

## Francisella

Tratto da

Fabbi M., Magnino S., Marone P. Capitolo 8. Francisella. In: Rondanelli E.G., Fabbi M., Marone P. Trattato sulle Infezioni e Tossinfezioni Alimentari. Selecta Medica, Pavia, 2005. Pagg. 417-433.



Massimo Fabbi  
Simone Magnino

*Sezione Diagnostica di Pavia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna .  
Centro di Referenza Nazionale per la Tularemia*

Piero Marone

*Laboratorio di Batteriologia e Micologia, Area Infettivologica, IRCCS Policlinico S.Matteo, Pavia*

*Francisella tularensis* è stata descritta per la prima volta nel 1912 da McCoy quale agente responsabile di una affezione simil-pestosa nello scoiattolo californiano (*Citellus beecheyi*) in seguito denominata Tularemia. In un primo momento il microrganismo venne denominato "*Bacterium tularense*" in memoria della contea di Tulare in California in cui il focolaio era stato osservato per la prima volta; dalla prima denominazione di *Bacterium* il germe ha subito frequenti reinquadramenti passando successivamente nel genere *Pasteurella* e poi nel genere *Brucella* e solo nel 1947 il microrganismo viene proposto come nuovo genere e denominato *Francisella*.

La Tularemia è nota in diverse parti del mondo con diversi sinonimi: "rabbit fever", "deerfly fever", "lemming fever" negli Stati Uniti, "yato-byo" (termine giapponese che significa "avvelenamento da

carne di lepre") e "malattia di Ohara" in Giappone, "water-rat trappers' disease" in Russia. La denominazione di *Francisella* è stata coniata in onore di Edward Francis che dedicò molti anni allo studio di questo microrganismo e per primo lo associò alla cosiddetta "deerfly fever" nell'uomo. Allo statunitense Francis si deve la messa a punto dei metodi di coltivazione del microrganismo e all'allestimento dei primi test sierologici, l'identificazione di zecche ed altri vettori di trasmissione, la descrizione di diverse forme cliniche associate all'infezione e la segnalazione del rischio d'infezione da parte degli operatori di laboratorio dalle diverse fonti infettanti. Altri importanti ricercatori in diversi Paesi come S. Ohara in Giappone e N.G. Olsufiev in Unione Sovietica hanno contribuito in modo significativo al progredire delle conoscenze scientifiche.

L'uomo contrae la Tularemia con estrema facilità e può acquisire l'infezione attraverso diverse vie quali la via inalatoria, il contatto diretto o indiretto con diverse specie animali, l'ingestione di acqua o alimenti contaminati e la puntura di insetti o artropodi vettori. All'infezione possono conseguire differenti quadri clinici a seconda del punto di ingresso del microrganismo con evoluzione talora fatale.

I primi casi di malattia dell'uomo sono stati diagnosticati nel corso degli anni '20 negli Stati Uniti e degli anni '30 in Europa, tuttavia una forma di "malattia associata alla lepre" compatibile con l'infezione tularemica era nota in Giappone già dal 1818 e abbastanza chiaramente descritta dal punto di vista clinico nel 1837.

### **Tassonomia**

La posizione tassonomica di *Francisella tularensis* appare complessa ed ha subito frequenti modificazioni. Diversi sono gli agenti inquadrati nel genere *Francisella* indistinguibili tra loro dal punto di vista morfologico (tabella 1 e 2). *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tipo A) è altamente virulento per diverse specie di mammiferi uomo compreso ed è presente soprattutto in Nord America; è stato tuttavia segnalato recentemente anche in Europa (1998).

*F. tularensis* subsp. *holarctica* (tipo B) è meno virulento rispetto al tipo A per l'uomo ed il coniglio ma altamente virulento per roditori e lagomorfi; è presente in Europa, Asia e Nord America.

*F. tularensis* subsp. *novicida* (tipo C) e *Francisella philomiragia* (già *Yersinia philomiragia*) rappresentano altre specie di minor rilevanza sanitaria. La prima è stata isolata da acque superficiali in occasione di una moria di topi muschiati e poche volte dall'uomo. *F. philomiragia* è stata anch'essa isolata nel corso di una moria di topi muschiati ed è stata associata a infezioni granulomatose croniche e disordini mieloproliferativi nell'uomo. Tra le altre specie di *Francisella* descritte figurano: *F. tularensis holarctica* subsp. *japonica* presente soprattutto in Giappone e *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* diffusa soprattutto in Asia centrale ed alcune aree dell'ex Unione Sovietica. Quest'ultima oltre a fermentare il glicerolo e possedere l'enzima citrullina ureidasi, è meno virulenta per il coniglio rispetto a *F. tularensis* subsp. *tularensis*.

*Francisella tularensis* è un piccolo coccobacillo Gram negativo (0,2 x 0,2 - 0,7 µm) pleomorfo, immobile, non sporigeno, provvisto di capsula e appartenente ai cosiddetti microrganismi "fastidious" in quanto possiede particolari esigenze di crescita nei terreni colturali di laboratorio

(necessita di cistina). Tale caratteristica riguarda in modo esclusivo *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tipo A) e *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tipo B), a differenza di *F. novicida* e *F. philomiragia* che non necessitano di cistina per la crescita.

Le diverse specie di *Francisella* possono essere identificate sulla base delle caratteristiche di crescita, reazioni biochimiche, caratteri di virulenza (tabella 2) e tecniche biomolecolari. L'impiego di terreni quali agar sangue-glucosio-cistina o il terreno di Thayer–Martin modificato incubati a 35°C in atmosfera arricchita con il 10% di CO<sub>2</sub> consentono in 2-4 giorni lo sviluppo di colonie bianco-grigiastre caratteristiche. L'identificazione presuntiva oltre che dalla colorazione di Gram (piccoli coccobacilli Gram negativi) può essere confortata dall'impiego di antisiero specifico anti-*F. tularensis* disponibile in commercio o prodotto direttamente nel coniglio. E' possibile differenziare il tipo A dal tipo B attraverso metodi di ibridizzazione del DNA o attraverso l'impiego di tecniche molecolari come la reazione a catena della polimerasi (PCR): è stata recentemente descritta una metodica PCR che consente di suddividere gli stipti di *F. tularensis* in 17 gruppi genetici (da A a Q) e che può essere utilmente impiegata anche per inquadrare i vari stipti in base all'origine geografica.

*Francisella* spp. è tra i più piccoli batteri conosciuti. In natura è piuttosto resistente e persiste per diverse settimane nel fango, acqua e carcasse animali in decomposizione. *F. tularensis* è in grado di sopravvivere e replicarsi all'interno di amebe a vita libera al pari di *Legionella* spp., una caratteristica utile alla sua sopravvivenza e replicazione in ecosistemi ambientali come acqua e fango.

*F. tularensis* è dotata di un'alta capacità infettante (da 1 a 10 batteri del tipo A sono sufficienti a determinare malattia in diverse specie di animali da laboratorio), pertanto i laboratori che trattano materiali sospetti dovrebbero essere dotati almeno di un livello di sicurezza 2, o anche 3 nel caso coltivino grandi quantità di questi microrganismi.

### **Fattori di virulenza.**

*F. tularensis* è considerato *in vivo* un patogeno intracellulare obbligato, sebbene *in vitro* possa supportare una crescita extracellulare. La capacità di penetrare e replicarsi nei macrofagi rappresenta la caratteristica patogenetica fondamentale di *Francisella*.

Fino ad ora sono stati identificati pochi fattori di virulenza di *F. tularensis*. Uno dei problemi maggiori nell'analisi del contributo di uno specifico gene per la virulenza è che non sono ancora stati prodotti dei mutanti isogenici. Ha avuto invece un relativo successo la mutagenesi mediante trasposoni che ha permesso di identificare i geni coinvolti nella sopravvivenza e nella replicazione nei macrofagi. Inoltre, alcuni fattori di virulenza classici, come le tossine di secrezione, non sembrano essere prodotti da *Francisella*.

L'espressione dei geni di virulenza nei batteri patogeni è noto essere attivata da un complesso apparato di segnali ambientali che vengono incontrati dal patogeno durante l'infezione. Alte temperature, basso pH, limitazione di ferro e bassa tensione di ossigeno sono tutti riconosciuti come esempi di tali stimoli ambientali e insieme costituiscono una condizione di stress globale per un patogeno nell'ospite. Tali stress, incluso lo shock termico, inducono la sintesi di proteine molto ben

caratterizzate che preparano il batterio ad affrontare l'ambiente ostile intracellulare e quindi potrebbero agire come fattori di virulenza propri. *F. tularensis* mostra un livello molto basso di risposta a condizioni ambientali avverse; è stata osservata la maggiore produzione di quattro proteine, ma solo due fino ad ora sembrano coinvolte nella patogenesi. Una proteina di 23 kDa che non mostra omologia di sequenza con nessuna proteina nota sembra essere coinvolta nella risposta agli stress ed in particolare in condizioni di stress ossidativo. MglAB è una proteina che risulta essenziale per la crescita nei macrofagi di *F. novicida* e che è presente anche in *F. tularensis*. MglAB mostra un'alta omologia con SspAB di *Escherichia coli* e potrebbe avere una funzione di regolatore trascrizionale. Ci sono inoltre indicazioni che MglAB possa essere in grado di regolare l'espressione di almeno una fosfatasi appartenente al gruppo di proteine che includono AcpA. AcpA è stata identificata in *F. tularensis* e sembra ricoprire un ruolo nella sopravvivenza del batterio nel tratto respiratorio. Un altro locus descritto come necessario per la sopravvivenza nei macrofagi è una proteina denominata minD del peso di 29 kDa e con due possibili ruoli: funzionare come una pompa per i radicali liberi o ioni radicali oppure avere un ruolo durante la replicazione batterica intracellulare.

## **Epidemiologia**

L'epidemiologia della Tularemia è particolarmente complessa e non sono ancora pienamente compresi i fattori che determinano la trasmissione dell'infezione e la comparsa della malattia in forma epidemica.

La malattia è ubiquitaria nell' Emisfero Settentrionale, da alcune regioni a nord del Circolo Polare Artico a quelle estese fino alla latitudine di 20°N, in particolare nei Paesi Scandinavi, nel Nord America, in Russia e in Giappone; recenti focolai sono stati segnalati inoltre in Turchia, Jugoslavia, Spagna, Slovacchia, Kosovo e Svizzera.

L'infezione è nota in almeno 145 specie di vertebrati e 111 di invertebrati, un numero di ospiti davvero notevole e non comune tra le zoonosi. Tra i vertebrati sono maggiormente rappresentati i mammiferi, e tra essi i lagomorfi (conigli e lepri), i roditori (soprattutto della sottofamiglia dei microtini, che comprende le arvicole), gli insettivori, i mustelidi, i carnivori, gli ungulati e i marsupiali; a questi vanno aggiunte anche diverse specie delle altre classi dei vertebrati: uccelli, rettili, anfibi e pesci. Tra gli invertebrati vengono comprese diverse specie di zecche, tafani, zanzare e pulci.

I serbatoi dell'infezione nei periodi interepidemici, quando cioè la malattia non viene osservata in forma epidemica, sono le zecche appartenenti alla famiglia degli Ixodidi (c.d. zecche dure): in esse la trasmissione del microrganismo avviene dallo stadio di larva a ninfa e da ninfa a adulto (trasmissione trans-stadiale).

Anche alcune specie di lagomorfi e roditori poco sensibili all'infezione - quali i conigli del genere *Sylvilagus*, i castori e i topi muschiati nel Nord America e i topi campagnoli in Europa - possono essere serbatoio del microrganismo; altre specie invece, come le lepri europee, non costituiscono propriamente un serbatoio poiché sviluppano comunemente una forma acuta setticemica

caratterizzata da elevata mortalità potendo tuttavia trasmettere la malattia all'uomo. Il coniglio selvatico europeo è invece relativamente resistente all'infezione.

### **Modalità di trasmissione**

La Tularemia nell'uomo è una malattia strettamente connessa agli *habitat* rurali e per questo viene spesso osservata in soggetti che frequentano ambienti extraurbani, in particolare nei cacciatori e negli escursionisti. Le modalità di infezione sono molteplici e comprendono principalmente il contatto diretto con alcuni mammiferi e la manipolazione delle loro carcasse, il morso di zecche e la puntura di tafani o zanzare, l'ingestione di carni infette non sufficientemente cotte e di acque contaminate, e l'inalazione di polveri derivanti da terreno, grano e fieno anch'essi contaminati. Raramente anche il morso di alcuni animali (coyote, scoiattolo, puzzola, maiale, cinghiale, gatto e cane) può risultare infettante per l'uomo, come anche pelli e zampe di animali.

In rapporto al tipo di microrganismo (*Francisella tularensis* tipo A o tipo B), di *reservoir* e di via di trasmissione, vengono riconosciuti diversi cicli di infezione predominanti nelle diverse aree geografiche. In America Settentrionale, l'infezione da *F. tularensis* tipo A (subsp. *tularensis*) è in genere trasmessa all'uomo da morsi e punture di alcuni artropodi - soprattutto zecche e tafani - e per contatto con i lagomorfi (in particolare i conigli appartenenti al genere *Sylvilagus* e in minor misura le lepri del genere *Lepus*), da cui le già ricordate denominazioni di "deerfly fever" e "rabbit fever" con le quali la malattia è anche nota. Negli Stati Uniti occidentali prevale la trasmissione tramite vettore, ragion per cui l'infezione è concentrata nelle stagioni estive, quando è maggiore l'attività delle zecche e di altri parassiti ematofagi, mentre negli stati orientali la malattia nell'uomo è più spesso correlata all'attività venatoria invernale che comporta il possibile contatto con prede infette. La trasmissione di *F.tularensis* può avvenire anche per inalazione di polveri infette, come segnalato da autori statunitensi nel caso di soggetti che hanno sviluppato la malattia dopo aver tagliato l'erba del prato (fieno contaminato). In Europa e in Asia, l'infezione da *F. tularensis* tipo B (subsp. *holarctica*) è invece associata primariamente alle acque lotiche (ruscelli, torrenti, fiumi) e ai roditori, soprattutto quelli appartenenti alla famiglia dei cricetini come il topo d'acqua, il topo muschiato, il lemming; spesso in questi ospiti si manifestano importanti epidemie in concomitanza a esplosioni demografiche della popolazione, con ulteriore propagazione del microrganismo a diverse specie di lagomorfi del genere *Lepus* e occasionalmente anche contagio umano. Similmente, nei Paesi dell'ex-Unione Sovietica alcune epidemie nell'uomo sono state correlate a epidemie nelle arvicole. In alcune aree del nord Europa, ad esempio la Svezia, la trasmissione della malattia avviene prevalentemente attraverso la puntura di zanzare e il morso di zecche infette.

L'uomo contrae l'infezione spesso per via percutanea, a seguito del contatto con animali predati infetti, per lo più lepri e conigli, talvolta scoiattoli e roditori cacciati anche per ricavarne la pelliccia. In Italia, la specie a cui viene più spesso attribuito il contagio umano è la lepre.

Anche l'ingestione di carni non sufficientemente cotte di lagomorfi e roditori è una riconosciuta modalità di infezione, per quanto l'evenienza del contagio per via alimentare vada più comunemente ricondotta alla fase precedente l'ingestione delle prede, ossia alla loro raccolta, manipolazione,

scuoimento ed eviscerazione. Nelle carni degli animali infetti il microrganismo può peraltro sopravvivere anche per anni a temperature di congelamento, un'evenienza accertata anche nel corso di indagini relative ad alcuni focolai di infezione umana.

La trasmissione del microrganismo attraverso l'acqua è un'altra importante modalità nota almeno dal 1936, descritta più volte in Europa per il tipo B di *F. tularensis* e in apparenza meno frequente nel continente americano. In alcuni casi la fonte di contaminazione dell'acqua non è stata identificata con certezza, in altri casi l'evidenza porta a ritenerne responsabili alcuni roditori - soprattutto le arvicole e i topi d'acqua (*Arvicola terrestris*, *Microtus* spp.) i lemming e il castoro in Scandinavia, il castoro e i topi muschiati in Nord America - infetti ed eliminatori del microrganismo con le urine. Questi animali porterebbero infatti a una contaminazione solitamente temporanea dei corsi d'acqua e all'infezione in forma epidemica di altre specie, in particolare il topo muschiato e il castoro, che possono contagiare a loro volta l'uomo. Anche la contaminazione diretta di derrate alimentari da parte di urine di roditori è stata all'origine di alcuni focolai di malattia nell'uomo nella Repubblica Ceca, come nel caso di alcuni lavoratori di impianti di lavorazione della barbabietola da zucchero e di un gruppo di pensionati che avevano consumato del succo di frutta prodotto con mele contaminate.

Un'altra modalità di contaminazione delle acque andrebbe inoltre riferita alla morte di alcuni animali infetti in uno stagno o in un lago e al rilascio del microrganismo nell'acqua a seguito della decomposizione delle carcasse. La contaminazione che ne deriva può riguardare sia le raccolte d'acqua ferma (stagni e laghi) sia i torrenti e i fiumi.

I meccanismi che portano a una contaminazione prolungata delle acque non sono tuttavia completamente compresi: l'infezione latente e lo stato di portatore dei roditori deriverebbe da una loro immunità non completa nei confronti di *Francisella*, mentre sarebbe da escludere il ruolo sia degli uccelli acquatici, sia degli animali pecilotermi (anfibi e pesci). Il perdurare della contaminazione delle acque, che secondo osservazioni controllate può durare almeno 16 anni, sarebbe anche dovuto alla presenza nel fango e/o nell'acqua di alcuni fattori non ancora noti che governano la persistenza del microrganismo e la sua possibile moltiplicazione in sospensioni di acqua e fango. A questo riguardo, è stata segnalata la possibilità che *F. tularensis* sopravviva all'interno di amebe a vita libera, un meccanismo che potrebbe rappresentare un preadattamento del microrganismo precedente all'invasione di cellule ospiti dell'uomo e di altri animali superiori. È stato inoltre osservato che in caso di condizioni ambientali avverse (basse temperature e mancanza di nutrienti), *F. tularensis* può transitare a una forma vitale non coltivabile in laboratorio in grado comunque di resistere nell'ambiente nei periodi interepidemici; da questa forma il microrganismo potrebbe ritornare allo stato vegetativo iniziale tramite il passaggio in specie animali recettive. La forma non coltivabile dovrebbe dunque essere considerata come la vera forma di esistenza del microrganismo in ecosistemi terricoli e acquicoli, dove riesce a sopravvivere anche a temperature basse, intorno ai 4-6°C.

La contaminazione dell'uomo a partire dalle acque può conseguire all'ingestione o anche al semplice contatto con esse. Relativamente alla prima modalità, nel corso degli anni sono stati descritti molti

focolai di malattia umana in ambito rurale correlati al consumo di acqua di torrenti, piccoli corsi d'acqua e stagni, in particolare nei Paesi dell'ex-Unione Sovietica, in Svezia e in Norvegia.

*F. tularensis* è inoltre stata isolata anche da acque di forniture domestiche ove la clorazione dei sistemi di approvvigionamento idrico non avvenga o sia insufficiente. E' il caso anche di alcuni focolai epidemici nell'uomo osservati in anni recenti in Italia (nel 1982 in Toscana, nei comuni di Sansepolcro e Chiusi della Verna, in provincia di Arezzo; nel 1987-88 in Liguria, in alcuni comuni in val di Vara, in provincia di La Spezia), all'origine dei quali sono state le acque contaminate – talvolta da carcasse di animali rinvenuti - originate da pozzi o in località boschive comunque non sottoposte a clorazione. In anni recenti (1999-2000) anche un importante focolaio di Tularemia nel Kosovo è stato determinato con tutta probabilità da una contaminazione della rete idrica e dall'ingestione di alimenti contaminati da roditori.

Il contatto con acque infette è anche all'origine di un episodio di contagio umano per via percutanea segnalato nel 1998 in Spagna, nella provincia di Cuenca. In questo caso, numerosi pescatori e cuochi che avevano pescato e manipolato gamberi di fiume (*Procambarus clarkii*) contrassero la malattia.

In caso di ingestione, la carica necessaria per l'infezione umana è di gran lunga superiore rispetto a quella necessaria per la trasmissione per via respiratoria (circa 100 milioni di organismi, rispetto a 10-50). La clorazione delle acque si rivela tuttavia una misura sufficiente per il controllo del focolaio.

### **Risposta immunitaria dell'ospite**

*F.tularensis* è un patogeno intracellulare facoltativo ed è stato anche definito “patogeno intracellulare obbligato dei macrofagi in vivo”. La sopravvivenza dei batteri o di alcune frazioni antigeniche nei macrofagi e nelle cellule mononucleate determina il persistere di una risposta immune umorale e cellulare prolungata. Tuttavia gli stipti virulenti capsulati sono difficilmente lisati anche in presenza di anticorpi opsonizzanti perché la capsula presenta un elevato contenuto di lipidi. La risposta cellulare compare precocemente e può essere evidenziata mediante intradermoreazione alla tularina, un test di allergia cutanea indotta dall'inoculazione di un autolisato inattivato al calore di *F.tularensis*. Dopo la moltiplicazione nei macrofagi il microrganismo induce l'apoptosi della cellula ospite, analogamente a quanto avviene nelle infezioni da *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* e *Legionella*. La gravità delle manifestazioni cliniche della malattia può essere correlata alla capacità di mobilitazione della risposta immunitaria cellulo-mediata. Al contrario le immunoglobuline specifiche, anche se secrete precocemente (dopo una settimana) in grande quantità e per molti anni, rivestono un ruolo marginale nel controllo dell'infezione.

### **Clinica**

*Nell'animale*

Il quadro clinico della Tularemia negli animali non comprende elementi caratteristici utili ai fini della diagnosi.

Nel gatto, che appare l'ospite più sensibile tra le specie animali da compagnia e quindi più facilmente rilevabili, i segni generali riferibili alla malattia comprendono marcata depressione, linfadenite regionale - localizzata alle ghiandole faringee, cervicali, o mesenteriche - o generalizzata, splenomegalia ed epatomegalia, ittero e panleucopenia. In aggiunta, vengono talvolta osservate ulcere superficiali a livello orale e linguale, lesioni da porre in relazione all'ingestione di roditori o conigli infetti.

Il cane, specie relativamente resistente alla malattia, manifesta generalmente anoressia, letargia, diarrea, brividi, mialgia e ipertermia; talvolta è riferita anche la comparsa di tonsillite, ascessi sottocutanei, linfadenite dei linfonodi superficiali, uveite e congiuntivite.

Tra le specie di interesse zootecnico, il quadro più grave si osserva nella pecora, che può manifestare depressione, ipertermia, rigidità dell'andatura, diarrea e mortalità anche elevata. Nel cavallo è stata segnalata ugualmente febbre, depressione, incoordinamento e dispnea, mentre nel suino e nel bovino non sono descritti quadri clinici.

Negli animali selvatici (p.es. lepore, cane della prateria, coyote, castoro e visoni di allevamento) viene riferita l'assenza di segni di malattia fino alla morte o eventualmente solo un quadro generico di anoressia, abbattimento, letargia, debolezza muscolare e apatia che comparirebbe dopo una breve incubazione e precede di poco (2-3 giorni) la morte. In queste condizioni l'animale può essere avvicinato e catturato agevolmente, eventualità che si raccomanda di evitare in quanto il contatto con animali dal comportamento insolito può rappresentare una facile occasione di contagio per l'uomo.

#### *Nell'uomo*

L'incubazione è generalmente breve (3-5 giorni) e l'esordio brusco con febbre elevata, brividi, cefalea, mialgie. La malattia può manifestarsi con quadri clinici differenti a seconda delle modalità di trasmissione del microrganismo.

#### Forma ulceroghiandolare

Costituisce la manifestazione clinica più frequente della malattia (45-80%). Si caratterizza per la comparsa di una lesione cutanea dolorosa e arrossata nella sede di inoculazione che evolve in papula e pustola. Nell'80% dei casi si localizza agli arti superiori (dita, mani, avambracci) in genere secondaria alla manipolazione di carcasse. Se presente agli arti inferiori, al collo o al viso è di solito dovuta al morso di zecca. La linfadenite satellite può a volte precedere la comparsa della lesione cutanea. Il o i linfonodi ingranditi sono dolenti, caratterizzati da una periadenite ed evolvono verso la colliquazione. Nel caso di manipolazione di carcasse infette la localizzazione tipica sarà



epitrocleare e ascellare, mentre la trasmissione per morso di zecca si accompagna a linfadeniti laterocervicali, inguinali ed occipitali. L'evoluzione della linfadenite è lenta (2-6 mesi).

#### Forma ghiandolare

Le manifestazioni ghiandolari isolate (fig. 3) si presentano nel 10-25% dei casi e sono frequenti nei casi causati da contaminazioni di origine idrica oppure da morso di zecca. La corretta definizione eziologia non è semplice.

#### Forma oculoghiandolare

Si presenta come una congiuntivite purulenta, dolorosa, unilaterale, caratterizzata da una mucosa congiuntivale iperemia, disseminata di granuli giallastri e a volte di ulcerazioni. E' presente inoltre una linfadenite pretragica e sottomandibolare (Sindrome di Parinaud). La sua frequenza varia dall'1 al 5%. L'inoculazione congiuntivale può essere legata a tocature con dita contaminate o ad inoculazione diretta di liquidi infetti.

#### Forme setticemiche

Si caratterizzano per la presenza di febbre elevata in assenza di ulcerazioni e linfadenite (5-15%). Sono frequenti nel personale di laboratorio che ha eseguito riscontri autoptici su animali infetti.

#### Forma faringotonsillare

La manifestazione anginosa accompagnata a linfadenite laterocervicale o sottomandibolare è dovuta all'assunzione di carne contaminata poco cotta o di acqua contaminata. La faringite è eritematosa, poltacea o ulcerativa. La sintomatologia (disfagia) può essere particolarmente rilevante.

#### Polmonite

La forma polmonare è di raro riscontro nel continente europeo, al contrario negli USA sono numerose le segnalazioni di polmoniti da *F.tularensis* in soggetti che hanno inalato polveri contaminate durante la tosatura di prati. Tuttavia l'infezione polmonare può essere secondaria a disseminazione ematogena e si riscontra nel 30-80% delle forme setticemiche. Il quadro clinico è caratterizzato da febbre elevata, tosse secca, dolore toracico, dispnea e raramente emoftoe. L'esame obiettivo spesso non evidenzia reperti patologici significativi. La radiografia del torace mostra la presenza di addensamenti parenchimali a focolaio mono o bilaterali accompagnati ad adenopatia ilare. La broncoscopia rivela la presenza di lesioni infiammatorie emorragiche.

#### Manifestazioni cutanee

Le lesioni cutanee possono comparire nella seconda settimana e sono legate a fenomeni di sensibilizzazione. Possono prendere l'aspetto di eruzioni papulose o vescicolose, eritema nodoso, eritema polimorfo e lesioni pseudoacneiche. Queste manifestazioni si accompagnano spesso alla polmonite e alla forma ulceroghiandolare.

### Forme cliniche rare

La meningite è una manifestazione rara nel corso dell'infezione da *F.tularensis* e può accompagnarsi ad un quadro di encefalite. Il liquor presenta un'elevata cellularità con predominanza di linfociti, è presente ipoglicorrachia ed iperproteinorrachia. La forma setticemica nei pazienti immunodepressi (leucemici, etilisti e diabetici) si caratterizza spesso per la presenza di rabdomiolisi, insufficienza renale e coagulazione intravascolare disseminata.

La prognosi della Tularemia in Europa è generalmente favorevole con una durata della malattia di 2-3 settimane in media, più raramente 2-3 mesi. Al contrario negli Stati Uniti la mortalità è più elevata, circa 3% contro l'1% dell'Europa.

### **Anatomia patologica**

#### *Nell'animale*

Le lesioni anatomico-patologiche riscontrabili in corso di infezione tularemica sono abbastanza simili tra loro nelle diverse specie. Nella lepore, specie particolarmente sensibile all'infezione, la lesione tipica è rappresentata dalla splenomegalia (fig.2) in assenza di lesioni necrotiche macroscopiche che sono tuttavia ben documentabili all'esame istologico. Tale lesione non è patognomonica in quanto presente, seppure con alcune differenze, anche in corso di altre patologie a carattere setticemico quali Toxoplasmosi, Pseudotubercolosi e Pasteurellosi. Mancano spesso lesioni ad altri distretti e raramente si possono osservare quadri di diffusa congestione dei parenchimi.

Nella pecora sono stati osservati quadri di linfadenite anche a carattere suppurativo, aree di consolidamento polmonare e splenomegalia.

Anche nel cane e nel gatto sono state osservate linfadeniti localizzate o diffuse talora accompagnate da quadri di epato-splenomegalia a carattere necrotico, ulcere linguali e tonsilliti; queste ultime, come anche più sopra accennato, originano in conseguenza dell'ingresso del microrganismo attraverso il cavo orale (ingestione di prede infette o acqua contaminata). Forme con linfadeniti estese a più distretti testimonierebbero invece l'inoculazione del microrganismo attraverso una trasmissione vettoriale (zecche).

#### *Nell'uomo*

Da 3 a 5 giorni dopo l'inoculazione cutanea *F.tularensis* si moltiplica localmente e dà luogo alla formazione di una papula che andrà incontro ad ulcerazione dopo un paio di giorni. I microrganismi giungono quindi ai linfonodi regionali e per via linfoematogena possono diffondersi ad altri organi. Le lesioni sono caratterizzate da necrosi suppurativa focale, simile alla reazione granulomatosa della tubercolosi. L'area centrale di necrosi è costituita primariamente da polimorfonucleati neutrofilici e macrofagi. In una fase più avanzata della malattia compare necrosi coagulativa granulosa simile alla necrosi caseosa (fig.4). I fibroblasti possono circondare la reazione infiammatoria

acuta, possono essere presenti cellule epitelioidi ed occasionalmente cellule giganti di Langhans. Questo quadro può essere presente in ogni sito di infezione, ad esempio nei linfonodi, nel polmone, nel fegato e nella milza. Le colorazioni di impregnazione argentea consentono di evidenziare la presenza di microrganismi nelle cellule epitelioidi e nei macrofagi. Le lesioni polmonari più frequenti sono caratterizzate da noduli subpleurici necrotici giallastri. L'esame istologico del tessuto linfonodale mostra la presenza di un infiltrato linfocitario con granulomi caratterizzati da necrosi caseosa e da reazione epitelioide con o senza cellule giganti. Il quadro appare simile a quanto si osserva nella tubercolosi, nella malattia da graffio di gatto e nella sarcoidosi.

## **Diagnosi**

### *Nell'animale*

Il rinvenimento in aree endemiche di animali morti o facilmente avvicinabili di specie selvatiche particolarmente sensibili all'infezione (lepri e micromammiferi) deve sempre far sospettare la possibilità di una infezione tularemica soprattutto in considerazione delle cautele da osservare durante la loro manipolazione. La conferma diagnostica è sempre di laboratorio attraverso la messa in evidenza dell'agente patogeno tramite esame colturale su terreno specifico o metodiche di biologia molecolare (PCR); queste ultime risultano particolarmente utili nel caso di ritrovamento di carcasse di animali in cattivo stato di conservazione. Negli animali domestici (cane, gatto) la sintomatologia è spesso poco specifica (anoressia, febbre, ascessi sottocutanei, linfadeniti, splenomegalia) e il sospetto deve essere supportato dal dato anamnestico (aree di provenienza, possibilità di contatti con specie sensibili, ingestione di prede, infestazione da zecche ecc.). Nell'animale in vita la diagnosi poggia in prima istanza sull'esame sierologico e valori anticorpali uguali o superiori a 1: 160 con il test di agglutinazione lenta possono essere ritenuti diagnostici; l'esame sierologico può essere seguito dall'evidenziazione diretta di *Francisella* spp. tramite esame colturale o PCR a partire da matrici quali sangue (emocoltura), tamponi e campioni bioptici.

### *Nell'uomo*

Il dato epidemiologico (manipolazione di carcasse di animali) e la provenienza da una zona ad elevata endemia devono suggerire il sospetto diagnostico. La diagnostica differenziale nel caso di forme ulceroghiandolari andrà posta con le adeniti da piogeni, la malattia da graffio di gatto, il sodoku e l'infezione da *Pasteurella*. Il quadro clinico della forma setticemica, con o senza polmonite, è simile a quello osservato nel caso di salmonellosi, brucellosi, malaria, polmoniti batteriche e polmoniti atipiche. Le indagini colturali eseguite sul materiale prelevato dalle lesioni cutanee o dal linfonodo consentono raramente l'isolamento del microrganismo poiché le sedi di infezione tendono ad autosterilizzarsi precocemente. La batteriemia, frequente nell'animale, è al contrario di raro riscontro nell'uomo. La *F.tularensis* può inoltre essere ricercata nell'escreato, nel

tampone faringeo e congiuntivale. E' stato messo a punto un metodo immunoenzimatico per la ricerca degli antigeni batterici nei liquidi biologici e nell'acqua. Infine va ricordata la possibilità di ricercare direttamente il microrganismo mediante metodiche molecolari (PCR) che non sono tuttavia alla portata dei comuni laboratori di microbiologia clinica. Nella pratica corrente la sierologia è il metodo più ampiamente utilizzato per la diagnostica della Tularemia. La macroagglutinazione in provetta consiste nel mettere a contatto il siero del paziente con una sospensione alcolica di batteri uccisi. Il test consente di rilevare la presenza di anticorpi di classe IgM diretti contro antigeni capsulari che compaiono generalmente una decina di giorni dopo l'esordio della malattia e possono persistere per anni. Sono possibili reazioni crociate e quindi false positività del test in soggetti con infezioni da *Brucella*, *Yersinia* e *Proteus* OX19. E' disponibile inoltre un test immunoenzimatico per la ricerca di anticorpi di classe IgG, IgA e IgM che è più sensibile dell'agglutinazione. La diagnosi sierologica definitiva si otterrà evidenziando un aumento di quattro volte o più del titolo in due determinazioni eseguite a distanza di 7-10 giorni.

### **Terapia**

Gli aminoglicosidi, streptomina e gentamicina, presentano un'attività battericida nei confronti di *F.tularensis* e sono, a tutt'oggi, gli antibiotici di prima scelta nel trattamento della Tularemia. La streptomina viene utilizzata al dosaggio di 7.5 mg/kg i.m. ogni 12 ore per due settimane. Anche la gentamicina (3-5 mg/kg/die) è stata impiegata nel trattamento della malattia, tuttavia gli insuccessi terapeutici sono stati più frequenti che non nel gruppo di pazienti trattati con streptomina. Nei primi giorni di terapia si può talvolta osservare una reazione simile alla Jarish-Herxheimer che si accompagna ad un riacutizzarsi della sintomatologia. La meningite dovrà essere trattata con l'associazione cloramfenicolo o doxiciclina più streptomina, poiché quest'ultima supera con difficoltà la barriera ematoencefalica. Alla terapia antibiotica dovrà essere associato il drenaggio chirurgico delle raccolte asessuali, ad esempio linfonodi colliquati. Le betalattamine e l'azitromicina sono scarsamente efficaci in vitro nei confronti del microrganismo, al contrario di telitromicina e ciprofloxacina e altri fluorchinoloni hanno mostrato attività battericida. Ciprofloxacina e levofloxacina sono state utilizzate con successo nel trattamento di pazienti con infezione. Le tetraciline e il cloramfenicolo sono batteriostatici nei confronti di *F.tularensis* e la loro utilizzazione si associa spesso a fallimento o recidiva.

### **Prevenzione**

In ambito veterinario massima attenzione deve essere posta alla introduzione di specie sensibili provenienti da aree endemiche per tularemia. In particolare le lepri provenienti da paesi dell'Est Europa importate a scopo di ripopolamento, seppur soggette a norme di controllo, possono

rappresentare un rischio per la possibilità di introduzione dell'agente eziologico in diverse aree del territorio nazionale come confermato dai diversi casi di tularemia accertati negli ultimi anni presso i nostri laboratori in lepri di importazione da paesi dell'Est Europa. Nelle aree geografiche in cui la Tularemia è endemica è opportuno evitare di manipolare a mani nude animali moribondi o morti, le cui carcasse devono essere incenerite. Inoltre andrà ridotto il rischio di morsi di zecche, potenziali vettori del patogeno utilizzando un abbigliamento adeguato e repellenti. La selvaggina deve essere consumata ben cotta. Infine la clorazione dell'acqua si è dimostrata efficace nel controllo delle epidemie *waterborne*. I vaccini contenenti microrganismi vivi attenuati conferiscono una buona immunità, al contrario quelli con microrganismi inattivati sono scarsamente efficaci. La vaccinazione è raccomandata per il personale di laboratori in cui si maneggino colture di *F.tularensis*. Il ricovero di pazienti con tularemia non richiede misure di isolamento perché l'infezione non può essere trasmessa da uomo a uomo.

### ***Francisella tularensis* come arma biologica**

Gli elementi a favore dell'utilizzo di *F. tularensis* come arma biologica sono legati alla bassa carica infettante, alla facilità di disseminazione (per via aerea e attraverso l'acqua) e al potere patogeno del microrganismo.

Per le sue caratteristiche *F. tularensis* è stata considerata fin dal 1932 come arma biologica e quindi come possibile minaccia in tal senso sia dagli Stati Uniti d'America che dalla ex Unione Sovietica. Negli Stati Uniti il Center Disease of Control (CDC) ha classificato *Francisella tularensis* nella classe A degli agenti biologici insieme a quelli del vaiolo, antrace, peste, botulismo e delle febbri emorragiche (Ebola, Marburg, Lassa, Junin, ecc.) in quanto agenti che possono facilmente essere disseminati (acqua, aria), possono causare elevata mortalità, generare panico e "sconvolgimento sociale".

E' stato anche ipotizzato che le epidemie di Tularemia occorse in migliaia di soldati tedeschi e sovietici durante la II guerra mondiale fossero legate alla disseminazione intenzionale del germe.

Mediante tecniche di ingegneria genetica sono stati condotti tentativi per esprimere in *F. tularensis* resistenza al cloramfenicolo e tetracicline. Ceppi virulenti di *F. tularensis* streptomycin - resistenti sono stati esaminati nel corso di studi finalizzati al bioterrorismo sia dagli Stati Uniti che dall'Unione Sovietica.

Un vaccino vivo attenuato derivato da un ceppo avirulento di *F. tularensis* è stato impiegato a scopo sperimentale negli Stati Uniti sugli operatori di laboratorio routinariamente esposti all'infezione. L'impiego del vaccino è attualmente in corso di revisione negli Stati Uniti da parte della Food and Drug Administration (FDA) e la sua futura disponibilità è attualmente incerta.

Tabella 1. Virulenza delle principali specie e biogruppi di *Francisella* spp.

Specie o biograppo	Sinonimo	Virulenza nell'uomo	Virulenza nel coniglio	Diffusione geografica
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>	Tipo A <i>nearctica</i>	+++	+++	Nord America
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	Tipo B <i>palaeartica</i>	++	+	Europa, Siberia, Nord America
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>mediaasiatica</i>	<i>F. tularensis</i> <i>mediaasiatica</i>	+	+	Asia centrale, URSS
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>novicida</i>	Tipo C <i>F. novicida</i>	+	+	Nord America
<i>Francisella philomiragia</i>	<i>Yersinia</i> <i>philomiragia</i>	+	?	Nord America

Tabella 2. Caratteristiche biochimiche di *Francisella* spp.

Reazioni	<i>F. tularensis</i> (tipo A)	<i>F. tularensis</i> (tipo B)	<i>F. novicida</i>	<i>F.</i> <i>philomiragia</i>	<i>F. tularensis</i> subsp. <i>mediaasiatic</i> <i>a</i>
Necessità di cistina	+	+	-	-	nd.
Crescita in brodo con 6% di NaCl	-	-	+*	+*	nd.
Mobilità	-	-	-	-	-
Ossidasi	-	-	-	+°	nd.
Riduzione dei nitrati	-	-	-	-	nd.
Produzione di acido da: glucosio	+*	+*	+*	+*	-
glicerolo	+	-	+	nd.	+
Idrolisi della gelatina	-	-	-	+*	nd.
Citrullina ureidasi	+	-	nd.	nd.	+
Sensibilità all'eritromicina	+	+^	nd.	nd.	-

modificata da Cross e Penn (2000) e Ellis et al. (2002)

\* Variabile o ritardata, ° con reattivo di Kovacs, ^ *F. tularensis* tipo B biovar 1. E' segnalato anche un biovar II di *F. tularensis* tipo B resistente all'eritromicina, nd. non disponibile

Figura 1: Ciclo di *Francisella tularensis* (da Armstrong D.: Infectious Diseases, 2000. Mosby, Hartcourt Publisher LTD, UK, modificata)

## Ciclo di *Francisella tularensis*

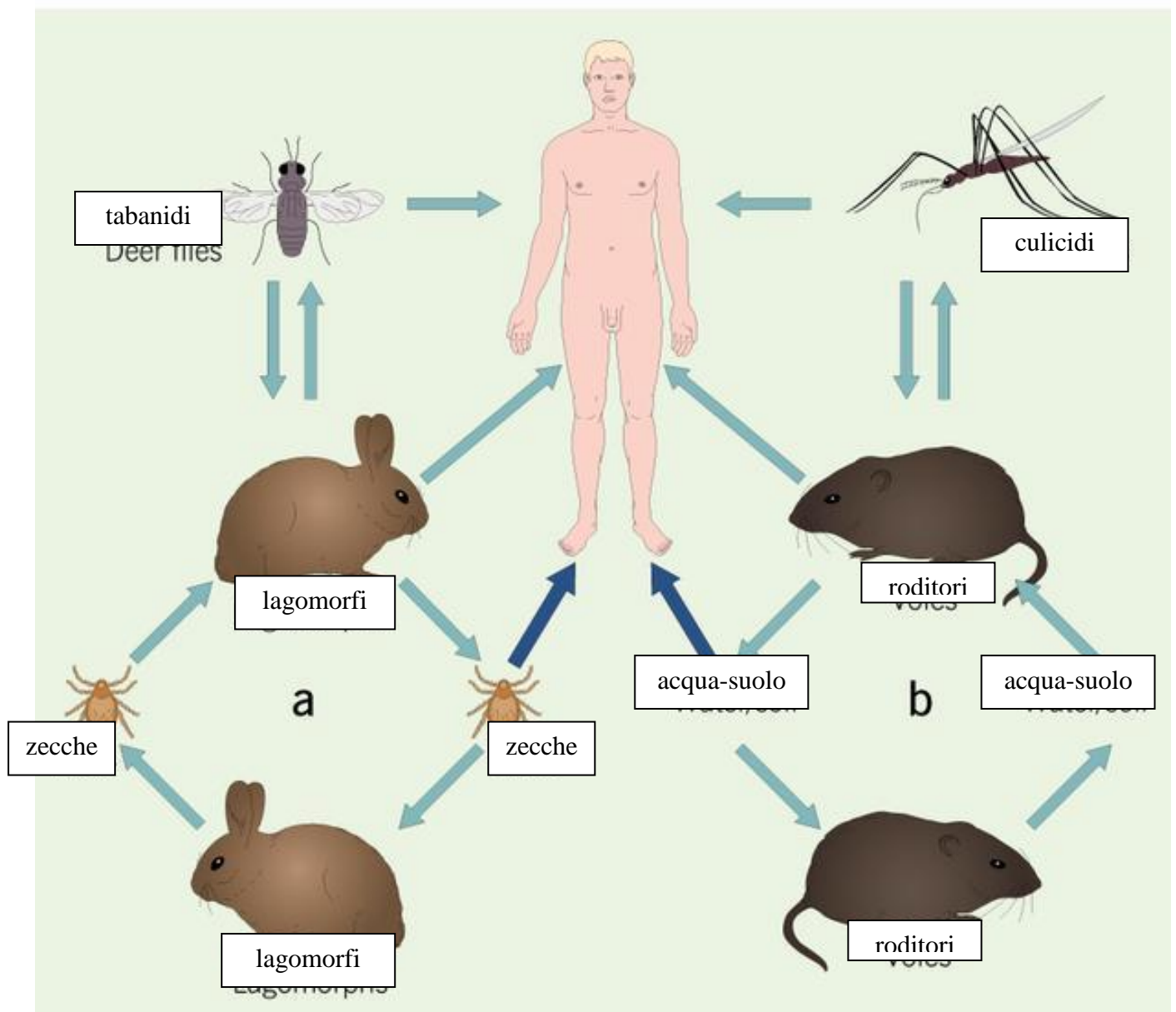


Figura 2: Tularemia della lepre: splenomegalia. La milza (freccia) è di dimensioni 4-5 volte la norma. (Sezione diagnostica di Pavia, I.Z.S.L.E.R. Centro di Referenza Nazionale per la Tularemia)

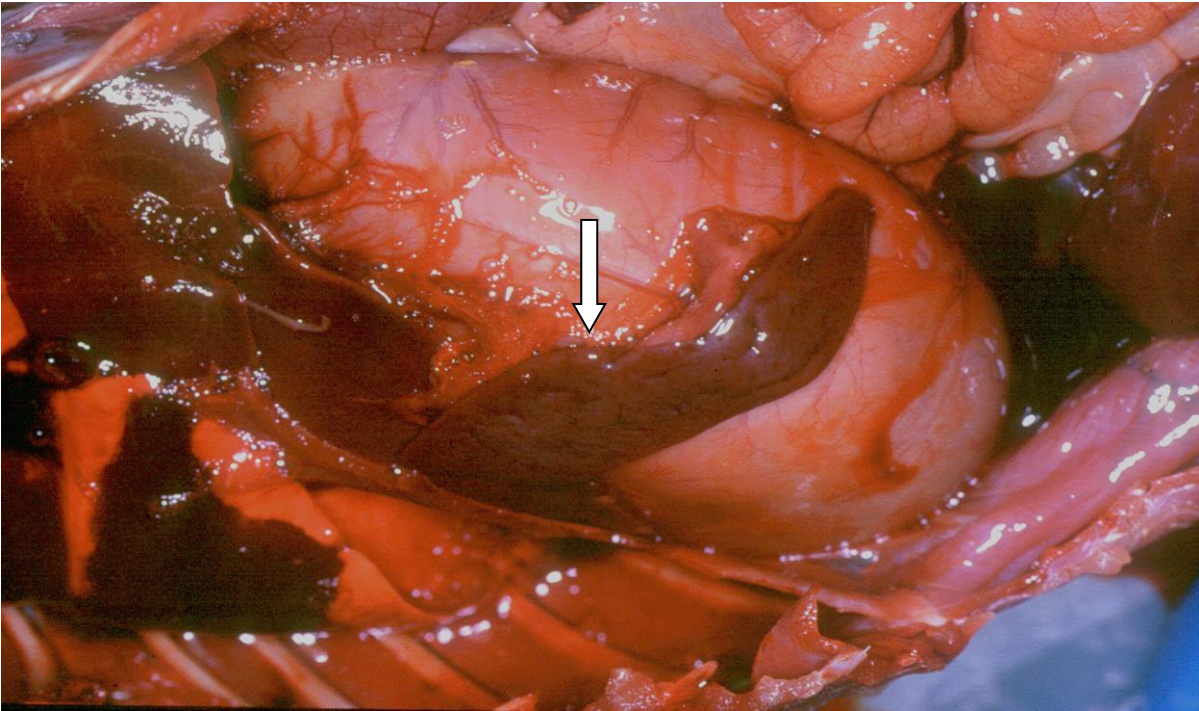
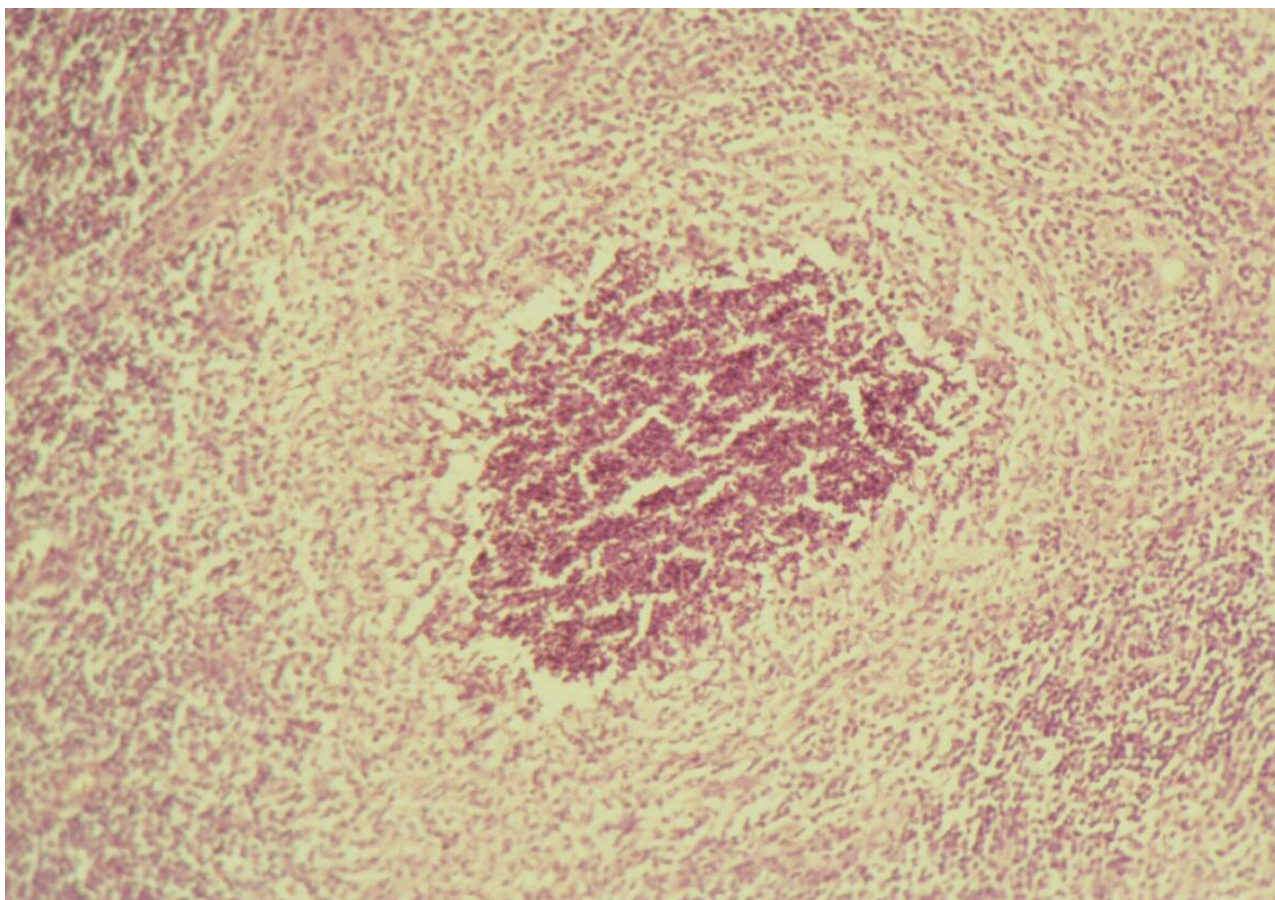


Figura 3: linfadenite ascellare in un caso di tularemia (Istituto di Clinica delle Malattie Infettive, IRCCS S.Matteo, Università di Pavia)





Figura 4: Granuloma da *F. tularensis*: lesione granulomatosa con presenza di linfociti, cellule epitelioidi, cellule giganti e tessuto necrotico [istologia da linfonodo asportato ad un paziente con tularemia]. (Istituto di Clinica delle Malattie Infettive, IRCCS S.Matteo, Università di Pavia).



## Bibliografia

- Anda, P., J. Segura del Pozo, J.M. Diaz Garcia, R. Escudero, F.J. Garcia Pena, M.C. Lopez Velasco, R.E. Sellek, M.R. Jimenez Chillaron, L.P. Sanchez Serrano, and J.F. Martinez Navarro.** 2001. Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 575-582.
- Anthony, L.S., S.C. Cowley, K.E. Mdluli, and F.E. Nano.** 1994. Isolation of a *Francisella tularensis* mutant that is sensitive to serum and oxidative killing and is avirulent in mice: correlation with the loss of MinD homologue expression. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**: 157-166.
- Bardelli, P., F. Ravaglia** 1931: Infezione nelle lepri di una riserva di caccia, riferibile a tularemia. *Ann. Ig.*, **41**: 776, 1931
- Baron, G.S., and F.E. Nano.** 1998. MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida*. *Mol. Microbiol.* **29**: 247-259.
- Berdal, B.P., R. Mehl, N.K. Meidell, A.-M. Lorentzen-Styr, and O. Scheel.** 1996. Field investigations of tularemia in Norway. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **13**: 191-195.
- Bianchi, L.** Su alcuni casi di tularemia riscontrati in Lombardia: osservazioni sieroinmunologiche ed istopatologiche. 1966. *G. Mal. Infett. Parassit.* **18**: 443-448.
- Cerny, Z.** Changes of the epidemiology and the clinical picture of tularemia in Southern Moravia (the Czech Republic) during the period 1936-1999. 2001. *Eur. J. Epidemiol.* **17**: 637-642.
- Cinelli E.** Infezione tularense. 1952. *Accad Med.* **67**: 191
- Costanzo R.** 1965. Un caso di tularemia accertato nell'uomo in provincia di Massa Carrara. *N. Progr. Vet.* **20**: 508.
- Cross, J.T., and R.L. Penn.** 2000. *Francisella tularensis*, **2**: 2393-2402. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandell, G.L., J.E. Bennet, R. Dolin. Fifth edition, Churchill Livingstone, Harcourt Health Science, U.S.A.
- Dennis, D.T.** 2000. Tularemia **2**: 6; 34; 19-23. In: Infectious Diseases. Armstrong D, Cohen J ed. Mosby, Hartcourt Publisher LTD, UK

- De La Puente Redondo, V.A., N. Garcia Del Blanco, C.B. Gutierrez-Martin, F.J. Garcia-Peña, E.F. Rodríguez Ferri.** 2000. Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *J.Clin. Microbiol.* **38**: 1016-1022.
- Dufrêne, M., and J. Vaissaire.** 1998. Epidémiologie de la tularémie dans le monde: essai de synthèse bibliographique. *Bull. Acad. Vét. de France* **71**: 67-78.
- Ellis, J., P.C.F. Oyston, M. Green, and R.W. Titball.** 2002. Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 631-646.
- Ercolini, C., S. Fisichella, G. Pasini, and E. Mignani.** 1991. Rilievi sieroepidemiologici sulla diffusione dell'infezione tularémica in provincia di La Spezia. *Nuovo Prog. Vet.* **46**: 358-361.
- Forsman, M., G. Sandström, and B. Jaurin.** 1990. Identification of *Francisella* species and discrimination of type A and type B of *F. tularensis* by 16s rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 949-955.
- Francis, E.** 1925. Tularemia. *J. Am. Med Assoc.* **84**: 1243-1250.
- Golovliov, I., M. Ericsson., G. Sandstrom, A. Tarvik, and A. Sjostedt.** 1997. Identification of proteins of *Francisella tularensis* induced during growth in microphages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23 kDa protein. *Infect. Immun.* **65**: 2183-2189.
- Greco, D. G. Allegrini, T. Tizzi, E. Ninu, A. Lamanna, and S. Luzi.** 1987. A waterborne tularemia outbreak. *Eur. J. Epidemiol.* **3**: 35-38.
- Gurycova, D.** 1998. First description of *Francisella tularensis* subsp.*tularensis* in Europe. *Eur. J. Epidemiol.* **3**: 35-38.
- Hopla, C.E.** 1974. The ecology of tularemia. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **18**: 25-53.
- Hopla, C.E., and A.K. Hopla.** 1994. Tularemia. In: CRC Handbook Series in Zoonoses. Section A: bacterial, rickettsial, chlamydial and mycotic. CRC Press Inc., Boca Raton, FL. pp 113-126.
- Jellison, W.L., D.C. Epler, E. Kuhns, and G.M. Kohls.** 1950. Tularemia in man from a domestic rural water supply. *Public Health Rep* **65**: 1219-1226.

**Leoncini, F., S. Biffi gentili, M. Di Pietro, M. Paoli, G. Micozzi, M. Palarchi, S. Bressan, E. Tasselli.** 1984. Tularemia in Toscana. *Atti Convegno Nazionale su: Malattie Infettive Riemergenti. Reggio Emilia, 19-20 ottobre 1984.*

**Magnino, S., M. Fabbi, M. Luini, G. Cervio, L. Guallini, and G. Redaelli.** 1990. Indagine epidemiologica sulla diffusione della Tularemia nel comprensorio dell'Oltrepò Pavese. *Arch. Vet. It.* **41:** 1-21.

**McCoy, G.W., and C.W. Chapin.** 1912. Further observation on a plague-like disease of rodents with a preliminary note of the causative agent *Bacterium tularense*. *J. Infect. Dis.* **10:** 61-62.

**Minoli L., G. Marchetti, E. Concia, A. Poggio.** 1981. Endemicità della tularemia nell'Oltrepò Pavese e nel Tortonese. *Atti XI Congresso Nazionale AMOI, Napoli, 26-27 giugno 1981.*

**Mörner, T.** 1992. The ecology of tularaemia. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **11:** 1123-1130.

**Office International des Epizooties (O.I.E).** 1996. Tularemia. In: Manual of Standards for diagnostic tests and Vaccines **3.7.2:** 584-588. Ed. O.I.E. Standard Commission

**Olsufiev, N.G.** 1970. Taxonomy and characteristics of the genus *Francisella* *Dorofeev.* *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **14:** 67-74.

**Paci, P., F. Leoncini, M. Paoli.** 1983. 85 casi di tularemia in Toscana. Considerazioni epidemiologiche. *Rec. Progr. Med.,* **74:** 430

**Reintjes, R., I. Dedushai, A. Gjini, T.R. Jorgensen, B. Cotter, A. Lieftucht, F. D'Ancona, D.T. Dennis, M.A. Kosoy, G. Mulliqi-Osmani, R. Grunow, A. Kalaveshi, L. Gashi, and I. Humolli.** 2002. Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. *Emerg. Infect. Dis.* **8:** 69-73.

**Rinaldi, A., G. Cervio, M. Frittoli, and G. Mandelli.** 1964. Descrizione di un focolaio di tularemia in Italia (nota preliminare). *Sel. Vet.* **5:** 353.

**Senaldi, G., G. Di Perri, P. Marone, L. Minoli.** 1987. Un'antropozoonosi ricorrente nell'Oltrepò Pavese: la tularemia. *Giorn. It. Mal. Inf. Parass.* **39:** 491-493.

**Tarnvik, A., G. Sandstrom, and A. Sjostedt.** 1997. Infrequent manifestations of tularemia in Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.* **29:** 443-446.

**Tasselli E., G. Micozzi, M. Palarchi, S. Bressan, F. Leoncini, S. Biffi Gentili, M. Di Pietro, and M. Paoli.** 1984. Evoluzione della tularemia in Toscana.  
*Nuovo Prog. Vet.* **22**: 1075.

**Tasselli E., G. Micozzi, M. Palarchi, F. Orlandi, F. Leoncini, S. Biffi Gentili, M. Di Pietro, C. Montaini.** 1988. La tularemia in Toscana dal 1982 al 1987. *Obiet. Doc. Vet.*, **9**: 23-28.