14) che la collegano direttamente con i Caraibi; esemplari di aironi guardabuoi inanelati in Guadalupe sono frequentemente ricataturati nel sud della Florida.



Figura 12. *Amblyomma marmoreum* (Jim Occi, BugPics, Bugwood.org).



Figura 13. *Geochelone pardalis*.

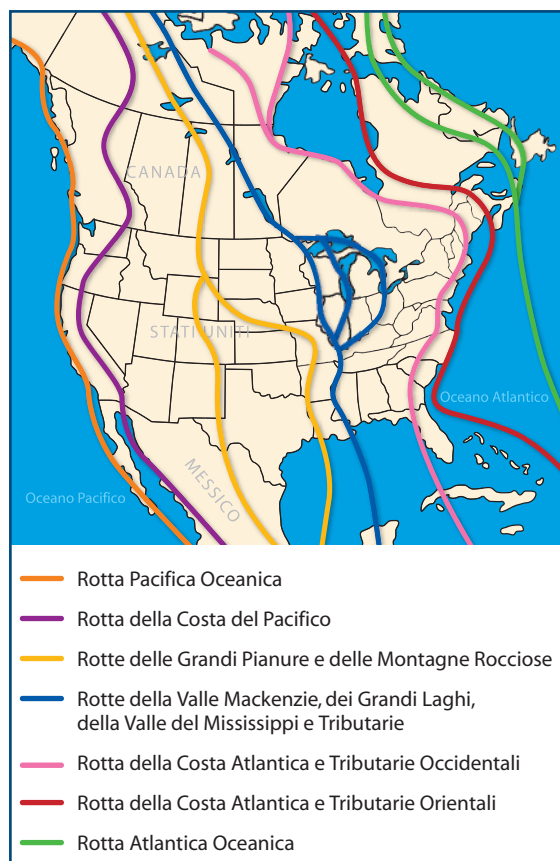


Figura 14. Rotte migratorie del Nord America.

Questo elevato livello d'attenzione presente negli stati della costa sud-orientale degli USA verso heartwater, è ancor più giustificato dall'ampia e capillare diffusione in tutti gli stati che si affacciano sul golfo del Messico di *Amblyomma maculatum* (*the Gulf Coast Tick*) (figura 15), potenziale vettore di heartwater (90).

32

Introduzione tramite uccelli migratori di *Amblyomma sp.* eventualmente infetti

Le rotte degli uccelli migratori sono vie d'introduzione di patogeni che, sebbene conosciute da tempo, si presentano difficilmente controllabili. Non mancano gli esempi di introduzione o di espansione di areali di specie di zecche i cui immaturi si nutrono su uccelli migratori, come ad esempio le due sottospecie della zecca *Hyalomma marginatum*.

Hyalomma marginatum marginatum, per poter compiere i primi due stadi di sviluppo sugli uccelli e per potersene servire come



Figura 15. *Amblyomma maculatum* (Jim Occi, BugPics, Bugwood.org).

mezzo di dispersione, ha accorciato notevolmente la durata del suo ciclo di sviluppo: la nutrizione delle larve, la loro muta in ninfe e il pasto di queste, richiedono, infatti, circa 20 giorni, cioè un lasso di tempo spesso superiore a quello necessario agli uccelli per i loro trasferimenti dai siti di svernamento a quelli di estivazione o viceversa. Tale meccanismo di dispersione ha fatto sì che *Hyalomma marginatum marginatum*, specie di origine africana, sia presente fino all'Europa centrale. Questa dispersione è però condizionata dalla dinamica stagionale di *Hyalomma marginatum marginatum*, i cui immaturi sono attivi in primavera e gli adulti, invece, in estate e fino al tardo autunno, sicché gli uccelli migratori, possono disperdere la zecca dalle zone più meridionali a quelle più settentrionali (migrazione primaverile) del loro naturale areale di distribuzione (57). Tramite lo stesso meccanismo *Hyalomma marginatum rufipes*, endemico nella regione etiopica, si è insediata tramite uccelli migratori nelle regioni dell'area caspica e probabilmente anche in Sicilia (2, 57). L'introduzione tramite uccelli migratori trans-sahariani di *Amblyomma sp.* e quindi di heartwater rimane verosimile ed in tal senso vanno interpretate le segnalazioni sporadiche di *Amblyomma variegatum* nell'area mediterranea (*Amblyomma variegatum* è già stato segnalato nel 1977 in Italia e un decennio più tardi in Grecia) (2, 66).

Quale rischio per l'Italia?

Il bacino del mediterraneo risulta compreso nelle principali rotte migratorie trans-saha-

riane che seguono tragitti che mettono in diretta comunicazione zone indenni (Europa) ed altre endemiche (Africa Sub-sahariana, regione etiopica) (figura 16). In Italia sono attualmente riconosciute come appartenenti alla fauna autoctona 500 specie di uccelli (1999) di cui circa i due terzi compiono migrazioni (di questi solo una parte attraverso il Sahara in tempi molto brevi, circa una settimana). Si tratta di milioni di uccelli che ogni anno lasciano i siti di svernamento africani per i siti di nidificazione nord-europei e che, una volta arrivati sulle coste dell'Africa settentrionale, si dividono in tre gruppi che seguono tre diverse rotte di volo sul Mediterraneo: una passa sullo stretto di Gibilterra, un'altra sull'Italia ed una terza sull'Europa sud-orientale. Queste specie di uccelli vengono definite "migratori veloci" poiché, durante il periodo primaverile (aprile-maggio), sono in grado di volare per circa 4.000 Km senza soste e di compiere il lungo viaggio che li separa dalle aree di riproduzione in circa una settimana. Alcuni di questi uccelli nidificano in Italia, che è posta sul tragitto delle rotte migratorie occidentali al limite dei 4.000 Km, ma moltissimi

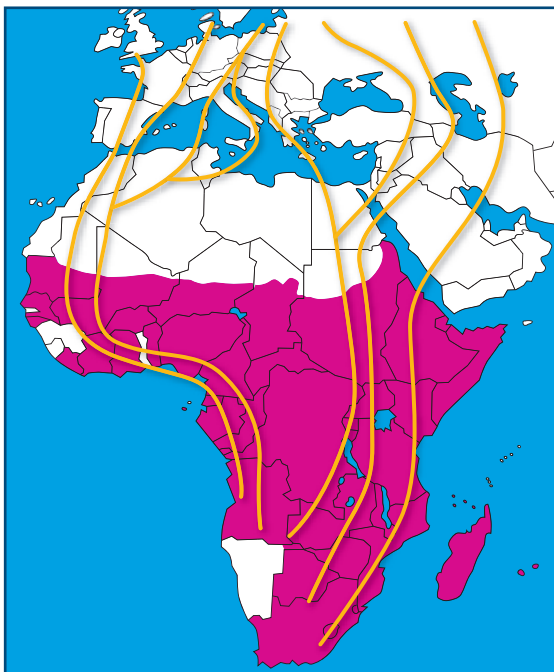


Figura 16. Tragitti delle rotte migratorie transahariane; in fuxia è evidenziata la distribuzione di heartwater in Africa.

vi si fermano per alcuni giorni, a seconda delle condizioni atmosferiche, per riposarsi e per alimentarsi ("refuelling"). Allo stesso modo nel nostro paese nidificano specie dei

Tabella IV. Principali specie di uccelli migratori a lungo raggio le cui rotte interessano il territorio italiano (43, 60).

Posizione sistematica Nome scientifico	Nome comune
Ordine Ciconiformi	
Famiglia Ardeidi	
<i>Ixobryncus minutus</i>	Tarabusino (figura 17)
<i>Nycticorax nycticorax</i>	Nitticora
<i>Ardeola ralloides</i>	Sgarza ciuffetto
<i>Ardea purpurea</i>	Airone rosso (figura 18)
Ordine Anseriformi	
Famiglia Anatidi	
<i>Anas acuta</i>	Codone
<i>Anas querquedula</i>	Marzaiola
Ordine Charadriiformi	
Famiglia Recurvirostridi	
<i>Himantopus himantopus</i>	Cavaliere d'Italia
Famiglia Burinidi	
<i>Burhinus oedincnemus</i>	Occhione
Famiglia Glareolidi	
<i>Glareola pratincola</i>	Pernice di mare
Famiglia Charadriidi	
<i>Charadrius dubius</i>	Corriere piccolo
<i>Charadrius hiaticula</i>	Corriere grosso
<i>Pluvialis squatarola</i>	Pivieressa
Famiglia Scolopacidi	
<i>Calidris canutus</i>	Piovanello maggiore
<i>Calidris alba</i>	Piovanello tridattilo
<i>Calidris ferruginea</i>	Piovanello comune
<i>Calidris minuta</i>	Gambecchio
<i>Calidris temmincki</i>	Gambecchio nano
<i>Philomachus pugnax</i>	Combattente
<i>Scolopax rusticola</i>	Beccaccia
Famiglia Tringini	
<i>Limosa limosa</i>	Pittima reale
<i>Limosa lapponica</i>	Pittima minore
<i>Numenius phaeopus</i>	Chiurlo piccolo
<i>Tringa nebularia</i>	Pantana
<i>Tringa glareola</i>	Piro piro boschereccio
<i>Tringa ochropus</i>	Piro piro culbianco
<i>Tringa hypoleucos</i>	Piro piro piccolo
<i>Tringa erythropus</i>	Totano moro
<i>Tringa stagnatilis</i>	Albastrello
Famiglia Arenarini	
<i>Arenaria interpres</i>	Voltapietre
Famiglia Laridi	
<i>Larus fuscus</i>	Zafferano
Famiglia Sternidi	
<i>Chlidonias niger</i>	Mignattino
<i>Chlidonias hybridus</i>	Mignattino piombato
<i>Sterna hirundo</i>	Sterna comune
<i>Sterna albifrons</i>	Fratello
<i>Sterna sandvicensis</i>	Beccapesci

segue

cosiddetti “migratori lenti” così detti poiché generalmente non arrivano al di là del Sahara, volano lentamente e fanno soste continue in funzione del clima (43).

La tabella IV riporta alcune specie di uccelli presenti in Italia che svernano in aree africane a sud del Sahara.

Tabella IV. Principali specie di uccelli migratori a lungo raggio le cui rotte interessano il territorio italiano (43, 60).

Posizione sistematica	Nome scientifico	Nome comune
Ordine Passeriformi		
Famiglia Iruinidi		
	<i>Hirundo rustica</i>	Rondine
	<i>Delichon urbica</i>	Balestruccio
	<i>Riparia riparia</i>	Topino
Famiglia Motacillidi		
	<i>Anthus trivialis</i>	Prispolone
	<i>Motacilla flava</i>	Cutrettola
	<i>Anthus campestris</i>	Calandro
Famiglia Turdidi		
	<i>Saxicola rubetra</i>	Stiaccino
	<i>Luscinia megarhynchos</i>	Usignolo
Famiglia Silvidi		
	<i>Sylvia borin</i>	Beccafico
	<i>Sylvia communis</i>	Sterpazzola
	<i>Sylvia atricapilla</i>	Capinera
	<i>Sylvia cantillans</i>	Sterpazzolina
	<i>Sylvia nisoria</i>	Bigia padovana
	<i>Sylvia curruca</i>	Bigiarella
	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	Cannaiola
	<i>Acrocephalus aeruginaceus</i>	Cannareccione
	<i>Acrocephalus palustris</i>	Cannaiola verdognola
	<i>Locustella luscinioides</i>	Salciaiola
	<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	Forapaglie
	<i>Locustella naevia</i>	Forapaglie macchiettato
	<i>Hippolais polyglotta</i>	Canapino comune
	<i>Hippolais icterina</i>	Canapino maggiore
	<i>Sylvia atricapilla</i>	Capinera
	<i>Phylloscopus sibilatrix</i>	Lui verde
	<i>Phylloscopus trochilus</i>	Lui grosso
	<i>Phylloscopus bonelli</i>	Lui bianco
Famiglia Muscicapidi		
	<i>Muscicapa striata</i>	Pigliamosche
	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	Codirosso
	<i>Saxicola rubetra</i>	Stiaccino
	<i>Oenanthe hispanica</i>	Monachella
	<i>Monticola saxatilis</i>	Codirossone
Famiglia Oriolidi		
	<i>Oriolus oriolus</i>	Rigogolo
Famiglia Lanniidi		
	<i>Lanius collurio</i>	Averla
	<i>Lanius minor</i>	Averla cenerina
	<i>Lanius senator</i>	Averla capirossa
Famiglia Alaudidi		
	<i>Calandrella brachydactyla</i>	Calandrella

Alla famiglia degli Ardeidi appartiene anche l'airone guardabuoi (*Bubulcus ibis*) (figura 19) (Linnaeus, 1758), specie politipica a corologia subcosmopolita, in origine indo-africana.

Di recente arrivo in Italia (fino a pochi decenni fa era presente in Europa solo nella penisola Iberica e nella Camargue), la sua presenza è ormai stabile; 800 coppie nidificanti sono distri-

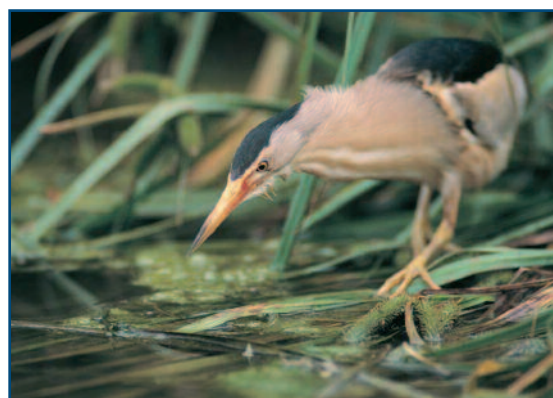


Figura 17. Tarabusino (*Ixobrychus minutus*) (9).

Posizione sistematica	Nome scientifico	Nome comune
Ordine Accipitriformi		
Famiglia Accipitridi		
	<i>Pernis apivorus</i>	Falco pecchiaiolo
	<i>Milvus migrans</i>	Nibbio bruno
	<i>Cyrcaetus gallicus</i>	Biancone
	<i>Circus pygargus</i>	Albanella minore
Famiglia Falconidi		
	<i>Falco naumanni</i>	Grillaio
	<i>Falco subbuteo</i>	Lodolaio
	<i>Falco eleonorae</i>	Falco della regina
Ordine Strigiformi		
Famiglia Strigidi		
	<i>Otus scops</i>	Assiolo
Ordine Galliformi		
Famiglia Phasianidi		
	<i>Coturnix coturnix</i>	Quaglia
Ordine Cuculiformi		
Famiglia Cuculidi		
	<i>Cuculus canourus</i>	Cuculo
Ordine Caprimugiliformi		
Famiglia Caprimugilidi		
	<i>Caprimulgus europaeus</i>	Succiacapre
Ordine Apodiformi		
Famiglia Apodidi		
	<i>Apus apus</i>	Rondone
	<i>Apus melba</i>	Rondone maggiore
Ordine Coraciformi		
Famiglia Meropidi		
	<i>Merops apiaster</i>	Gruccione
Famiglia Upupidi		
	<i>Upupa epops</i>	Upupa

buite prevalentemente in Sardegna, sulla costa tirrenica ed in pianura padana (figura 20) (9).

Analisi tramite l'applicazione di GIS (Geographic Information System)

Considerato quanto detto finora ed in particolare i tragitti migratori degli uccelli, partendo dai dati sull'ecobiologia delle zecche del genere *Amblyomma* ricavabili dalla bibliografia e dai

dati eco-climatici del territorio italiano, è stato possibile tramite analisi effettuata con l'applicazione di GIS (Geographic Information System) costruire delle mappe di rischio di colonizzazione e sopravvivenza di *Amblyomma* sp.



Figura 18. Airone rosso (*Ardea purpurea*) (9).



Figura 19. Airone guardabuoi (*Bulbus ibis*) (9).

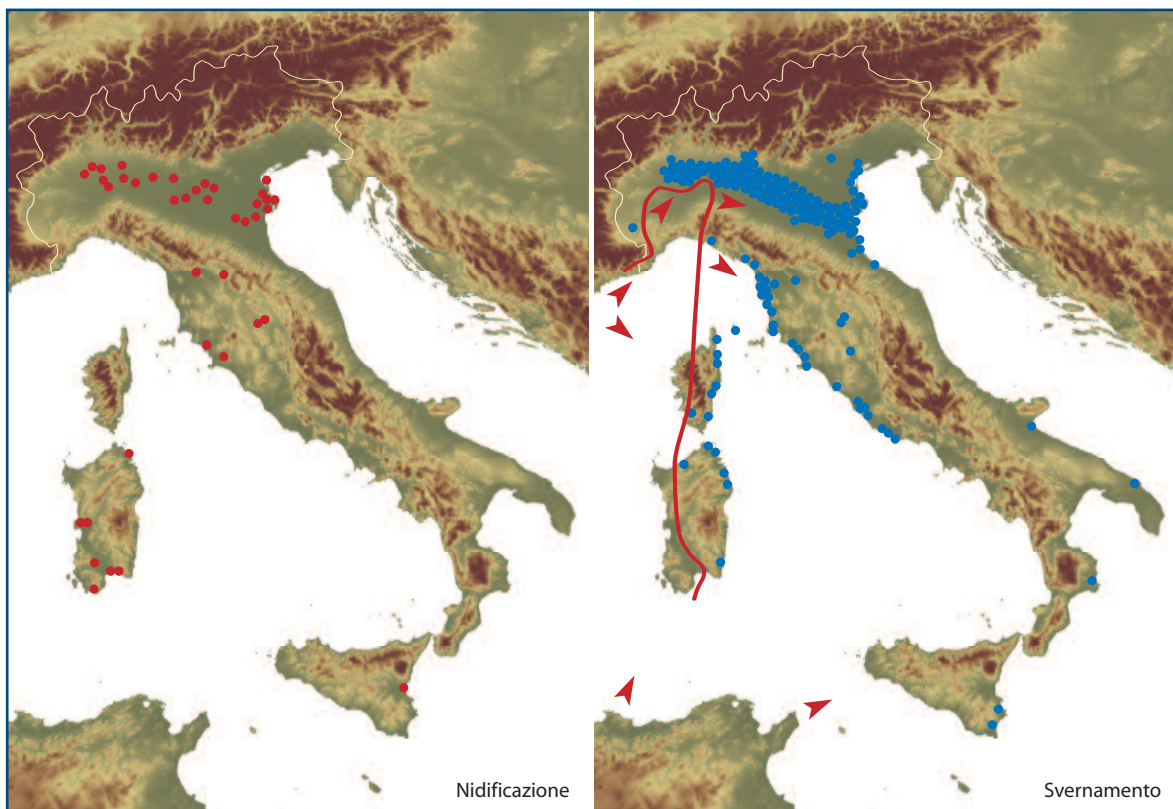


Figura 20. Distribuzione dell'airone guardabuoi (*Bulbus ibis*) in Italia.

I dati sull'ecobiologia delle zecche del genere *Amblyomma*

La ricerca è stata limitata ai due principali vettori africani di heartwater, *Amblyomma hebraeum* e *Amblyomma variegatum*.

In base ai dati sull'ecobiologia dei vettori ricavabili dalla bibliografia, l'uso del suolo nel territorio nazionale, derivato dal CORINE a 250 metri di risoluzione, è stato classificato in 3 categorie di rischio di sopravvivenza e colonizzazione da parte di *Amblyomma sp.* (tabella V).

Il principale criterio per la classificazione per ciascuna tipologia d'uso del suolo è stato la possibilità di creare microhabitat ricchi di umidità e riparati dall'esposizione diretta dei raggi solari.

In base a tale classificazione è stata costruita la mappa riportata nella figura 21.

Successivamente è stato considerato il parametro temperatura. Sono stati raccolti i dati sulle temperature massima, minima e media, nonché gli estremi minimo e massimo registrati negli areali di distribuzione di *Amblyomma variegatum* ed *Amblyomma*

hebraeum durante il picco di attività (fonte *British Broadcasting Corporation*) (10).

Le tabelle VI e VII riportano tali dati per ciascuna delle due specie considerate.

In un secondo momento sono state considerate le temperature medie rilevate da 102 stazioni meteo dell'aeronautica militare italiana nel periodo primaverile (marzo – maggio); tali rilevazioni puntuali sono state trasformate, mediante interpolazione geo-statistica (*ordinary kriging*), in informazioni continue sull'intero territorio nazionale.

La mappa rappresentata nella figura 22 mostra le temperature medie rilevate nel periodo primaverile.

La scelta di contemplare la sola stagione primaverile è motivata dal fatto che è questo il periodo in cui si ha la migrazione verso l'Europa delle specie di uccelli svernanti nell'Africa sub-sahariana; è inoltre da considerare che l'imminente stagione estiva creerebbe le condizioni ideali per l'eventuale insediamento di esemplari di *Amblyomma variegatum* e/o *Amblyomma hebraeum* arrivati con la migrazione primaverile.

Tabella V. Classificazione del rischio di sopravvivenza di *Amblyomma hebraeum* e *Amblyomma variegatum* in base alla tipologia di uso del suolo.

Rischio minimo	Rischio intermedio	Rischio massimo
Aree continue di edificazione urbana	Reti stradali e ferroviarie e territori associati	Campi permanentemente irrigati
Aree discontinue di edificazione urbana	Aree verdi urbane	Vigne
Unità industriali e commerciali	Terre arate non irrigabili	Frutteti
Aree portuali	Campi di riso	Pascoli
Aeroporti	Oliveti	Territorio principalmente occupato dall'agricoltura, ma con consistenti aree occupate dalla vegetazione naturale
Miniere	Seminativi annuali e perenni	Aree agro-forestali
Discariche	Modelli complessi di coltivazione	Foresta di latifoglie
Siti di costruzione	Foreste di conifere	Foresta mista
Strutture per lo sport e il tempo libero	Spiagge, dune, sabbia	Prati naturali
Rocce nude	Piani intercotidali	Brughiere
Aree bruciate		Vegetazione di sclerofille
Ghiacciai e nevi perpetue		Foreste di transizione e cespuglieti
Mari ed oceani		Aree con vegetazione rada
		Paludi interne
		Torbiere

Tabella VI. Temperature, in gradi Celsius, registrate negli areali di distribuzione di *Amblyomma variegatum* al picco di attività, in azzurro ed in rosso sono stati evidenziati i valori minimi e massimi.

Areale	Periodo del picco di attività	T min media	T max media	T min estrema	T max estrema
Tanzania Dar el salaam (costa)	novembre-marzo (stagione delle piogge)	24°	31°	19°	36°
Tanzania Dodoma (interno)	novembre-marzo (stagione delle piogge)	18°	31°	13°	36°
Malawi (Lilongwe - altipiani)	novembre-marzo (stagione delle piogge)	16°	29°	11°	34°
Etiopia (Harrar - altipiani)	marzo-luglio (piogge primaverili)	14°	27°	11°	31°
Nord Somalia (estremamente arido e caldo)	aprile-maggio (stagione delle piogge)	25°	36°	19°	44°
Yemen (costa Mar Rosso)	marzo-luglio	25°	37°	21°	41°
Mozambico (Zumbo - Valle dello Zambesi)	settembre-maggio (stagione delle piogge)	15°	38°	7°	49°
Nigeria (Lagos - costa, caldo e umido)	maggio-giugno, piena stagione delle piogge (picco degli adulti)	23°	31°	21°	40°
Nigeria (Ibadan - area centrale a clima meno umido)	maggio-giugno, piena stagione delle piogge (picco degli adulti)	22°	32°	18°	35°
Nigeria (Kano - area settentrionale a clima più secco)	maggio-giugno (picco degli adulti)	23°	37°	17°	44°
Zimbabwe (Harare - altipiani)	settembre-maggio (stagione delle piogge)	9°	28°	2°	35°

Tabella VII. Temperature, in gradi Celsius, registrate negli areali di distribuzione di *Amblyomma hebraeum* al picco di attività, in azzurro ed in rosso sono stati evidenziati i valori minimi e massimi.

Areale	Periodo del picco di attività	T min media	T max media	T min estrema	T max estrema
Mozambico (Zumbo - Valle dello Zambesi)	settembre-maggio (stagione delle piogge)	15°	38°	7°	49°
Sudafrica (Provincia Città del Capo)	settembre-marzo (primavera/estate australe)	14°	26°	1°	39°
Zimbabwe (Harare - altipiani)	settembre-maggio (stagione delle piogge)	9°	28°	2°	35°

In base alle temperature rilevate negli areali di distribuzione di *Amblyomma variegatum* ed *Amblyomma hebraeum*, quindi, le temperature medie sono state suddivise nelle medesime classi di rischio di sopravvivenza utilizzate per l'uso del suolo (tabella VIII).

Le temperature medie così suddivise sono state mappate sulla base cartografica rappresentante l'intero territorio nazionale.

Successivamente l'applicazione di un modello additivo ha permesso di integrare la mappa delle classi di rischio di sopravvivenza di *Amblyomma variegatum* ed *Amblyomma hebraeum* in base all'uso del

suolo con la mappa delle classi di rischio di sopravvivenza di *Amblyomma variegatum* ed *Amblyomma hebraeum* in base alle temperature medie.

La figura 23 mostra schematicamente tale modello additivo.

La stratificazione dei dati riguardo l'uso del suolo e di quelli derivanti dalla riclassificazione dalle temperature medie nel periodo primaverile ha permesso di costruire una mappa che mostra la distribuzione sul territorio italiano del rischio di sopravvivenza di *Amblyomma variegatum* ed *Amblyomma hebraeum* legato alle condizioni eco-climatiche.

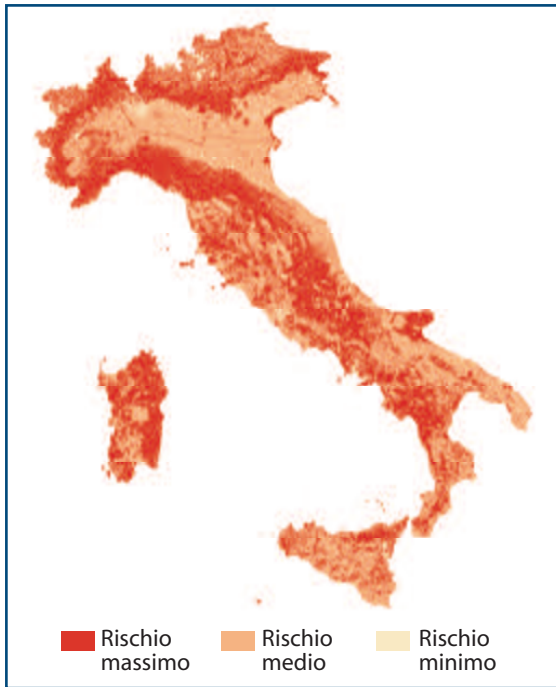


Figura 21. Rischio di sopravvivenza e colonizzazione di *Amblyomma variegatum* e *Amblyomma hebraeum* in base all'uso del territorio.

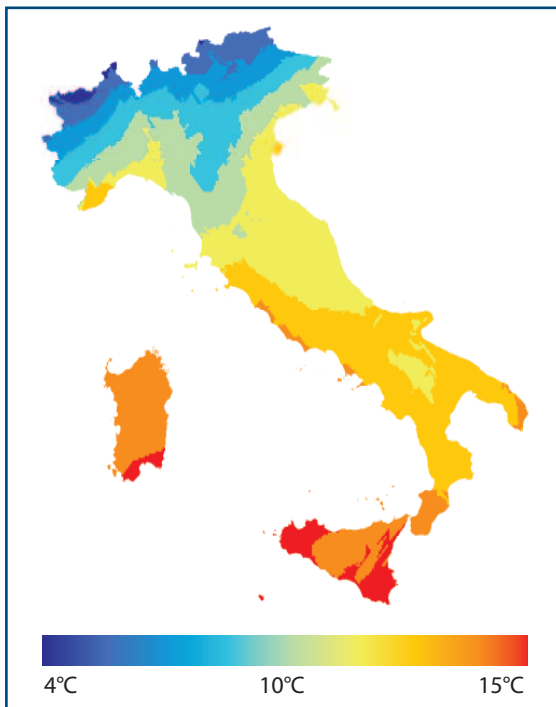


Figura 22. Temperature medie rilevate nel periodo primaverile in Italia.

Tabella VIII. Temperature e rischio di sopravvivenza di *Amblyomma hebraeum* e *Amblyomma variegatum*.

Range	Rischio
< 8°C	basso
8°C - 13°C	medio
> 13°C	alto

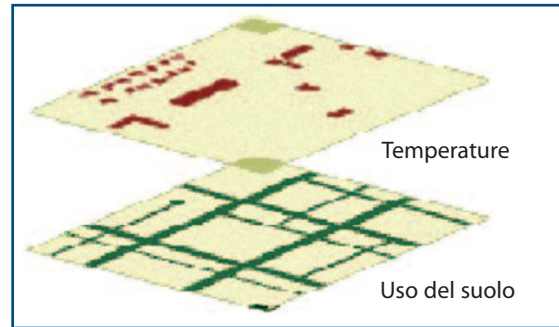


Figura 23. Modello additivo.

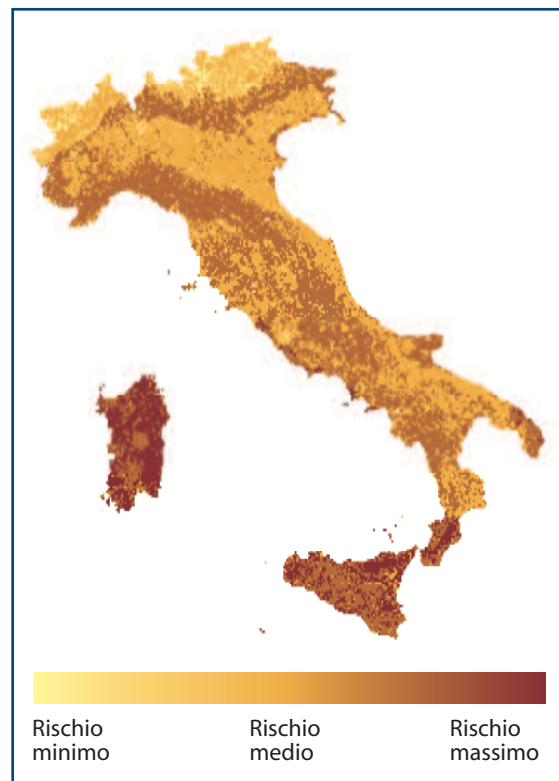


Figura 24. Rischio di sopravvivenza di *Amblyomma variegatum* ed *Amblyomma hebraeum* legato alle condizioni eco-climatiche.

Come appare dalla mappa in figura 24 alcune zone dell'Italia insulare e centro-meridionale a clima particolarmente mite risultano essere quelle a maggior rischio di sopravvivenza di

Amblyomma variegatum ed *Amblyomma hebraeum*.

Nelle stesse aree è inoltre presente e diffuso l'allevamento ovino e bovino allo stato brado.

È inoltre da sottolineare che nel nostro territorio sono presenti aree fondamentali nelle rotte dei migratori che fungono sia da punti di passaggio, come nel caso dello stretto di Messina, che da aree di sosta, come nel caso delle numerose aree fondamentali per il "refuelling" sparse su tutto il territorio nazionale insulare e peninsulare, nelle quali è facile osservare gli uccelli durante i periodi di migrazione.

È da sottolineare inoltre che l'airone guardabuoi (*Bubulcus ibis*) è nidificante in Sardegna meridionale ed in alcune aree della Toscana (padule di Fucecchio).

In bibliografia, inoltre, sono presenti dati sulla potenziale distribuzione di *Amblyomma variegatum*, ottenuti con l'applicazione del sistema computerizzato CLIMEX, che ipotizzano una

possibile presenza di *Amblyomma variegatum* anche nell'area mediterranea (81).

Le zecche italiane?

Finora non è mai stata testata la competenza vettoriale nei confronti di *Ehrlichia ruminantium* delle specie di zecche presenti in Italia. L'assenza sul territorio italiano (come in tutto il resto dell'Europa) di popolazioni stabili di *Amblyomma* è un dato certo, mentre sono presenti e diffuse sul territorio italiano le specie del genere *Hyalomma* e *Haemaphysalis* che filogeneticamente (figura 25) deriverebbero dalla sottofamiglia *Amblyomminae*.

Secondo l'ipotesi di evoluzione degli Ixodidi formulata da Hoogstraal e Kim (1985) (45) i

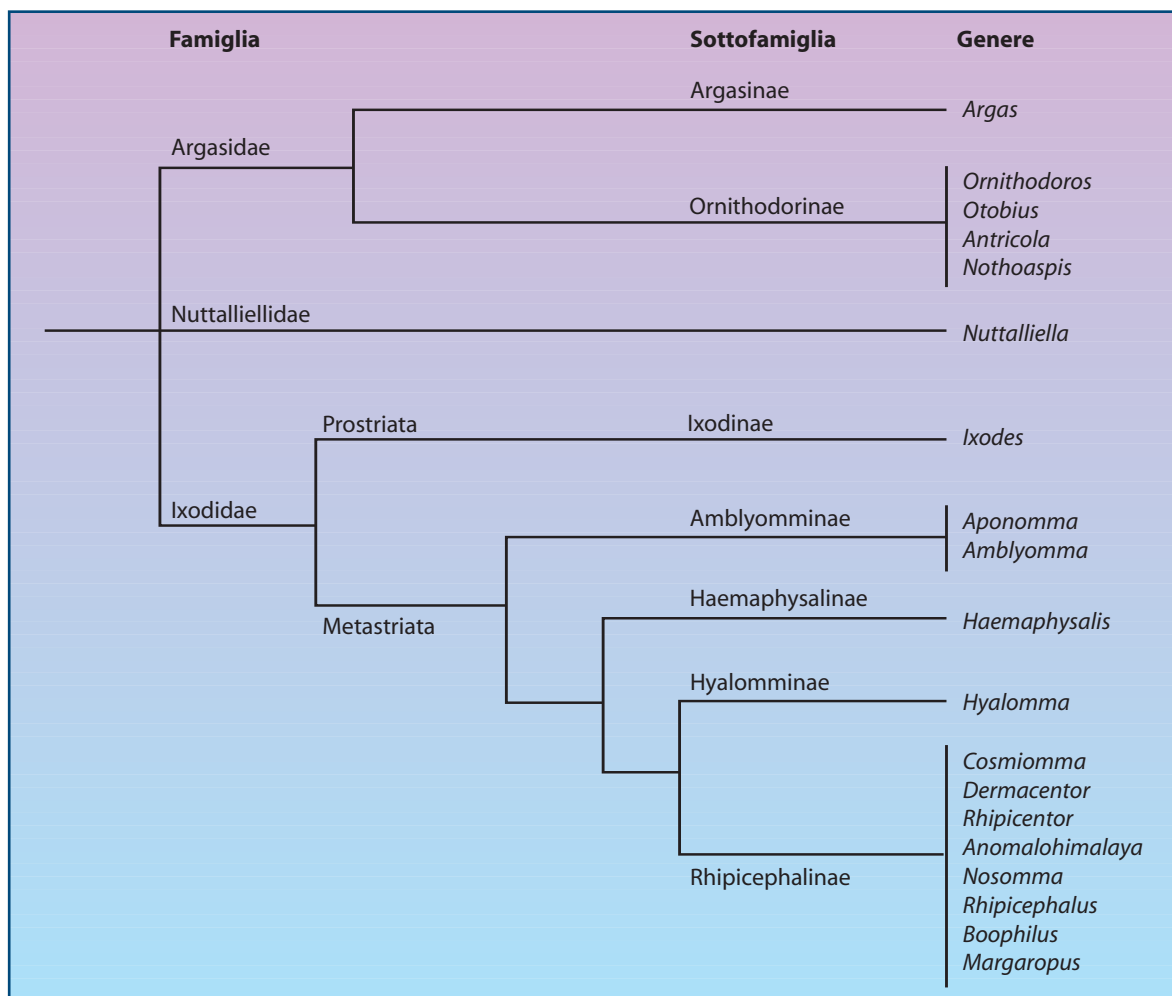


Figura 25. Ipotesi di evoluzione degli Ixodidi formulata da Hoogstraal e Kim (1985).

generi odierni del gruppo *Metastrata* derivano da progenitori corrispondenti agli attuali generi *Aponomma* e *Amblyomma* (sottofamiglia *Amblyomminae*) strettamente adattati ai grossi rettili che ebbero il loro massimo successo evolutivo contemporaneamente alla presenza dei dinosauri dalla fine del Paleozoico a tutto il Cretaceo.

Successivamente, nel periodo che va dal tardo Cretaceo all'inizio del Terziario, contemporaneamente al declino dei dinosauri, si assistette alla comparsa e quindi al successo evolutivo di uccelli e mammiferi contemporaneamente alla differenziazione delle sottofamiglie *Haemaphysalinae* e *Hyalomminae* costituite rispettivamente dai generi *Hyalomma* ed *Haemaphysalis*.

Attualmente quasi tutte le specie appartenenti al genere *Aponomma* ed, approssimativamente, un terzo delle specie di *Amblyomma* continuano a parassitare quasi esclusivamente i rettili (es. *Amblyomma marmoratum* ed *Amblyomma sparsum*), testimoniando ancora un forte legame con i loro progenitori ancestrali, mentre, a seguito della co-evoluzione

con uccelli e mammiferi, solo alcune specie (una per ciascun genere) dalle caratteristiche più primitive dei generi *Haemaphysalis* e *Hyalomma* sono rimaste strettamente adattate ai rettili.

Dalle specie più evolute della sottofamiglia *Hyalomminae* si differenziarono successivamente i generi appartenenti alla sottofamiglia *Rhipicephalinae* (45).

Sulla base delle attuali conoscenze, sebbene remota, non può essere esclusa la possibilità che, una volta arrivata *Ehrlichia ruminantium* sul nostro territorio, specie autoctona di zecche, in particolare *Hyalomma sp.* e *Haemaphysalis sp.* filogeneticamente e biologicamente vicine alle specie del genere *Amblyomma* vettori naturali di heartwater, siano in grado a loro volta di fungere da vettori.

Conclusione

L'assenza di vettori naturali in Europa fa sì che heartwater non rappresenti una minaccia imminente per il nostro paese; l'introduzione di heartwater nei paesi dell'area mediterranea

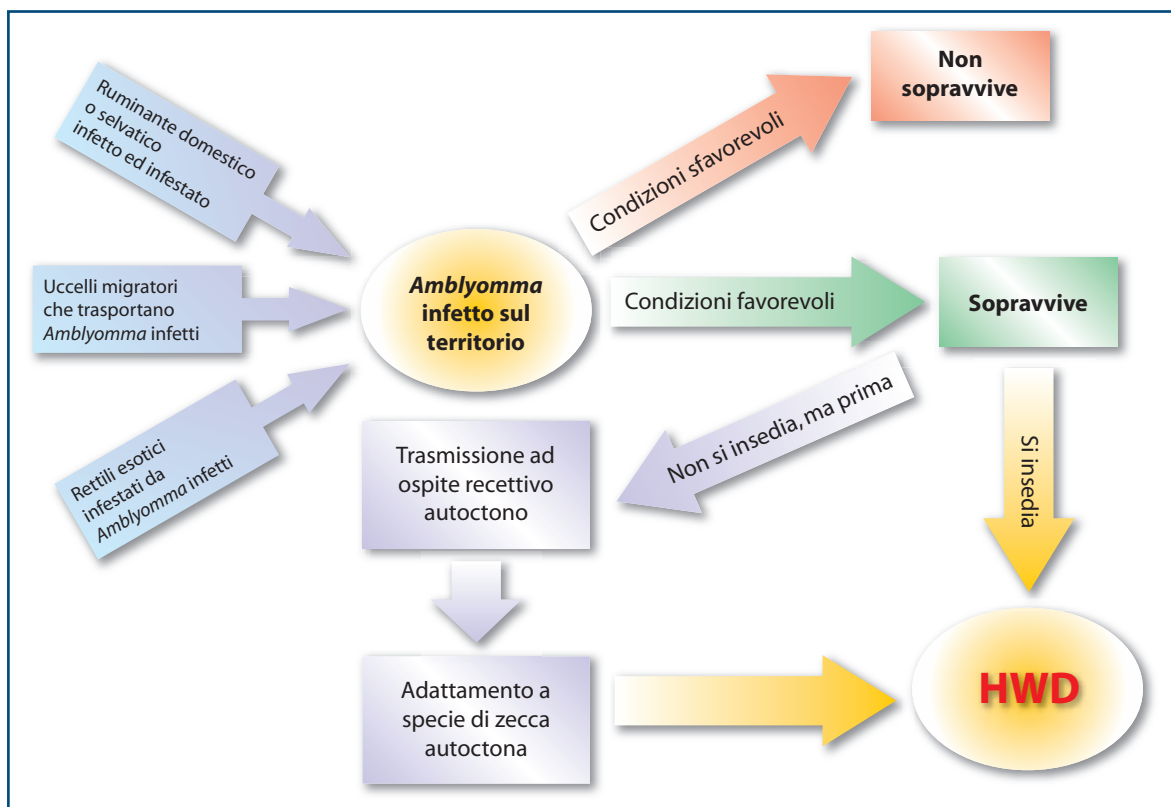


Figura 26. Albero degli eventi.

appare improbabile anche se non impossibile. La figura 26 schematizza un ipotetico albero degli eventi che potrebbero condurre all'introduzione ed endemizzazione di heartwater nel nostro paese.

Per poter individuare in maniera più precisa le aree di possibile introduzione ed endemizzazione di *Amblyomma* e quindi di heartwater, è necessario disporre della maggior quantità possibile d'informazioni sugli ectoparassiti e sui patogeni in genere introdotti dagli uccelli migratori.

Nel contesto internazionale, del resto, le malattie trasmesse da vettori hanno assunto negli ultimi anni sempre maggior importanza; le mutate condizioni climatiche e il cosiddetto "global warming" ne rendono sempre più necessaria la conoscenza nonché l'identificazione di aree a rischio. L'utilizzo di strumenti innovativi quali le tecnologie GIS che permettono di integrare diverse tipologie di dati eco-

climatici fornisce una nuova metodologia di approccio allo studio del rischio d'introduzione di patologie esotiche. Se da un lato, infatti, la presenza di restrizioni legate alle normative internazionali che regolano gli scambi di animali permette di controllare efficacemente i movimenti degli animali sia domestici che selvatici se connessi alle attività umane, dall'altro gli spostamenti di popolazioni di vettori e le migrazioni o erratismi di uccelli non legati alle attività umane, ma a variazioni climatiche (es. venti, considerevoli variazioni di temperatura) risultano difficilmente controllabili.

La necessità di implementare conoscenze sui rischi d'introduzione di patologie considerate finora solamente appannaggio delle regioni africane è ancor più sentita nei paesi dell'area mediterranea, questi, infatti, per la loro posizione geografica costituiscono una via preferenziale d'ingresso di tali malattie nel continente europeo.

Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare la Dr.ssa Rossella Lelli per il prezioso contributo fornito nella redazione del presente lavoro; il Dr. Massimo Scacchia per il costante supporto scientifico e umano; la Dr.ssa Annamaria

Conte per l'esecuzione dell'analisi GIS; la Dr.ssa Claudia Weiss per il contributo alla traduzione; il Dr. Giuseppe Di Giulio per aver fornito l'esemplare di *Amblyomma* riportato nella figura 3 del lavoro.

1. Aklaku I.K. 1980. Principal causes of mortality in small ruminants in Ghana. *Bull Off Int Épiz*, **91**, 1227-1231.
2. Albanese B., Smiraglia C. & Lavagnino A. 1971. Notizie sulle zecche di Sicilia con segnalazione di *Hyalomma detritum* e *Amblyomma variegatum*. *Riv Parassitol*, **32**, 273-276.
3. Alexander R.A. 1931. Heartwater. The present state of the disease. *In* 17th Report of Veterinary Services and Animal Industry, Union of South Africa, 89-150.
4. Allan S.A. 1998. Establishment of the tortoise tick *Amblyomma marmoreum* (Acari. Ixodidae) on a reptile-breeding facility in Florida. *J Med Entomol*, **35**, 621-624.
5. Andrew H.R. & Norval R.A.I. 1989. The carrier status of sheep, cattle and African buffalo recovered from heartwater. *Vet Parasitol*, **34** (3), 261-266.
6. Aphis Usda (United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service) 2002. Heartwater (http://www.aphis.usda.gov/lpa/pubs/fsheet_faq_notice/fs_ahheartw.html consultato il 7 Luglio 2007).
7. Barré N., Camus E., Birnie E., Burrige M.J., Uilenberg G. & Provost A. 1984. Setting up a method for surveying the distribution of cowdriosis (heartwater) in the Caribbean. *In* Proc. XIIIth World Congress on diseases of cattle, 17-21 September, Durban, Vol. 1. World Association for Buiatrics, 536-541.
8. Barré N., Uilenberg G., Morel P.C. & Camus E. 1987. Danger of introducing Heartwater onto the American mainland: potential role of indigenous and exotic *Amblyomma* ticks. *Onderstepoort J Vet Res*, **54** (3), 405-417.
9. Bartolini A. 2004. Aironi e specie affini: identificazione, status e conservazione dei ciconiformi del padule di Fucecchio. Quaderni del padule di Fucecchio n. 3 Centro di Ricerca Documentazione e Promozione del Padule di Fucecchio, Larciano.
10. BBC weather (<<http://www.bbc.co.uk/weather/world/africa/>> consultato il 6 Luglio 2007).
11. Bezuidenhout J.D. 1981. The development of a new heartwater vaccine, using *Amblyomma hebrareum* nymphae infected with *Cowdria ruminantium*. *In* Proc. International Conference on Tick biology and control, Grahamstown, 41-45.
12. Bezuidenhout J.D. 1982. Diseases of the central nervous system of cattle under tropical conditions. Proceedings of the Twelfth World Congress on Diseases of Cattle, 7-10 September 1982, Amsterdam, The Netherlands, 991-998.
13. Bezuidenhout J.D. 1988. Certain aspects of the transmission of heartwater, the occurrence of the organism in ticks and *in vitro* culture. DVS Thesis, University of Pretoria, 265 pp.
14. Bezuidenhout J.D. & Bigalke R.D. 1987. The control of heartwater by means of tick control. *Onderstepoort J Vet Res*, **54** (2), 525-528.
15. Bezuidenhout J.D. & Jacobsz G.J. 1986. Proof of transovarial transmission of *Cowdria ruminantium* by *Amblyomma variegatum*. *Onderstepoort J Vet Res*, **53**, 31-34.
16. Bezuidenhout J.D., Paterson C.L. & Barnard B.J.H. 1985. *In vitro* cultivation of *Cowdria ruminantium*. *Onderstepoort J Vet Res*, **52**, 113-120.
17. Bezuidenhout J.D., Prozesky L., du Plessis J.L. & van Amstel S.R. 1994. Heartwater. *In* Infectious diseases of livestock (with special reference to southern Africa), Vol. I, Chapter 35 (J.A.W. Coetzer, G.R. Thomson & R.C. Tustin, eds). Oxford University Press, Cape Town, 351-370.

18. Brett S. 1988. Dati non pubblicati. Veterinary. Research. Institute, Onderstepoort.
19. Burdin M.L. 1962. Selective staining of *Rickettsia ruminantium* in tissue sections. *Vet Rec*, **74**, 1371-1372.
20. Burrige M.J. 2000. Evidence of *Cowdria ruminantium* infection (heartwater) in *Amblyomma sparsum* ticks found on tortoises imported into Florida. *J Parasitol*, **86**, 1135-1136.
21. Burrige M.J. 2000. Introduction of potential heartwater vectors and other exotic ticks into Florida on imported reptiles. *J Parasitol*, **86**, 700-704.
22. Byrom B., Ynker C.E., Donovan P.L. & Smith G.E. 1991. *In vitro* isolation of *Cowdria ruminantium* from plasma of infected ruminants. *Vet Microbiol*, **26**, 263-268.
23. Camus E. & Barré N. 1982. La cowdriose (heartwater). Revue générale des connaissances. Etudes et Synthèses de l'IEMVT, n.4. IEMVT, Maisons-Alfort, 147pp.
24. Camus E., Barré N., Martinez D & Uilenberg G. 1996. Heartwater (cowdriosis). A review. 2nd Ed. Office International des Epizooties, Paris, 177 pp.
25. Caribbean Animal Health Network (<http://www.caribvet.net/information.php?i_id_page=59> consultato il 6 Luglio 2007)
26. Cilli V. & Corazzi G. 1954. Su alcuni aspetti morfologici di *Cowdria ruminantium*. *Rivista di Parassitologia*, **15**, 337-352.
27. Clark R. 1962. The pathological physiology of heartwater. *Onderstepoort J Vet Res*, **29**, 25-33.
28. Collins N.E., Allsopp M.T. & Allsopp B.A. 2002. Molecular diagnosis of theileriosis and heartwater in bovines in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **96**, Suppl. 1, S 217-224.
29. Cornell Laboratory of Ornithology. 2006. Cattle egret. In All about birds. Cornell Laboratory of Ornithology, Ithaca, New York (www.birds.cornell.edu/programs/AllAboutBirds/BirdGuide/Cattle_Egret_dtl.html consultato il 6 Luglio 2007).
30. Cowdry E.V. 1925. Studies on the aetiology of H. I. *Rickettsia ruminantium* (n.sp.) in the tissues of infected animals. *J Exp Med*, **42**, 231-252.
31. Curasson G. 1943. Sporozoaires Tome III. In *Traité de protozoologie vétérinaire et comparée*. Vigot Frères, Paris, 359-378.
32. Da Graca H.M. 1964. Quelques aspects de la heartwater en Angola. *Bull Off Int Epiz*, **62**, 963-969.
33. de Villiers E.P., Brayton K.A., Zwegarth E. & Allsopp B.A. 2000. Genome size and genetic map of *Cowdria ruminantium*. *Microbiology*, **146**, 2627-2634.
34. Deem S.L., Norval, R.A.I., Donachie, P.L. & Mahan S.M. 1996. Demonstration of vertical transmission of *Cowdria ruminantium*, the causative agent of heartwater, from cows to their calves. *Vet Parasitol*, **61**, 133-144.
35. Du Plessis J.L. 1970. Pathogenesis of heartwater. I: *Cowdria ruminantium* in the lymph nodes of domestic ruminants. *Onderstepoort J Vet Res*, **37**, 89-96.
36. Du Plessis J.L. 1975. Electron microscopy of *Cowdria ruminantium*-infected reticulo-endothelial cells of the mammalian host. *Onderstepoort J Vet Res*, **48**, 175-176.
37. Du Plessis J.L. 1975. Histopathological studies on the pathogenesis of heartwater as manifested in mice infected with a strain of *Cowdria ruminantium*. MVM Thesis, University of Pretoria, South Africa, 50 pp.
38. Du Plessis J.L. 1982. Mice infected with a *Cowdria ruminantium*-like agent as a model in the study of Heartwater. DVS Thesis, University of Pretoria, 157 pp.
39. Du Plessis J.L. 1985. A method for determining the *Cowdria ruminantium* infection rate of

Amblyomma hebraeum: effects in mice injected with tick homogenates. *Onderstepoort J Vet Res*, **52**, 55-61.

40. Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P.J., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y. & Rurangirwa F.R. 2001. Reorganisation of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **51**, 2145-2165.
41. Folkers C., Lumsden W.H.R. & McNeillage G.J.C. 1967. The prevalence of *Babesia bovis* (*Babesia argentina*) in the brains of slaughter cattle in Northern Nigeria. *Bull Epiz Dis Afr*, **15**, 359-361.
42. Gruss B. 1981. A practical approach to the control of heartwater in the Angora goats and certain sheep breeds in the Eastern Cape Coastal region. In *Tick biology and control* (G.B. Whitehead, J.D. Gibson, eds). Proc. International Conference, Tick Research Unit, Rhodes University, Grahamstown, 135-136.
43. Guberti V. 2005. 'West Nile disease: un'antropozoonosi emergente'. Teramo 15-18 gennaio 2005.
44. Gueye A, Mbengue M., Diouf A. & Vassiliades G. 1989. Prophylaxie de la cowdriose et observations sur la pathologie ovine dans la région des Niayes au Sénégal. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop*, **42**, 497-503.
45. Hoogstraal H., Kim K.C. 1985. Tick and mammal coevolution, with emphasis on *Haemaphysalis*. In *Coevolution of parasitic arthropods and mammals*. (KC Kim, eds) John Wiley & Sons, New York, 505-568.
46. Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux (IEMVT) 1971. Rapport annuel. IEMVT, Maisons-Alfort, 50-51.
47. Illemobade A.A. 1976. Study on heartwater and the causative agent *Cowdria ruminantium* (Cowdry 1925) in Nigeria. PhD thesis, Ahmadu Bello, University Zaria, Nigeria, 276 pp.
48. Jackson C. & Neitz N.O. 1932. On the aetiology of heartwater. In 18th Report of the Director of Veterinary Services and Animal Industry; Pretoria, South Africa, 49-66.
49. Jackson C. 1931. The microscopic diagnosis of heartwater: a preliminary note on the value of intima smears. In 17th Report of the Director of Veterinary Services and Animal Industry, South Africa, 161-173.
50. Jones F.F. 1937. Annual report of the Veterinary Department of Northern Rhodesia. Ministry of Agriculture, Lusaka, 71-76.
51. Karrar G. 1960. Rickettsial infection (heartwater) in sheep and goats in the Sudan. *Br Vet J*, **116**, 105-114.
52. Kocan K.M & Bezuidenhout J.D. 1987. Morphology and development of *Cowdria ruminantium* in *Amblyomma* ticks. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 177-182.
53. Kocan K.M, Bezuidenhout J.D. & Hart A. 1987. Ultrastructural features of *Cowdria ruminantium* in midgut epithelial cells and salivary glands of *Amblyomma variegatum*. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 87-93.
54. Kocan K.M., Morzaria S.P., Voight W.P., Kiarie J. & Irvin A.D. 1987. Demonstration of colonies of *Cowdria ruminantium* in midgut epithelial cells of *Amblyomma variegatum*. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 87-93.
55. Logan L.L., Whyard T.L., Quintero J.C. & Mebus C.A. 1987. The development of *Cowdria ruminantium* in neutrophils. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 197-204 .

56. Mahan S.M., Andrew H.R., Tebele N. & Burr ridge M.J. 1995. Immunisation of sheep against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. *Res Vet Sci*, **58**, 46-49.
57. Manilla G. 1998. Fauna d'Italia. Ixodida. Edizioni Calderini, Bologna.
58. Martinez D. 2003. Cowdriose *In* Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail: Europe et regions chaudes. Editions Tec&Doc, Éditions médicales internationales, London, Paris, New York, **91**, 1111-1129.
59. Martinez D., Maillard J.C., Coisne S., Sheikboudou C., Debus A. & Bensaid A. 1996. Comparative efficacy of Freund's and Montanide ISA 50 adjuvants for the immunisation of goats against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. *Vet Parasitol*, **67**, 175-184.
60. Meschini E. & Frugis D. 1993. Atlante degli uccelli nidificanti in Italia. Supplemento alle Ricerche di Biologia della Selvaggina, **XX**, 344 pp.
61. Neitz W.O. 1968. Heartwater. *Bull Off Int Epiz*, **70**, 329-336.
62. Neitz A.H.W., Viljoen G.J., Bezuidenhout J.D., Oberem P.T., Van Wyngaart W. & Vermulen N.M.J. 1986. The detection of antibodies to *Cowdria ruminantium* in serum *Cowdria ruminantium* antigen in *Amblyomma hebraeum* by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Onderstepoort J Vet Res*, **53**, 39-41.
63. Norval R.A.I. 1994. Vectors: Ticks, Chapter 1. *In* Infectious diseases of livestock (with special references to the Southern Africa), Vol. I (J.A.W. Coetzer, G.R. Thomson & R.C. Tustin, eds). Oxford University Press, Cape Town, 6-9.
64. Office International des Epizooties (OIE) 2004. Chapter 2.2.7: Heartwater. *In* Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 5th ed. OIE, Paris (http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00046.htm consultato il 5 Luglio 2007).
65. Owen N.C., Littlejohn A., Kruger J.M. & Erasmus B.J. 1973. Physiopathological features of Heartwater in sheep. *J S Afr Vet Assoc*, **44**, 397-403.
66. Papadopoulus B., Morel P.C. and Aeschliman A. 1996. Ticks of domestic animals in the Macedonia region of Greece. *Vet Parasitol*, **63** (1-2), 25-40.
67. Pascucci I., Conte A. & Scacchia M. 2007. The use of GIS to identify area at risk for *Amblyomma variegatum* and *Amblyomma hebraeum* in Italy. *Vet Ital*, **43** (3), 655-661.
68. Pegram R.G., Rota A., Onkelinx R., Wilson D.D., Bartlette P., Nisbett B.S., Swanston G., Vanterpool P. & de Castro J.J. 2005. Eradicating the tropical bont tick from the Caribbean. Food and Agriculture Organization, Rome (www.fao.org/ag/aga/agap/frg/feedback/war/W2650T/w2650t06.htm consultato il 7 Luglio 2007).
69. Peter T.F., Burr ridge M.J. & Mahan S.M. 2002. *Ehrlichia ruminantium* infection (heartwater) in wild animals. *Trends in Parasitology*, **18**:5, 214-218.
70. Petney T.N., Horak I.G. & Rechav Y. 1987. The ecology of the African vectors of heartwater, with particular reference to *Amblyomma hebraeum* and *Amblyomma variegatum*. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 381-395.
71. Pienaar J.G. 1970. Electron microscopy of *Cowdria* (Rickettsia) *ruminantium* (Cowdry, 1926) in the endothelial cells of the vertebrate host. *Onderstepoort J Vet Res*, **37**, 67-68
72. Pienaar J.G., Basson P.A., & Van Der Merwe J.L. de B. 1966. Studies on the pathology of heartwater (*Cowdria ruminantium*, Cowdry 1926). I: Neuropathological changes. *Onderstepoort J Vet Res*, **33**, 115-138.
73. Prozesky L. & Du Plessis J.L. 1985. Heartwater in Angora goats II. A pathological study of artificially infected, treated and untreated goats. *Onderstepoort J Vet Res*, **52**, 13-19.

74. Prozesky L. & Du Plessis J.L. 1985. The pathology of heartwater. I. A study of mice infected with the Welgevonden strain of *Cowdria ruminantium*. *Onderstepoort J Vet Res*, **52**, 71-79.
75. Prozesky L. & Du Plessis J.L. 1987. Heartwater. The development and life cycle of *Cowdria ruminantium* in the vertebrate host, ticks and cultured endothelial cells. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 197-204.
76. Purchase H.S. 1945. A simple and rapid method for demonstrating *Rickettsia ruminantium* (Cowdry, 1926) in heartwater brains. *Vet Rec*, **57**, 413-414.
77. Purnell R.E. 1987. Development of a prophylactic regime using Terramycin/LA to assist in the introduction of susceptible cattle into heartwater endemic areas of Africa. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 509-512.
78. Rioche M. 1967. Lésions microscopiques de la rickettsiose générale bovine à *Rickettsia* (Ehrlichia) *bovis* (Donatien et Lestoquard, 1936). *Rev Elev Méd Vét Pays Trop*, **20**, 415-427.
79. Schreuder B.E.C. 1980. A simple technique for the collection of brain samples for the diagnosis of heartwater. *Trop Anim Health Prod*, **12**, 25-29.
80. Steck W. 1928. Pathological studies on heartwater. In 13th and 14th Reports of the Director of Veterinary Research, Union of South Africa, 238-305.
81. Sutherst R.W. and Maywald G.F. 1985. A computerized system for matching climates in ecology Agriculture, Ecosystems Environ, **13**, (3-4), 281-299.
82. Synge B.A. 1978. Brain biopsy for the diagnosis of heartwater. *Trop Anim Health Prod*, **10**, 45-48.
83. Theiler A. 1905. Maladies des troupeaux en Afrique du Sud. *Bull Inst Pasteur*, **3**, 617-624.
84. Theiler A. 1905. The advance of our knowledge respecting the stock diseases of South Africa. *Transvaal Agric J*, **4** (13), 69-80.
85. Thomas A.D. & Mansvelt P.R. 1957. The immunization of goats against heartwater. *JS African Vet Med Ass*, **8** (2), 163-168.
86. Totte P., McKeever D., Martinez D. & Bensaid D. 1997. Analysis of T-cell responses in cattle immunised against heartwater by vaccination with killed elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. *Infect Immun*, **65**, 236-241.
87. Uilenberg G. 1965. Sur la pathogénie des formes cérébrales des babésioses bovines à Madagascar. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop*, **18**, 83-88.
88. Uilenberg G. 1971. Etudes sur la cowdriose à Madagascar. Première partie. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop*, **24**, 355-364.
89. Uilenberg G. 1981. Heartwater. In Diseases in cattle in the tropics (M. Ristic & I. McIntire, eds.). Martinus Nijhoff Publishers, Amsterdam, 345-360.
90. Uilenberg G. 1982. Experimental transmission of *Cowdria ruminantium* by the Gulf Coast tick *Amblyomma maculatum*: danger of introducing heartwater and benign African theileriasis onto the American mainland. *Am J Vet Res*, **43**, 1279-1282.
91. Uilenberg G. 1999. Importance of ticks and tick-borne diseases of domestic ruminants in southern Europe. *Parassitologia*, **41**, (Suppl. 1), 107-109.
92. Uilenberg G., Barré N., Camus E., Burridge M.J. & Garris G.I. 1984. Heartwater in the Caribbean. *Prev Vet Med*, **2**, 255-267.
93. Van Amstel S.R. & Oberem P.T. 1987. The treatment of heartwater. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 475-479.
94. Van Amstel S.R., Oberem P.T., Di Domenico M., Kirkpatrick R.D. & Mathee J. 1988. The presence of endotoxin activity in cases of experimentally-induced heartwater in sheep. *Onderstepoort J Vet Res*, **55**, 217-220.

95. Van De Pypekamp H.E. & Prozesky L. 1987. Heartwater. An overview of the clinical signs, susceptibility and differential diagnosis of the disease in domestic ruminants. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 263-266.
96. Van Der Merwe D., Swan G.E. & Botha C.J. 2001. Use of ethnoveterinary medicinal plants in cattle by Setswana-speaking people in the Madikwe area of the North West Province of South Africa. *J S Afr Vet Assoc*, **72** (4), 189-196.
97. Van Kleef M., Gunter N.J., MacMillan H., Allsopp B.A., Shkap V. & Brown W.C. 2000. Identification of *Cowdria ruminantium* antigens that stimulate proliferation of lymphocytes from cattle immunized by infection and treatment or with inactivated organism. *Infect Immun*, **68**, 603-614.
98. Viljoen G.J., Neitz A.W.H., Bezuidenhout J.D., Oberem P.T. & Vermulen N.M. 1988. The presence of *Cowdria ruminantium* antigen in various tissues of *Amblyomma hebraeum* imagoes as detected by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Onderstepoort J Vet Res*, **55**, 239-240.
99. Walker Jane B. with illustration of by Olwage A. 1987. The tick vectors of *Cowdria ruminantium* (*Ixodoidea*, *Ixodidae* genus *Amblyomma*) and their distribution. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 353-379.
100. Wilson D.D. & Richard R.D. 1984. Interception of a vector of heartwater, *Amblyomma hebraeum* Kock (Acari: *Ixodidae*) on black rhinoceroses imported into United States. In Proc. Eighty-eighth Annual Meeting of the United States Animal Health Association (USAHA), 21-26 October, Fort Worth, Texas. USAHA, Richmond, Virginia, 303-311.
101. Yonow T., Brewster C.C., Allen J.C. & Meltzer M.I. 1998. Models for heartwater epidemiology: practical implications and suggestions for future research. *Onderstepoort J Vet Res*, **65**, 263-273.
102. Yunker C.E., Byrom B. & Semu S. 1988. Cultivation of *Cowdria ruminantium* in bovine vascular endothelial cells. *Kenya Vet*, **12**, 2-16.

Introduction

Tick borne diseases (TBD) are the most important cause of livestock loss in Africa. They are thus of particular relevance for any measure aiming to improve or develop breeding .

Cowdriosis or heartwater is an infectious, non-contagious, tick-borne rickettsiosis affecting cattle, sheep, goats and some wild ruminants and is one of the OIE former List B diseases. The disease is widespread in Africa where, together with East Coast Fever and other trypanosomoses, it inflicts the heaviest losses in livestock. Wild ruminants are the main reservoir, being asymptomatic

carriers; domestic cattle, especially imported breeds, are particularly susceptible to the disease, which is one of the major obstacles to genetic selection in sub-Saharan countries.

The aetiology of heartwater has been known for many years but the epidemiology of the disease is complex, which also makes it a potential risk in countries where the disease is absent. New technologies such as GIS (geographic information system) can be used to study foreign vector-borne diseases which might be introduced into free countries.

Definition

Heartwater is an infectious, non-contagious, tick-borne rickettsiosis that affects cattle, sheep, goats and some wild ruminants. The causal agent is *Ehrlichia ruminantium* (in the

past known as *Cowdria ruminantium* and earlier still as *Rickettsia ruminantium*). It is transmitted by hard ticks (family *Ixodida*) of the *Amblyomma* genus.

Health and economic significance

In Africa, heartwater is important for various reasons:

- it is one of the major obstacles to the introduction/import of non-native animals for breeding and genetic improvement of the local stock in order to boost productivity (85);
- it is one of the major health threats to local animal populations forced to move from disease-free zones to infected areas in order to reach new pastures (15);
- in the areas where heartwater is endemic,

the disease is a constant threat for animals that are moved from disease-free areas to endemic areas. Dipping baths and environmental changes may affect the disease's endemic stability (90, 92);

- heartwater is a threat to both the American continent, where the potential vectors (*Amblyomma* ticks) are already present, and areas where the vector is not yet present but could be introduced and become established due to suitable environmental characteristics (8, 67, 100).

Taxonomy

Ehrlichia ruminantium is an intracellular bacterium, belonging to the order *Rickettsiales*, family *Ehrlichiaeae*, tribe *Ehrlichiae*. Until recently it was included in the *Cowdria* genus. (table I).

Table I. Previous taxonomy of *Cowdria ruminantium*.

Kingdom	Proteobacteria
Class	Rhodospirilli
Order	Rickettsiales
Family	Ehrlichiaeae
Genus	Cowdria

Recent studies of the gene sequence codifying for ribosomal RNA subunit 16S have brought about the need to update the taxonomy. Ongoing investigations have identified 5 genogroups in the *Rickettsiales* order (figure 1):

Geno-group 1 includes *Cowdria ruminantium*, *Ehrlichia canis* (causal agent of the canine monocytic ehrlichiosis), *Ehrlichia ewingii* (causal agent of the canine granulocytic ehrlichiosis), *Ehrlichia chaffensis* (causal agent of the human monocytic ehrlichiosis) and *Ehrlichia muris*. The species in this genogroup have a

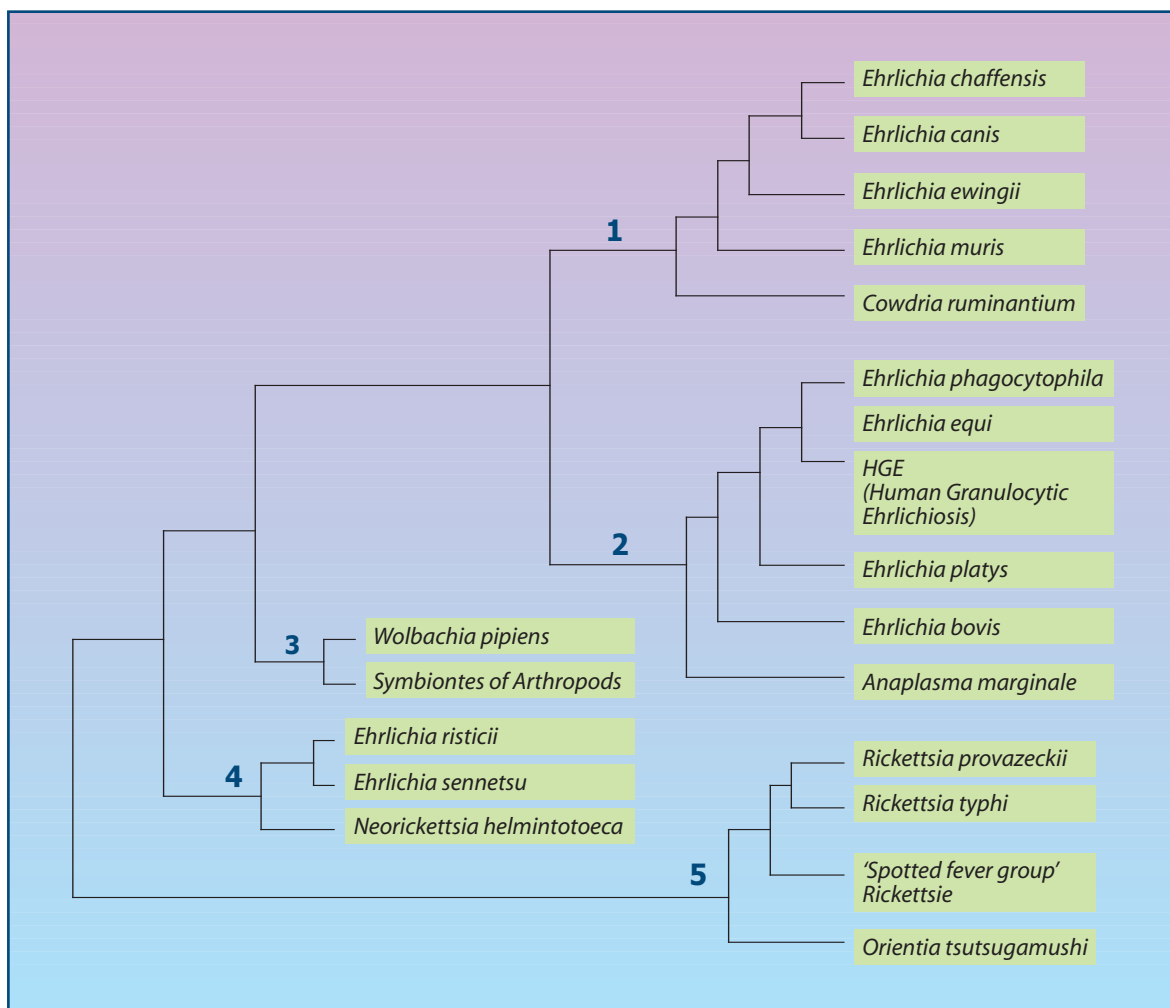


Figure 1. Taxonomy of the *Rickettsiales* order (58).

genetic correlation exceeding 97.7%; this is one of the reasons for the renaming of *Cowdria ruminantium* as *Ehrlichia ruminantium* and the genogroup has become the ***Ehrlichia*** genus.

Geno-group 2 includes *Anaplasma marginale* (erythrocytes parasite, causal agent of ruminant anaplasmosis), *Ehrlichia equi* (causal agent of equine ehrlichiosis), *Ehrlichia phagocytophila* (causal agent of granulocytic ehrlichiosis in ruminants) and the *Ehrlichia* causing human granulocytic ehrlichiosis (HGE); the last three are presently classified as one single species, *Anaplasma phagocytophilum*. *Ehrlichia platys* and *Ehrlichia bovis* are related to these species. This genogroup has become the ***Anaplasma*** genus (40).

Geno-group 3 includes *Wolbachia pipiens* and other Arthropod endosymbionts.

Geno-group 4 includes *Neorickettsia helmitoeca*, the agent of salmonid poisoning in dogs in America, and another two pathogens previously classified as *Ehrlichia* due to their morphology: *Ehrlichia risticii*, the causal agent of Potomac Horse Fever, and *Ehrlichia sennetsu*, causing Sennetsu fever. On the basis of genetic similarities and their close antigenic and biological relationship (the vectors are not arthropods, but trematodes parasitising molluscs), the two species are currently included in the ***Neorickettsia*** genus.

Geno-group 5 includes the arthropod-borne ***Rickettsia*** genus, of great significance in human medicine. The most important species are *Rickettsia prowazeki*, transmitted by lice (*Pediculus humanus corporis*), which causes petechial typhus, *Rickettsia typhi*, transmitted by fleas mainly *Pulex irritans*, and the 'Spotted fever group' rickettsiae, including *Rickettsia rickettsii* - also pathogenic for dogs - and the only representative of the ***Orientia*** genus: *Orientia tsutsugamushi* (58).

Resistance

Ehrlichia ruminantium is very fragile. It is

impossible to recover from dead animals 6 h after death (30). Once putrefaction has begun, blood is no longer infectious if exposed to direct sunlight for more than 5 min (31). It resists in the brain of the dead animal for 5 h at 5°C and up to three days at 4°C (46).

Freezing is the best option for conservation of *Ehrlichiae* outside the vector (24).

Structure and genetic characteristics

Ehrlichia ruminantium is an endocellular, obligate parasite with a remarkable pleomorphism. It is found in vascular endothelial cells, although during febrile stages it can also be recovered from circulating leucocytes, and some isolates have been recovered from peritoneal macrophages of mice.

Ultrastructure studies using transmission electron microscopy (TEM) have revealed that *Ehrlichia ruminantium* multiplies inside cytoplasm vacuoles (morula) surrounded by double membranes (figure 2).

As with other species of the genus *Ehrlichia*, TEM studies have revealed two distinct forms of the organism, the elementary and reticulate bodies. The first, which is the infectious form known as the "elementary body", is able to adhere to and penetrate endothelial cells, probably by phagocytosis, where it multiplies inside vacuoles, forming the morula clusters. The other form - the "reticulated body" - is the vegetative stage

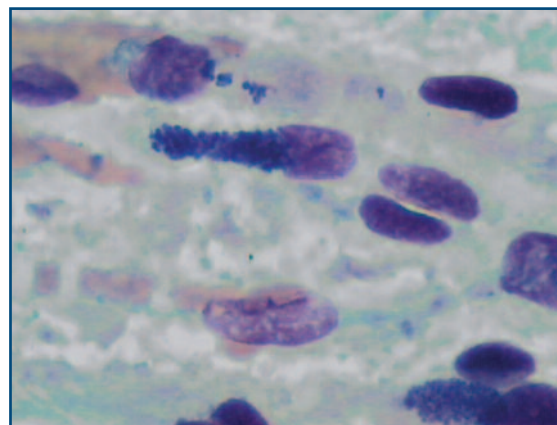


Figure 2. Morula inside bovine endothelial cells (100x May Grunwald-Giemsa).

and appears to be less electron-dense than the elementary body. A third group of organisms called the "intermediate body" is characterised by its intermediate size and appearance.

In vitro studies have revealed that the reticulate bodies appear 2-3 days after infection, followed by the intermediate forms (3-5 days). 4-6 days after the infection the host cell ruptures, releasing hundreds of elementary bodies ready to invade new cells (15, 71, 85).

Ehrlichia ruminantium genome size is estimated as around 1500 KB. Although its sequencing has not yet been completed, the sequences of two of the main genes (one for the RNA of the 16S ribosomal unit and the other for the MAP1 gene) have been known for some time. The 16S gene has been sequenced to provide an accurate taxonomy of *Ehrlichia ruminantium* and enable the development of molecular diagnostic testing methods. The MAP1 gene codifies for the major immunodominant surface protein. It contains sequences which appear the same in all the isolates, and three hypervariable regions which differ greatly from one isolate to the next. The protein's constant structure makes it an excellent candidate for the development of diagnostic serological techniques, and its extreme pleomorphism equally enhances its usefulness for the molecular characterisation of the isolates (28, 33).

Although the term 'stock' or 'isolate' is more correct, as characterisation techniques are not sensitive enough to characterise the isolates as strains, numerous papers discussing *Ehrlichia ruminantium* isolates define them indifferently as isolates and stocks or strains. Different isolates do not confer cross-immunity, due to their antigenic differences, whose existence has been shown in both lab tests (experimental infection) and field trials. Many isolates are named for the country or farm where they were first isolated. They have also been characterised on the basis of their pathogenicity and infectivity in both the natural hosts and laboratory mice. Antigenic characterisation is thus the first essential step

in the development of a vaccine able to protect animals against all the isolates (17).

Localisation

In the host

Ehrlichia ruminantium multiplies in the endothelial cells throughout the body, and in both the myeloblastic and monoblastic cell lines of ruminants and mice (experimental conditions) (40). It is frequently detected inside the capillary endothelial cells of the renal glomerulus and in the grey matter of the cerebral cortex (30), and the reticular-endothelial system (36). It also occurs in many other organs.

In the vector

Ehrlichia ruminantium has been detected in the midgut epithelium cells (30), the Malpighi tubules (13), the salivary glands and the nervous system (99) without lesions. In an experimental study, sensitive sheep were infected through inoculation with a suspension made with the organs of ticks infected with the Ball 3 stock. All tick organs have been demonstrated as infectious with the exception of the nervous system, ovaries and haemolymph (13).

Life cycle of the aetiologic agent

Ehrlichia ruminantium occurs in different forms, suggesting that its life cycle involves different developmental stages.

In the natural host

The detection of the organism in the lymph nodes prior to its arrival in the brain (35) suggests that the organism multiplies in the regional lymph nodes immediately after inoculation. It then travels along the lymphatic vessels to the blood stream (rickettsiemic stage, with fever peak), from which it is transported by the plasma or inside neutrophils (55) to the vascular endothelial cells, where it continues to multiply. The endothelial cells may also be invaded, due to their contiguity (25). Early reports of diplococcal forms (30), confirmed by electron

microscopy (EM), have revealed that small and intermediate forms of *Ehrlichia ruminantium* multiply mainly by binary fission, although there are indications of endosporulation (71).

Vertical transmission in the host

Vertical transmission in natural conditions has been demonstrated by a study carried out on 12 mixed breed calves born from mothers living in an endemic area in Zimbabwe. The newborn calves were tested using laboratory-bred *Ehrlichia ruminantium*-free *Amblyomma* ticks, which after feeding on the calves were transferred to small ruminants or tested by PCR. 5 of the 12 test subjects were considered positive, following the successful experimental transmission of the infection to the susceptible animals, while 11 of the 12 PCR tests on the ticks confirmed the infection. Colostrum may play a role in transmitting the infection from mother to newborn calf (34).

In the experimental host

Ehrlichia also has a two-stage cycle in mice: the organism first multiplies in the reticular-endothelial cells and later inside the endothelial cells (38).

In the tick vector

Ehrlichia ruminantium's development in ticks has not yet been completely clarified. Salivary secretions are relatively non-infectious (11), so regurgitation was initially considered as the most probable means of infection. Subsequently, a suspension of tick salivary glands was found to be more pathogenic for susceptible animals than intestine suspensions (13). EM (5, 53, 54) and ELISA (62, 98) have detected *Ehrlichia ruminantium* in the salivary glands of ticks, whose acini are probably invaded after an initial multiplication inside the intestinal epithelial cells (75); this passage would be enabled by haemocytes (39). The interval between the ingestion of infected blood and *Ehrlichia*

detection in the gut cells is about 15 days (54). Ticks can come into contact with *Ehrlichia ruminantium* during any of their three developmental stages (larva, nymph and adult), but only the latter two appear to be able to transmit the disease to susceptible hosts. Bezuidenhout (20) was unable to infect susceptible sheep by intravenous injection of a suspension of 75 engorged and infected larvae, probably because the maturation or multiplication of *Ehrlichia ruminantium* inside the larval stage of the vector does not achieve sufficient pathogenicity. However, a sheep has been infected by a single engorged nymph. Transmission through different developmental stages has been clearly demonstrated (5), while evidence of trans-ovarian transmission is scarce, although some authors have reported it. In any case, the epidemiological significance of trans-ovarian transmission is negligible (11).

In vitro cultivation

Ehrlichia ruminantium was first cultivated in vitro on bovine umbilical cells in 1985 (16), and subsequently on cell cultures of purified goat neutrophils. E5 lines (monolayers of bovine endothelial cells) appear to be particularly indicated for the cultivation of different *Ehrlichia ruminantium* strains, especially after γ -irradiation to delay cell growth and sometimes after centrifuging the inoculum in the monolayer to enable closer contact between cells and rickettsiae. Eagles minimum essential medium (Glasgow modified) containing tryptose-phosphate broth and bovine serum is commonly used as the culture medium. It takes 5-6 days to grow *Ehrlichia ruminantium* on bovine endothelial cells (18, 55, 105).

Pathogenicity

Clinical signs vary considerably, depending on the *Ehrlichia ruminantium* stock involved, the animal species and natural vs. experimental conditions.

Currently 13 *Amblyomma* species are considered *Ehrlichia ruminantium* competent vectors in natural and/or experimental conditions.

The *Amblyomma* genus (family *Ixodidae*) occurs worldwide between 40°N and 40°S, except in Europe.

Morphology

Amblyomma specimens are usually large and richly, ornated with eyes and coxal spurs. Like all *Ixodidae*, they are protected by a rigid shield which completely covers the dorsal body surface in the male; female shields are smaller, enabling significant distension of the abdominal wall during blood feeding.

In some species, the shield is richly coloured. The well-developed rostrum is clearly visible on the dorsal surface of the body (figure 3).

Life-cycle

All *Amblyomma* species develop through three stages. Each stage feeds on a different host, and after feeding it moults far from the host. After the blood meal, female ticks can produce thousands of eggs (up to 40 000 for *Amblyomma variegatum*). The length of the life cycle is extremely variable, ranging between 5 months and 4 years, depending on

the environmental characteristics and availability of hosts. Heartwater vectors are ticks able to feed on a variety of hosts and during their developmental stages (six-legged larvae, nymph, male adult and female eight-legged adult) they feed on different livestock species, wild animals, terrestrial birds, small mammals, reptiles and amphibians (63, 70).

Trans-ovarian transmission of *Ehrlichia ruminantium* occurs only exceptionally; ticks usually become infected with *Ehrlichia ruminantium* after feeding on an infected host and trans-stadial transmission maintains the infection in the ticks, for which *Ehrlichia ruminantium* is not pathogenic (63).

Habitat

Amblyomma hebraeum and *Amblyomma variegatum* are the two main vectors in the epidemiology of the disease. They occur in different geographical areas, although they are adapted to the same type of habitat. Their presence is affected by climate and the surrounding environment, according also to their developmental stage. Even though individuals of both species are active throughout the year, in African ranges of distribution a certain seasonality of the life cycle can be seen. Generally, adults are more numerous during the rainy season, while larvae and nymphs start to be more active at the end of the rainy season. This seasonality, especially marked with *Amblyomma variegatum*, allows strategic control of the infestation: treatment of animals every year at the beginning of the activity period of the adults and regular treatment throughout the rainy season considerably decreases the number of adult ticks, and thus of larvae and nymphs in the following season. Generally speaking, heartwater vectors are more frequently found in hot or temperate zones with a rich vegetation, while drier climates



Figure 3. Male specimen of *Amblyomma* sp.

tend to limit their activity. An exception is *Amblyomma lepidum*, which is also adapted to the dry climates of Eastern Africa. Interspecies competition also limits the activity of the various tick species present in the environment.

Amblyomma pomposum, a minor vector occurring mainly in Angola and Zambia, is present in savannah and forests at high altitudes. In Angola there is a peak in the activity of larvae and nymphs during the wet season (63, 70).

Geographic distribution

The *Amblyomma* genus occurs worldwide, with the exception of Europe. Heartwater distribution is mainly affected by the distribution of the 5 main natural vectors, all of African origin. Of these, *Amblyomma variegatum* (Tropical Bont Tick - TBT) is most widespread. This tick originates from Africa, south of the Sahara desert, and was first introduced into the Caribbean around 1828, following the import of cattle from Senegal, later spreading to the rest of the West Indies. *Amblyomma variegatum* was similarly introduced from Africa into the Arabian Peninsula and Mauritius (68).

Other natural vectors (*Amblyomma hebraeum*, *Amblyomma pomposum*, *Amblyomma gemma* and *Amblyomma lepidum*) are limited to specific African areas. *Amblyomma hebraeum* is the main vector in southern Africa, while in some areas of Zambia it occurs together with *Amblyomma variegatum*.

The simultaneous occurrence of both the aetiological agent and the vector in the Caribbean islands poses a huge risk to the American continent, exacerbated by the fact that three ticks endemic in America (*Amblyomma maculatum*, *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dissimile*) are potential vectors of the disease. *Amblyomma maculatum* occurs in all the states surrounding the Gulf of Mexico: in experimental conditions, this tick shares the same vectorial capacity as *Amblyomma variegatum*.

Figure 4 illustrates the spread of heartwater vectors in Africa [please note that *Amblyomma gemma* is not represented, as according to some South African authors it is not a vector (17)]. Table II summarises some biological characteristics of natural and experimental heartwater vectors (58).

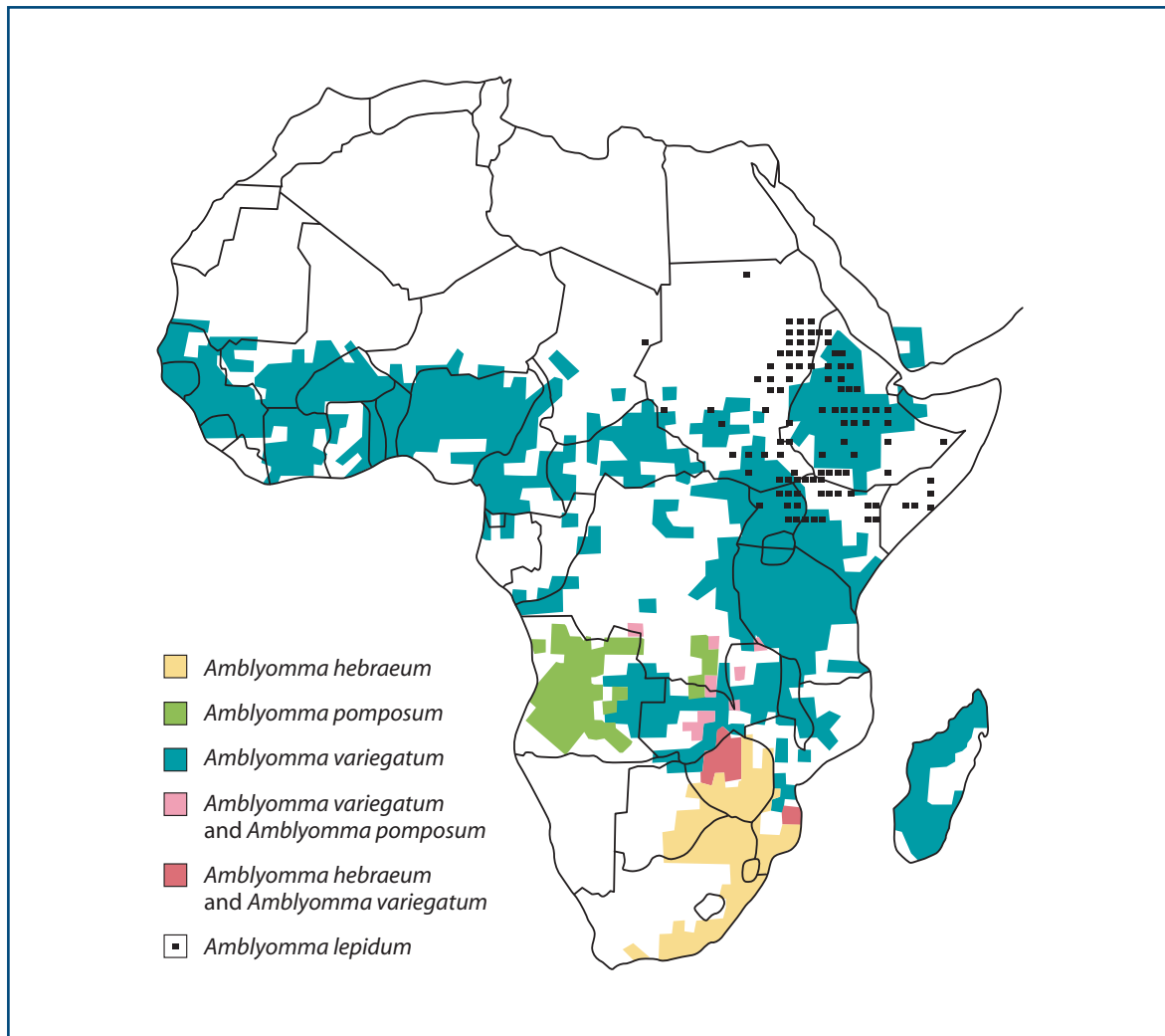


Figure 4. Distribution of heartwater vectors in Africa (17).

Table II. Biological characteristics of natural and experimental vectors of heartwater (58).

Species	Hosts	Importance and distribution
African <i>Amblyomma</i> ticks (natural vectors)		
<i>Amblyomma hebraeum</i>	Adults feed on livestock, large wild herbivores, warthogs (<i>Phacochoerus africanus</i>). Larvae and nymphs feed on birds, small mammals and reptiles.	Good vector. The main vector in South Africa and South-East Africa.
<i>Amblyomma variegatum</i>	Adults feed on livestock, large and medium size wild animals. Larvae and nymphs feed on birds, small mammals, carnivores and reptiles.	Good vector, most widespread. Present in all African open range (save for South Africa, where <i>Amblyomma hebraeum</i> occurs).
<i>Amblyomma gemma</i>	Adults feed on livestock, large wild herbivores. Larvae and nymphs feed on birds, lagomorphs and primates.	Its range of distribution includes East Africa savannahs, from eastern Ethiopia to central Tanzania.
<i>Amblyomma pomposum</i>	Adults feed on livestock, wild artiodactyls. Larvae and nymphs on reptiles and primates.	Equatorial Africa, Angolan plains, Zambia and Southern Congo Democratic Republic (formerly Zaire).
<i>Amblyomma lepidum</i>	Adults feed on livestock, carnivores, large wild herbivores. Larvae and nymphs on birds, carnivores and primates.	African Horn, from eastern Sudan to central Tanzania.
African <i>Amblyomma</i> ticks (experimental vectors)		
<i>Amblyomma tholloni</i>	Adults feed almost exclusively on elephants (<i>Loxodonta africana</i>) or other pachyderms. Larvae and nymphs on birds and reptiles.	Equatorial Africa, exclusively where elephants live.
<i>Amblyomma astrion</i>	Adults feed on african buffaloes (<i>Syncerus caffer</i>); on cattle and sheep in Sao Tomé.	Angola, Congo Democratic Republic (formerly Zaire), Central Africa Republic, Sao Tomé.
<i>Amblyomma cohaerens</i>	Adults feed mainly in african buffaloes, but also on cattle.	Tanzania, Kenia, Angola.
<i>Amblyomma sparsum</i>	Adults feed mainly on african buffaloes and pachyderms (black rhinoceros - <i>Diceros bicornis</i>), but also on reptiles (tortoises and giant lizards); livestock is usually spared. Nymphs and larvae feed on reptiles.	Equatorial Africa, East Tanzania, Kenya, Uganda.
<i>Amblyomma marmoreum</i>	Adults feed mainly on reptiles (tortoises and large lizards). Larvae and nymphs feed on domestic ruminants.	Southern Africa, Zambia, Zimbabwe, Southern Mozambique and South Africa.
American <i>Amblyomma</i> ticks (experimental vectors)		
<i>Amblyomma maculatum</i>	Adults feed on livestock.	Very good vector. Coast of the Gulf of Mexico to north of Venezuela.
<i>Amblyomma cajennense</i>	Livestock and capibara (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>).	Poor vectors. Ranges from northern Mexico to northern Argentina.
<i>Amblyomma dissimile</i>	Reptiles and amphibians.	

Cattle and livestock

All cattle and livestock in the family Bovidae are susceptible to the disease, including the domestic or Asian buffalo (*Bubalus bubalis*).

Wild animals

Most literature references to the range of wild animals possibly susceptible to *Ehrlichia ruminantium* infection are unreliable, due to the lack of a definitive diagnosis and of clinical and epidemiological data.

Due to its predilection for endothelial cells, *Ehrlichia ruminantium* is not easily detected in blood smears; the only reliable diagnosis is the identification of colonies in brain smears. However, brain smears contain colonies only in the first weeks after infection, when rickettsia is present in large numbers. In susceptible livestock high fever occurs in this period.

Wild animals have a natural resistance to the disease and rarely show clinical signs; in the unlikely event of clinical disease, this is difficult to detect. It should be considered that the performance of diagnostic tests for heartwater in most wild animals is not yet well known.

Diagnosis is also uncertain in wild animals, due to the lack of the characteristic gross lesions. Furthermore, they are often infected with unknown or little-known organisms which are genetically and antigenically similar to *Ehrlichia ruminantium*. For this reason, the serological tests and molecular diagnostic methods developed for domestic ruminants are unable to diagnose infection in wild animals.

The only reliable information on the host range of *Ehrlichia ruminantium* is that generated from well-documented and controlled experimental infections, confirmed by brain smears or xenodiagnosis with previous identification of the inoculum (strain, dose and virulence). Data from natural cases of heartwater can also be considered as

conclusive, when post mortem detection (optical microscope) of *Ehrlichia ruminantium* is verified by epidemiological data.

On the basis of these criteria, *Ehrlichia ruminantium* infection has been demonstrated in 12 African ruminants, 3 non-African ruminants and 2 African rodents. Evidence of a sub-clinical carrier state in 8 species of wild African ruminants supports the theory that heartwater persistence in the ecosystem is due to these carriers (58, 69). There are some reports of suspected heartwater infection in pachyderms. Colonies similar to *Ehrlichia ruminantium* were detected in brain smears from an African elephant (*Loxodonta africana*) killed by anthrax, while a black rhinoceros (*Diceros bicornis*) and a white rhinoceros (*Cheratherium simum*) tested serologically positive. However, none of these cases is considered certain, as the presumptive diagnosis was not confirmed by xenodiagnosis and possible false positives due to co-infections were not excluded.

Carnivores are not reported as hosts. One literature record exists of a suspected case in an Ethiopian vervet monkey (*Chlorocebus aethiops*), subsequently shown to be infected with a rickettsia transmitted by the tick *Boophilus decoloratus*. This case further confirms the difficulty of diagnosing *Ehrlichia ruminantium* infections in wild animals, due to simultaneous infections with other unknown rickettsiae.

Two wild African rodents, *Praomys coucha* (which develops clinical disease) and *Rhabdomys pumilio*, are susceptible to heartwater in experimental conditions and able to transmit the infection to susceptible hosts. There is no information on the possible infection of competent vectors.

There is also some partial information on the guinea fowl (*Numida meleagris*), leopard tortoise (*Geochelone pardalis*) and scrub hare (*Lepus saxatilis*), which have all been

described as susceptible species, but no experimental details were provided.

Table III summarises known or suspected cases of heartwater in domestic and wild species (24, 58, 69).

Laboratory animals

The mouse is the only laboratory animal susceptible to the disease (74).

Table III. Certain or suspect reports of heartwater in domestic and wild species (24, 58, 69).

Family	Subfamily	Common name	Scientific name	Type of infection	
Domestic ruminants					
Bovidae					
	<i>Bovinae</i>	Cattle	<i>Bos taurus</i>	Natural	Confirmed
		Zebu	<i>Bos taurus indicus</i>	Natural	Confirmed
		Asian buffalo	<i>Bubalus bubalis</i>	Natural	Confirmed
	<i>Caprinae</i>	Sheep	<i>Ovis aries</i>	Natural	Confirmed
		Goat	<i>Capra hircus</i>	Natural	Confirmed
Wild ruminants					
Cervidae					
		White-tailed deer	<i>Odocoileus virginianus</i>	Experimental	Confirmed
		Chital	<i>Axis axis</i>	Natural	Confirmed
		Timor deer	<i>Cervus timorensis</i>	Natural	Confirmed
Bovidae					
	<i>Bovinae</i>	African buffalo	<i>Syncerus caffer</i>	Experimental	Confirmed
		Nilgai*	<i>Boselaphus tragocamelus</i>	Natural	Not confirmed
		Greater kudu	<i>Tragelaphus strepsiceros</i>	Experimental	Confirmed
		Sitatunga*	<i>Tragelaphus spekii</i>	Natural	Confirmed
		Eland	<i>Taurotragus oryx</i>	Experimental	Confirmed
	<i>Caprinae</i>	Mouflon	<i>Ovis musimon</i>	Experimental	Confirmed
		Asian mouflon	<i>Ovis orientalis</i>	Experimental	Confirmed
		Barbary sheep	<i>Ammotragus lervia</i>	Natural	Not confirmed
		Sable antelope	<i>Hippotragus niger</i>	Experimental	Confirmed
		Himalayan tahr	<i>Hemitragus jemlahicus</i>	Natural	Not confirmed
	<i>Antilopinae</i>	Springbok*	<i>Antidorcas marsupialis</i>	Natural	Confirmed
		Steenbok*	<i>Raphicerus campestris</i>	Natural	Confirmed
	<i>Alcelaphinae</i>	Blesbok*	<i>Damaliscus pygargus</i> <i>sb. albifrons</i>	Experimental	Confirmed
		Black wildebeest*	<i>Connochaetes gnou</i>	Experimental	Confirmed
		Blue wildebeest*	<i>Connochaetes taurinus</i>	Experimental	Confirmed
	<i>Reduncinae</i>	Kafue lechwe*	<i>Kobus leche kafuensis</i>	Natural	Confirmed
Giraffidae					
		Giraffe	<i>Giraffa camelopardalis</i>	Experimental	Confirmed
Rodents					
		Domestic mouse	<i>Mus musculus</i>	Experimental	Confirmed
		Southern multimammate mouse	<i>Praomys couchua</i>	Experimental	Confirmed
		Stripped grass mouse	<i>Rhabdomys pumilio</i>	Experimental	Confirmed

* original language

to be continued

Table III. Certain or suspect reports of heartwater in domestic and wild species (24, 58, 69).

Family	Subfamily	Common name	Scientific name	Type of infection	
Pachyderms					
	<i>Elephantidae</i>	African elephant	<i>Loxodonta africana</i>	Natural	Not confirmed
	<i>Rhinocerotidae</i>	White rhinoceros	<i>Ceratotehrium simum</i>	Natural	Not confirmed
		Black rhinoceros	<i>Diceros bicornis</i>	Natural	Not confirmed
Lagomorpha					
		Scrub hare	<i>Lepus saxatilis</i>	Experimental	Not confirmed
Birds					
		Giunea fowl	<i>Numida meleagris</i>	Experimental	Not confirmed
Reptiles					
		Leopard tortoise	<i>Geochelone pardalis</i>	Experimental	Not confirmed

Epidemiology

Heartwater is reported only where *Amblyomma* species able to transmit *Ehrlichia ruminantium* occur. The spread of the disease is therefore limited by the availability of the vector.

Although studied extensively, heartwater epidemiology is only partially known. This is due to the existence of factors not yet perfectly identified, some depending on the aetiological agent, others on the host or vector and thus the environment. The immunological and pathogenic differences of the various *Ehrlichia ruminantium* strains, availability of natural reservoirs, age of the susceptible hosts and their genetic susceptibility are particularly significant. Other factors include those affecting vector population dynamics, infection prevalence in the tick population and the intensity of parasiticide treatments.

Amblyomma variegatum (the species with the largest range of distribution) and *Amblyomma hebraeum* (most frequently responsible for transmission in Southern Africa) are the main vectors among the 10 African tick vector species. Other species are generally less important as vectors, although may be significant on a local scale (99).

The role of each species in the transmission of

heartwater depends not only on its vectorial capacity, but also on its distribution and adaptation to the domestic ruminants, while the ticks' activity and abundance are affected by environmental characteristics, especially temperature and humidity. Epidemic outbreaks are seasonal in most of Africa; however, generally speaking, heartwater cases increase when tick activity peaks.

Disease seasonality is not always this well defined: in some temperate areas of Africa, and in the Caribbean, where the rainy season is not clear-cut, cases tend to appear throughout the year.

The time period during which an infected host can transmit the infection to a feeding vector varies according to the host species:

- sheep: ticks feeding on infected sheep can be infected from two days after the fever first occurred to two days after antibiotic treatment against *Ehrlichia ruminantium*;
- goats: data available for the creole breed only: period of infectivity from two days after onset of fever to three days after temperature has returned to normal;
- cattle: period of infectivity can exceed 361 days.

The parasite probably multiplies inside the vector: just one bite from a single infected nymph or adult tick can transmit the infection to a large ruminant.

During the fever peak, *Amblyomma* specimens can be infected by only 2.7-5.5 µl of blood. Nevertheless, epidemiological studies lasting over 7 years in endemic zones reported that the prevalence in the tick population is generally low, although it can vary from place to place and is affected by seasonal variations. This low prevalence is due to the biology of *Amblyomma*; larvae and nymphs of the main heartwater vectors are characterised by low host specificity, hence only a part of the individual ticks feed on infected hosts. Moreover, feeding on an infected host does not necessarily cause the vector to become infected, as rickettsia levels in the blood may be insufficient (17).

The vectorial capacity of each *Amblyomma* species transmitting heartwater is variable and is also affected by the *Ehrlichia ruminantium* strain involved. This variability is particularly evident in *Amblyomma variegatum*. Experimental infection of ticks from this species is more easily achieved using *Ehrlichia ruminantium* strains sharing the ticks' usual habitat than with strains from areas where the usual vector is *Amblyomma hebraeum* (58).

Experiments on mice and field observations have shown that different strains have different pathogenicity characteristics, which also depend on the susceptibility of different species and, in mice, the administration/inoculation route.

All *Ehrlichia ruminantium* strains are pathogenic for sheep and probably for goats, while Kumm is the only known strain not pathogenic for cattle.

The different pathogenicity of *Ehrlichia ruminantium* strains also depends on their antigenic characteristics, which differ so greatly that save a few exceptions, heartwater does not induce any form of antibody cross-protection. In most cases, introducing cattle immune to a particular strain of *Ehrlichia ruminantium* in an area where another strain

is prevalent results in new heartwater cases.

The manifestation of clinical signs rather than the asymptomatic form depends on various factors: the species, breed and immunological conditions of the susceptible animal and the strain involved. The susceptibility of young calves, lambs and kids is inversely proportional to their age and independent of their mother's immunological status. This resistance is not absolute and its duration is brief, on average lasting 4 weeks in calves and one week in lambs and kids (17).

Susceptibility differences among cattle breeds are very marked, but European cattle (*Bos taurus*) are generally more susceptible to heartwater than the indigenous breeds of Africa (*Bos Taurus sb. indicus*). This is probably due to a natural selection process where host and parasite have shared the same habitat for a long time, and therefore achieved a sort of balance in the ecosystem. Sheep are usually more susceptible than cattle, but differences among breeds are less marked than in bovines.

Angora goats are particularly susceptible and the immunity of the kids is of very short duration. Guadeloupe goats are resistant to the disease due to the presence of a recessive gene, whose expression is conditioned by gender (17).

In any case, resistance to the disease does not prevent infection.

In cattle, the level of serum congenitins may be involved in the development of a non-specific resistance. Similar observations have been made on wild bovids kept in captivity. Wild animals are probably the infection reservoirs, as supported by field observations in Guadeloupe, Madagascar and the Sao Tomé islands, which are devoid of stable wild ruminant populations (17).

Endemic stability

Endemic or enzootic stability is an equilibrium state when host, aetiological agent and vector share the same habitat but clinical disease is rare despite high levels of infection. Young animals are infected during the period of protection, thanks to frequent

transmission of the aetiological agent. This equilibrium state occurs when the prevalence of infection in the vector population is high and exists alongside colostrum-derived or age-related immunity, as is the case with heartwater. Young animals therefore come into contact with the parasite when they are immunologically protected. Due to the high prevalence of the infection in the vector population, animals are infected repeatedly

during their entire life, thus generating a continuous immune booster. This stability does not develop with Mediterranean theileriosis (*Theileria annulata*) or East Coast fever (*Theileria parva*), due to the lack of this kind of immunity (91).

In theory, endemic stability is also possible when prevalence in the vector population is low, although in this case there is a high risk of epidemic peaks (102).

Clinical signs

Cattle

Incubation

The incubation period varies between 9 and 29 days, with a mean of 18 days (1). This variability partly depends on the maturation stage of the vector tick: incubation is close to two weeks when the disease is transmitted by a nymph, but is longer when the vector is an adult.

Hyperacute form

Sudden death occurs within a few hours of the initial fever peak. The disease might run a completely subclinical course, or prostration, respiratory distress and occasionally diarrhoea could precede death (3, 7, 41).

Acute form

This is by far the most common form in animals aged 3-18 months, with a mean duration of 2-6 days. An initial fever exceeding 40°C can last for the entire course of the disease, with minimal fluctuations. The animal appears anxious and stares fixedly, with shallow breath and tachycardia. Pulmonary oedema and hydropericardium cause dyspnoea. The pulse is weak.

Nervous signs of variable intensity appear in the second stage: lack of coordination, circling, chewing and suckling movement,

standing rigidly until the animal can stand no more and collapses in convulsions, pedalling its feet until the onset of complete paralysis. Photophobia, nystagmus and opisthotonos are present in this last stage, together with protrusion of the tongue. The animal can die during or between attacks. Death is usually preceded by a sudden drop in fever.

Diarrhoea is often reported in specific breeds (Jersey) and can vary from mucoid to haemorrhagic; its appearance signals approaching death (3, 23, 27, 32, 89, 95).

Subacute form

The course is similar to the hyperacute form, but with a longer duration (up to 10 days) and signs are less severe. Mortality is lower and death is sometimes due to secondary respiratory or digestive complications (3).

Subclinical form

This is the most insidious form of heartwater and is very difficult to recognise, especially in field conditions. Fever, mild apathy and rapid breathing can go undetected until recovery, which occurs after a few days (23, 89).

Secondary complications

The most frequent secondary complications are pneumonia from hypostasis, ruminal atony, stiff neck, alopecia and blindness (32, 95).

Small ruminants

Small ruminants show the same signs, same duration of incubation period, and 4 clinical forms as cattle. Major differences involve the digestive and nervous systems: while diarrhoea is less frequent, nervous signs are more common and better defined (32, 65, 90) (figure 5). Anxious behaviour with frequent tail movements and brief bleating have been reported in goats (58).

Laboratory mice

The average duration of the incubation period is 10 days.

The most frequent clinical signs are rapid breathing, horripilation, lethargy, occasional ataxia and hypothermia, which appears 12-72 h before death.



Figure 5. Sheep in the terminal stage of the disease showing opisthotonos of limbs, neck and head (24).

Prognosis

Prognosis is not easy, because the outcome is affected by many factors. Generally speaking, the hyperacute and acute forms have a very high mortality rate (up to 100%). However, remarkable differences exist among outbreaks, depending on the breed and age of the animals, the *Ehrlichia*

ruminantium strain involved, the presence of endemic stability and the time of year (seasonal variability has been reported in South Africa). It must be remembered that most literature reports concern imported breeds, which are a minority of African livestock (83, 84).

Post mortem findings

Gross lesions

Gross lesions are similar in all species but differ according to the strain's virulence (3, 80). There are no signs characteristic of the disease, apart from the detection of rickettsiae colonies in the capillary endothelial cells (86).

Body cavities

Fluid accumulation - typical of the acute and subacute forms - can occur in the following districts:

- peritoneum: abundant, clear fluid; most common in cattle;
- pleura: up to 2 l of fluid in cattle, 0.5 l in sheep and goats (figure 6);
- pericardium: hydropericardium is more frequent in small ruminants than in cattle (figure 7).

The fluid is usually pale yellow, transparent or slightly turbid; blood may occasionally be present; due to the high fibrin content the fluid often coagulates when exposed to air (3, 81).

Cardiovascular system

Apart from occasional petechiae, lesions are not frequently observed in the pericardium and endocardium. Haemorrhages and degeneration can be seen in the myocardium.

Respiratory system

The trachea and bronchi often contain a fibrinous froth and the mucosa is congested and covered with petechiae and haemorrhages. Oedema and congestion of the parenchyma and interlobular sects are often observed, especially in the hyperacute and acute forms, where they can cause suffocation and death. The pleurae are thickened, brilliant and shining with petechial haemorrhages (88, 95).

Digestive system

The abomasal mucosa sometimes appears congested and thickened, especially in the acute forms; in cattle small haemorrhages can appear around the pilorum. Haemorrhagic and non-haemorrhagic enteritis is common in Jerseys, usually affecting the small and large intestine down to the rectum (50, 88). The liver is often congested, with Glisson's capsule



Figure 6. Hydrothorax (17).

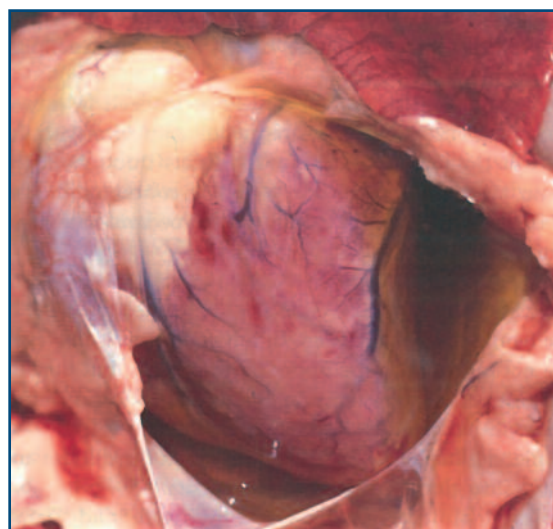


Figure 7. Hydropericardium (17).

distension and occasional haemorrhages in the gall bladder. Degeneration of the parenchyma is often reported (88).

Lymphatic system

Splenomegaly apparently depends on the strain. The cut surface is dark red and pulpy (47, 51, 88). Lymph nodes are frequently oedematous with petechial haemorrhages clearly visible on the dissected surface. Mesenteric, retropharyngeal, cervical, bronchial and sub-maxillary lymph nodes are the most frequently affected (3).

Urinary system

The most common lesion is congestion. Kidneys are massively damaged, with nephrosis and ischaemia in Angora goats (47, 74).

Nervous system

Meningeal congestion and brain oedema are often present. They are directly responsible for the clinical signs of the disease but are not easily detectable as post mortem findings. Occasionally, oedema can become very severe and affect the entire brain, which can partially prolapse through the *foramen magnum*. There is fluid accumulation in the sub-arachnoid space and the choroid plexus is thickened, with an opaque, greyish appearance. Bruises and petechiae can be detected along the spinal chord, the brain and the cerebellum (47).

Microscopical lesions

Lungs

Alveolar and interstitial oedema, not easily recognisable.

Kidneys

Nephrosis of variable intensity, with perirenal oedema and petechiae in the cortex and dilatation of the convoluted tubules, collecting tubules and Bowman's spaces.

Nervous system

Brain lesions are compatible with oedema. Perivascular spaces are dilated, with

accumulation of fluids and proteins - but also cells such as macrophages or neutrophils - within them. Axonal oedema, multifocal microcavities, necrosis foci in the cerebellar and cerebral cortex and necrotic degeneration of the neuroglia with occasional haemorrhages are also observed.

Parasitized endothelial cells

PAS+ granules and globules inside the cytoplasm, slight swelling of the mitochondria and endoplasmic reticulum, distension and mechanical deformation of the nucleus (74).

Unaffected endothelial cells

Sometimes oedematous or necrotic, clearly separated from the basal membrane (74).

Pathogenesis

Various theories have been formulated to explain the various mechanisms involved in the pathogenesis of heartwater.

Cell lesions

The occurrence of *Ehrlichia ruminantium* in capillary endothelial cells could alter their permeability, allowing transudate to pass through cellular membranes, while direct damage may explain both the haemorrhagic foci in the brain and the neuroglial lesions, due to the close spatial relationship between the neuroglia and the endothelium (72).

The role of a toxin

The increase in permeability and the nervous signs have been repeatedly attributed to a toxin (47), although this has never been definitively proven. As an alternative to the theory of immunocomplex precipitation (19), this toxin may also be responsible for kidney lesions in Angora goats. Experimental infections have shown the activity of a lipopolysaccharide, but its pathogenetic role has not been explained (94).

Biochemical alterations

The increased secretion of corticosteroids causes leukopenia and eosinopenia, while hypocalcaemia, suggested but not yet demonstrated, could trigger the neuromuscular signs (47).

Death

Death may be attributable to various causes,

from an extremely severe lung oedema to heart failure following pericardial distension, or alternatively to heart failure due to peripheral vasoconstriction (27, 65).

In laboratory mice

Death may be triggered by the release of vasoactive amines particularly histamine, following mast cell degranulation (37).

Immunity

The immunology of the disease is not well known, but the response appears to be more cellular than humoral. Serum from infected animals or large amounts of immunoglobulins obtained from immune individuals and co-inoculated in susceptible animals alongside experimental infection or during the incubation period do not prevent the onset of the disease.

The transfer of spleen cells from immune donors to susceptible hosts protects laboratory mice against the disease (3, 35, 38). A number of literature records point to a possible major role of T lymphocytes, whose proliferative response is apparently triggered by low molecular weight ehrlichia protein fractions (11 - 23 kDa) (97).

Diagnosis

Clinical and post-mortem diagnosis

An initial diagnosis of heartwater is suggested by the presence of ticks, the possible vectors of the infection, and characteristic signs such as fever, fluid collection in the thorax and nervous signs (such as nystagmus), associated with the disease's rapid course. This diagnosis must be confirmed at a later date.

Post mortem findings of hydrothorax and hydropericardium are not sufficient for unequivocal diagnosis.

Inoculation of susceptible animals

Inoculation of a tick suspension

The inoculation of susceptible animals with a suspension obtained from an homogenate of ticks collected from one or more groups of suspected animals could detect herds infected by *Ehrlichia ruminantium* (7).

Inoculation of blood

5-10 ml of blood sampled from a suspect animal can be inoculated in healthy sheep or goats. Heartwater diagnosis is confirmed by the onset of characteristic clinical signs and

the detection of the aetiological agent inside the endothelial cells (24).

Laboratory diagnosis

Haematology

Leukopenia (eosinopenia and neutropenia), anaemia, increased blood urine and plasma colour alteration can support the diagnosis (24).

Direct diagnosis

Isolation from cell cultures

This is not the best diagnostic method due to the complexity of laboratory procedures, but it is important in isolating the involved *Ehrlichia ruminantium* strain.

Detection of rickettsiae in endothelial cells

Identification of *Ehrlichia ruminantium* in the brain capillary cells of suspect animals is a highly specific sign (69), although due to the decreasing likelihood of detecting *Ehrlichia ruminantium* in the late stages of infection, its sensitivity is obviously low (23, 83).

Smears can be obtained from the "tunica interna" of large blood vessels (48), although the best method is sampling the brain cortex. The sample is about the size of a match head and must be pressed and smeared between two slides (76).

To avoid opening the cranium - especially in the field - a sample of cerebellar cortex, also useful for diagnosis, can be obtained by inserting a curette inside the *foramen occipitalis* (79) (figure 8). The slides are examined under a microscope at a low magnification (x10 objective) to locate the cerebral capillaries. An oil-immersion lens with a magnification of at least x50 is useful for identifying the rickettsiae colonies.

Diagnosis is considerably less certain 6 h after antibiotic treatment, because colonies tend to merge. In any case, diagnosis is neither easy nor simple, requiring 30-40 min of observation of the slide.

Staining techniques

Smeared slides can be fixed in methanol for 5 min and stained using the Giemsa or May

Grunwald Giemsa techniques. Rapid staining kits can be used in the field with very good results.

Staining with acridine orange is useful for fluorescent microscopy. Once fixed, slides can be stained at a later date.

Biotechnologies

The implementation of new diagnostic techniques (PCR, PFGE and DNA hybridisation) has enabled the precise identification of the disease's causal agent. The Wellcome Trust Ranger Institute Cambridge UK is currently working on its sequencing. The genome size has been established as approximately 1576 kb (33), with a guanine + cytosine content of about 29.5%. By 2003 the institute database contained 3139 kb (about 86.3% of the whole genome), obtained from DNA fragmentation by restriction enzymes.

The DNA probes used include SSUrRNA (16S), pCS20 and MAP1. pCS20 is the most sensitive and specific for the aetiological agent of heartwater, but is unable to distinguish among different genotypes. The MAP1 gene has also been used as a diagnostic tool, but its remarkable polymorphism makes it more useful for differentiation of different genotypes and identification of new *Ehrlichia* species (28). In general, although PCR methods have proved highly effective in detecting infection in ticks or in animal samples during the clinical stage of the disease or after death, only limited studies have been conducted to assess their value in healthy carrier ruminants. *Ehrlichia ruminantium* can easily be found in the blood of infected animals just before the onset of the febrile period and for a few days after recovery, but then seems to disappear from the circulation (64). Whether the lack of detection in most carrier animals is due to insufficient sensitivity of the PCR methods or the intermittent release of organisms in the circulation is unknown.

A useful technique for confirming the status of a suspected carrier whose blood is PCR-

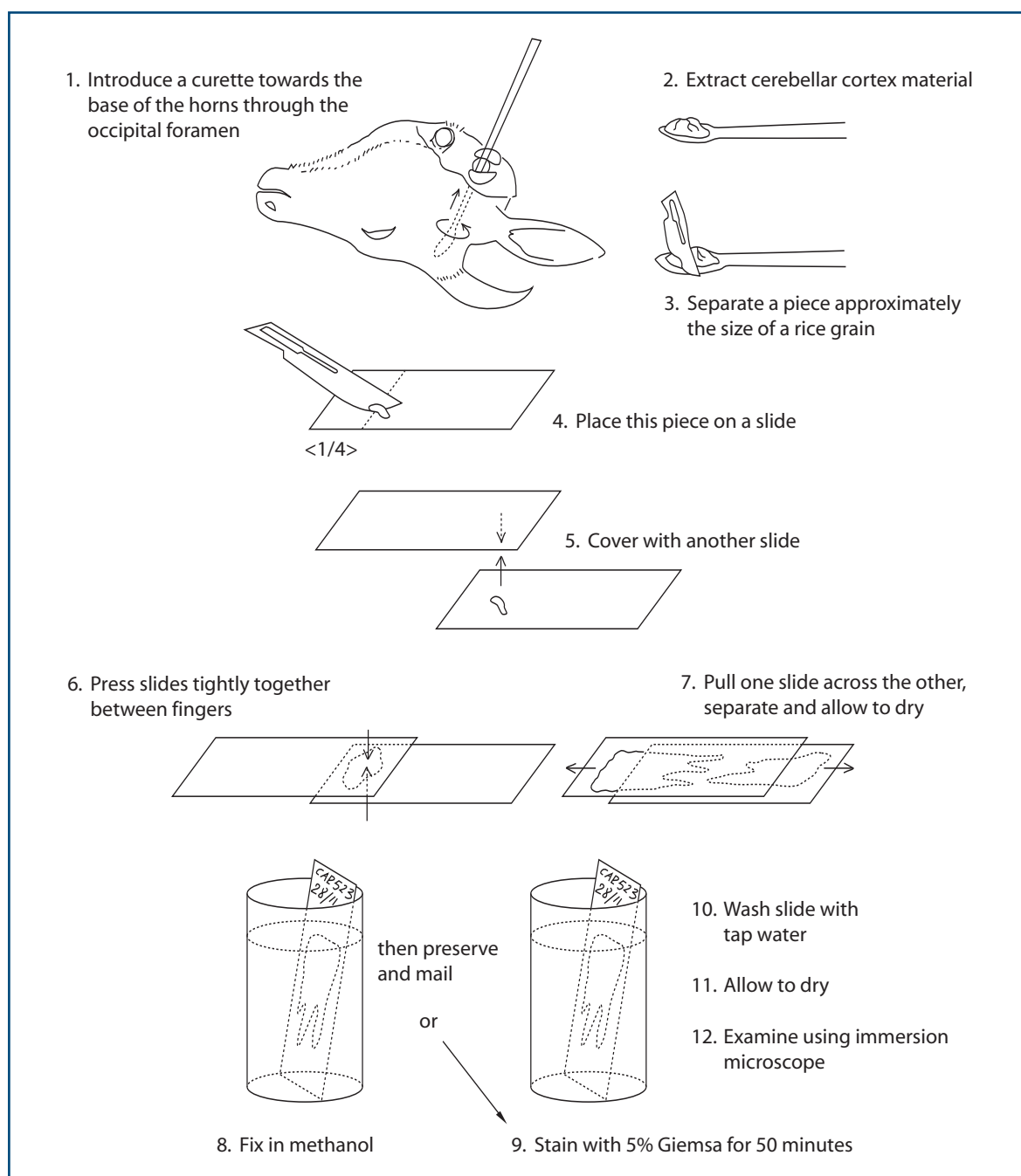


Figure 8. Post mortem brain collection procedure (24).

negative is to feed batches of naïve ticks on the animal and then test the ticks by PCR (64).

Indirect diagnosis

Antibodies appear 2-3 weeks after natural or experimental infection. They peak between 4 and 6 weeks after infection and are detectable for an extremely variable period, depending on the strain and animal species involved:

- in cattle, antibodies have been reported for a period varying from 1 to 6 months after infection, depending on both the author and technique used. Recent longitudinal epidemiological studies have demonstrated that a significant number of cattle living in endemic zones did not produce antibodies at all, or if they did, the antibodies were extremely labile;

- in sheep, antibodies are detectable for about 39 months;
- in goats, this period is extremely variable, ranging between 3 and 24 months.

These marked differences in antibody persistence are mirrored by a lower seroprevalence in cattle than in sheep and goats (58).

In general all the serological tests used to diagnose HWD have problems with specificity, due to the presence of common antigens on the surface of different *Ehrlichia* species. The most common serological tests are the following.

Indirect immunofluorescence – *in vivo* antigens (MIFA test)

Mouse macrophages are extremely sensitive. However, their use requires a specialised lab. Neutrophils from infected goats provide poorly repeatable results and cannot be routinely used.

Indirect immunofluorescence – *in vitro* antigens (CIFA test)

In vitro antigens harvested from cell cultures can be used by unspecialised labs; they are however subject to false positive reactions and therefore have a low specificity.

Immunoenzymatic techniques

To overcome the problem of cross-reactions with *Ehrlichia* sp, two ELISAs based on a recombinant MAP1 antigen have been developed. The first is an indirect ELISA that uses an immunogenic region of the MAP1 protein (MAP1-B) and gives far fewer cross-reactions with *Ehrlichia* sp. (MAP1-B ELISA). The second is a competitive ELISA that uses the MAP1 gene cloned in a baculovirus and monoclonal antibodies (MABs) raised against the MAP1 protein (MAP1 C-ELISA). Both tests have dramatically improved specificity, but they still show some reactivity with high titre sera against *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and an unclassified white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) agent (64).

Differential diagnosis

In small ruminants

Endoparasitosis

Gastrointestinal Strongyles and *Oesophagostomum* infestations can trigger hyponatraemia and hydropericardium in anaemic and cachectic animals. The slow course, absence of nervous signs, fever and detection of parasites guide diagnosis toward a parasitological condition rather than heartwater (24).

Bluetongue

BT often occurs in heartwater endemic zones. This disease can also cause hydropericardium, but buccal and foot lesions facilitate differential diagnosis (24).

Tetanus, strychnine poisoning, acaricide intoxication and ingestion of poisonous plants. Bacterial meningoencephalitis, hypophysis abscesses (especially in goats)

Signs are easily mistaken for hyperacute heartwater cases. Rickettsiae detection and a detailed history can be of considerable help (17, 24).

Anthrax

Causes sudden death due to elevated temperature. Differential diagnosis is easy, given the characteristic post mortem findings (24).

Pneumonia

Lungs are more severely affected than in heartwater (17, 24).

Other rickettsial diseases

Ehrlichia ovina causes similar signs, but organisms are detected in circulating monocytes. It is a predisposing factor for *Ehrlichia ruminantium* infection (24, 44).

In cattle

Babesiosis

Cerebral babesiosis can be distinguished

from heartwater by the detection of parasites inside red blood cells (41, 87).

Theileriosis

Theileria parva, which causes East Coast fever, and *Theileria taurotragi*, which causes a severe brain disease ('Ormilo', in Maasai), can be mistaken for heartwater. Slide diagnosis is important to distinguish the diseases.

Trypanosomoses tse-tse transmitted

Can be mistaken for the hyperacute form, but the parasites in the blood are easily detected (24).

Other rickettsial diseases

Ehrlichia bovis infection is clinically similar, but the causal organisms are detected inside circulating monocytes (78).

In small ruminants and cattle

Coccidiosis and Botulism

Both these diseases can be mistaken for acute

or subacute heartwater cases (24); oocyst detection easily differentiates coccidiosis.

Rabies

The nervous signs and the fact that rabies is a zoonotic disease make it extremely important to distinguish between the two. Epidemiological investigations and case history (possible bites by carnivores) are the best diagnostic tools.

Chlamydiosis

Chlamydia sp. and *Ehrlichia ruminantium* are not easily distinguished in slides or tissue sections. They are both pleomorphic and characterised by elementary, intermediate and reticulate bodies. However, *Chlamydia* colonies often contain all the forms, while *Ehrlichia* colonies are often homogeneous. The two infections can also be differentiated by observing the different brain histopathology (17).

Control and treatment

Treatment

Many drugs have been used to treat heartwater. Tetracyclines are the best treatment option currently available but must be administered as soon as possible, before the onset of clinical and especially nervous signs. Both normal and long-acting oxytetracycline (20 mg/kg in a single administration) are very effective and do not prevent the development of the immune response, as they do not cause sterile immunity (17). Of course, in the field it is not easy to treat animals promptly.

Supportive treatment

Diuretics

Indicated to treat brain oedema. They should be used alongside anti-inflammatory drugs and antibiotics (94).

Adrenomimetic drugs, electrolytes, calcium, plasma or whole blood

These can be used as a form of support treatment, to decrease acidosis and combat ruminal atony and neuromuscular signs (3, 27, 47).

Traditional treatment

The traditional knowledge of African nomadic

populations is crucial to preserve and manage their livestock. The Masai tribes are well known for their knowledge not only of the most frequent diseases, but also the times of year when the risk of disease is highest, association with vectors and parasites, locations of infested and therefore risky pastures and traditional treatments to control and treat diseases.

South Africa is no exception; a study carried

out by the Rapid Rural Appraisal method in a North-Eastern province (Madikwe area) revealed that the local population uses 45 plants from 26 different families to treat livestock diseases. These substances are used singly or in combination to treat 29 different disorders, ranging from placenta retention, diarrhoea, fractures, eye inflammation, fertility problems, endo- and ectoparasites and heartwater (96).

Prevention

Chemoprophylaxis

This consists of a series of tetracycline injections to protect susceptible animals introduced into heartwater endemic areas (42). Fast-acting tetracycline injections (dose = 3 mg/kg) are suggested for goats 10, 20, 30, 45 and 60 days after introduction; however animals must not be dipped during the first two months (59).

Cattle are protected by injection of long-acting tetracyclines (dose = 10-20 mg/kg) 7, 14 and 21 days after introduction. These injections protect against infection and allow the build-up of the immune response (77).

The basis of this procedure is that animals become naturally infected while they are protected by the drug. The degree of tick infestation can affect the efficacy of this practice.

Vaccination strategies

Control through vaccination

This method has also been called 'raw vaccine' or 'infection and treatment'. It consists of the administration of a calibrated dose of infected blood or a homogenate of infected ticks to susceptible animals, followed by tetracycline treatment of reactive animals (64). 2-10 ml of infected blood or 100 µl of a suspension obtained from a homogenate of infected ticks is inoculated intravenously, slowly, to prevent anaphylactic reactions. In some cases the auricular vein can be used.

Fast-acting antibiotic treatment starts at the onset of fever (generally 12-22 days after infection) and is administered to all animals aged over 21 days (dose = 5-10 mg/kg) for three consecutive days or until fever decreases. Alternatively, a single injection of long-acting tetracyclines can be used (dose 20 mg/kg).

In South Africa, many thousands of animals are treated in this way every year with the moderately pathogenic Ball 3 strain.

The two methods described above protect animals from the onset of clinical signs, but not from infection.

Immunological control of ticks

No vaccine is currently available or under development to protect animals from vector infestation, although a vaccine against some *Boophilus* species has been developed.

Control by endemic stability

In some cases, a controversial attempt has been made to achieve a balance among host, vector and parasite, in order to decrease the huge losses caused by epidemics. Progressive schemes to reduce the number of external parasite treatments have been implemented, with the aim of developing a sufficiently high prevalence of infection in ticks to enable the herds living in endemic areas to reach the level of immunity necessary to maintain endemic stability (101).

Heartwater: a possible risk for Italy?

As we have seen, heartwater epidemiology is rather complex and affected by the characteristics of the parasite itself, vector and host. These characteristics can both favour and limit the spread of the disease.

Aetiological agent

Regarding aetiological agent the following can be predisposing factors:

- very pathogenic, especially for exotic breeds;
- different strains have a different pathogenicity for the various susceptible species;
- possible absence of sterile immunity in the clinically healed animal;
- possible vertical transmission in the host;
- presence of serological cross-reactions.

On the other side there are limiting factors:

- unable to survive outside the host and/or vector;
- needs a competent vector for transmission (*Amblyomma* ticks).

Host

Predisposing factors regarding the host are also present:

- wide range of susceptible species; wild species (not easily controllable) as reservoirs;
- sub-clinical carriers possible;
- vertical transmission.

The following can be considered limiting factors:

- high lethality rate, with a high prevalence of hyperacute forms in initial outbreaks;
- colostrum-derived immunity.

Vector

For the vector predisposing factors are:

- low host specificity, at least for the two main vectors (*Amblyomma variegatum* and *Amblyomma hebraeum*);
- migratory birds could transport immature forms;
- transstadial transmission;
- infection can thus persist in the environment long term (depending on the duration of the development cycle).

While the following can be limiting factors:

- survival inside vectors is conditioned by the availability of a specific habitat (hot, humid climate, vegetation);
- no trans-ovarian transmission.

Possible vector and heartwater introduction routes in free areas

Introduction of domestic or wild ruminants infected or infested by *Amblyomma* sp.

The introduction of heartwater or *Amblyomma* individuals into a heartwater-free country via legal trade of domestic/wild ruminants is unlikely, given current international legislation regulating the trade of live animals. In the past, *Amblyomma variegatum* and heartwater have been introduced into the American continent through the live animal trade (68).

The invasion of the Caribbean

Amblyomma variegatum individuals were introduced in the Caribbean at the beginning of the 19th century through the movement of infested cattle from Senegal to the French Antilles (Guadeloupe 1828). The tick later invaded the territory, spreading to other islands of the West Indies (68).

In 1980 heartwater was confirmed for the first time in the American continent on the island of Guadeloupe (6); both clinical heartwater and *Ehrlichia ruminantium*

serological reactions are currently present in the West Indies.

The spread of *Amblyomma variegatum* in the Caribbean was facilitated by the arrival of the cattle egret (*Bubulcus ibis*) (figure 9), also of African origin, from across the Atlantic ocean (1877) (29), and its subsequent spread throughout Central America.

Some ethological characteristics of this bird – a member of the *Ardeidae* family - have enhanced its role as a spreader of *Amblyomma variegatum* in the Caribbean:

- cattle egrets live alongside animals living in the open (figure 10);
- they eat a varied diet: arthropods and parasites on animals' bodies and insects raised by walking animals (figure 11);
- they are extremely adaptable to a variety of habitats (they are the least 'aquatic' of the heron family);
- the species is currently expanding and spreading in all continents (sub-cosmopolite chorology) (29).

Considering the farming sector's huge losses inflicted by *Amblyomma variegatum* - Tropical Bont Tick (TBT), in relation to the large-scale import of animals necessary to support tourism in the area (i.e. feed the tourists), in 1995 an ambitious eradication effort - the Caribbean *Amblyomma* Programme (CAP) - was initiated.

From 1995 to 2005 the USDA (United States Department of Agriculture), French government, FAO (Food and Agriculture Organisation), IFAD (International Fund for

Agricultural Development) and IICA (Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture), alongside the island nations of the Caribbean, strived for the eradication of the TBT in the Caribbean. During this time the TBT was eradicated from Anguilla, Montserrat and St. Vincent and the levels of infestation on Barbados, St. Kitts, Nevis, Dominica and St. Lucia were greatly reduced. Nevertheless, by December 2005 it was realised that its complete eradication from the Caribbean region was unattainable. The eradication programme has therefore been converted into a region-wide TBT control programme, focussing on surveillance and capacity building (25).

Introduction of other exotic animals infested by *Amblyomma* sp. and possibly infected

The introduction of exotic animals other than ruminants from endemic areas, including



Figure 9. Cattle egret (*Bubulcus ibis*).



Figure 10. Cattle egret and wild ruminants.



Figure 11. Cattle egret and domestic ruminants.

through smuggling, is a high-risk route for the introduction of exotic tick specimens. An example is provided by the events in Florida at the end of the 90s.

The Florida case

The likelihood of heartwater introduction in the USA has increased, following the increase in the import of wild animals - especially exotic reptiles - from endemic areas, in addition to the geographical proximity of Florida and the Caribbean. Between 1997 and 2000, 500 tick specimens able to transmit heartwater were detected; they had been introduced with wild animals. In August 1997 an *Amblyomma marmoratum* (figure 12) infestation was reported in a reptile house. This African tick is a heartwater experimental vector which usually feeds on reptiles. Several development stages were reported, which testifies to the tick's capacity to carry out its entire development cycle in that microhabitat, and also that the infestation had been present in the reptile house for some time.

Amblyomma marmoratum was later confirmed in another 7 counties in Florida. In all cases, tick introduction was due to the trade in live reptiles (4, 101).

In November 1999, PCR detected *Ehrlichia ruminantium* in 15 *Amblyomma sparsum* specimens collected from leopard tortoises (*Geochelone pardalis*) (figure 13) imported from Africa (20).

Given all this evidence, in 1999 the Florida Health Authorities began a surveillance plan of exotic animal imports, with the aim of detecting the introduction of exotic ticks.

As the Florida peninsula is situated along the migratory routes connecting the American continent to the Caribbean (figure 14), cattle egrets ringed in Guadeloupe have often been caught in south Florida.

The South-East coastal states of the US are extremely vigilant against heartwater, especially given the capillary presence of *Amblyomma maculatum* (the Gulf Coast tick) (figure 15) - a potential heartwater vector (90) - in all the states facing the Gulf of Mexico.

Introduction by migratory birds transporting *Amblyomma* sp. and possibly infected

Migratory paths are known routes for the introduction of pathogens, but even so cannot be easily controlled. There are several examples of the introduction or expansion into new areas of tick species whose immature stages feed on migratory birds, e.g. two sub-species of the *Hyalomma marginatum* tick.

Hyalomma marginatum marginatum is an African tick whose life-cycle has been considerably shortened in order to accommodate the first two development stages on birds and use them in order to disperse: it takes about 20 days for the larvae feed, transform into nymphs and



Figure 12. *Amblyomma marmoratum* (Jim Occi, BugPics, Bugwood.org).



Figure 13. *Geochelone pardalis*.

feed again, which exceeds the time birds need to move from their winter to their summer sites, or vice-versa. This dispersion mechanism has enabled *Hyalomma marginatum marginatum* to spread up to central Europe. However, dispersal is conditioned by the seasonal dynamics of the tick, whose immature stages are active in spring while adults are active from summer to late autumn, so that migratory

birds can spread the ticks from the southernmost to the northernmost zones (spring migration) of the whole distribution area (57). *Hyalomma marginatum rufipes*, endemic in the Ethiopian region, used a similar mechanism to spread through the Caspian regions and probably also to Sicily (2, 57).

The introduction of *Amblyomma* sp. (and therefore of heartwater) by trans-Saharan migratory birds is likely (67). The sporadic reports of *Amblyomma variegatum* in the Mediterranean (*Amblyomma variegatum* was reported in 1977 in Italy and 10 years later in Greece) (2, 66) should be read under this light.

How great is the risk for Italy?

The Mediterranean Basin falls under the main trans-Saharan migratory routes, directly connecting free areas (Europe) with endemic zones (sub-Saharan Africa, Ethiopian region). 500 native bird species are currently (1999) recorded in Italy; of these, about two thirds are migratory. Only some of these fly, very quickly, across the Sahara. Millions of birds leave their African



Figure 14. Migratory routes of North America.



Figure 15. *Amblyomma maculatum* (Jim Occi, BugPics, Bugwood.org).

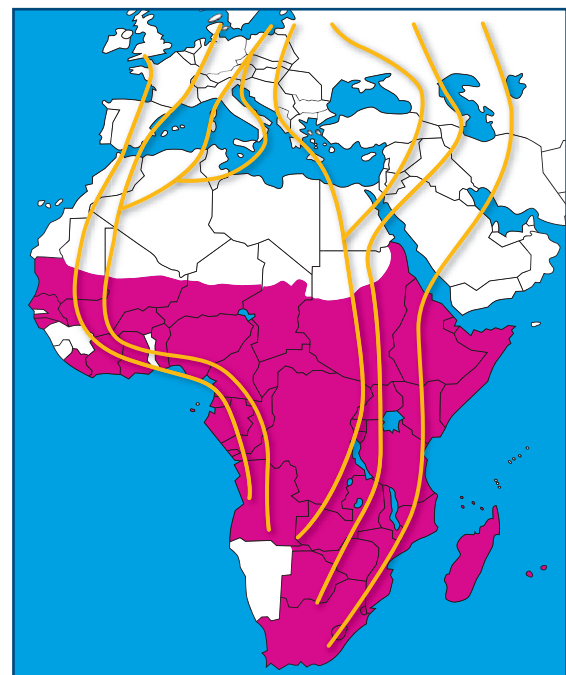


Figure 16. Trans-Saharan migratory routes; in fuxia heartwater distribution in Africa.

wintering sites every year to fly to nesting sites in North Europe. On arrival at the North African coast, the birds divide into three groups travelling along three different flight paths across the Mediterranean: one of these passes above Gibraltar, another above Italy and the third above south-east Europe. These bird species are known as 'quick migrators', because during spring (April-May) they can fly non-stop for over 4 000 km; the journey to the breeding sites takes more or less a week. The nesting sites of some of these birds are in Italy, which falls

Table IV. Main long-range migratory bird species found in Italy (43, 60).

Taxonomy	
Scientific name	Common name
Order Ciconiiformes	
Family Ardeidae	
<i>Ixobryncus minutus</i>	Little bittern (figure 17)
<i>Nycticorax nycticorax</i>	Night heron
<i>Ardeola ralloides</i>	Squacco heron
<i>Ardea purpurea</i>	Purple heron (figure 18)
Order Anseriformes	
Family Anatidae	
<i>Anas acuta</i>	Pintail
<i>Anas querquedula</i>	Garganey
Order Charadriiformes	
Family Recurvirostridae	
<i>Himantopus himantopus</i>	Black-winged stilt
Family Burinidae	
<i>Burhinus oedincnemus</i>	Stone curlew
Family Glareolidae	
<i>Glareola pratincola</i>	Collared pratincole
Family Charadriidae	
<i>Charadrius dubius</i>	Little ringed plover
<i>Charadrius hiaticula</i>	Ringed plover
<i>Pluvialis squatarola</i>	Grey plover
Family Scolopacidae	
<i>Calidris canutus</i>	Knot
<i>Calidris alba</i>	Sanderling
<i>Calidris ferruginea</i>	Curlew sandpiper
<i>Calidris minuta</i>	Little stint
<i>Calidris temminckii</i>	Temminck's stint
<i>Philomachus pugnax</i>	Ruff
<i>Scolopax rusticola</i>	Woodcock
Family Tringinae	
<i>Limosa limosa</i>	Black-tailed godwit
<i>Limosa lapponica</i>	Bar-tailed godwit
<i>Numenius phaeopus</i>	Whimbrel
<i>Tringa nebularia</i>	Greenshank
<i>Tringa glareola</i>	Wood sandpiper
<i>Tringa ochropus</i>	Green sandpiper
<i>Tringa hypoleucos</i>	Common sandpiper
<i>Tringa erythropus</i>	Spotted redshank
<i>Tringa stagnatilis</i>	Marsh sandpiper

under the Western migratory route at the limit of the 4 000 km. However, many other birds also stop over in the Italian peninsula (for a few days, depending on the weather conditions), to rest and feed (refuelling) (43). Similarly, Italy also hosts the nesting sites of 'slow migrators', so-called because they do not usually cross the Sahara desert, fly slowly and stop frequently according to climatic conditions.

Table IV reports some bird species occurring in Italy that winter south of the Sahara.

The heron (*Bubulcus ibis*) is a member of the Ardeidae family (Linnaeus, 1758) (figure 19), a polytypic, sub-cosmopolite species of Hindu-African origin.

Posizione sistematica	
Nome scientifico	Nome comune
Family Arenarinae	
<i>Arenaria interpres</i>	Turnstone
Family Laridae	
<i>Larus fuscus</i>	Lesser black-backed gull
Family Sternidae	
<i>Chlidonias niger</i>	Black tern
<i>Chlidonias hybridus</i>	Whiskered tern
<i>Sterna hirundo</i>	Common tern
<i>Sterna albifrons</i>	Little tern
<i>Sterna sandvicensis</i>	Sandwich tern
Order Passeriformes	
Family Irudinidae	
<i>Hirundo rustica</i>	Swallow
<i>Delichon urbica</i>	House martin
<i>Riparia riparia</i>	Sand martin
Family Motacillidae	
<i>Anthus trivialis</i>	Tree pipit
<i>Motacilla flava</i>	Yellow wagtail
<i>Anthus campestris</i>	Tawny pipit
Family Turdidae	
<i>Saxicola rubetra</i>	Whinchat
<i>Luscinia megarhynchos</i>	Nightingale
Family Silvidae	
<i>Sylvia borin</i>	Garden warbler
<i>Sylvia communis</i>	Common whitethroat
<i>Sylvia atricapilla</i>	Blackcap
<i>Sylvia cantillans</i>	Subalpine warbler
<i>Sylvia nisoria</i>	Barred warbler
<i>Sylvia curruca</i>	Lesser whitethroat
<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	Reed warbler
<i>Acrocephalus aeruginaceus</i>	Great reed warbler
<i>Acrocephalus palustris</i>	Marsh warbler
<i>Locustella luscinioides</i>	Savi's warbler
<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	Sedge warbler
<i>Locustella naevia</i>	Grasshopper warbler
<i>Hippolais polyglotta</i>	Melodious warbler

to be continued

This species arrived in Italy fairly recently (until a few decades ago it occurred in Europe only in the Camargue and the Iberian peninsula), and its presence is now stable.

Table IV. Main long-range migratory bird species found in Italy (43, 60).

Taxonomy	
Scientific name	Common name
<i>Hippolais icterina</i>	Icterine warbler
<i>Sylvia atricapilla</i>	Blackcap
<i>Phylloscopus sibilatrix</i>	Wood warbler
<i>Phylloscopus trochilus</i>	Willow warbler
<i>Phylloscopus bonelli</i> spp.	Bonelli's warbler sp.
Family Muscipapidae	
<i>Muscicapa striata</i>	Spotted flycatcher
<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	Common redstart
<i>Saxicola rubetra</i>	Whinchat
<i>Oenanthe hispanica</i>	Black-eared wheatear
<i>Monticola saxatilis</i>	Rock thrush
Family Oriolidae	
<i>Oriolus oriolus</i>	Golden oriole
Family Laniidae	
<i>Lanius collurio</i>	Red-backed shrike
<i>Lanius minor</i>	Lesser grey shrike
<i>Lanius senator</i>	Woodchat shrike
Family Alaudidae	
<i>Calandrella brachydactyla</i>	Short-toed lark
Order Accipitriformes	
Family Accipitridae	
<i>Pernis apivorus</i>	Honey buzzard
<i>Milvus migrans</i>	Black kite
<i>Cyrcaetus gallicus</i>	Short-toed eagle
<i>Circus pygargus</i>	Montagu's harrier
Family Falconidae	
<i>Falco naumanni</i>	Lesser kestrel
<i>Falco subbuteo</i>	Hobby
<i>Falco eleonora</i>	Eleonora's falcon
Order Strigiformes	
Family Strigidae	
<i>Otus scops</i>	Scops owl
Order Galliformes	
Family Phasianidae	
<i>Coturnix coturnix</i>	Quail
Order Cuculiformes	
Family Cuculidae	
<i>Cuculus canourus</i>	Cuckoo
Order Caprimugiliformes	
Family Caprimugilidae	
<i>Caprimulgus europaeus</i>	Nightjar
Order Apodiformes	
Family Apodidae	
<i>Apus apus</i>	Common swift
<i>Apus melba</i>	Alpine swift
Order Coraciiformes	
Family Meropidae	
<i>Merops apiaster</i>	European bee-eater
Family Upupidae	
<i>Upupa epops</i>	Hoopoe

There are 800 nesting pairs, mainly in Sardinia, on the Tyrrhenian coast and in the Po valley (figure 20) (9).



Figure 17. Little bittern (*Ixobrychus minutus*) (9).



Figure 18. Purple heron (*Ardea purpurea*) (9).



Figure 19. Heron (*Bulbucus ibis*) (9).

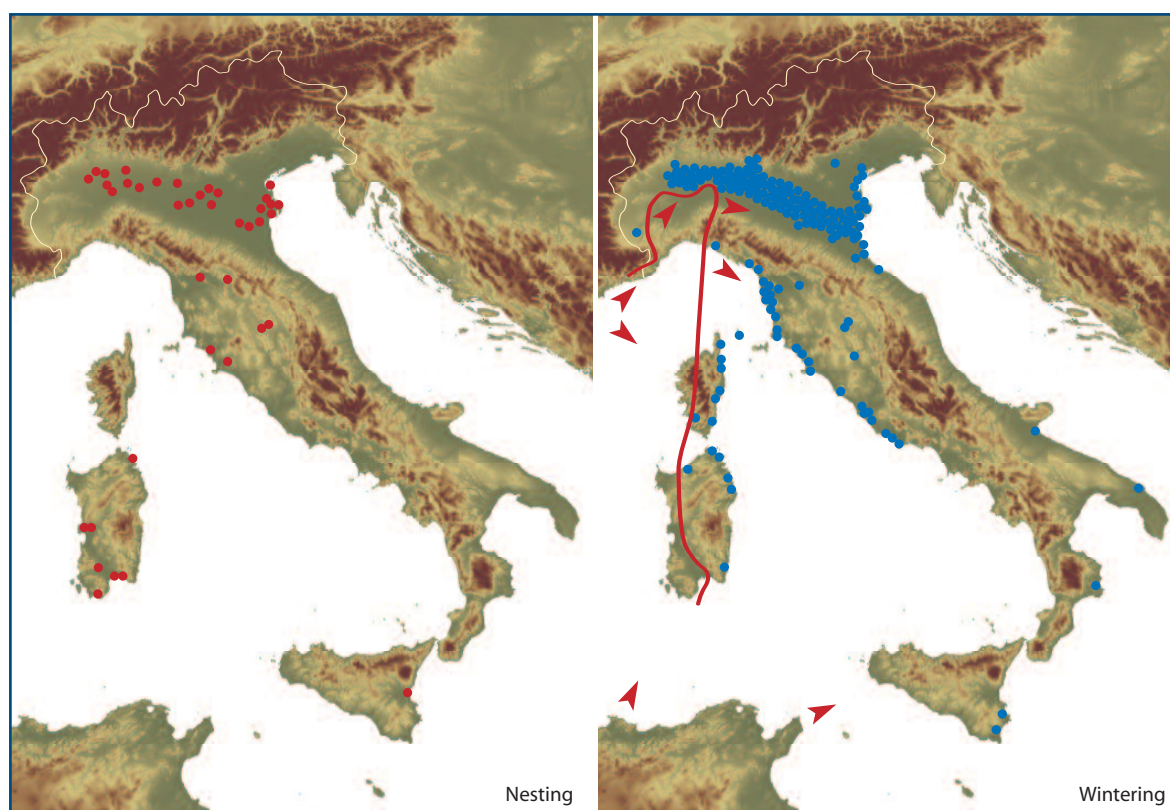


Figure 20. Cattle egret (*Bulbucus ibis*) distribution in Italy.

Geographic information system analysis

In light of the above information on birds' migratory routes, geographical risk maps of *Amblyomma* sp. colonisation and survival have been constructed using a GIS (Geographical Information System). These take account of all the evidence reported above, especially the ecological and biological requirements of *Amblyomma* ticks (literature data) and ecological and climate data for Italy.

Amblyomma tick: ecological and biological data

The literature survey focused on the two main African vectors of heartwater, *Amblyomma hebraeum* and *Amblyomma variegatum*.

Land use in Italy, as derived from the CORINE system to a resolution of 250 m, was classified into 3 risk categories (table V) with respect to the colonisation and survival of *Amblyomma* sp.

The main criterion adopted for classifying

each land use type was the likelihood of creating humid microhabitats screened from direct sunlight.

The map in figure 21 was constructed on the basis of this classification.

After this first step, temperature parameters were assessed.

Maximum, mean and minimum temperature data and the minimum and maximum extremes recorded in the distribution areas of *Amblyomma variegatum* and *Amblyomma hebraeum* during the activity peak were collected (source: BBC - 9).

Tables VI and VII report these data for each tick species.

The mean temperatures in Italy, recorded in spring (March-May) by 102 weather stations operated by the Air Italian Force, were then collected. These accurate records were then geostatistically interpolated (ordinary kriging) to cover the whole country.

The map reported in figure 22 shows the mean temperatures recorded in springtime.

Spring was chosen because it is the period when birds wintering in sub-Saharan Africa

Table V. *Amblyomma hebraeum* and *Amblyomma variegatum* survival risk according to land use.

Minimal risk	Intermediate risk	Maximum risk
Continuous urban fabric	Road and rail networks and associated land	Permanently irrigated land
Discontinuous urban fabric	Green urban areas	Vineyards
Industrial or commercial units	Non-irrigated arable land	Fruit trees and berry plantations
Port areas	Rice fields	Pastures
Airports	Olive groves	Predominantly agricultural land with significant areas of natural vegetation
Mineral extraction sites	Annual crops associated with permanent crops	Agro-forestry areas
Dump sites	Complex cultivation patterns	Broad-leaved forest
Construction sites	Coniferous forest	Mixed forest
Sport and leisure facilities	Beaches, dunes, sands	Natural grasslands
Bare rocks	Intertidal flats	Moors and heaths
Burnt areas		Sclerophyllous vegetation
Glaciers and perpetual snow		Transitional woodland-shrub
Sea and ocean		Sparsely vegetated areas
		Inland marshes
		Peat bogs

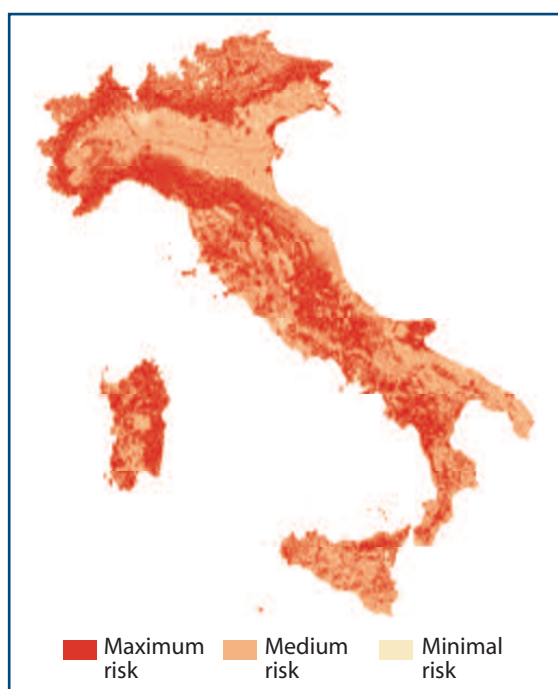
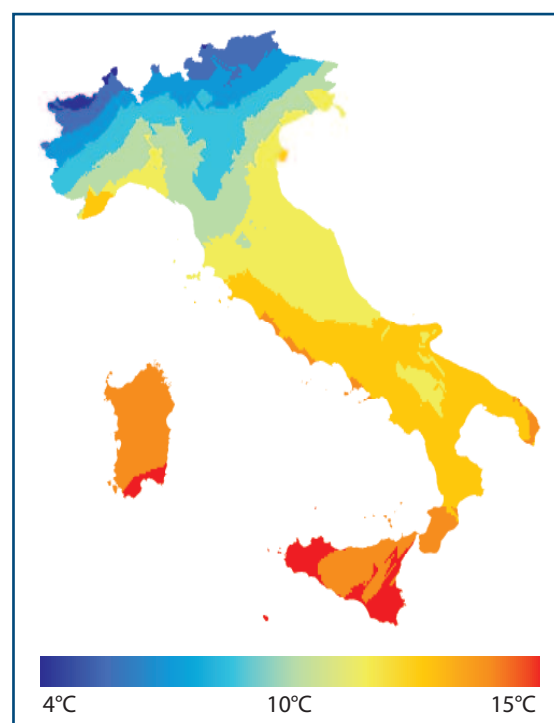
**Figure 21.** Survival and colonisation risk of *Amblyomma variegatum* and *Amblyomma hebraeum* by land use.**Figure 22.** Mean springtime temperatures in Italy.

Table VI. Temperatures recorded in the areas of distribution of *Amblyomma variegatum* during peak activity. Minimal and maximum values are highlighted in blue and in red.

Location	Activity peak	Average minimum temperature	Average maximum temperature	Extreme minimum temperature	Extreme maximum temperature
Tanzania Dar el salaam (coast)	November-March (rainy season)	24°	31°	19°	36°
Tanzania Dodoma (internal)	November-March (rainy season)	18°	31°	13°	36°
Malawi (Lilongwe - highlands)	November-March (rainy season)	16°	29°	11°	34°
Ethiopia (Harrar - highlands)	March-July (spring rains)	14°	27°	11°	31°
North Somalia (extremely hot and arid)	April-May (rainy season)	25°	36°	19°	44°
Yemen (Red Sea coast)	March-July	25°	37°	21°	41°
Mozambique (Zumbo - Zambezi valley)	September-May (rainy season)	15°	38°	7°	49°
Nigeria (Lagos - coast hot and humid)	May-June, in the mid of the rain season (adults peak)	23°	31°	21°	40°
Nigeria (Ibadan - central area, less humid climate)	May-June mid rainy season (adults peak)	22°	32°	18°	35°
Nigeria (Kano - northern area, with drier climate)	May-June (adults peak)	23°	37°	17°	44°
Zimbabwe (Harare highlands)	September-May (rainy season)	9°	28°	2°	35°

Table VII. Temperatures recorded in the areas of distribution of *Amblyomma hebraeum* during peak activity. Minimal and maximum values are highlighted in blue and in red.

Location	Activity peak	Average minimum temperature	Average maximum temperature	Extreme minimum temperature	Extreme maximum temperature
Mozambique (Zumbo Zambezi valley)	September-May (rainy season)	15°	38°	7°	49°
South Africa (Cape Town Province)	September-March (spring/summer period)	14°	26°	1°	39°
Zimbabwe (Harare highlands)	September-May (rainy season)	9°	28°	2°	35°

migrate to Europe. Furthermore, the subsequent summer season would create suitable conditions to enable the establishment of any *Amblyomma variegatum* and/or *Amblyomma hebraeum* individuals arriving in Italy with the spring migration. On the basis of the temperatures recorded in the distribution areas of *Amblyomma variegatum* and *Amblyomma hebraeum*, the mean temperatures have been divided into the same survival risk categories used for land use (table VIII).

After subdivision, the mean temperatures were mapped onto the whole of Italy. The two maps (land use and mean temperatures) of the survival risk classes of *Amblyomma variegatum* and *Amblyomma hebraeum* were then integrated using an additive model (figure 23).

Stratification of the land use data and data deriving from the reclassification of mean springtime temperatures enabled construction of a map of the survival risk of *Amblyomma variegatum* and *Amblyomma hebraeum* in Italy

Table VIII. Temperatures and survival risk of *Amblyomma hebraeum* and *Amblyomma variegatum*.

Range	Risk
< 8°C	Low
8°C - 13°C	Medium
> 13°C	High

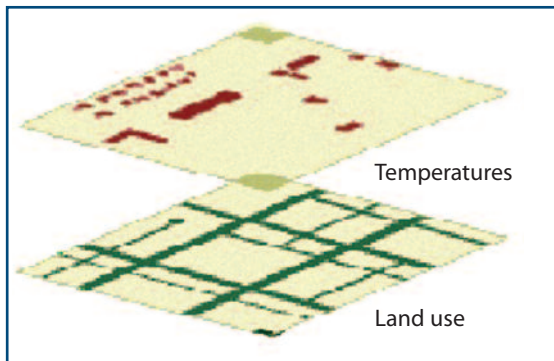


Figure 23. Additive model.

on the basis of local ecological and climate characteristics (figure 24).

As can be seen, insular, central and southern zones with a particularly mild climate are those where the survival risk of *Amblyomma variegatum* and *Amblyomma hebraeum* is highest. Cattle and sheep are reared extensively in these areas.

Italy contains some important areas for the migratory routes, including passage points (like the Messina strait) and rest areas, such as the refuelling areas located throughout Italy (both insular and peninsular), where it is easy to observe birds during migratory periods.

Cattle egrets (*Bubulcus ibis*) nest in southern Sardinia and some areas of Tuscany (Fucecchio marshes).

Literature data generated by the CLIMEX computer model on the potential distribution of *Amblyomma variegatum* suggest it could also become established in the Mediterranean area (81).

Italian ticks?

Ticks in Italy have not yet been tested or recognised as potential vectors of *Ehrlichia ruminantium*.

There are no stable *Amblyomma* populations in Italy (or elsewhere in Europe). However, the

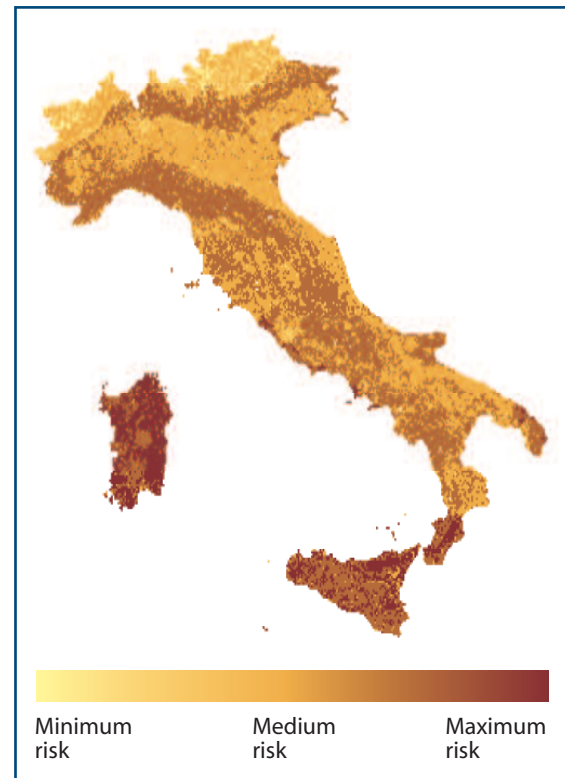


Figure 24. *Amblyomma variegatum* and *Amblyomma hebraeum* survival risk according to eco-climate characteristics.

genera *Hyalomma* and *Haemaphysalis*, deriving phylogenetically from the subfamily *Amblyomminae* (figure 25), are present.

According to the *Ixodidae* evolutionary hypothesis formulated by Hoogstraal and Kim (1985) (45), the present day genera of the metastrata group derive from ancestors corresponding to the current *Aponomma* and *Amblyomma* genera (subfamily *Amblyomminae*), strictly adapted to the large reptiles which reached their evolutionary peak simultaneously with the dinosaurs, from the end of the Palaeozoic to the end of the Cretaceous period.

Birds and mammals made their first appearance in the late Cretaceous/early Tertiary period, when dinosaurs were declining, and then enjoyed an ever-greater evolutionary success. At this time the subfamilies *Haemaphysalinae* and *Hyalomminae*, consisting respectively of the genera *Hyalomma* and *Haemaphysalis*, were undergoing increasing differentiation.

Today, all species of *Aponomma* and about a

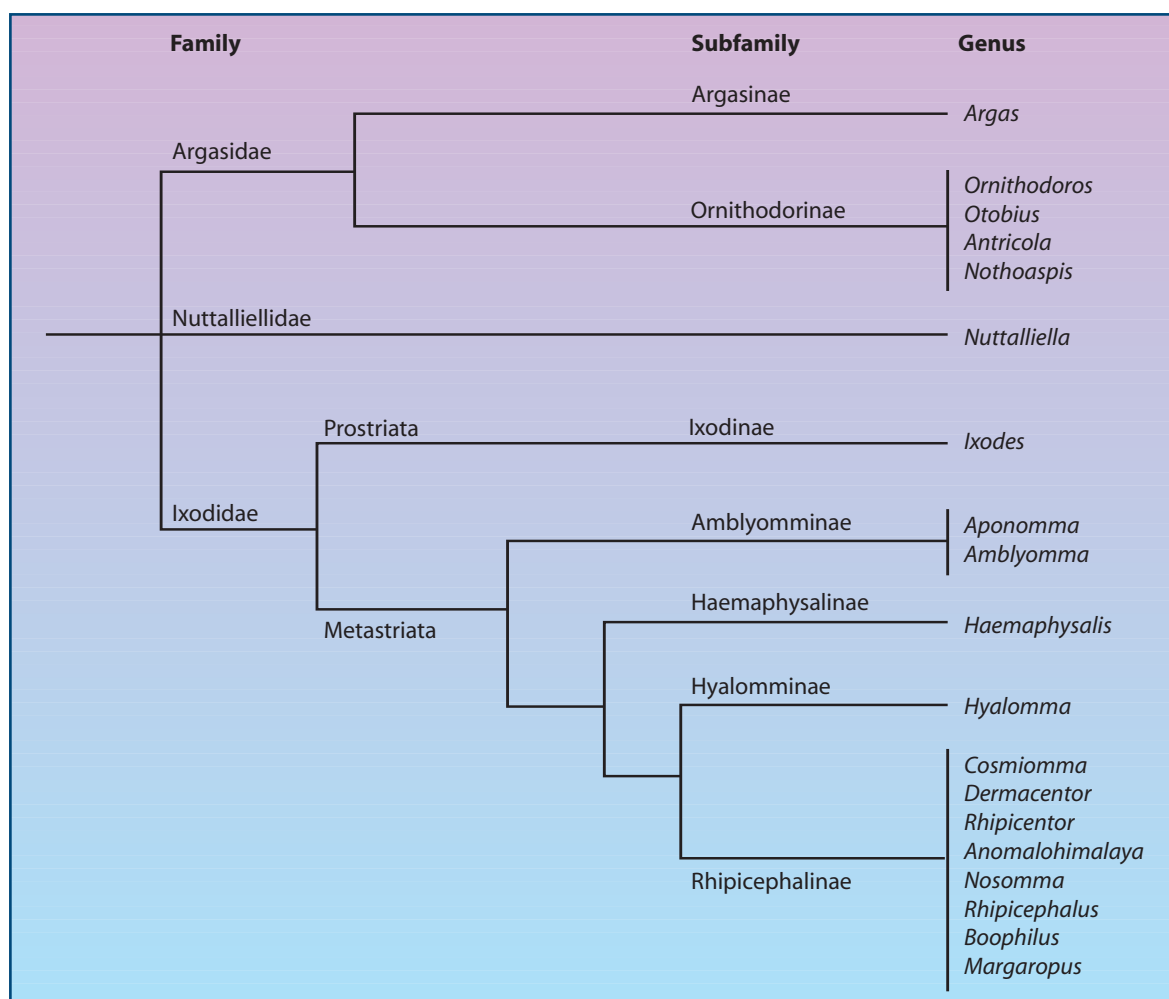


Figure 25. *Ixodidae* evolutionary hypothesis from Hoogstraal and Kim (1985).

third of the *Amblyomma* genus are almost exclusively reptile parasites (see *Amblyomma marmoreum* and *Amblyomma sparsum*), thus still showing a strong relationship with their distant ancestors. In contrast, co-evolution with birds and mammals means that only a couple of very primitive species in the *Haemaphysalis* and *Hyalomma* genera (one for each genus) are still strongly adapted to reptiles.

Genera in the sub-family *Rhipicephalinae* subsequently diversified from the most evolved species of the *Hyalomminae* family (45).

Although a remote possibility, it cannot be excluded that *Ehrlichia ruminantium*, after arriving in Italy, might be transmitted by native tick species (especially *Hyalomma* sp. and *Haemaphysalis* sp., phylogenetically and biologically close to the natural vector species, *Amblyomma*).

Conclusions

Due to the absence of natural vectors in Europe, heartwater should not be an imminent threat for Italy. However, although the introduction and the establishment of *Amblyomma* ticks and heartwater is unlikely, it is not impossible. Figure 26 illustrates a possible event tree of heartwater introduction in Italy. In order to more accurately identify the areas of possible introduction and establishment of *Amblyomma* and thus of heartwater, more information on the ectoparasites and/or pathogens introduced by migratory birds is needed.

International concern on the diseases transmitted by vectors is growing. Climate change - especially global warming - increases the need for knowledge of these diseases and identification of areas at risk.

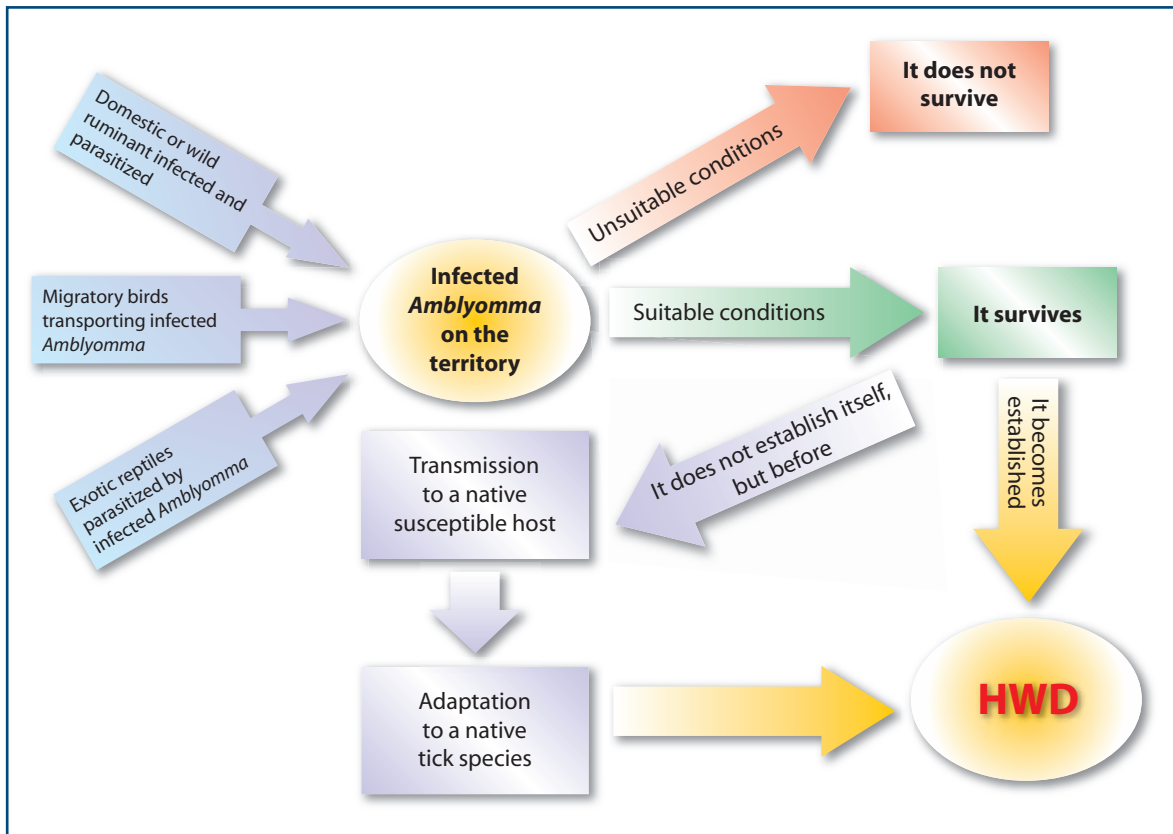


Figure 26. Event tree.

The use of innovative technologies, such as GIS, enable a new approach to the risk assessment of exotic diseases. Restrictions due to international legislation on the movements of domestic and wild animals allow easy control of animal trade; however movements of vector populations and bird migrations, dependent not on human activities but climate change (wind, strong

temperature variations), cannot be easily controlled.

Mediterranean countries are aware of a need to improve their knowledge of the risk of introduction of diseases previously considered as exclusive to Africa. This need is particularly strong because of their geographical position, which make them preferential routes for the introduction of exotic diseases into Europe.

Aknowledgments

The authors would like to thank Dr. Rossella Lelli for her precious contribution in the drafting of this volume, Dr. Massimo Scacchia for his constant scientific and personal support, Dr. Annamaria Conte for performing

the GIS-analysis, Dr. Claudia Weiss for the contribution to the translation, and Dr. Giuseppe Di Giulio for providing the *Amblyomma* tick in figure 3.

References

1. Aklaku I.K. 1980. Principal causes of mortality in small ruminants in Ghana. *Bull Off Int Épiz*, **91**, 1227-1231.
2. Albanese B., Smiraglia C. & Lavagnino A. 1971. Notizie sulle zecche di Sicilia con segnalazione di *Hyalomma detritum* e *Amblyomma variegatum*. *Riv Parassitol*, **32**, 273-276.
3. Alexander R.A. 1931. Heartwater. The present state of the disease. In 17th Report of Veterinary Services and Animal Industry, Union of South Africa, 89-150.
4. Allan S.A. 1998. Establishment of the tortoise tick *Amblyomma marmoreum* (Acari. Ixodidae) on a reptile-breeding facility in Florida. *J Med Entomol*, **35**, 621-624.
5. Andrew H.R. & Norval R.A.I. 1989. The carrier status of sheep, cattle and African buffalo recovered from heartwater. *Vet Parasitol*, **34** (3), 261-266.
6. Aphis Usda (United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service) 2002. Heartwater (http://www.aphis.usda.gov/lpa/pubs/fsheet_faq_notice/fs_ahheartw.html accessed on 7 July 2007).
7. Barré N., Camus E., Birnie E., Burrige M.J., Uilenberg G. & Provost A. 1984. Setting up a method for surveying the distribution of cowdriosis (heartwater) in the Caribbean. In Proc. XIIIth World Congress on diseases of cattle, 17-21 September, Durban, Vol. 1. World Association for Buiatrics, 536-541.
8. Barré N., Uilenberg G., Morel P.C. & Camus E. 1987. Danger of introducing Heartwater onto the American mainland: potential role of indigenous and exotic *Amblyomma* ticks. *Onderstepoort J Vet Res*, **54** (3), 405-417.
9. Bartolini A. 2004. Aironi e specie affini: identificazione, status e conservazione dei ciconiformi del padule di Fucecchio. Quaderni del padule di Fucecchio n. 3 Centro di Ricerca Documentazione e Promozione del Padule di Fucecchio, Larciano.
10. BBC weather (<<http://www.bbc.co.uk/weather/world/africa/>> accessed on 6 July 2007).
11. Bezuidenhout J.D. 1981. The development of a new heartwater vaccine, using *Amblyomma hebrareum* nymphae infected with *Cowdria ruminantium*. In Proc. International Conference on Tick biology and control, Grahamstown, 41-45.
12. Bezuidenhout J.D. 1982. Diseases of the central nervous system of cattle under tropical conditions. Proceedings of the Twelfth World Congress on Diseases of Cattle, 7-10 September 1982, Amsterdam, The Netherlands, 991-998.
13. Bezuidenhout J.D. 1988. Certain aspects of the transmission of heartwater, the occurrence of the organism in ticks and *in vitro* culture. DVS Thesis, University of Pretoria, 265 pp.
14. Bezuidenhout J.D. & Bigalke R.D. 1987. The control of heartwater by means of tick control. *Onderstepoort J Vet Res*, **54** (2), 525-528.
15. Bezuidenhout J.D. & Jacobsz G.J. 1986. Proof of transovarial transmission of *Cowdria ruminantium* by *Amblyomma variegatum*. *Onderstepoort J Vet Res*, **53**, 31-34.
16. Bezuidenhout J.D., Paterson C.L. & Barnard B.J.H. 1985. *In vitro* cultivation of *Cowdria ruminantium*. *Onderstepoort J Vet Res*, **52**, 113-120.
17. Bezuidenhout J.D., Prozesky L., du Plessis J.L. & van Amstel S.R. 1994. Heartwater. In Infectious diseases of livestock (with special reference to southern Africa), Vol. I,

- Chapter 35 (J.A.W. Coetzer, G.R. Thomson & R.C. Tustin, eds). Oxford University Press, Cape Town, 351-370.
18. Brett S. 1988. Unpublished data. Veterinary Research Institute, Onderstepoort.
 19. Burdin M.L. 1962. Selective staining of *Rickettsia ruminantium* in tissue sections. *Vet Rec*, **74**, 1371-1372.
 20. BurrIDGE M.J. 2000. Evidence of *Cowdria ruminantium* infection (heartwater) in *Amblyomma sparsum* ticks found on tortoises imported into Florida. *J Parasitol*, **86**, 1135-1136.
 21. BurrIDGE M.J. 2000. Introduction of potential heartwater vectors and other exotic ticks into Florida on imported reptiles. *J Parasitol*, **86**, 700-704.
 22. Byrom B., Ynker C.E., Donovan P.L. & Smith G.E. 1991. *In vitro* isolation of *Cowdria ruminantium* from plasma of infected ruminants. *Vet Microbiol*, **26**, 263-268.
 23. Camus E. & Barré N. 1982. La cowdriose (heartwater). Revue générale des connaissances. Etudes et Synthèses de l'IEMVT, n.4. IEMVT, Maisons-Alfort, 147pp.
 24. Camus E., Barré N., Martinez D & Uilenberg G. 1996. Heartwater (cowdriosis). A review. 2nd Ed. Office International des Epizooties, Paris, 177 pp.
 25. Caribbean Animal Health Network (<http://www.caribvet.net/information.php?i_id_page=59> accessed on 6 July 2007)
 26. Cilli V. & Corazzi G. 1954. Su alcuni aspetti morfologici di *Cowdria ruminantium*. *Rivista di Parassitologia*, **15**, 337-352.
 27. Clark R. 1962. The pathological physiology of heartwater. *Onderstepoort J Vet Res*, **29**, 25-33.
 28. Collins N.E., Allsopp M.T. & Allsopp B.A. 2002. Molecular diagnosis of theileriosis and heartwater in bovines in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **96**, Suppl. 1, S 217-224.
 29. Cornell Laboratory of Ornithology. 2006. Cattle egret. In All about birds. Cornell Laboratory of Ornithology, Ithaca, New York (www.birds.cornell.edu/programs/AllAboutBirds/BirdGuide/Cattle_Egret_dtl.html accessed on 6 July 2007).
 30. Cowdry E.V. 1925. Studies on the aetiology of H. I. *Rickettsia ruminantium* (n.sp.) in the tissues of infected animals. *J Exp Med*, **42**, 231-252.
 31. Curasson G. 1943. Sporozoaires Tome III. In Traité de protozoologie vétérinaire et comparée. Vigot Frères, Paris, 359-378.
 32. Da Graca H.M. 1964. Quelques aspects de la heartwater en Angola. *Bull Off Int Epiz*, **62**, 963-969.
 33. de Villiers E.P., Brayton K.A., Zwegarth E. & Allsopp B.A. 2000. Genome size and genetic map of *Cowdria ruminantium*. *Microbiology*, **146**, 2627-2634.
 34. Deem S.L., Norval, R.A.I., Donachie, P.L. & Mahan S.M. 1996. Demonstration of vertical transmission of *Cowdria ruminantium*, the causative agent of heartwater, from cows to their calves. *Vet Parasitol*, **61**, 133-144.
 35. Du Plessis J.L. 1970. Pathogenesis of heartwater. I: *Cowdria ruminantium* in the lymph nodes of domestic ruminants. *Onderstepoort J Vet Res*, **37**, 89-96.
 36. Du Plessis J.L. 1975. Electron microscopy of *Cowdria ruminantium*-infected reticulo-endothelial cells of the mammalian host. *Onderstepoort J Vet Res*, **48**, 175-176.
 37. Du Plessis J.L. 1975. Histopathological studies on the pathogenesis of heartwater as manifested in mice infected with a strain of *Cowdria ruminantium*. MVM Thesis, University of Pretoria, South Africa, 50 pp.
 38. Du Plessis J.L. 1982. Mice infected with a *Cowdria ruminantium*-like agent as a model in the study of Heartwater. DVS Thesis, University of Pretoria, 157 pp.

39. Du Plessis J.L. 1985. A method for determining the *Cowdria ruminantium* infection rate of *Amblyomma hebraeum*: effects in mice injected with tick homogenates. *Onderstepoort J Vet Res*, **52**, 55-61.
40. Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P.J., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y. & Rurangirwa F.R. 2001. Reorganisation of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **51**, 2145-2165.
41. Folkers C., Lumsden W.H.R. & McNeillage G.J.C. 1967. The prevalence of *Babesia bovis* (*Babesia argentina*) in the brains of slaughter cattle in Northern Nigeria. *Bull Epiz Dis Afr*, **15**, 359-361.
42. Gruss B. 1981. A practical approach to the control of heartwater in the Angora goats and certain sheep breeds in the Eastern Cape Coastal region. In *Tick biology and control* (G.B. Whitehead, J.D. Gibson, eds). Proc. International Conference, Tick Research Unit, Rhodes University, Grahamstown, 135-136.
43. Guberti V. 2005. 'West Nile disease: un'antropozoonosi emergente'. Teramo 15-18 gennaio 2005.
44. Gueye A, Mbengue M., Diouf A. & Vassiliades G. 1989. Prophylaxie de la cowdriose et observations sur la pathologie ovine dans la région des Niayes au Sénégal. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop*, **42**, 497-503.
45. Hoogstraal H., Kim K.C. 1985. Tick and mammal coevolution, with emphasis on *Haemaphysalis*. In *Coevolution of parasitic arthropods and mammals*. (KC Kim, eds) John Wiley & Sons, New York, 505-568.
46. Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux (IEMVT) 1971. Rapport annuel. IEMVT, Maisons-Alfort, 50-51.
47. Illemobade A.A. 1976. Study on heartwater and the causative agent *Cowdria ruminantium* (Cowdry 1925) in Nigeria. PhD thesis, Ahmadu Bello, University Zaria, Nigeria, 276 pp.
48. Jackson C. & Neitz N.O. 1932. On the aetiology of heartwater. In 18th Report of the Director of Veterinary Services and Animal Industry; Pretoria, South Africa, 49-66.
49. Jackson C. 1931. The microscopic diagnosis of heartwater: a preliminary note on the value of intima smears. In 17th Report of the Director of Veterinary Services and Animal Industry, South Africa, 161-173.
50. Jones F.F. 1937. Annual report of the Veterinary Department of Northern Rhodesia. Ministry of Agriculture, Lusaka, 71-76.
51. Karrar G. 1960. Rickettsial infection (heartwater) in sheep and goats in the Sudan. *Br Vet J*, **116**, 105-114.
52. Kocan K.M & Bezuidenhout J.D. 1987. Morphology and development of *Cowdria ruminantium* in *Amblyomma* ticks. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 177-182.
53. Kocan K.M, Bezuidenhout J.D. & Hart A. 1987. Ultrastructural features of *Cowdria ruminantium* in midgut epithelial cells and salivary glands of *Amblyomma variegatum*. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 87-93.
54. Kocan K.M., Morzaria S.P., Voight W.P., Kiarie J. & Irvin A.D. 1987. Demonstration of colonies of *Cowdria ruminantium* in midgut epithelial cells of *Amblyomma variegatum*. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 87-93.
55. Logan L.L., Whyard T.L., Quintero J.C. & Mebus C.A. 1987. The development of *Cowdria ruminantium* in neutrophils. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 197-204.

56. Mahan S.M., Andrew H.R., Tebele N. & Burrridge M.J. 1995. Immunisation of sheep against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. *Res Vet Sci*, **58**, 46-49.
57. Manilla G. 1998. Fauna d'Italia. Ixodida. Edizioni Calderini, Bologna.
58. Martinez D. 2003. Cowdriose *In* Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail: Europe et regions chaudes. Editions Tec&Doc, Éditions médicales internationales, London, Paris, New York, **91**, 1111-1129.
59. Martinez D., Maillard J.C., Coisne S., Sheikboudou C., Debus A. & Bensaid A. 1996. Comparative efficacy of Freund's and Montanide ISA 50 adjuvants for the immunisation of goats against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. *Vet Parasitol*, **67**, 175-184.
60. Meschini E. & Frugis D. 1993. Atlante degli uccelli nidificanti in Italia. Supplemento alle Ricerche di Biologia della Selvaggina, **XX**, 344 pp.
61. Neitz W.O. 1968. Heartwater. *Bull Off Int Epiz*, **70**, 329-336.
62. Neitz A.H.W., Viljoen G.J., Bezuidenhout J.D., Oberem P.T., Van Wyngaart W. & Vermulen N.M.J. 1986. The detection of antibodies to *Cowdria ruminantium* in serum *Cowdria ruminantium* antigen in *Amblyomma hebraeum* by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Onderstepoort J Vet Res*, **53**, 39-41.
63. Norval R.A.I. 1994. Vectors: Ticks, Chapter 1. *In* Infectious diseases of livestock (with special references to the Southern Africa), Vol. I (J.A.W. Coetzer, G.R. Thomson & R.C. Tustin, eds). Oxford University Press, Cape Town, 6-9.
64. Office International des Epizooties (OIE) 2004. Chapter 2.2.7: Heartwater. *In* Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 5th ed. OIE, Paris (http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00046.htm accessed on 5 July 2007).
65. Owen N.C., Littlejohn A., Kruger J.M. & Erasmus B.J. 1973. Physiopathological features of Heartwater in sheep. *J S Afr Vet Assoc*, **44**, 397-403.
66. Papadopoulus B., Morel P.C. and Aeschliman A. 1996. Ticks of domestic animals in the Macedonia region of Greece. *Vet Parasitol*, **63** (1-2), 25-40.
67. Pascucci I., Conte A. & Scacchia M. 2007. The use of GIS to identify area at risk for *Amblyomma variegatum* and *Amblyomma hebraeum* in Italy. *Vet Ital*, **43** (3), 655-661.
68. Pegram R.G., Rota A., Onkelinx R., Wilson D.D., Bartlette P., Nisbett B.S., Swanston G., Vanterpool P. & de Castro J.J. 2005. Eradicating the tropical bont tick from the Caribbean. Food and Agriculture Organization, Rome (www.fao.org/ag/aga/agap/frg/feedback/war/W2650T/w2650t06.htm accessed on 7 July 2007).
69. Peter T.F., Burrridge M.J. & Mahan S.M. 2002. *Ehrlichia ruminantium* infection (heartwater) in wild animals. *Trends in Parasitology*, **18**:5, 214-218.
70. Petney T.N., Horak I.G. & Rechav Y. 1987. The ecology of the African vectors of heartwater, with particular reference to *Amblyomma hebraeum* and *Amblyomma variegatum*. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 381-395.
71. Pienaar J.G. 1970. Electron microscopy of *Cowdria* (Rickettsia) *ruminantium* (Cowdry, 1926) in the endothelial cells of the vertebrate host. *Onderstepoort J Vet Res*, **37**, 67-68
72. Pienaar J.G., Basson P.A., & Van Der Merwe J.L. de B. 1966. Studies on the pathology of heartwater (*Cowdria ruminantium*, Cowdry 1926). I: Neuropathological changes. *Onderstepoort J Vet Res*, **33**, 115-138.
73. Prozesky L. & Du Plessis J.L. 1985. Heartwater in Angora goats II. A pathological study of artificially infected, treated and untreated goats. *Onderstepoort J Vet Res*, **52**, 13-19.

74. Prozesky L. & Du Plessis J.L. 1985. The pathology of heartwater. I. A study of mice infected with the Welgevonden strain of *Cowdria ruminantium*. *Onderstepoort J Vet Res*, **52**, 71-79.
75. Prozesky L. & Du Plessis J.L. 1987. Heartwater. The development and life cycle of *Cowdria ruminantium* in the vertebrate host, ticks and cultured endothelial cells. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 197-204.
76. Purchase H.S. 1945. A simple and rapid method for demonstrating *Rickettsia ruminantium* (Cowdry, 1926) in heartwater brains. *Vet Rec*, **57**, 413-414.
77. Purnell R.E. 1987. Development of a prophylactic regime using Terramycin/LA to assist in the introduction of susceptible cattle into heartwater endemic areas of Africa. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 509-512.
78. Rioche M. 1967. Lésions microscopiques de la rickettsiose générale bovine à *Rickettsia* (Ehrlichia) *bovis* (Donatien et Lestoquard, 1936). *Rev Elev Méd Vét Pays Trop*, **20**, 415-427.
79. Schreuder B.E.C. 1980. A simple technique for the collection of brain samples for the diagnosis of heartwater. *Trop Anim Health Prod*, **12**, 25-29.
80. Steck W. 1928. Pathological studies on heartwater. In 13th and 14th Reports of the Director of Veterinary Research, Union of South Africa, 238-305.
81. Sutherst R.W. and Maywald G.F. 1985. A computerized system for matching climates in ecology Agriculture, Ecosystems Environ, **13**, (3-4), 281-299.
82. Synge B.A. 1978. Brain biopsy for the diagnosis of heartwater. *Trop Anim Health Prod*, **10**, 45-48.
83. Theiler A. 1905. Maladies des troupeaux en Afrique du Sud. *Bull Inst Pasteur*, **3**, 617-624.
84. Theiler A. 1905. The advance of our knowledge respecting the stock diseases of South Africa. *Transvaal Agric J*, **4** (13), 69-80.
85. Thomas A.D. & Mansvelt P.R. 1957. The immunization of goats against heartwater. *JS African Vet Med Ass*, **8** (2), 163-168.
86. Totte P., McKeever D., Martinez D. & Bensaid D. 1997. Analysis of T-cell responses in cattle immunised against heartwater by vaccination with killed elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. *Infect Immun*, **65**, 236-241.
87. Uilenberg G. 1965. Sur la pathogénie des formes cérébrales des babésioses bovines à Madagascar. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop*, **18**, 83-88.
88. Uilenberg G. 1971. Etudes sur la cowdriose à Madagascar. Première partie. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop*, **24**, 355-364.
89. Uilenberg G. 1981. Heartwater. In Diseases in cattle in the tropics (M. Ristic & I. McIntire, eds.). Martinus Nijhoff Publishers, Amsterdam, 345-360.
90. Uilenberg G. 1982. Experimental transmission of *Cowdria ruminantium* by the Gulf Coast tick *Amblyomma maculatum*: danger of introducing heartwater and benign African theileriasis onto the American mainland. *Am J Vet Res*, **43**, 1279-1282.
91. Uilenberg G. 1999. Importance of ticks and tick-borne diseases of domestic ruminants in southern Europe. *Parassitologia*, **41**, (Suppl. 1), 107-109.
92. Uilenberg G., Barré N., Camus E., Burridge M.J. & Garris G.I. 1984. Heartwater in the Caribbean. *Prev Vet Med*, **2**, 255-267.
93. Van Amstel S.R. & Oberem P.T. 1987. The treatment of heartwater. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 475-479.
94. Van Amstel S.R., Oberem P.T., Di Domenico M., Kirkpatrick R.D. & Mathee J. 1988. The presence of endotoxin activity in cases of experimentally-induced heartwater in sheep. *Onderstepoort J Vet Res*, **55**, 217-220.

95. Van De Pypekamp H.E. & Prozesky L. 1987. Heartwater. An overview of the clinical signs, susceptibility and differential diagnosis of the disease in domestic ruminants. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 263-266.
96. Van Der Merwe D., Swan G.E. & Botha C.J. 2001. Use of ethnoveterinary medicinal plants in cattle by Setswana-speaking people in the Madikwe area of the North West Province of South Africa. *J S Afr Vet Assoc*, **72** (4), 189-196.
97. Van Kleef M., Gunter N.J., MacMillan H., Allsopp B.A., Shkap V. & Brown W.C. 2000. Identification of *Cowdria ruminantium* antigens that stimulate proliferation of lymphocytes from cattle immunized by infection and treatment or with inactivated organism. *Infect Immun*, **68**, 603-614.
98. Viljoen G.J., Neitz A.W.H., Bezuidenhout J.D., Oberem P.T. & Vermulen N.M. 1988. The presence of *Cowdria ruminantium* antigen in various tissues of *Amblyomma hebraeum* imagoes as detected by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Onderstepoort J Vet Res*, **55**, 239-240.
99. Walker Jane B. with illustration of by Olwage A. 1987. The tick vectors of *Cowdria ruminantium* (*Ixodoidea*, *Ixodidae* genus *Amblyomma*) and their distribution. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 353-379.
100. Wilson D.D. & Richard R.D. 1984. Interception of a vector of heartwater, *Amblyomma hebraeum* Kock (Acari: *Ixodidae*) on black rhinoceroses imported into United States. In Proc. Eighty-eighth Annual Meeting of the United States Animal Health Association (USAHA), 21-26 October, Fort Worth, Texas. USAHA, Richmond, Virginia, 303-311.
101. Yonow T., Brewster C.C., Allen J.C. & Meltzer M.I. 1998. Models for heartwater epidemiology: practical implications and suggestions for future research. *Onderstepoort J Vet Res*, **65**, 263-273.
102. Yunker C.E., Byrom B. & Semu S. 1988. Cultivation of *Cowdria ruminantium* in bovine vascular endothelial cells. *Kenya Vet*, **12**, 2-16.