



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Istituto Sperimentale Zooprofilattico della Lombardia e dell’Emilia-
Romagna, Sede Territoriale di Pavia

Applicazione della tecnologia microfluidic PCR
nell’identificazione molecolare rapida di *Rickettsia* e *Borrelia* in
campioni di zecche prelevate da ospiti

Relatore:

Prof.re Davide Sasserà

Correlatore:

Dott. Paola Prati

Dott. Emanuela Olivieri

Tesi Sperimentale di
Alessandra Quendolo

Anno Accademico 2024/2025

INDICE:

1. INTRODUZIONE

1.1. Le zecche

1.1.1. Tassonomia

1.1.2. Caratteristiche morfologiche

1.1.3. Ciclo vitale

1.1.4. Ixodidae come vettore di patogeni

1.1.5. *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex

1.1.6. Spotted fever group *Rickettsiae*

1.2. Microfluidica

2. SCOPO DEL LAVORO

3. MATERIALI E METODI

3.1. Campionamento e identificazione morfologica degli stadi di Ixodidae

3.2. Estrazione del DNA

3.3. qPCR per la ricerca dei patogeni

3.4. PCR ed elettroforesi

3.5. Utilizzo della microfluidica per la ricerca dei patogeni

3.5.1. Messa a punto del metodo

3.6. Analisi statistica

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

5. CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

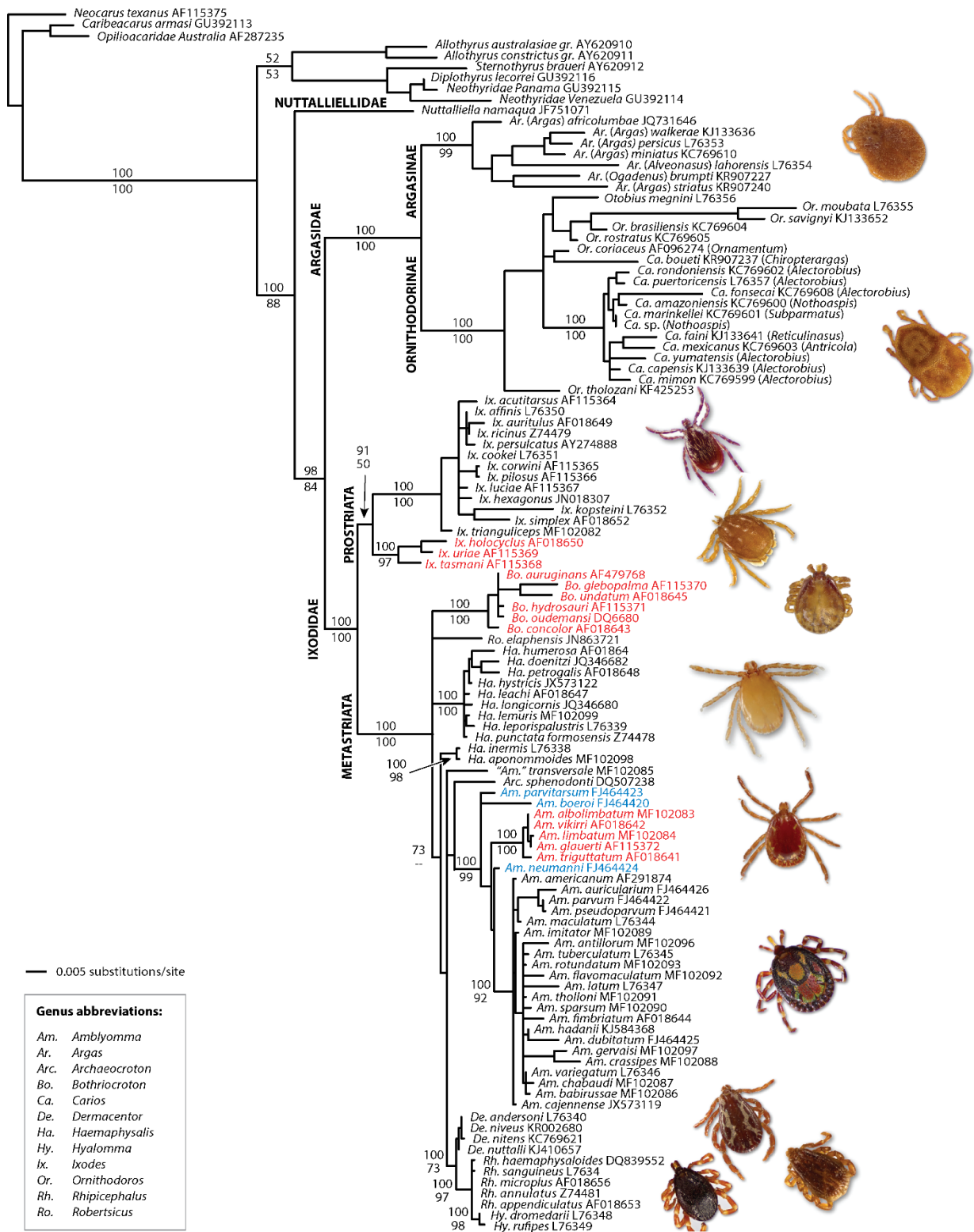
1. INTRODUZIONE:

1.1. Le zecche

1.1.1. Tassonomia

Le zecche sono artropodi ematofagi appartenenti al Phylum Arthropoda, sub-Phylum Chelicerata, classe Arachnida, sottoclasse Acari, ordine Ixodida. Definiti anche ectoparassiti obbligati, parassitano tutte le classi di vertebrati, ad eccezione dei pesci (Nava, 2009).

Esistono circa 900 diverse specie di zecche, appartenenti principalmente alla famiglia delle Ixodidae, definite zecche dure, e alla famiglia delle Argasidae, note come zecche molli. Esiste anche una terza famiglia chiamata Nuttallielidae, di importanza e distribuzione limitate con caratteristiche in comuni sia alle Ixodidae che alle Argasidae (Figura 1).



Beati L, Klompen H. 2019. *Annu. Rev. Entomol.* 64:379–97

Figura 1. Albero filogenetico delle zecche basato sull'analisi delle sequenze del gene 18S rRNA (Beati & Klompen, 2019)

1.1.2. Caratteristiche morfologiche

Le zecche della famiglia Ixodidae sono definite “zecche dure” perché presentano uno scudo dorsale fortemente chitinizzato che ricopre la parte anteriore del corpo delle femmine e degli stadi immaturi mentre nei maschi ricopre l'intero corpo (Figura 3). Il corpo delle zecche argasidi, invece, è privo di scutum e presenta caratteristiche differenti (Figura 3) (Anderson, & Magnarelli, 2008). Durante il processo di alimentazione, la cuticola, ad eccezione dello scutum, si espande per accogliere il pasto di sangue ingerito. All'interno delle Ixodidae sono descritti i generi *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor*, *Rhipicephalus* (Nava, 2009).

Le zecche della famiglia Ixodidae presentano il corpo suddiviso in due regioni: lo gnastoma che comprende le strutture boccali e l'idiosoma, a cui si articolano le zampe. Le larve di zecca presentano sei zampe, mentre le ninfe e gli adulti ne possiedono otto. Le zecche adulte misurano tra i 2 e i 20 mm di lunghezza prima del pasto di sangue. Le femmine dopo il pasto di sangue possono arrivare a misurare tra i 25 e i 30 mm e il loro peso può aumentare fino a 100 volte in seguito al pasto di sangue (Anderson & Magnarelli, 2008).

L'apparato buccale è formato dal rostro, il quale è ancorato alla base del capitulum. Da quest'ultimo dipartono due paia di cheliceri segmentati, l'ipostoma e un paio di palpi (Sojka, 2015). L'ipostoma funge da canale alimentare. Le variazioni nelle dimensioni e nella forma dell'ipostoma, insieme alla disposizione dei denticoli, differiscono tra le diverse specie e rappresentano caratteristiche fondamentali per l'identificazione tassonomica. La saliva, che contiene enzimi proteolitici in grado di digerire i tessuti, viene trasferita dalla zecca all'ospite attraverso questo canale, permettendo così l'iniezione di sostanze antinfiammatorie, anticoagulanti e antidolorifiche.

La sezione anteriore del corpo è dotata di zampe e di un poro genitale, mentre la sezione posteriore presenta gli spiracoli e l'ano (Figura 2). L'apertura genitale risulta chiusa e non visibile nelle larve e nelle ninfe, mentre è aperta negli adulti.

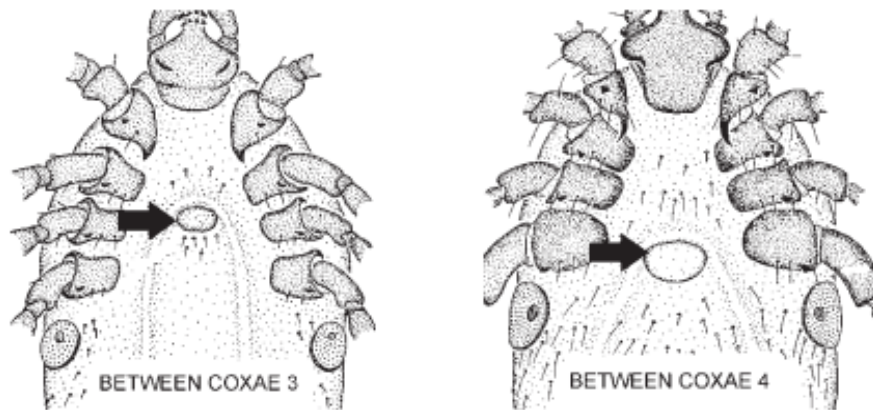


Figura 2 Estrada-Peña, A., et al. "Ticks of domestic animals in the Mediterranean region." University of Zaragoza, Spain 131.4 (2004).

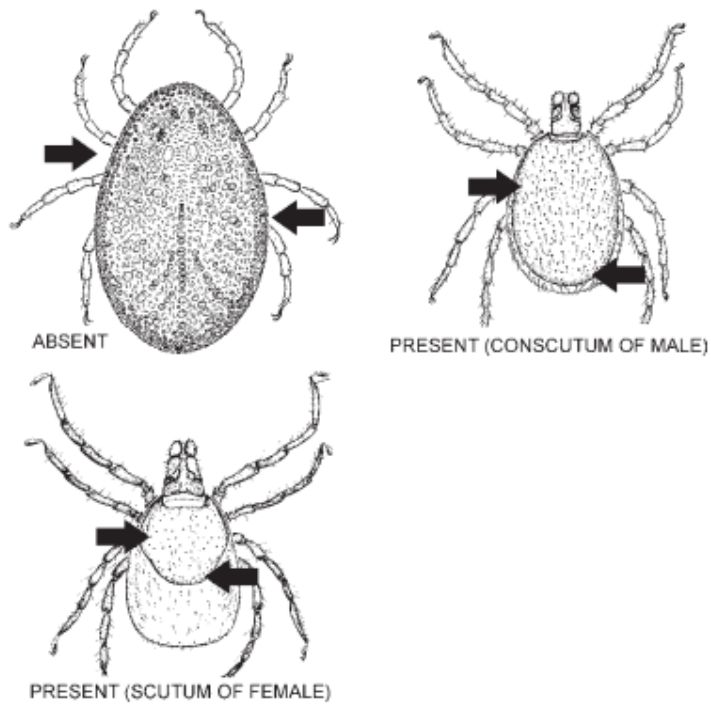


Figura 3 Estrada-Peña, A., et al. "Ticks of domestic animals in the Mediterranean region." University of Zaragoza, Spain 131.4 (2004).

Le appendici articolate, composte da sei segmenti, sono impiegate per la locomozione. Nel primo paio di zampe della zecca si trova l'organo di Haller, organo sensoriale capace di percepire gli stimoli fisici e meccanici, come il calore emesso dal corpo dell'ospite e qualsiasi vibrazione provocata dal suo movimento. L'organo di Haller è in grado di rilevare anche gli stimoli chimici come l'anidride carbonica.

1.1.3. Ciclo vitale

Le zecche Ixodidae hanno un ciclo vitale a quattro stadi: uova, larva, ninfa e adulto e sono ematofagi obbligati in tutti gli stadi vitali.

Tutti gli stadi attivi (larve, ninfe e adulti) necessitano di sangue come fonte nutritiva per la crescita verso il successivo stadio di sviluppo e la riproduzione (Cupp, 1991). In base all'interazione con l'ospite si dividono in monofasiche, difasiche e trifasiche. Le larve e le ninfe si nutrono una sola volta fino a raggiungere la replezione, dopo di che effettuano il cambiamento di stadio. Le zecche monofasiche, anche dette a un ospite, completano due cambiamenti di stadio sul medesimo animale, passando dallo stadio di larva a quello di ninfa e successivamente da ninfa a adulto. Le zecche a due ospiti, invece, effettuano un solo cambiamento di stadio sull'ospite, passando dallo stadio larvale a quello di ninfa; la ninfa ingorgata si stacca, modifica il suo stadio al di fuori dell'ospite e l'adulto deve cercare un secondo animale ospite, appartenente o meno alla stessa specie del primo. Infine, le zecche a tre ospiti non effettuano il cambiamento di stadio sull'ospite; la larva ingorgata si stacca, diventa ninfa, la quale deve trovare un secondo animale ospite per nutrirsi e staccarsi nuovamente, completando così raggiungendo lo stadio adulto, che si attacca a un terzo animale ospite (Jongejan & Uilenberg, 2004).

Gli Ixodidi adulti generalmente si accoppiano sull'ospite, con la femmina che si nutre completamente, si stacca e depone un numero elevato di uova, morendo dopo la deposizione, mentre i maschi possono rimanere sull'ospite per un periodo che può protrarsi a diversi mesi.

Il pasto di sangue implica una serie complessa di eventi comportamentali ed è in questo contesto che una zecca può infliggere danni al suo ospite, poiché è in grado di acquisire organismi patogeni da un ospite infetto e successivamente trasmettere tali agenti a nuovi ospiti durante i pasti ematici successivi.

La sequenza di eventi che conduce a un'alimentazione efficace è stata articolata in nove fasi principali. Inizialmente, la zecca deve identificare un ospite attraverso due strategie principali: la strategia di caccia, nota come "hunter", che implica un rapido avvicinamento all'ospite, e la strategia di "questing", in cui i vari stadi della zecca si arrampicano sugli steli d'erba e adottano una posizione di attesa, con gli arti anteriori sollevati a diverse altezze in base allo stadio di sviluppo. Questa postura consente loro di aderire alla pelle o al pelo dell'ospite, avviando così la ricerca di un sito di attacco appropriato, che di solito si trova in aree umide come ascelle o inguine. Una volta individuato il sito, la zecca inserisce il proprio apparato boccale nell'epidermide e nel derma dell'ospite, permettendo così di stabilizzarsi durante il pasto, durante il quale assorbe sangue e altri fluidi, effettuando pasti parziali o completi. Al termine dell'alimentazione, la zecca ritira il proprio apparato boccale e si allontana dall'ospite (Anderson & Magnarelli, 2008).

Il processo di alimentazione delle zecche avviene lentamente, tra l'altro facilitando la dispersione di questi ectoparassiti quando l'ospite si muove nel suo ambiente. Non presentando gli occhi, le zecche sfruttano diversi stimoli che permettono loro di avvertire il passaggio dell'ospite, come il tatto, le temperature cutanee, l'olfatto e le vibrazioni. Gli stimoli tattili, percepiti attraverso le proiezioni simili a peli (setae) presenti sui palpi o su altre parti del corpo, sono impiegati per selezionare i siti di attacco sulla pelle dell'ospite. Tali siti sono frequentemente localizzati in aree protette e umide del corpo dell'ospite. La zecca si aggrappa alla superficie cutanea mediante le sue unghie tarsali, orientandosi in modo tale che la bocca sia rivolta verso l'alto e inclinando il proprio corpo iniziando così a incidere l'epidermide. Al fine di completare il processo di alimentazione, l'ipostoma dotato di denti grandi e ricurvi verso l'indietro, viene inserito nella lesione (Anderson & Magnarelli, 2008).

1.1.4. Ixodidae come vettori patogeni

Le zecche sono responsabili della trasmissione di una vasta gamma di microrganismi patogeni, tra cui protozoi, rickettsiae, spirochete, virus, elminti, superando qualsiasi altro gruppo di artropodi vettori (Cupp, 1991).

Rappresentano uno dei principali vettori di malattie che colpiscono l'uomo e gli animali domestici. La zecca è considerata un vettore di un determinato agente patogeno solo se soddisfa due criteri: deve nutrirsi da un ospite vertebrato infetto e deve essere in grado di trasmettere l'agente patogeno stesso a un ospite sano (Varma, 1999; Jongejan & Uilenberg, 2004).

L'acquisizione dell'agente patogeno avviene durante il pasto di sangue. Successivamente, l'organismo può conservare l'agente patogeno attraverso uno o più stadi del suo ciclo vitale e trasmetterlo ad altri ospiti durante un nuovo episodio di alimentazione. Essi sono mantenuti nelle popolazioni di zecche attraverso diverse vie di trasmissione: per via orizzontale, dove riveste particolare importanza l'abbondanza degli ospiti reservoir e il comportamento alimentare delle zecche (mono-polifasico) esempio: *TBE* e *Borrelia burgdorferi*; per co-feeding, ovvero trasmessi da una zecca all'altra se queste si nutrono simultaneamente sullo stesso ospite, per via verticale se la trasmissione del patogeno avviene attraverso le uova, come ad esempio i virus della *TBE* e le Rickettsie, e per via trans-stadiale. Gli agenti patogeni della zecca possono essere trasmessi all'ospite attraverso la saliva (Borrelie, Rickettsie, Virus) e più raramente con il fluido coxale (Borrelie) (paralisi da zecche) o con le feci (Rickettsie).

Le zecche e le infezioni ad esse associate hanno coevoluto con diversi animali selvatici che agiscono come ospiti, stabilendo frequentemente un equilibrio con questi parassiti. Di conseguenza, tali animali diventano "ospiti-serbatoio" per le zecche e i patogeni che esse trasmettono. La problematica relativa alle zecche negli animali domestici si manifesta principalmente quando vi è l'interazione con ospiti selvatici. La maggior parte delle zecche tende a nutrirsi di specifici gruppi di animali selvatici. Di conseguenza, il numero di specie che si relazionano con animali domestici e/o esseri umani risulta piuttosto limitato (Jongejan & Uilenberg, 2004). Solo un numero relativamente ridotto di specie di zecche ha mostrato un adattamento efficace agli animali o si nutre su esseri umani, e queste specie si sono evolute come vettori altamente efficienti di vari microrganismi patogeni. È importante notare che tutte le malattie umane trasmesse dalle zecche sono di origine zoonotica (Jongejan & Uilenberg, 2004).

La reazione delle zecche nei confronti dell'ambiente deve essere chiaramente definita, il che richiede un'analisi dell'influenza del microclima in cui esse si sviluppano. La temperatura e l'umidità relativa rappresentano elementi fondamentali che influenzano i principali aspetti del ciclo vitale delle zecche. I "periodi di crescita", che comprendono la deposizione delle uova e il cambiamento di stadio, sono influenzati dalla temperatura, con modalità che variano significativamente a seconda della specie di zecca (Estrada-Peña, 2001). Alcune, definite endofile, possono prediligere ambienti con temperatura e umidità stabili come tane, grotte, stalle e parassitano animali che frequentano tali ambienti o ospiti accidentali (predatori/uomo); altre ancora, riconosciute come esofile, vivono in ambienti aperti in

occasione della ricerca degli ospiti, dove le caratteristiche climatiche e la copertura vegetale giocano un ruolo importante; infine, le xerofile, vivono in una situazione intermedia, si comportano come da endofile durante gli stadi larvali, mentre negli stadi di sviluppo successivi assumono le caratteristiche delle specie esofile ampliando così la gamma di ospiti.

La distribuzione geografica delle diverse specie di zecche, e di conseguenza delle malattie da esse trasmesse, è condizionata da fattori climatici. Il clima si configura come una variabile cruciale nel ciclo vitale delle zecche, le quali tendono a stabilirsi in aree con caratteristiche ambientali molto eterogenee.

L'identificazione della specie di zecca è quindi fondamentale per valutare quali patogeni possono essere trasmessi. La presenza di patogeni nella zecca può essere valutata con protocolli di PCR specifici (e successiva conferma in sequenziamento).

Le principali specie presenti sul suolo italiano sono: *I. ricinus*, *R. sanguineus* e *D. marginatus*. I patogeni trasmessi dalle zecche dure sono: virus (e.g *Tick-borne encephalitis*), *Rickettsia* spp. (varie rickettsiosi), *Anaplasma* (anaplasmosi), *Francisella tularensis* (Tularemia), *Coxiella burnetii* (febbre Q), *Ehrlichia* spp. (ehrlichiosi), *Borrelia burgdorferi* (Malattia di Lyme), *Babesia* (Babesiosi) (Figura 4).

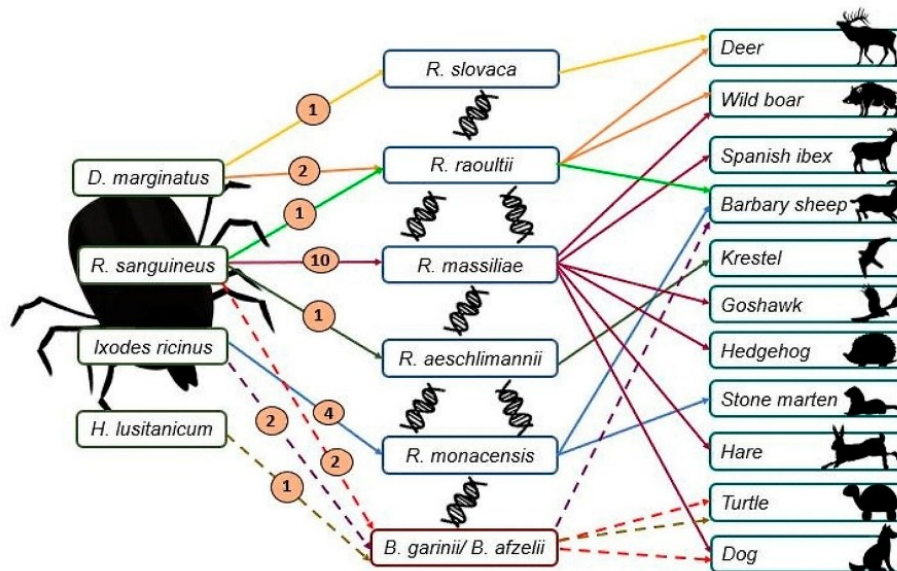


Figura 4 Specie di *Rickettsia* e *Borrelia* identificate in diversi pool di specie di zecche e l'ospite da cui sono state estratte. È incluso il numero di pool utilizzati per ciascuna specie di zecca (Ortega et al., 2024).

Il genere *Ixodes* rappresenta il più ampio gruppo di zecche dure, comprendente 241 specie. Queste zecche si distinguono per essere longirostrate, per la presenza di un solco anale che si curva anteriormente verso l'ano, per uno scuto privo di ornamenti e per l'assenza di occhi. Il loro ciclo vitale si sviluppa attraverso tre ospiti (Jongejan & Uilenberg, 2004). Sebbene le specie di *Ixodes* che parassitano mammiferi di dimensioni maggiori siano relativamente poche, il genere è ampiamente diffuso in ambienti forestali o erbosi. In Europa e Asia, le specie di maggiore rilevanza sono *I. ricinus* e *I. persulcatus*, mentre in Nord America, *I. scapularis* è la specie più comune (Figura 5).



Figura 5 Distribuzione di *I. ricinus* (verde) e *I. persulcatus* (arancione) e area di co-presenza (giallo) (Lindgren & Jaenson, 2006).

I. ricinus (Figura 6-7-8) si nutre di una varietà di ospiti, rendendola vettore significativo di numerose malattie zoonotiche. L'aumento delle malattie zoonotiche trasmesse dalle zecche nelle regioni temperate del mondo costituisce un crescente pericolo per la salute pubblica. Si osserva una chiara relazione tra l'incremento della popolazione di cervi in gran parte dell'Europa occidentale, che fungono da ospiti principali per le zecche della specie *I. ricinus*, e la densità di queste ultime. Tale fenomeno è attribuibile alla trasformazione di terreni agricoli in habitat favorevoli alla proliferazione di ampie popolazioni di cervi, il che ha comportato un significativo aumento della popolazione di zecche. Inoltre, l'intensificazione delle attività ricreative nelle aree rurali infestate ha determinato un incremento dei casi di morsi di zecca tra la popolazione umana in Europa occidentale. (Jongejan & Uilenberg, 2004).



Figura 6 Foto di A. Grassi



Figura 7 Foto di A. Grassi



Figura 8 Foto di A. Grassi

Il genere *Dermacentor* (Figura 9) include 33 specie caratterizzate da scudi ornamentali, palpi e occhi di dimensioni ridotte, e generalmente adotta un ciclo vitale che coinvolge tre ospiti. Le specie appartenenti a questo genere sono distribuite su tutti i continenti, ad eccezione dell'Australia. In Eurasia, diverse specie, come *D. marginatus* e *D. reticulatus*, infestano il bestiame e altri animali domestici, mentre in Nord America, *D. variabilis* e *D. andersoni* rivestono un'importanza notevole come ectoparassiti del bestiame. Al contrario, in Africa, le specie di *Dermacentor* non esercitano un'influenza significativa sugli animali da allevamento (Jongejan & Uilenberg, 2004).



Figura 9 Foto di A. Grassi

Per quanto riguarda il genere *Rhipicephalus* (Figura 10), esso comprende circa 70 specie. Queste zecche, di dimensioni piccole e medie, presentano palpi corti e larghi, generalmente privi di ornamenti, ma dotati di occhi e festoni. La maggior parte delle specie di *Rhipicephalus* è associata a mammiferi presenti nel continente africano. Queste zecche sono tipicamente a tre ospiti, sebbene alcune specie, come *R. evertsi*, possano avere un ciclo a due ospiti. L'identificazione tassonomica delle zecche di questo genere è un aspetto cruciale per la comprensione della loro ecologia e del loro ruolo nella trasmissione di patogeni (Jongejan & Uilenberg, 2004).



Figura 10 Foto di A. Grassi

1.1.5. *Borrelia Burgdorferi* sensu lato

Le malattie umane associate alle zecche hanno guadagnato notevole attenzione nel tempo, specialmente dopo la scoperta della malattia di Lyme. Le spirochete appartenenti al complesso *B. burgdorferi* sono state oggetto di particolare interesse in questo contesto. Il genere *Borrelia* comprende microrganismi gram-negativi di forma spirillare, possiedono delle cellule con una forma elicoidale e sono mobili (Tilly et al., 2008).

Sono capaci di infettare sia gli esseri umani sia vari animali, quali cervi, ratti, roditori e uccelli, che fungono da serbatoi naturali (Stanek et al., 1993; Sala & De Faveri, 2016).

Questi batteri sono responsabili di malattie infettive note come borreliosi, le quali vengono generalmente trasmesse dagli animali all'uomo, con le zecche che rappresentano il principale mezzo di trasmissione.

Il genere *Borrelia* comprende almeno 37 specie riconosciute; tra queste, 12 sono associate alla malattia di Lyme o ad altre forme di borreliosi, sotto l'appellativo di *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex. “Tra le 18 specie di *Borrelia* identificate fino ad oggi, 8 sono confermate come circolanti in aree endemiche in Europa: *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. bissetii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. spielmanii*, *B. lusitaniae* e *B. valaisiana* (Figura 11) (Rudenko et al., 2011).

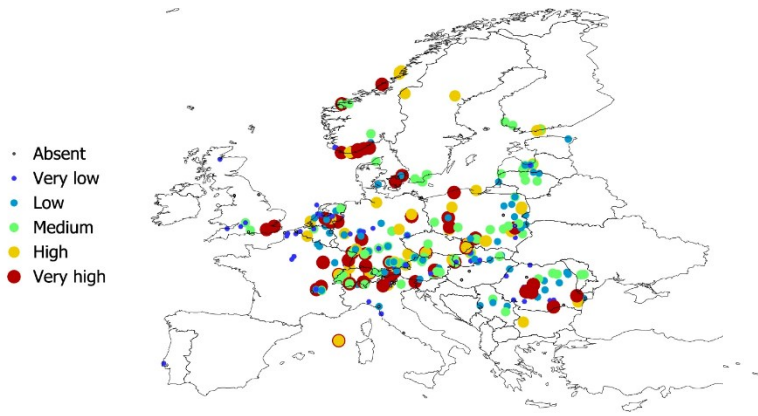


Figura A

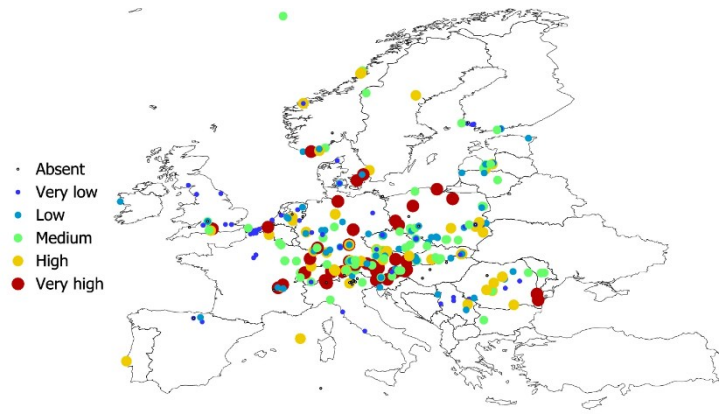


Figura B

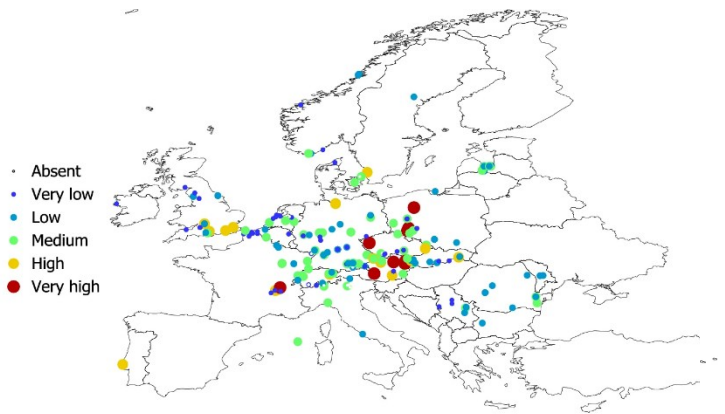


Figura C

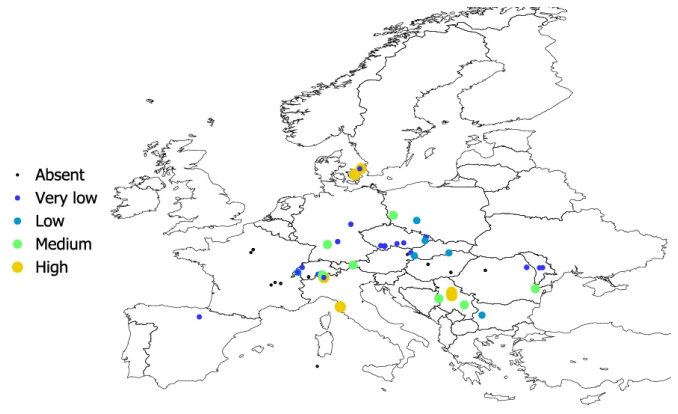


Figura D

Figura 11 Distribuzione in Europa di *B. afzelii* (A), *B. garinii* (B), *B. valaisiana* (C), *B. lusitaniae* (D) (Estrada-Peña et al., 2018).

Sebbene l'infezione negli ospiti naturali non porti alla malattia, l'infezione degli esseri umani può causare la malattia di Lyme come conseguenza della risposta immunopatologica umana a *B. burgdorferi* (Tilly et al., 2008).

Attualmente, la malattia di Lyme è riconosciuta come la patologia da artropodi più frequentemente riportata in Nord America e in Europa, dove prende il nome di borreliosi (Roos, 2014), con un continuo aumento di nuovi casi registrati annualmente in entrambe le aree. Le complicazioni derivanti da una forma non trattata di malattia di Lyme nell'essere umano possono risultare gravi e debilitanti. I costi associati all'assistenza medica per i pazienti affetti da malattia di Lyme, alla sorveglianza epidemiologica e alla diagnostica di laboratorio sono indubbiamente elevati.

In Europa e in Asia, le tre specie di *Borrelia* che sono responsabili della maggior parte dei casi di malattie umane includono *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* e *B. afzelii*, le quali sono comunemente raggruppate sotto il termine *B. burgdorferi* sensu lato (Figura 11). Negli Stati Uniti, la malattia di Lyme è attribuita esclusivamente alla specie *B. burgdorferi* sensu stricto. Le manifestazioni cliniche della malattia di Lyme, sia in Europa che in Nord America, presentano alcune caratteristiche comuni, tra cui un'eruzione cutanea eritematosa migrante e sintomi simil-influenzali. In seguito, possono emergere ulteriori sintomi che si correlano in modo approssimativo alla specie responsabile dell'infezione. L'artrite è frequentemente associata all'infezione da *B. burgdorferi* sensu stricto, mentre i sintomi neurologici sono più comunemente legati a *B. garinii* e i disturbi cutanei a *B. afzelii* (Tilly et al., 2008).

Geni fondamentali per l'infettività o la persistenza negli ospiti vertebrati, possono presentare significative variazioni a livello di nucleotidi e aminoacidi. La variabilità all'interno di un determinato prodotto genico complica la progettazione di vaccini efficaci basati su queste proteine, poiché la risposta immunitaria generata potrebbe non garantire protezione contro tutte le varianti.

B. burgdorferi infetta una vasta varietà di animali vertebrati, tra cui piccoli mammiferi, lucertole e uccelli (Figura 12). Le zecche appartenenti al genere *Ixodes* sono responsabili della trasmissione di *B. burgdorferi* tra gli ospiti e sono gli unici vettori naturali attraverso i quali è stato accertato che gli esseri umani possano contrarre l'infezione (Tilly et al., 2008).

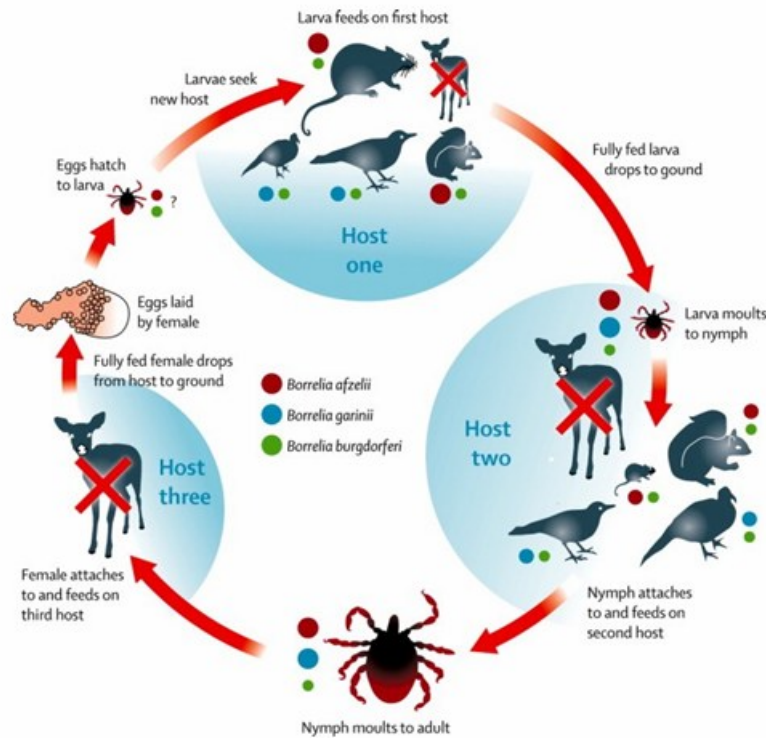


Figura 12 Ciclo infettivo della genospecie europea *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Stanek et al., 2011).

La diffusione della malattia di Lyme è legata alla sovrapposizione degli habitat di un ospite serbatoio idoneo per *B. burgdorferi* e della zecca vettore. Gli agenti della malattia di Lyme in Europa e Asia sono trasmessi tramite le zecche, in particolare *I. ricinus* (la zecca europea delle pecore) e *I. persulcatus* (la zecca della taiga), sono responsabili della trasmissione di spirochete, principalmente durante il loro stadio larvale, quando si nutrono di roditori infetti. Dopo la muta in ninfa, le zecche infette si alimentano su una varietà di animali, inclusi i roditori, che fungono da nuovi serbatoi, contribuendo così alla perpetuazione del ciclo di trasmissione. Una volta che le ninfe raggiungono lo stadio adulto, si nutrono esclusivamente di mammiferi di dimensioni maggiori, i quali spesso non sono ospiti competenti per *Borrelia burgdorferi*. La trasmissione delle spirochete per via trans ovarica è estremamente rara, se non del tutto assente, rendendo quindi fondamentale l'alimentazione delle larve e delle ninfe per il mantenimento della popolazione di spirochete. Sebbene ninfe e adulti possano occasionalmente nutrirsi di esseri umani, è la piccola dimensione delle larve a renderle significative nel contesto della trasmissione (Tilly et al., 2008).

In seguito alla trasmissione della spirocheta, la malattia di Lyme negli esseri umani si sviluppa solitamente in fasi caratterizzate da periodi di remissione e riacutizzazioni, con diverse manifestazioni cliniche in ciascuna fase (Huppertz & Girschick, 2016).

L'infezione iniziale corrisponde al primo stadio, dove intorno alla puntura della zecca può comparire un arrossamento della pelle che tende lentamente a ingrandirsi (eritema migrante). In Europa, l'eritema migrante è più frequentemente causato da *B. afzelii* o *B. garinii* piuttosto che da *B. burgdorferi* sensu stricto e l'infiammazione associata ad esso tende a essere meno severa e la migrazione risulta più lenta (Smith et al., 2002). Esso si manifesta dopo 4 - 40 giorni dalla puntura del parassita e può scomparire spontaneamente senza nessuna cura dopo alcune settimane (ma ciò non implica che l'infezione sia risolta). Nonostante solitamente si presenta una forte risposta immunitaria cellulo mediata, *Borrelia* può sopravvivere dando inizio al secondo stadio.

Se l'infezione non viene trattata può diffondersi nel giro di qualche mese a tutto l'organismo e dare disturbi importanti, come chiazze rossastre in più parti del corpo. Possono essere coinvolti le articolazioni e il sistema nervoso (manifestazioni gravi includono la meningite e la paralisi del nervo facciale). Raramente interessa altri organi come il cuore, gli occhi, il fegato, i reni ed i polmoni.

Il terzo stadio indica un'infezione persistente. Essa tende a cronicizzare causando disturbi alla pelle, alle articolazioni (dolori e rigonfiamento), a livello cardiaco ed al sistema nervoso. Tuttavia, il decorso dell'infezione può variare: alcuni pazienti possono manifestare solo un'infezione localizzata della pelle, mentre altri presentano esclusivamente sintomi tardivi della malattia, come l'artrite (Steere et al., 2004).

Per quanto riguarda la diagnosi, viene prima effettuato un test ad elevata sensibilità (ELISA) che, se positivo o dubbio, viene integrato con un test ad elevata specificità (immunoblot). Adeguatamente integrati con i dati clinici, i risultati dei test di laboratorio possono supportare la diagnosi di malattia di Lyme (Cartabellotta et al.). Per quanto riguarda il trattamento da seguire, vengono consigliati antibiotici come Doxiciclina.

1.1.7. Spotted Fever Group *Rickettsia* spp.

Le *Rickettsie* sono batteri intracellulari obbligati gram-negativi appartenenti alla famiglia delle Rickettsiaceae e all'ordine Rickettsiales. Il gruppo della febbre maculata (SFG) unisce un clade filogeneticamente ben definito di *Rickettsie*, distinto dalle altre specie, il cui ciclo vitale coinvolge artropodi, in particolare zecche (Burgdorfer & Brinton, 1975; Socolovschi et al., 2009).

La *Rickettsia* spp. causa rickettsiosi, che è tra le più antiche malattie trasmesse dagli artropodi conosciute. Ad oggi, 16 delle 25 specie sono riconosciute come patogeni umani e altre 2 sono sospettate di causare rickettsiosi (Parola et al., 2005; Botelho-Nevers et al., 2012).

La rickettsiosi trasmessa da zecche, nota come febbre maculata delle Montagne Rocciose, è provocata dall'agente patogeno *Rickettsia rickettsii*. Questa malattia, sebbene potenzialmente letale, è curabile e si riscontra in gran parte degli Stati Uniti e in altre regioni. La trasmissione avviene attraverso il morso di zecche appartenenti al genere *Dermacentor* (Figura 13) (Socolovschi et al., 2009).

Un'altra forma di infezione è la febbre bottonosa, la quale rappresenta una malattia infettiva provocata da batteri appartenenti al genere *Rickettsia*, come *R. slovaca*, *R. massiliae*, *R. monacensis*, *R. conorii*, i quali sono prevalentemente rinvenibili nella regione mediterranea europea. La trasmissione della febbre bottonosa avviene attraverso la puntura della zecca del cane (*Rhipicephalus sanguineus*) (Figura 14). La maggior parte degli individui che contraggono questa malattia presentano un'escara nera, nota come "tache noire", nel punto di inoculazione. La puntura della zecca consente l'ingresso nel flusso sanguigno e la diffusione dei batteri zoonotici (MacConnachie & Tishkowski, 2023).

Il ciclo infettivo dell'SFG negli esseri umani inizia con la puntura di zecche seguito da un periodo di incubazione della durata di circa quindici giorni. I sintomi clinici dell'infezione da SFG variano da lievi a potenzialmente letali (Robinson et al., 2019). Le zecche si infettano con la *Rickettsia* durante il pasto su un ospite affetto da rickettsiosi. All'interno della popolazione di zecche, le *Rickettsie* si diffondono attraverso meccanismi di trasmissione trans ovarica, trans-stadiale e, con minore frequenza, trans-spermica. È stato suggerito che la trasmissione di SFGR *R. massiliae* e *R. rickettsii* possa avvenire anche durante la co-alimentazione tra zecche ixodidi. In ambienti naturali, le *Rickettsie* possono essere trasferite in altri modi (Buczek et al., 2020).

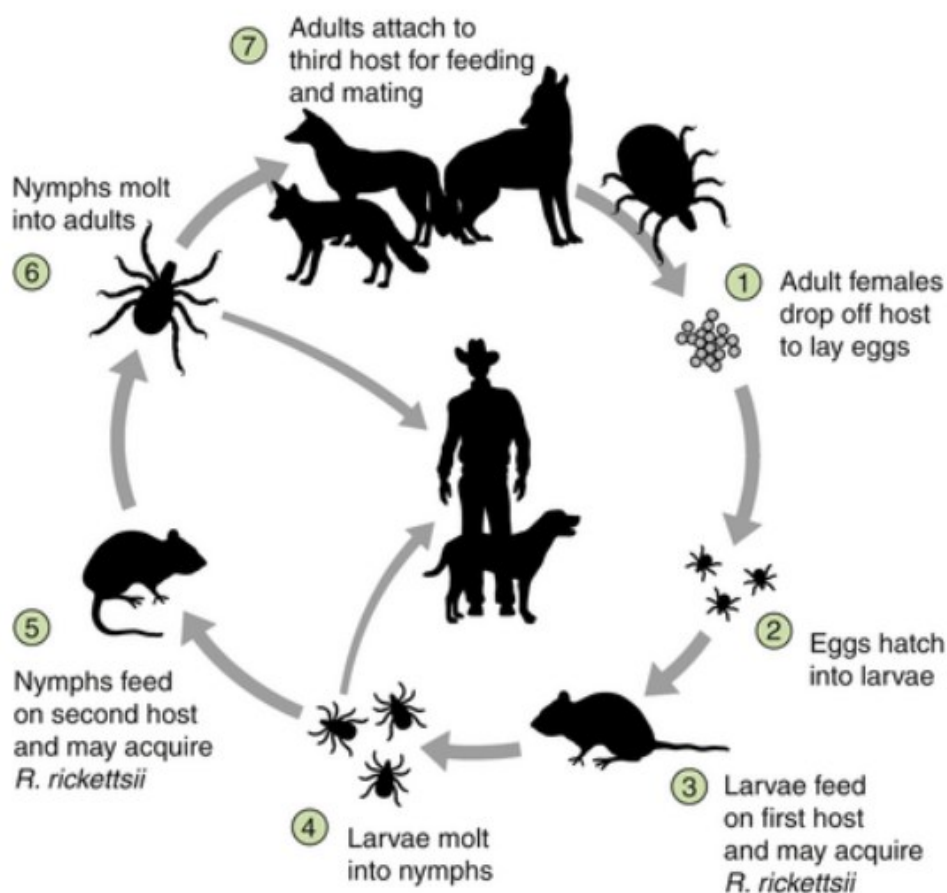


Figura 13 Ciclo di trasmissione di *Rickettsia rickettsii* nelle popolazioni di zecche, nell'uomo e nei cani. Dopo che le zecche femmine adulte depongono le uova e queste si schiudono (1 e 2), le zecche *Dermacentor* spp. acquisiscono *R. rickettsii* nutrendosi come larve o ninfe di roditori (3); quindi trasmettono durante il successivo pasto come ninfe o adulte (4 e 6). Le zecche adulte si nutrono di una varietà di specie di canidi, come volpi e forse lupi e coyote. Inoltre, l'infezione da *R. rickettsii* può essere mantenuta per via trans ovarica nelle zecche *Dermacentor*; quindi, alcune larve che si schiudono dalla massa di uova ospitano già un'infezione (Nicholson et al., 2010).

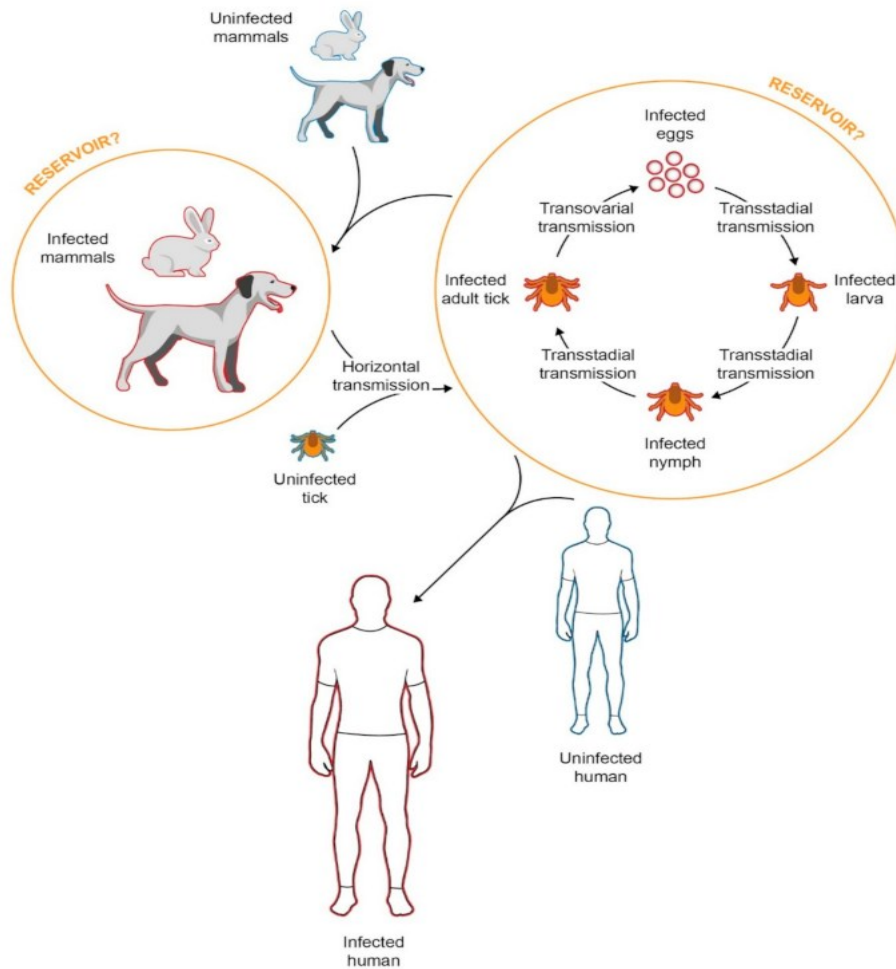


Figura 14 *Rhipicephalus sanguineus* può essere infettato da *R. conorii* attraverso tre vie principali: quando le zecche si nutrono di mammiferi infetti (trasmissione orizzontale), per via trans ovarica (trasmissione verticale) e per via trans stadiale (trasmissione verticale). La trasmissione trans ovarica e trans stadiale di *R. conorii* all'interno della popolazione di zecche potrebbe suggerire il potenziale ruolo della zecca come serbatoio. La vera natura del serbatoio di *R. conorii* non è ancora del tutto compresa, mentre molti autori teorizzano che la popolazione canina, così come altri mammiferi, potrebbe potenzialmente contribuire come serbatoio. La trasmissione di *R. conorii* all'uomo avviene attraverso zecche infette, che vengono trasferite all'habitat umano attraverso la popolazione canina (Spernovasilis et al., 2021).

Le specie del genere *Rickettsia*, che includono *R. slovaca*, *R. helvetica*, *R. aeschlimannii*, *R. massiliae* e *R. monacensis* (Blanda et al., 2017), vengono trasmesse attraverso la puntura di zecche infette (Figura 15). Le Rickettsie si diffondono nel flusso sanguigno, infettando l'endotelio e, in alcuni casi, le cellule muscolari lisce dei vasi. Queste specie riescono a penetrare nelle cellule ospiti dove si replicano mediante scissione binaria nel citosol, causando un danno diretto alle cellule gravemente infettate (Curto et al., 2019). La febbre bottonosa si manifesta prevalentemente nelle stagioni calde e presenta un quadro clinico caratterizzato da febbre, cefalea, un'eruzione cutanea maculo papulare che coinvolge anche i palmi delle mani e le piante dei piedi, oltre alla comparsa di un'escara, nota come 'tache noire', nel punto di inoculazione del morso della zecca (Chapman et al., 2006; Botelho-Nevers et al., 2012).

Per quanto riguarda invece la febbre maculata delle Montagne Rocciose, la manifestazione clinica abituale comprende febbre, cefalea e mialgia, accompagnate da un'eruzione cutanea maculo papulare che, nei casi più gravi, può presentarsi in forma purpurica, spesso preceduta da una storia di morso di zecca (Botelho-Nevers et al., 2012). I pazienti sospettati di infezione da SFG normalmente presentano, oltre a febbre, nausea, vomito e rash maculo papulare, anche complicazioni come perdita dell'udito, miocardite acuta e infarto cerebrale. Pertanto, la disponibilità di tecniche diagnostiche per le infezioni da SFG è importante, così come la consapevolezza dei medici sulla SFG per consentire la somministrazione precoce di un trattamento antibiotico appropriato, come l'utilizzo della Doxiciclina (Santibáñez et al., 2012; Parola, 2004; Robinson et al., 2019).

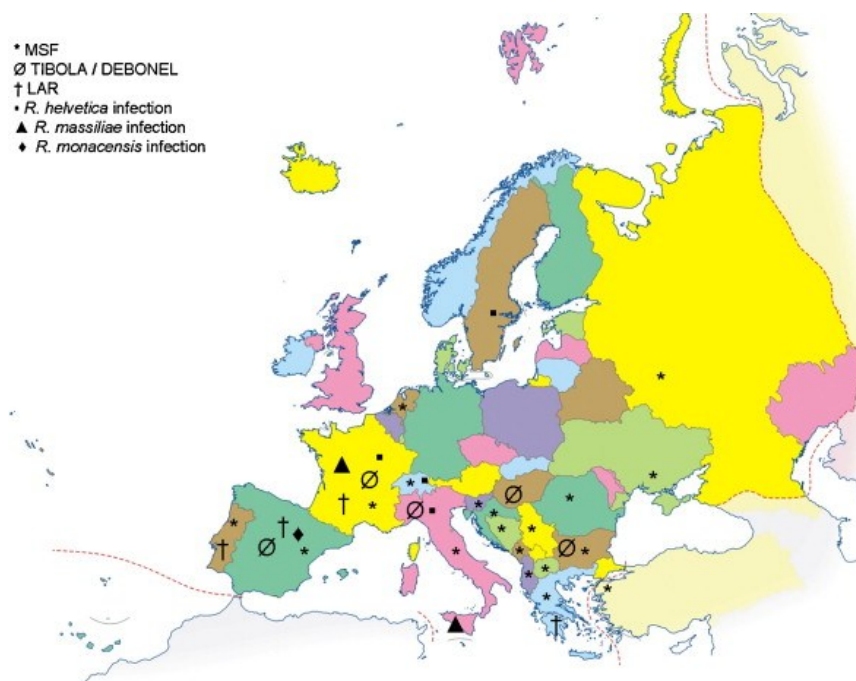


Figura 15 Mappa che mostra la distribuzione dei casi umani di rickettsiosi trasmesse da zecche in Europa (Oteo & Portillo, 2012).

1.2. Microfluidica

Il sistema BioMark real-time PCR (Fluidigm, USA) (Figura 16) è stato utilizzato per l'amplificazione PCR in tempo reale, definita “microfluidica ad alta produttività”, utilizzando array dinamici 48.48 oppure 96.96 (Fluidigm, USA). Questi chip hanno distribuito 48 (o 90) campioni e 48 (o 90) saggi in pozzetti individuali, seguiti da reazioni di Real-Time PCR on-chip in camere individuali e cicli termici, per un totale di 2.304 (o 8.100) reazioni individuali (Michelet et al., 2014).

La tecnologia microfluidica rivoluziona l'approccio sperimentale della diagnostica molecolare, permettendo l'esecuzione simultanea di numerose reazioni su un unico chip, con un significativo risparmio di tempo e reagenti. Questo rappresenta un netto vantaggio rispetto alla tecnica di Real-Time PCR, in cui viene ricercato un patogeno singolarmente in ciascun campione.

Vede la sua applicazione in diversi ambiti come agri genomica, espressione genica, genotyping, farmaco genomica.

La tecnica presenta però diversi step e richiede l'utilizzo di volumi relativamente piccoli, fino a 1,2 μ l, aumentando così il rischio di commettere errori da parte dell'operatore nella fase di preparazione.



Figura 16 High-Throughput Genomics
Standard Biotoools

2. SCOPO DEL LAVORO

Il lavoro descritto in questa tesi è stato svolto presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "Bruno Umbertini", Sede Territoriale di Pavia.

Il presente lavoro si propone di confrontare, rispetto alle normali Real-Time PCR, l'efficacia diagnostica della microfluidica per effettuare lo screening dei patogeni presenti in Ixodidae, attraverso il confronto dei cicli soglia (CT) ottenuti sullo stesso campione analizzato sia in microfluidica che in Real-Time PCR.

La messa a punto della metodica è essenziale per le diagnosi svolte in Istituto per indagare la circolazione dei patogeni sul suolo italiano, specialmente in Lombardia, in modo tale da massimizzare le prestazioni dello strumento per garantire un funzionamento ottimale e risultati accurati.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Campionamento e identificazione morfologica degli stadi di Ixodidae

I campioni vengono inviati direttamente all'Istituto Zooprofilattico, Ente Sanitario di diritto pubblico dotato di autonomia gestionale, tecnica e amministrativa operante nell'ambito del più ampio Servizio Sanitario Nazionale, dove a ciascuno di essi viene assegnato un numero identificativo di conferimento. Ogni paziente compila un modulo (Figura 17) con i propri dati anagrafici e il luogo in cui è stata trovata la zecca. In seguito, i veterinari procedono all'identificazione delle zecche utilizzando chiavi dicotomiche, indicando la specie, lo stadio e il sesso (e.g. ninfa *Ixodes ricinus*).

DOPO AVER RIMOSSO LA ZECCA
Distanza la cute con un disinfettante non colorato e volatile per 30-45 giorni la zona dove ti interessava.
Consulta il medico se nelle successive 4-6 settimane avverti uno stato di malessere prolungato, mal di testa, ecc. con particolare riferimento nel punto della puntura della zecca.
Conserva la zecca in un barattolo e portala in un centro di riferimento per l'identificazione nel più breve tempo possibile.
Segna la data, il luogo dell'evento e la specie della micropuntura sulla "Etichetta rilevamento zecca".

Telefona all'ufficio dei Servizi Veterinari dell'ATS Montagna se ti è più vicino per concordare data e orario di consegna del barattolo e della scheda. Gli uffici sono attivi dal lunedì al venerdì dalle 9.00 alle 12.00.

Servizi Veterinari - ATS Montagna:

Sondrio Via Savoia 35
Tel. 0342/859007

Tirano Via Cappadocia 6
Tel. 0342/607289

Bormio Via Ago 8
Tel. 0342/992522

Morbegno Via Marconi 18
Tel. 0342/643302

Chiavenna Piazza Corbetta 1
Tel. 0342/87289 oppure 0342/872024

Dongo Via Frate 2
Tel. 0344/973521

Breno Via Nautica 2
Tel. 0344/284816



Vivi la natura...
AZZECCA LA PREVENZIONE!
 Campagna informativa per la prevenzione delle malattie infettive trasmesse dalle zecche.
 Istituto Zooprofilattico
 Regione Lombardia
 ATS Montagna

Scheda rilevamento zecca

DATI ANAGRAFICI:
 Nome _____
 Cognome _____
 Data di nascita _____
 Codice Fiscale _____
 Indirizzo (via, numero civico, comune) _____
 Telefono _____

RILEVAMENTO ZECCA
 Data _____
 Località _____
 Ambiente _____
 bosco prato giardino altro _____
 Presenza di animali _____
 domestici allevamento selvatici _____
 altro _____
 Dove ho trovato la zecca _____
 testa orecchia regione inguinale braccio busto inguine ginocchio gamba altro _____

Istituti Zooprofilattici:

IZSLER Sondrio
 Via Torino, 26
 Tel. 0342/14312
 0342/11024
 e.mail: sondrio@izsler.it

IZSLER Brescia
 Via Racine 8
 Tel. 030/250221
 030/2503052
 e.mail: brescia@izsler.it

L'evento dell'evento sarà comunicato telefonicamente da operatori del Dipartimento di Igiene e Prevenzione Sanitaria dell'ATS della Montagna.

Figura 17 Modulo "Azzecca la prevenzione" Istituto Sperimentale Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (fronte e retro)


Cosa sono le zecche?
 Le zecche sono **parassiti di piccole dimensioni e di colore scuro che si nutrono di sangue** e che la volta possono costituire un pericolo per l'uomo.

Dove vivono?
 Preferiscono gli **ambienti naturali**, in particolare quelli caratterizzati da **umidità, fresco e ombra**:
 • boschi e bordi dei sentieri
 • prati e campi incolti
 • cespugli e giardini

Le zecche sono più attive **dalla primavera all'autunno**, ma possono vivere in tutti i mesi dell'anno anche in inverno. Vivono a stretto contatto con gli animali selvatici, che rappresentano i principali ospiti parassitari, ma possono mordersi anche animali domestici e uomo.

Come pungono gli animali e l'uomo?
 Le zecche **non saltano e non volano** ma si appiccicano all'attaccatura dei peli, inghiottendo il sangue dell'animale o dell'uomo. Con le loro zampe anteriori si agganciano ai peli, ai vestiti, scottandosi alla pelle. Fino a trovare il punto esatto in cui ancorarsi al sangue. Generalmente impiegano alcune ore al tavolo per un pasto che varia tra 7 e 7-10 giorni per poi lasciare cadere spontaneamente.

La puntura di zecca è pericolosa?
 La puntura di zecca, di solito, non è né dolorosa né pruriginosa, tuttavia può essere **pericolosa per l'uomo** sia per le gravi reazioni allergiche che per il possibile rischio di trasmissione malattie infettive.




Quali malattie possono essere trasmesse all'uomo?
 In Italia le principali malattie trasmesse da zecche sono la malattia di Lyme, la febbre tifoide (in cui la febbre bollosa del Malattia di Lyme), il morbo di Lyme e il Chagas, la meningococcemia da zecche (TBE) e la tubercolosi.

Malattia di Lyme
 È un'infezione batterica che dopo un'infezione da 3-20 giorni, si manifesta all'incirca con il sintomo classico sulla pelle, il sintomo con febbre, mal di testa, mal di collo alle articolazioni e a muscoli. Dopo un certo tempo (settimane o mesi) può causare disturbi più gravi alle articolazioni (artrite), al cuore e al sistema nervoso (paralisi). La cura è di antibiotici ad ampio spettro. La cura è più semplice ed efficace nei primi stadi della malattia che nelle fasi tardive, per questo motivo è importante riconoscere subito, fare il diagnosi e iniziare il trattamento.

Febbre tifoide
 È una grave malattia virale che colpisce l'intera regione. Inizia con febbre e disturbi simili influenzali. Nel 20-30% dei casi il decorso è molto serio, con possibili conseguenze permanenti e invalidanti. Non esiste una cura specifica ma **si può prevenire con la vaccinazione** (rischiata). Il rischio di infezione non è presente nel territorio dell'ATS Montagna.

Come si può prevenire la puntura?
Durante le escursioni:
 >>> COPERTI <<<<
 Indossare abiti chiari, con maniche e pantaloni lunghi ed i ricami garzati nei calzoni. Indossare scarpe chiuse e caespate.
 >>> USA DOL REPULLENTI <<<<
 Applica un repellente adeguato (regardando le indicazioni di uso del prodotto).
 >>> EVITA L'ERBA ALTA <<<<
 Cammina su sentieri battuti, preferibilmente al centro, evitando le zone ricche di cespugli e di sottobosco.
 >>> CONTROLLA <<<<
 Controlla il tuo corpo: rimosso il materiale appoggiato sul corpo prima di rimosso.
Al ritorno:
 >>> CONTROLLA <<<<
 Indossare i pantaloni scoperti, sovrapposti con l'aiuto di un'altra persona per le zone più difficili da ispezionare (dorso e nuca). Ricordarsi che la zecca tendono a localizzarsi preferibilmente alla testa, su collo, dietro le ginocchia, nelle pieghe dell'inguinale e delle ascelle.
CONTROLLA ATTENTAMENTE I BAMBINI!

In caso di puntura di zecca:
COSSA NON FARE:
 Non utilizzare mai alcol, benzina, acetone, ammoniaca, olio per rimuovere la zecca, non toglierla con le mani o non schiacciarla con le dita.
 Non utilizzare antibiotici di tua iniziativa senza prima consultare il medico.
COSSA FARE:
 Rimuovi la zecca al più presto, affermandola delicatamente, senza strapparla, con una pinzetta a più possibile vicino alla cute, mantenendola più volte per evitare ostacolo di sangue.



3.2. Estrazione del DNA

La fase di estrazione del DNA ha lo scopo di ottenere il DNA purificato e inattivare le nucleasi ed è eseguita tramite un metodo semi automatico che utilizza il kit IndiMag® Pathogen (Indical Bioscience). Secondo il metodo, si esegue una disgregazione meccanica per la rottura di tessuti e pareti cellulari e successivamente una digestione enzimatica mediante l'utilizzo della proteinasi K, proteasi isolata dal fungo saprofito *Tritirachium album* e adatta per digestioni che avvengono in tempi brevi; possiede un'elevata attività, la quale aumenta e risulta stabile anche all'aumentare della temperatura e dei valori di pH.

- I campioni vengono collocati singolarmente in provette Eppendorf da 2 ml, contenenti una sfera magnetica e 500 µl di PBS (tampone fosfato salino, pH 7.2)
- I campioni vengono sottoposti a lisi mediante l'utilizzo dello strumento TissueLyser II per una durata di 2 minuti, impostando una frequenza di 30 hertz
- In conformità con il protocollo del kit IndiMag, si procede alla preparazione delle piastre destinate ai lavaggi
- Etichettare e preparare 3 piastre a pozzetti profondi da 96 pozzetti e 1 micropiastra a 96 pozzetti
- Preparare la miscela di tampone (Binding Mix) contenente Buffer VXL, Buffer ACB, MagAttract G, RNA carrier e il controllo interno di DNA
- Dispensare 20 µl di proteinasi K sul fondo di una nuova piastra a pozzetti profondi da 96 pozzetti e aggiungere 200 µl di campione omogenato
- Aggiungere 500 µl di miscela di Binding Mix a ciascun campione
- Ogni piastra viene inserita nell'estrattore automatico, il quale procederà con la fase di estrazione del DNA utilizzando il programma specificato

3.3. Real-Time PCR per la ricerca dei patogeni

Ogni campione è stato sottoposto a un processo di amplificazione mediante Real-Time PCR al fine di accertare la presenza dei patogeni di interesse.

La Real-Time PCR (reazione a catena delle polimerasi in tempo reale) è una tecnica che permette di valutare la qualità di DNA mentre viene amplificato. Prevede tre cicli ripetuti, composti ciascuno da tre fasi: la fase definita di denaturazione, dove il DNA viene denaturato mediante riscaldamento a 92°-95°C, la fase di annealing, dove la miscela viene raffreddata gradualmente fino a raggiungere la temperatura che garantisce la specifica ibridazione dei primers alle regioni ad esse complementari, e infine la fase di allungamento, nella quale la temperatura della miscela viene portata a 70-72°C consentendo alla DNA polimerasi termostabile di sintetizzare il filamento complementare allo stampo a partire dall'innesco oligonucleotidico. Il metodo utilizzato per controllare la progressione in tempo reale della PCR misura l'attività 5'-esonucleasica della Taq polimerasi, eliminando una sonda specifica. Il sistema TaqMan utilizza un approccio con due primer e una sonda, la quale è all'interno della regione definita dai primer ed è etichettata sull'estremità 5' con una molecola fluorescente e al 3' con una molecola che "spegne" la fluorescenza. L'attività 5' esonucleasica della Taq polimerasi degrada la sonda liberando la molecola fluorescente e il quencher; perciò, più prodotti di PCR vengono generati, più molecole fluorescenti vengono rilasciate e la fluorescenza del campione aumenta.

Per l'analisi dei singoli patogeni, è stata preparata una miscela di reagenti composta da acqua, master mix, primers forward e reverse e un controllo interno di estrazione. La miscela finale viene quindi distribuita nei singoli pozzetti, e la piastra inserita nel termociclatore per consentire l'esecuzione dell'analisi. Al termine della reazione, vengono registrati i valori di CT dei campioni risultati positivi al patogeno analizzato. Il CT è definito come ciclo soglia, ovvero il ciclo della reazione di PCR al quale viene prodotto il valore di fluorescenza scelto come riferimento al quale paragonare successivamente tra loro tutti i campioni.

Per quanto riguarda la ricerca dell'agente eziologico *Borrelia* spp., il metodo permette di rilevare la presenza del genoma di *Borrelia* spp. tramite l'amplificazione di parte della regione non codificante l'RNA ribosomiale, ITS. Si utilizza una Master Mix qPCR VetMAX™-Plus.

Vengono utilizzati i seguenti primer (concentrazione 10 μ M) e la seguente sonda (concentrazione 25 μ M):

Bor ITS_F	5' GGCTTCGGGTCTACCACATCTA 3'
Bor ITS4_R	5' CCGGGAGGGGAGTGAAATAG 3'
Bor ITS4 P	FAM-TGCAAAAGGCACGCCATCACC-BHQ1

In seguito ad un'analisi in PCR end point dei campioni positivi per *Borrelia* spp., si esegue un'ulteriore analisi mediante Real-Time PCR per la ricerca di due specie specifiche: *B. afzelii* e *B. miyamotoi*. *B. afzelii*, è inclusa nel *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex e risulta positiva nella fase di end point. In questo caso il metodo di Real-Time PCR si basa sull'amplificazione selettiva del gene *flaB*, il quale codifica per la flagellina presente in *B. afzelii*.

Vengono utilizzati i seguenti primer (concentrazione 10 μ M) e la seguente sonda (concentrazione 25 μ M):

Bo_af_fl_a_F	5' GGAGCAAATCAAGATGAAGCAAT 3'
Bo_af_fl_a_R	5' TGAGCACCTCTTGAACAGG 3'
Bo_af_fl_a_S	FAM-TGCAGCCTGAGCAGCTTGAGCTCC-BHQ1

La specie *B. miyamotoi*, inizialmente negativa all'identificazione di *Borrelia burgdorferi* sensu lato eseguita con la tecnica di PCR end point, viene analizzata attraverso l'amplificazione in Real-Time PCR di una porzione del gene *glpQ*, il quale codifica per la proteina glicerofosfodiesterase fosfodiesterasi.

Vengono utilizzati i seguenti primer (concentrazione 10 μ M) e la seguente sonda (concentrazione 25 μ M):

B_miya_glpQ_F	5' CACGACCCAGAAARRGACACA 3'
B_miya_glpQ_R	5' GTGTGAAGTCAGTGGCCGGTAAT 3'
B_miya_glpQ_P	FAM-TCGTCCGTTTTCTCTAGCTCGATTGGG-BHQ1

Il protocollo termico di amplificazione è riportato in tabella:

STEP	Temperatura	Tempo	N° cicli
Attivazione	95°	5 min	1
Denaturazione	95°	15 sec	45
Annealing ed Estensione	60°	30 sec	

La ricerca dell'agente eziologico *Rickettsia* spp. si basa sull'amplificazione di una parte del gene *gltA* che codifica per l'enzima citrato sintasi.

Per la preparazione della mix, si utilizza una master mix qPCR GoTaq® Probe pronta all'uso che include tutti i componenti per la Real-Time PCR, tra cui GoTaq® Hot Start Polymerase, MgCl₂, dNTP e un buffer di reazione. Templato, primer e sonda sono aggiunti in seguito.

Vengono utilizzati i seguenti primer (concentrazione 10 μ M) e la seguente sonda (concentrazione 25 μ M):

Rick_spp_gltA_F	5' GTCGCAAATGTTACGGTACTT 3'
Rick_spp_gltA_R	5' TCTTCGTGCATTTCTTTCCATTG 3'
Rick_spp_gltA_P	FAM-TGCAATAGCAAGAACCGTAGGCTGGATG- BHQ1

Il protocollo termico di amplificazione è riportato in tabella:

STEP	Temperatura	Tempo	N° cicli
Attivazione	95°	2 min	1
Denaturazione	95°	15 sec	40
Annealing ed Estensione	60°	1 min	

3.4. PCR ed elettroforesi

I campioni positivi a *Borrelia* spp. e *Rickettsia* spp., secondo il metodo di prova, devono essere sottoposti a un'ulteriore PCR ed-point (Figura 18-19) per la ricerca della specie, utilizzando un gel di agarosio al 2%. Si prepara una miscela che comprende una master mix, dNTPs, MgCl₂, Taq polimerasi e i primer forward e reverse, entrambi a una concentrazione di 10 µM. La miscela finale viene quindi distribuita nei singoli pozzetti (17 µl + 3 µl di campione) e la piastra viene collocata nel termociclatore. Al termine della reazione, si procede alla preparazione del gel di agarosio al 2%. L'agarosio al 2% viene combinato con la soluzione tampone per elettroforesi TBE running buffer 50X, in base al numero di campioni da analizzare. Dopo aver riscaldato la miscela per alcuni minuti, si aggiunge l'intercalante del DNA SYBR™ Safe DNA Gel Stain Invitrogen™, il quale si inserisce tra le basi azotate, consentendo la visualizzazione della banda al termine della corsa elettroforetica. Una volta solidificato, il gel viene posto in una scatola elettroforetica contenente tampone TBE running buffer 50X. Nel primo pozzetto del gel è collocato un Ladder (una miscela composta da 10 µl di 100pb DNA Ladder, 10 µl di 10X Blue Juice Loading Buffer e 80 µl di acqua pura) che funge da marcatore di peso molecolare da 100 bp. In ogni pozzetto viene inserito 10 µl di campione precedentemente mescolato con 2 µl di Blu di Bromofenolo (una miscela composta da 100 µl di acqua distillata e 20 µl di Blu 6x DNA Loading Dye) per monitorare il progresso dell'elettroforesi e per determinare la migrazione relativa delle molecole. Dopo aver posizionato tutti i campioni e il Ladder, vengono impostati i seguenti parametri nel generatore di corrente: la potenza (80-100 watt, a seconda del numero di pozzetti), la durata della corsa (30 minuti) e la tensione (400 volt). Una volta avviata la corsa, i due elettrodi generano una forza che crea un campo elettrico diretto dall'anodo al catodo, il quale induce la migrazione del DNA presente nei campioni poiché il DNA è carico negativamente

e tende a spostarsi verso il catodo. L'elettroforesi su gel rappresenta una tecnica di separazione, in quanto gli acidi nucleici si muovono attraverso le maglie del gel; le molecole di dimensioni minori si spostano più rapidamente, mentre quelle di massa maggiore impiegano più tempo per attraversare il gel.

Per quanto riguarda la *Rickettsia* spp., il metodo si basa sull'amplificazione di una porzione del gene *gltA* che codifica per l'enzima citrato sintasi.

Vengono utilizzati i seguenti primer (concentrazione 10 µM):

RpCS 877p	5' GGGGGCCTGCTCACGGCGG 3'
RpCS 1258n	5' ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA 3'

Il protocollo termico di amplificazione è riportato in tabella:

STEP	Temperatura	Tempo	N° cicli
Denaturazione	95° C	15 min	1
		30 sec	6
Annealing	58 °C	30 sec	
Estensione	72 °C	15 sec	
Denaturazione	95 °C	30 sec	34
Annealing	50 °C	30 sec	
Estensione	72 °C	15 sec	
Estensione finale	72 °C	5 min	1

Per quanto riguarda *Borrelia* spp., il metodo permette di identificare il genoma di *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, nome per indicare un gruppo di diciotto differenti specie di *Borrelia*, tredici delle quali (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garini*, *B. bavariensis*, *B. japonica*, *B. lusitaniae*, *B. sinica*, *B. spielmanii*, *B. tunukii*, *B. turdi*, *B. valaisiana*, *B. yangtze*, *B. bissetii* e *B. carolinensis*) sono presenti in Eurasia, mediante l'amplificazione di una parte del gene che codifica il 16S rRNA.

È un metodo qualitativo che si applica ai campioni di DNA risultati positivi al metodo di screening di *Borrelia* spp.

Vengono utilizzati i seguenti primer (concentrazione 10 μ M):

BBDL5 FW	5' ATGCACACTTGGTGTTAACTA 3'
BBDL5 REV	5' GACTTATCACCGGCAGTCTTA 3'

Il protocollo termico di amplificazione è riportato in tabella:

STEP	Temperatura	Tempo	N° cicli
Denaturazione	95 °C	15 min	1
		30 sec	40
Annealing	58°C	30 sec	
Estensione	72 °C	40 sec	
Estensione finale	72 °C	5 min	1

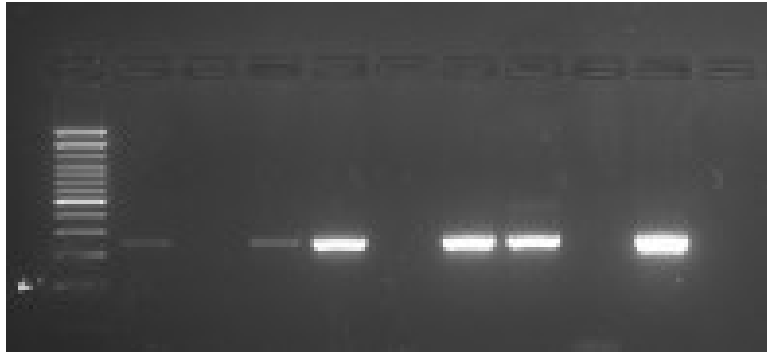


Figura 18 Elettroforesi su gel per *Borrelia* spp.

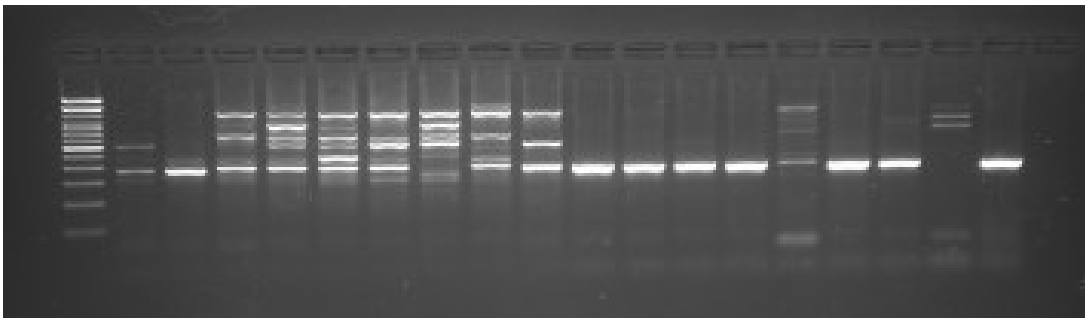


Figura 19 Elettroforesi su gel per *Rickettsia* spp.

3.5. Utilizzo della microfluidica per la ricerca dei patogeni

L'impiego della microfluidica prevede diversi passaggi fondamentali: la creazione di un Pool 0,2x che include tutti i primer dei patogeni da analizzare, la preparazione della piastra di assay, contenente i saggi relativi ai target da identificare, nonché la preparazione della piastra di pre-amplificazione e della piastra dei campioni.

Il "Pool 0,2x" è una miscela omogenea derivante da una soluzione madre denominata 20X TaqMan Gene Expression Assay, la quale comprende le coppie di primer (forward e reverse a concentrazione 18 μ M) dei patogeni di interesse, utilizzata per la pre-amplificazione del DNA. Questa soluzione madre viene diluita con un reagente specifico, noto come Dilution Reagent, fino a raggiungere una concentrazione finale di 0.2X.

Per la preparazione, è necessario agitare i primer a concentrazione 100 μ M su un vortex per 10 secondi e successivamente centrifugare. In una provetta da 1,5 mL, si aggiunge acqua sterile e il volume appropriato di primer forward e reverse a 18 μ M. In questo passaggio non sono da includere primer per *E. coli* o per specie di zecche nel pool. Agitare la soluzione mediante vortex, quindi centrifugare.

Successivamente, si procede alla preparazione della piastra di "pre-amplificazione", fondamentale per migliorare la sensibilità e la specificità dello strumento:

- Preparare la miscela di pre-amplificazione in una provetta Eppendorf da 1,5 mL, utilizzando il Kit di pre-amplificazione Standard Biotools, che include una mix di amplificazione, acqua sterile e il "Pool 0,2x" precedentemente preparato
- Distribuire 3,75 μ L della miscela di pre-amplificazione in ciascun pozzetto della piastra
- Aggiungere 1,25 μ L di acqua sterile nel pozzetto designato come controllo negativo di amplificazione
- Caricare 1,25 μ L di DNA per ciascun campione
- Centrifugare la piastra
- Caricare la piastra su termociclatore

Il protocollo termico di amplificazione è riportato in tabella:

STEP	Temperatura	Tempo	N° cicli
Attivazione	95 °C	2 min	1
Denaturazione	95 °C	15 sec	14
Annealing ed Estensione	60 °C	4 min	
Estensione finale	4 °C	∞	∞

Al termine della pre-amplificazione, vengono diluiti i campioni preamplificati:

- Vortexare brevemente la piastra contenente il cDNA preamplificato e quindi centrifugarla per sedimentare sul fondo del pozzetto il contenuto prima di rimuovere il sigillo della piastra
- Diluire il cDNA preamplificato aggiungendo 20 µM di Dilution Reagent direttamente nei pozzetti
- Chiudere ermeticamente la piastra, agitarla delicatamente su vortex per miscelare le diluizioni e quindi centrifugarla per sedimentare il contenuto
- Il cDNA preamplificato diluito può essere analizzato immediatamente o conservato a -20 °C per un uso successivo

Nel passaggio successivo, si procede alla preparazione della piastra per l'assay, la quale include tutti i saggi necessari per l'identificazione del target specifico presente nel campione. Si parte dai primer e sonda a 100 µM e aggiungendo acqua si ottiene una mix con primer e sonda a concentrazione rispettivamente di 18 µM e 5 µM:

- Agitare su vortex e centrifugare i primer da 100 µM e le sonde da 100 µM una volta scongelati
- Aliquotare
- Sigillare la piastra e conservare a -20 °C

Infine, viene preparata la "Sample plate":

- Portare a temperatura ambiente la 2X Master Mix TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific) e il reagente 20X GE Sample Loading Reagent
- Per un chip da 48, preparare una miscela in una microprovetta con 18 μL del reagente 20X GE Sample Loading Reagent e 180 μL di 2X Master Mix TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific)
- Per un chip da 96, preparare una miscela in una microprovetta con 36 μL del reagente 20X GE Sample Loading Reagent e 360 μL di 2X Master Mix TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific)
- Distribuire 3,3 μL di mastermix in ogni pozzetto per 6 colonne (per un chip da 48.48) o 12 colonne (per un chip da 96.96) della piastra a 96 pozzetti con la pipetta multicanale
- Agitare su vortex e centrifugare la piastra contenente i campioni preamplificati e diluiti
- Caricare 2,7 μL di DNA utilizzando la pipetta multicanale
- Chiudere la piastra preparata, nota come "sample plate", con pellicola trasparente, quindi agitare su vortex e centrifugare

Successivamente alla preparazione delle piastre, il materiale contenuto nelle "assay plate" e "sample plate" viene trasferito nel microchip predisposto per le reazioni, seguendo i passaggi successivi.

1. Fase di preparazione definita "prime chip":

- Selezionare le siringhe per il fluido della linea di controllo corrispondenti al tipo di chip utilizzato: per un chip 48.48, la siringa contiene 300 μL di olio, mentre per un chip 96.96, la siringa contiene 150 μL di olio
- Premere le valvole in ciascuna camera con la punta nera della siringa per verificare che non siano bloccate
- Tenere la siringa capovolta quando si rimuove la punta nera per evitare la fuoriuscita di olio
- Inclinare il chip di 45°

- Inserire la siringa nella valvola spingendo completamente la guarnizione nera (la guarnizione nera deve essere spinta lateralmente dalla siringa per consentire il passaggio dell'olio)
- Svuotare il contenuto della siringa. Fare lo stesso per la seconda siringa nella seconda valvola
- Rimuovere la pellicola protettiva nera

2. Fase di dispensazione del cDNA e degli assay nel microchip:

- Utilizzare la pipetta multicanale per caricare 5 μ L della piastra di assay nella parte sinistra del chip e 5 μ L della piastra del campione sul lato destro del chip. La parte smussata corrisponde ad A1, l'angolo del chip. Questo deve essere sempre in alto a sinistra quando il chip è posizionato sul banco. Per caricare correttamente il saggio e il campione, utilizzare la pipetta con molta delicatezza durante il prelievo e l'espulsione del liquido; posizionare il liquido sul fondo dei pozzetti del chip e fermarsi alla prima tacca della pipetta per evitare la formazione di bolle
- Verificare che non vi siano bolle nei pozzetti. In caso contrario, romperli con un puntale da 10 μ L, cambiando puntale tra un pozzetto e l'altro
- Avviare il controller IFC
- Per le reazioni eseguite nel chip 48.48 viene effettuata una fase di priming secondo le istruzioni del produttore (Fluidigm). Tale passaggio consiste nel riempimento preliminare dei canali microfluidici con control line fluid, necessario per l'attivazione delle valvole pneumatiche e il corretto funzionamento del sistema. Nel caso del chip 96.96, la fase di priming non è richiesta in quanto il dispositivo è pre-condizionato dal produttore e pronto all'uso
- Caricare il chip nel controller IFC, premendo "EJECT" e posizionare il chip sul vassoio (rispettando il segno A1), quindi fare clic su "Load", quindi su "Next"
- Al termine della corsa, viene visualizzato un messaggio che indica se la corsa è stata completata correttamente. Rimuovere la piastra dallo sportello. Salvare la corsa su una chiavetta USB

L'analisi del chip viene eseguita grazie all'utilizzo di un software chiamato Fluidigm Real-Time PCR analysis.

- In "Quick Task" cliccare su "Open Chip Run", trovare la cartella e aprire il file chip run.bml
- In "Analysis View", scorrere fino a "Result Table", quindi selezionare "Image View". Selezionare "ROX". Verificare che il ROX sia presente per tutti i campioni (punti bianchi).
- In "Image View", scorrere fino a "Heat Map View"
- Nel riquadro "Analysis Settings" a sinistra, selezionare "Auto Detector". Fare clic su "Analyze"
- In "Detector Setup", fare clic su "New" e poi su "OK". Fare clic su "..." per la condizione di mappatura e selezionare "M48 assay SBS96 left" per un chip da 48.48 o "M96-Assay-SBS96" per un chip da 96.96, quindi fare clic su "Apri". Copiare il piano di analisi da un file Excel e incollarlo in A1 sul piano di analisi del software. Selezionare "Nome del rivelatore FAM-MGB" e accettare
- In "Configurazione campione", fare clic su "Nuovo" e quindi su "OK". Selezionare la condizione di mappatura "M48 sample SBS96 left" per un chip da 48.48 o "M96-Sample-SBS96" per un chip da 96.96, quindi fare clic su "Apri". Copiare il piano di analisi da un file Excel e incollarlo in A1 sul piano di analisi del software. Selezionare "Nome del rivelatore FAM-MGB" e accettare
- Tornare alla schermata di analisi e fare clic su "Analizza". Analizzare il chip e salvare. Vengono considerati solo i campioni con un CT inferiore a 30.
- Per scaricare un file Excel, fare clic su "File" e poi su "Esporta". Selezionare "Risultato Heat Map" e poi su "Salva" (Figura 20-21)

(Michelet et al., 2014)

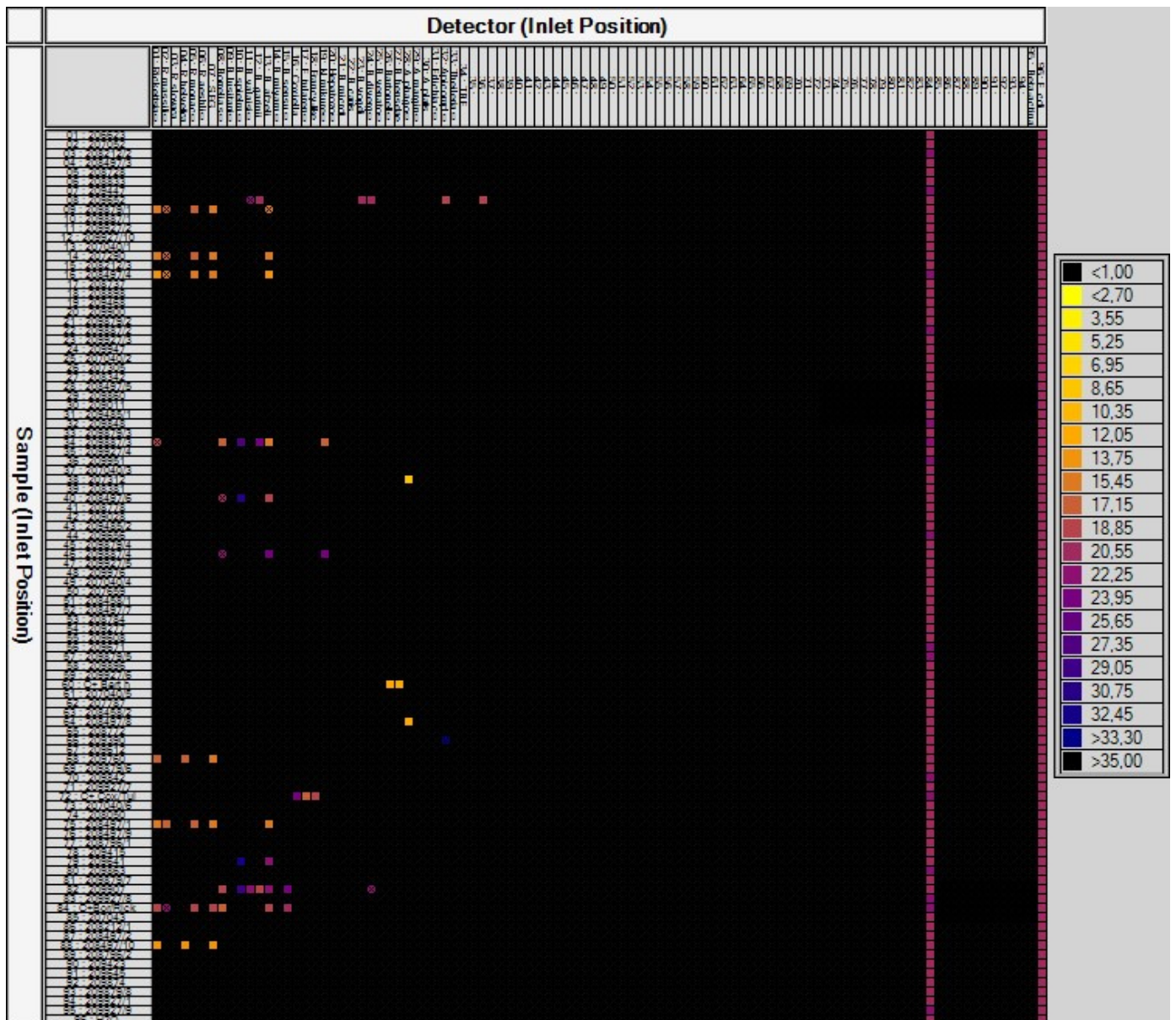


Figura 21 Heat Map Microchip 96.96

3.5.1. Messa a punto del metodo

Per valutare l'affidabilità del nuovo sistema microfluidico impiegato nella ricerca di patogeni trasmessi da zecche, in particolare *Borrelia* spp. e *Rickettsia* spp., è stata condotta una fase di validazione sperimentale, mirata a confrontare le prestazioni del sistema microfluidico con quelle del metodo di Real-Time PCR già in uso nel laboratorio. Sono stati analizzati specificamente i parametri di sensibilità, specificità, ripetibilità e riproducibilità, utilizzando un insieme di campioni positivi e negativi già caratterizzati. La sensibilità e la specificità sono state valutate confrontando i risultati ottenuti tramite il sistema microfluidico con quelli del metodo di riferimento, considerato come gold standard.

È stato possibile confrontare i diversi valori di CT dei campioni positivi ottenuti tramite Real-Time PCR e microfluidica, evidenziando come il valore di CT registrato per lo stesso campione in microfluidica risulti significativamente inferiore rispetto a quello ottenuto in tempo reale. Questo fenomeno indica una sensibilità superiore della microfluidica, attribuibile alla fase aggiuntiva di pre-amplificazione, che consente di amplificare anche quantità minime di DNA patogeno che non vengono rilevate in tempo reale.

In aggiunta, lo strumento presenta una maggiore specificità, poiché è in grado di identificare direttamente la specie specifica del patogeno. Al contrario, nel metodo in Real-Time PCR, come precedentemente descritto, sono necessari diversi passaggi e la conferma della specie avviene esclusivamente attraverso il sequenziamento.

La ripetibilità è stata valutata mediante l'esecuzione di più repliche dello stesso campione all'interno della medesima seduta analitica, mentre la riproducibilità è stata testata ripetendo l'analisi in giorni differenti e/o da parte di operatori diversi.

3.6. Analisi statistica

L'analisi del confronto tra i valori di CT delle due tecniche è stata eseguita attraverso il test statistico parametrico T-test student per dati appaiati, adatto per dati che seguono una distribuzione normale.

Nel disegno per dati appaiati si applicano entrambi i metodi a ogni unità campionaria. L'ipotesi nulla sostiene che non ci siano differenze significative tra i CT delle due tecniche, mentre l'ipotesi alternativa indica che la variazione media dei valori di CT tra i due strumenti non è pari a 0.

Per affrontare la valutazione della differenza tra le medie di CT, la prima fase prevede il calcolo della differenza tra i due valori di CT in ogni campione.

Successivamente viene calcolata la media campionaria delle differenze e la relativa deviazione standard. La tendenza è quella di diminuire i valori di CT con l'utilizzo della microfluidica e non che restino simili a quelli calcolati in Real-Time PCR come prevedeva l'ipotesi iniziale.

Il test è stato eseguito per il confronto tra i valori di CT delle due metodiche sia per l'analisi di *Borrelia* spp. che per *Rickettsia* spp.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

I patogeni trasmessi dalle zecche sono frequentemente identificati mediante tecniche molecolari tradizionali, quali PCR, Real-Time PCR e nested PCR. Tuttavia, tali metodologie presentano delle limitazioni riguardo al numero di agenti patogeni analizzabili, a causa della quantità di DNA disponibile per l'esame.

I risultati ottenuti provengono dall'analisi di diversi campioni di zecche raccolti in Lombardia, impiegando le tecniche di Real-Time PCR e microfluidica ad alta produttività. La possibilità di confrontare i risultati delle due metodologie ha evidenziato la superiorità in termini di sensibilità e specificità della microfluidica.

Tra i campioni analizzati, 181 sono risultati positivi per *Borrelia* spp sia in Real-Time PCR che in microfluidica.

La differenza tra i valori di CT ottenuti tramite Real-Time PCR e quelli ottenuti con la microfluidica è statisticamente significativa con $t = 103.34$, $df = 179$, $p\text{-value} < 2.2 \cdot 10^{-16}$, con un intervallo di confidenza al 95% tra i valori 12.34 e 12.82.

Il calcolo del valore del p value è pari a $1.62 \cdot 10^{-161}$, il che consente di rigettare l'ipotesi nulla, i risultati ottenuti attraverso l'utilizzo della microfluidica, dunque, si possono definire sistematici e non dovuti al caso.

Metodo	Media	Mediana	Deviazione standard	Numero campioni	T-test
Borrelia spp	31,06	31,03	3,87	181	p value = $1.62 \cdot 10^{-161}$
Microfluidica	18,48	18,55	3,78	181	
Differenza	12,58	12,56	1,63	181	

Per analizzare graficamente le distribuzioni, è stato elaborato un box plot (Figura 22):

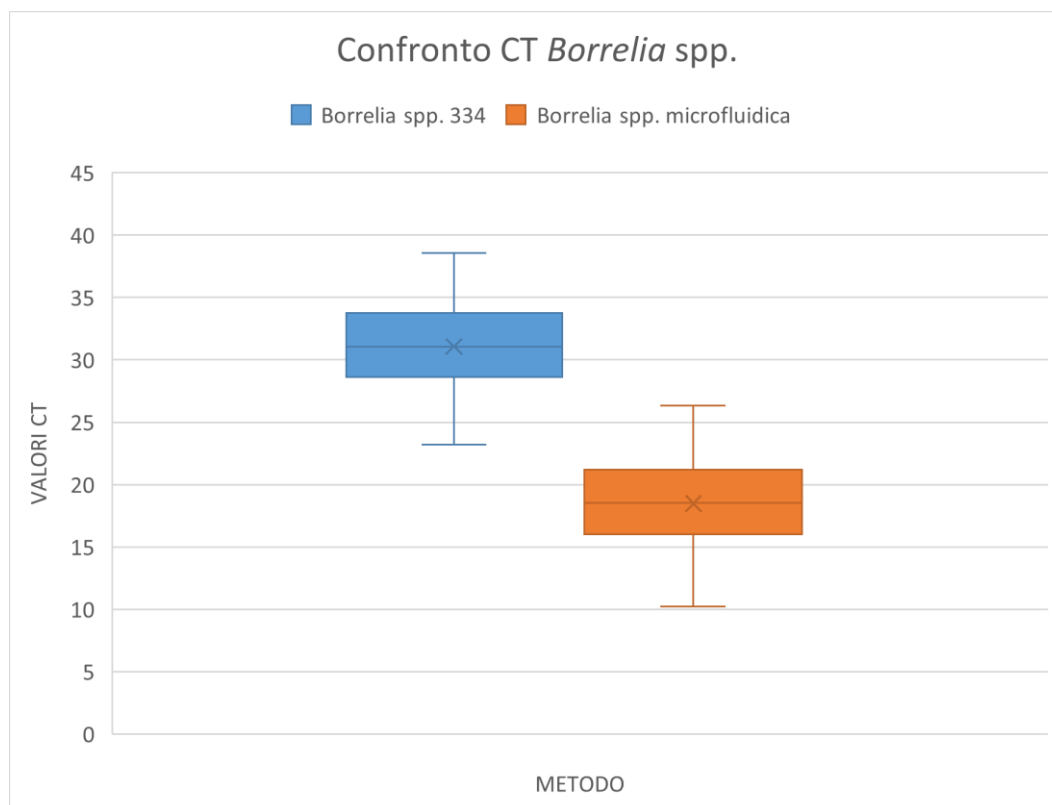


Figura 22 Boxplot “Confronto CT *Borrelia* spp.”

Dall'analisi del grafico (Figura 22) emerge chiaramente che i valori di CT nella microfluidica risultino inferiori rispetto a quelli ottenuti attraverso la tecnica di Real-Time PCR, con un valore medio di 19 per la microfluidica e un valore medio di 31 per la Real-Time PCR. Questo conferma ulteriormente la maggiore sensibilità dello strumento utilizzato. Si osserva, infatti, che i valori di CT derivanti dalla microfluidica sono inferiori di quasi dieci unità. Il risultato ottenuto dimostra che la fase di pre-amplificazione riveste un'importanza fondamentale nella metodologia, dal momento che l'ulteriore amplificazione del materiale genetico consente di rilevare il DNA patogeno il quale nella Real-Time PCR potrebbe non essere identificato o risultare un debole positivo; anche campioni che mostrano una positività debole o assente in Real-Time PCR vengono riconosciuti in microfluidica, con valori di CT significativi. In aggiunta, la disponibilità di un ampio pannello di saggi permette di rilevare e identificare ulteriori patogeni.

Si può affermare che la microfluidica offre vantaggi sostanziali nella sensibilità di rilevamento.

In questo grafico (Figura 23) invece è possibile osservare come lo strumento permetta anche un'identificazione di specie diretta, confermate dal confronto con il DNA sequenziato.

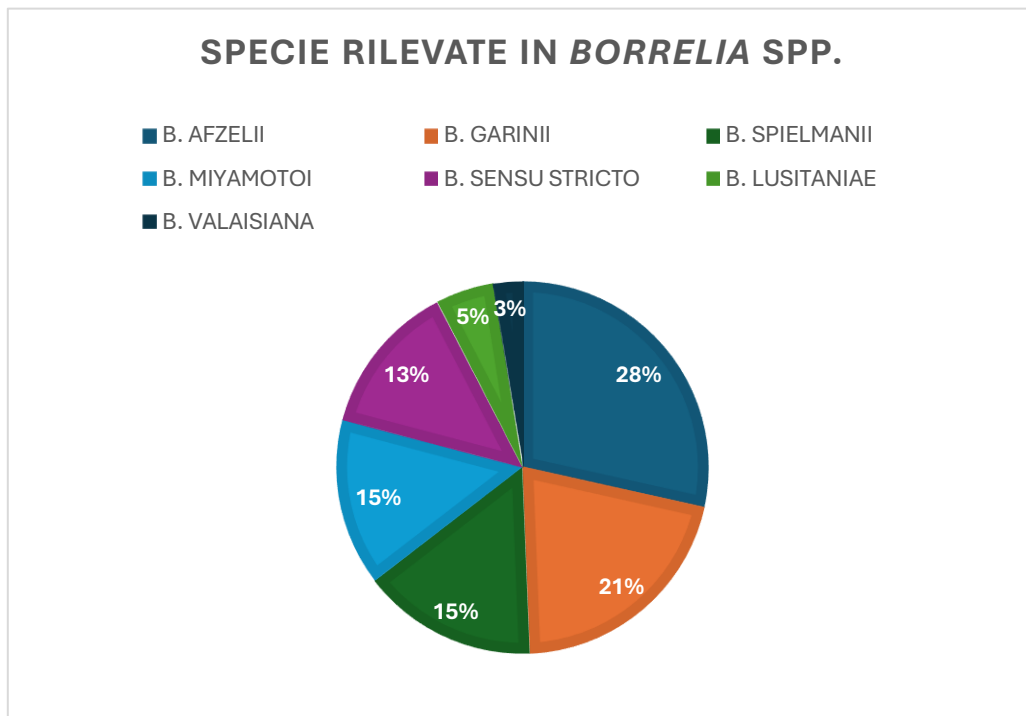


Figura 23 Grafico a torta "Specie rilevate in *Borrelia* spp."

In relazione al genere *Borrelia*, è stata riscontrata una maggiore prevalenza delle specie *B. afzelii* e *B. garinii*, mentre le specie *B. lusitaniae* e *B. valaisiana* si presentano con una frequenza inferiore nei campioni esaminati. Numerosi studi effettuati in regioni dell'Europa centrale e settentrionale, inclusa l'Italia settentrionale, evidenziano che *B. afzelii* e *B. garinii* sono tra le specie più comunemente identificate in *Ixodes ricinus*, la quale risulta essere la specie di zecca predominante nei campioni analizzati, in particolare nella fase ninfa. *B. afzelii* è frequentemente associata a ospiti mammiferi, come i roditori, mentre *B. garinii* è spesso riscontrata in ospiti avicoli. Anche se *B. valaisiana* presenta una bassa prevalenza, la sua distribuzione è comunque in linea con quanto riportato nella letteratura scientifica (Dennis & Hayes, 2002; Rauter & Hartung, 2005).

È fondamentale notare che i campioni di zecche analizzati non provengono da un campionamento sistematico in ambiente naturale, ma sono stati raccolti da zecche rimosse da esseri umani e animali, in particolare ungulati, tassi e volpi, noti per la loro funzione di ospiti per le zecche della specie *Ixodes ricinus* e sono frequentemente oggetto di campionamento da parte di cittadini e cacciatori.

Tale modalità di campionamento ha un impatto significativo sulla composizione delle specie di *Borrelia* identificate (Gern et al., 1998; Gern, 2008; Wolcott et al., 2021;). La forte associazione di *B. afzelii* con ospiti mammiferi, quali roditori e ungulati, spiega l'elevata prevalenza di questa specie nei campioni prelevati da animali ed esseri umani, considerando che le zecche sono spesso rinvenute in ambienti boschivi. D'altra parte, *B. garinii*, sebbene associata principalmente agli uccelli, può essere trasmessa anche da zecche che parassitano mammiferi e umani. Questa specie utilizza in gran parte gli uccelli come serbatoi, in particolare a passeriformi, i quali possono riattivare l'infezione durante le migrazioni, contribuendo così alla diffusione e al mantenimento della *Borrelia* tra le popolazioni di zecche (Comstedt et al., 2011). Un'ulteriore revisione conferma che gli uccelli non solo preservano la spirocheta, ma ne facilitano anche la dispersione geografica (Kurtenbach et al., 2002; Comstedt et al., 2006; Comstedt et al., 2011).

Sebbene i mammiferi ospiti non fungano da serbatoi sistematici per *B. garinii*, in quanto non sostengono un'infezione efficace, esiste la possibilità di trasmissione attraverso il co-feeding. Diversi mammiferi di dimensioni medie, quali scoiattoli, tassi, volpi e persino lepri, possono risultare infettati da *B. garinii*, sebbene non siano classificati come serbatoi principali. Ad esempio, in Scozia e Francia sono stati documentati casi di *B. garinii* in scoiattoli, suggerendo che tali mammiferi possano agire come ospiti occasionali all'interno della rete di trasmissione (Mysterud et al., 2019). In Slovacchia è stato dimostrato che i roditori non amplificano *B. garinii* o *B. valaisiana*, e queste specie vengono addirittura eliminate durante l'alimentazione delle zecche sui roditori (Hanincova et al., 2003). Pertanto, la presenza riscontrata nei nostri campioni è in linea con l'ecologia della specie, che potrebbe aver evoluto un passaggio dalla trasmissione avicola a mammiferi secondari nel ciclo vitale della zecca.

B. valaisiana, fortemente riscontrata negli uccelli, potrebbe essere sottorappresentata poiché questi non sono ospiti comunemente esaminati o campionati attraverso la metodologia utilizzata. La presenza di *B. valaisiana* è stata rilevata in una percentuale molto ridotta dei campioni analizzati. Tale risultato è in linea con quanto evidenziato nella letteratura, la quale indica che *B. valaisiana* è strettamente legata agli uccelli passeriformi, che rappresentano i suoi unici serbatoi competenti (Hanincova et al., 2003). I campioni esaminati, provenienti esclusivamente da zecche prelevate su mammiferi non forniscono l'opportunità ecologica necessaria per il mantenimento o la trasmissione efficace di questa specie. In aggiunta, ricerche precedenti condotte in Italia settentrionale dimostrano che *B. valaisiana* è generalmente rara anche in contesti più ampi, con prevalenze basse riscontrate solo in aree caratterizzate da un'importante presenza avicola. Di conseguenza, la limitata presenza

nei nostri dati può essere attribuita al tipo di campionamento adottato e alla specificità ecologica di questa genospecie. Un'ampia metanalisi condotta a livello europeo ha messo in evidenza che le specie *B. afzelii*, *B. garinii* e *B. valaisiana* sono le più riscontrate nei vettori, spesso in sovrapposizione tra loro, probabilmente in relazione a nicchie ecologiche specifiche e a condizioni ambientali favorevoli (Estrada-Peña et al., 2018).

B. lusitaniae è stata identificata nel 5% dei campioni esaminati. Questa specie è principalmente associata ai rettili, i quali fungono da serbatoi competenti (Ragagli et al., 2010). Studi condotti in Italia meridionale hanno mostrato prevalenze tra l'11,6 % e il 12,3 % nelle zecche immature presenti sulle lucertole e nel sangue dei rettili stessi (Mendoza-Roldan et al., 2019). In regioni come la Lombardia, la ridotta presenza di rettili e il campionamento mirato su zecche prelevate da mammiferi possono spiegare la bassa prevalenza di *B. lusitaniae* nei risultati ottenuti. Sebbene il dato sia limitato, esso conferma comunque la circolazione locale della specie, in linea con la sua ecologia verso ospiti rettiliani.

Di conseguenza, i risultati ottenuti sono in linea sia con i dati locali che con le tendenze generali europee riguardanti la distribuzione delle specie di *Borrelia*. Tuttavia, il tipo di raccolta dei campioni rappresenta una distorsione dei dati poiché non riesce a coprire tutte le possibili nicchie ecologiche delle zecche, è influenzato dalla stagionalità e dalle attività umane, come escursionismo e caccia, e non assicura una distribuzione uniforme né nel numero né nella distribuzione spaziale delle zecche raccolte.

Nei campioni analizzati positivi per *Borrelia*, la quasi totalità appartiene alla specie *Ixodes ricinus*, con una presenza marginale di *Ixodes hexagonus*, *Dermacentor* spp. e *Rhipicephalus* spp. Questo risultato è in linea con quanto riportato nella letteratura scientifica: in uno studio esteso condotto in Lombardia tra il 2018 e il 2023, il 93,5% delle zecche raccolte da esseri umani era rappresentato da *Ixodes ricinus*, mentre solo un numero esiguo di esemplari apparteneva ad altri generi, inclusi *Ixodes hexagonus* e *Dermacentor* spp. (Olivieri et al., 2025) confermando il ruolo predominante di questa specie in ambienti boschivi e temperati del Nord Italia. Un'indagine sulle zecche prelevate da esseri umani nel nord-ovest dell'Italia ha evidenziato che il 78% dei campioni era costituito da *I. ricinus* (Audino et al., 2021).

Questo predominio può essere giustificato da considerazioni ecologiche: la sua ampia distribuzione è facilitata da condizioni ambientali favorevoli, caratterizzate da un'umidità compresa tra l'85% e il 98% e da temperature variabili tra i 20°C e i 23°C (Otranto et al., 2014), oltre che dalla presenza di

un ampio spettro di ospiti, che include ungulati selvatici, roditori, carnivori e l'essere umano stesso. (Accorsi et al., 2022). La predominanza di zecche *I. ricinus* positive a *Borrelia* spp. rilevate nei campioni analizzati è in linea con i modelli epidemiologici ed ecologici documentati per il Nord Italia.

In aggiunta, tra gli stadi di sviluppo di *I. ricinus* identificati, si evidenzia una netta predominanza delle ninfe, seguite dalle femmine adulte. La presenza predominante di ninfe di *I. ricinus* nei nostri campioni, in confronto agli altri stadi di sviluppo, è in linea con il ciclo biologico della specie. Ricerche condotte in Europa evidenziano che la fase ninfale è particolarmente abbondante durante i mesi primaverili ed estivi, con un picco specifico tra maggio e giugno, periodo che coincide esattamente con l'intervallo di raccolta dei nostri campioni (marzo-agosto). Ad esempio, in provincia di Belluno, su un totale di 2.668 esemplari di *I. ricinus*, le ninfe rappresentavano oltre il 77% delle zecche raccolte (Bertola et al., 2021). Inoltre, in Europa centrale, i massimi livelli di ninfe si registrano attorno a metà maggio (Daniel et al., 2015). Questo stadio è considerato epidemiologicamente critico, poiché è numericamente predominante e spesso difficile da rilevare sull'ospite a causa delle sue dimensioni ridotte, il che aumenta il rischio di trasmissione di patogeni.

La microfluidica offre una specificità superiore rispetto alla Real-Time PCR, poiché consente di identificare la specie presente. Tuttavia, non sempre si verifica l'unicità della specie, e in tali circostanze è possibile identificare una doppia, o anche tripla, specie contemporaneamente. In questi casi, la conferma della specie può essere effettuata e validata esclusivamente mediante la tecnica del sequenziamento.

La presenza di più specie nello stesso campione comporta il fenomeno della cross-reatzione, dal momento che alcune specie diverse non contengono sufficienti polimorfismi per la distinzione specie specifica. È un fenomeno noto tra le varie specie di *Borrelia* e di *Rickettsia*. Da un punto di vista epidemiologico, risulta importante valutare la presenza di più specie nello stesso campione soprattutto collegata alle malattie trasmesse dai patogeni. Spesso, infatti, non si considera la possibilità che possano esserci diversi patogeni contemporaneamente e questo porta ad una sottostima della presenza di alcune specie. Inoltre, le zecche da noi campionate erano prevalentemente in forma ninfale, stadio noto per l'elevata trasmissione dei patogeni, questo a sottolineare come siano facilmente trasmissibili più patogeni contemporaneamente.

La specie che ha cross-reagito di più con tutte le altre è stata *B. garinii*, specialmente in relazione con *B. afzelii*. Queste due specie sono note in letteratura per essere sia le specie maggiormente presenti sul territorio, sia per dare spesso fenomeni di cross-reazione (Moutailler et al., 2016).

B. miyamotoi non cross-reagisce con nessuna specie ricercata, eccetto in alcuni campioni con *B. afzelii*. Questo fondamentalmente accade perché il gene target *glpQ* è completamente assente nella *B. burgdorferi* sensu lato, riducendo le possibilità di cross-reazione. La cross-reazione con *B. afzelii* è una delle poche combinazioni presentate in letteratura con regolarità (Michelet et al., 2014), probabilmente perché causata da una contaminazione crociata nella preparazione dei chip oppure a causa del gene *flaB* altamente conservato tra le specie del genere *Borrelia*. Di conseguenza, le sequenze di primer disegnate per *B. afzelii* possono presentare omologia anche con le sequenze di *B. miyamotoi*, causando un riconoscimento parziale e una possibile amplificazione non specifica (Van Duijvendijk et al., 2016; Chiappa et al., 2022; Hoornstra et al., 2022)

Tra le *B. burgdorferi* sensu lato, spicca *B. lusitaniae* come la specie che crea meno cross-reazioni, probabilmente dovuto ai geni target di *B. lusitaniae* che hanno regioni nucleotidiche che differiscono dalle altre specie di *Borrelia* (Chiappa et al., 2022; Taylor et al., 2025). Questa bassa omologia riduce al minimo il legame dei primer alle specie non bersaglio, diminuendo l'amplificazione crociata; in più negli studi eseguiti su microfluidica viene spesso citato che alcune specie hanno pattern di esclusione reciproca per limiti tecnici dello strumento (Michelet et al., 2014).

La presenza di cross-reazioni, con l'identificazione di più specie all'interno dello stesso campione, è in accordo con studi condotti a livello europeo, i quali riportano tassi di cross-reazione compresi tra il 10% e il 30%. Queste complicano il processo diagnostico e possono influenzare sia la presentazione clinica che la risposta ai trattamenti.

I dati raccolti sottolineano l'urgenza di un monitoraggio costante dei vettori e della diffusione delle diverse specie di *Borrelia* spp. in Lombardia. L'ampia varietà di specie osservata evidenzia la necessità di adottare un approccio diagnostico integrato per garantire una gestione clinica adeguata.

Tra i campioni analizzati, 211 sono risultati positivi per *Rickettsia* spp. sia in Real-Time PCR che in microfluidica.

La differenza tra i valori di CT ottenuti tramite Real-Time PCR e quelli ottenuti con la microfluidica è statisticamente significativa con $t = 54.112$, $df = 209$, $p\text{-value} < 2.2 \cdot 10^{-16}$, con un intervallo di confidenza al 95% tra i valori 11.63 e 12.51.

Il calcolo del valore del p-value è pari a $6.67 \cdot 10^{-125}$, il che consente di rigettare l'ipotesi nulla; i risultati ottenuti attraverso l'utilizzo della microfluidica, dunque, si possono definire sistematici e non dovuti al caso.

Metodo	Media	Mediana	Deviazione standard	Numero campioni	T-test
Rickettsia spp	27.51	26.02	5.54	211	p value= $6.67 \cdot 10^{-125}$
Microfluidica	15.43	14.3	5.74	211	
Differenza	12,07	11.96	3.23	211	

Per analizzare graficamente le distribuzioni, è stato elaborato un boxplot (Figura 24):

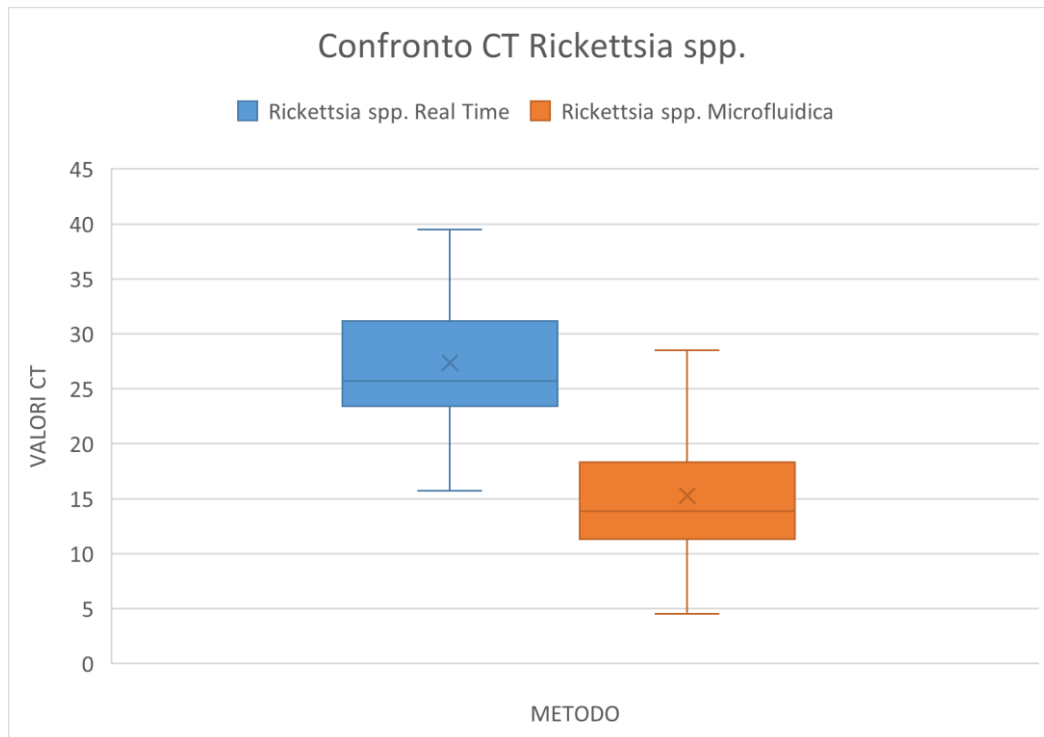


Figura 24 Boxplot "Confronto CT *Rickettsia* spp."

Dall'analisi del grafico emerge chiaramente che i valori di CT nella microfluidica risultino inferiori rispetto a quelli della Real-Time PCR, con un valore medio di 15 per la microfluidica e un valore medio di 27 per la Real-Time PCR. Questo conferma ulteriormente la maggiore sensibilità dello strumento utilizzato. Si osserva, infatti, che i valori di CT derivanti dalla microfluidica sono inferiori di quasi dieci unità. Tale risultato dimostra ancora una volta che la fase di pre-amplificazione riveste un'importanza fondamentale nella metodologia, poiché l'ulteriore amplificazione del materiale genetico consente di rilevare il DNA patogeno che, nella Real-Time PCR, potrebbe non essere identificato o risultare estremamente debole. Di conseguenza, si conferma che la microfluidica offre vantaggi sostanziali nella sensibilità di rilevamento.

Nei campioni risultati positivi per *Rickettsia* spp. (Figura 25), è stata osservata una prevalenza del 48% di *R. monacensis* e del 39% di *R. helvetica*, mentre la prevalenza di *R. slovacae* è risultata piuttosto bassa (1%), *R. massiliae* si colloca in un valore intermedio. *R. aeschlimannii* viene dichiarata completamente assente (0%) in quanto la sua rilevazione in microfluidica è dovuta al fenomeno delle cross-reazioni, dove prevalgono altre specie confermate dal sequenziamento.

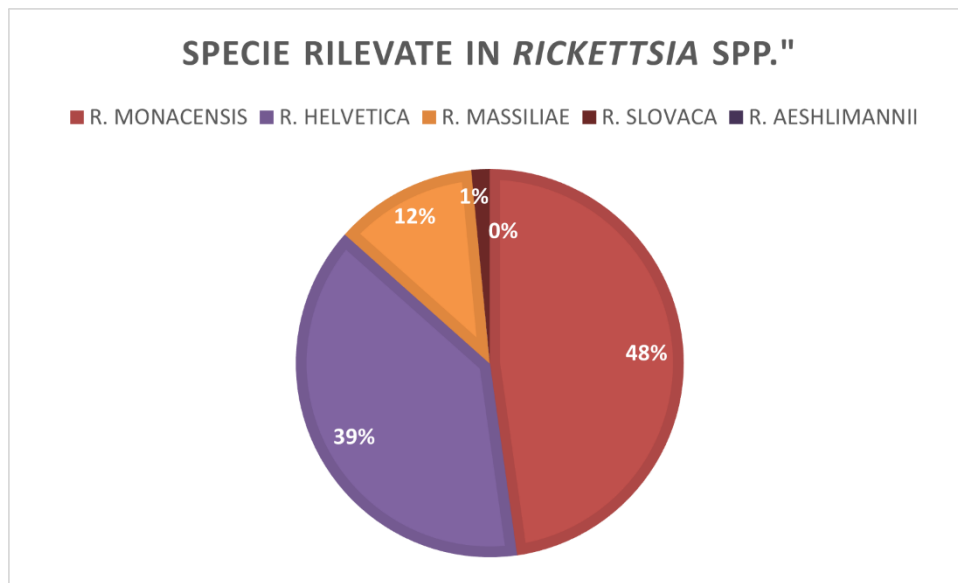


Figura 25 Grafico a torta "Specie rilevate in *Rickettsia* spp."

La significativa presenza di *R. monacensis* è supportata da ricerche condotte in Liguria e Trentino, mentre *R. helvetica*, sebbene meno comune, è frequentemente riportata in letteratura (Guardone et al., 2024).

Ciò è coerente con la distribuzione geografica delle due specie, in particolare *R. monacensis* viene comunemente citata nella letteratura in riferimento alla sua presenza nelle popolazioni di *I. ricinus* nell'Europa meridionale, tra cui emerge anche l'Italia (Cafiso et al., 2021; Silaghi et al., 2008).

Le elevate prevalenze sono correlate al genere di zecca da cui sono stati isolati i patogeni, ovvero *Ixodes ricinus*. È noto in letteratura che *R. monacensis* e *R. helvetica* sono i principali patogeni legati a rickettsiosi trasmessi da *I. ricinus* presente in Europa (Cafiso et al., 2021).

Questo genere è stato rinvenuto principalmente in forma di ninfa e femmina adulta, in accordo con il campionamento stagionale di queste ultime (primavera-estate), il che conferma la ciclicità delle zecche, già ampiamente descritta in precedenti paragrafi riguardanti *Borrelia* spp. Inoltre, la presenza di questi patogeni su ospiti come ungulati, tassi, cani, volpi ed esseri umani è in linea con i risultati ottenuti. Come già evidenziato, i campioni di zecche analizzati provengono da un campionamento sistematico condotto in ambienti naturali, il quale ha portato alla raccolta di zecche rimosse da esseri umani e animali, in particolare ungulati, tassi e cani, che sono noti per fungere da ospiti per le zecche della specie *I. ricinus* e sono spesso oggetto di campionamento da parte di cittadini e cacciatori.

La bassa prevalenza di *R. slovacca* sembra contraddire quanto riportato nella letteratura esistente, dove questa specie viene identificata con frequenza come predominante nell'Italia settentrionale, in particolare in Trentino, ma anche dominante in Liguria e nel nord-est del paese (Grassi et al., 2022). Tuttavia, *R. slovacca* è strettamente associata alla specie *Dermacentor marginatus*, come evidenziato in studi precedenti (Rubel et al., 2015). Analogamente ad altre Rickettsie, la sua replicazione avviene in quasi tutti gli organi del vettore, tra cui le ovaie, il che consente la trasmissione trans ovarica (Martello et al., 2013). Di conseguenza, le specie di *Dermacentor* fungono sia da vettori che da serbatoi del patogeno.

Nonostante numerosi studi evidenzino la presenza del genere *Dermacentor* in Italia, è fondamentale considerare la stagionalità di questa specie di zecca, la quale risulta attiva principalmente tra la fine dell'autunno e l'inizio della primavera (Oteo & Portillo, 2012). I campioni esaminati nel presente studio sono stati raccolti tra marzo e agosto, periodo in cui l'attività delle zecche è notevolmente ridotta. Tale osservazione è confermata dal fatto che nei campioni analizzati non sono state rinvenute zecche appartenenti al genere *Dermacentor*, in particolare *D. marginatus* positive per *Rickettsia* spp.

In aggiunta, è importante notare che il genere *Dermacentor* viene ripetutamente identificata in ospiti come i cinghiali (Garcia-Vozmediano et al., 2020), mentre i campioni da noi raccolti provengono principalmente da cervi, tassi, volpi, cani ed esseri umani. Questa discrepanza potrebbe rappresentare un ulteriore motivo per cui il campionamento non ha incluso *Dermacentor* spp., portando a una possibile sottostima della sua presenza e, di conseguenza anche di *R. slovacca*, nelle aree lombarde.

R. massiliae è spesso associata a *Rhipicephalus* spp. Il genere *Rhipicephalus* è comunemente noto anche come “zecca del cane” tanto è vero che i campioni analizzati sono stati prelevati quasi totalmente da cani. Nel nostro studio tutti i campioni provenienti da zecche del genere *Rhipicephalus*, sia femmine che maschi, sono risultati positivi a *R. massiliae*. Il risultato è in accordo con quanto riscontrato in letteratura, dove viene evidenziato che *R. massiliae* utilizza *Rhipicephalus* spp. come vettore (Guccione et al., 2021). È nota in letteratura che la stagionalità di *Rhipicephalus* varia biologicamente in base alle temperature e all’umidità (Dantas-Torres, 2008). Il picco di attività nei mesi primaverili ed estivi, specialmente in zone con un clima temperato come l’Italia, è in linea con il ritrovamento nei campioni prelevati nel nostro studio. La sua presenza nello stadio adulto durante il periodo di campionamento coincide con quanto riportato nella letteratura.

In relazione allo stadio vitale delle zecche rinvenute, anche in questo caso è presente una maggiore prevalenza di ninfe di *I. ricinus*. Spicca in modo già evidenziato la presenza di *Rhipicephalus* in fase adulta rispetto all’analisi eseguita sui campioni positivi a *Borrelia* spp. Il motivo è legato al patogeno di cui *Rhipicephalus* spp. è vettore, ovvero i patogeni del genere *Rickettsia*. È possibile dunque avvalersi della spiegazione legata alla stagionalità della zecca e al periodo di campionamento esercitato che comprende i mesi da marzo ad agosto. È nota la stagionalità della zecca *I. ricinus*, presente maggiormente in fase ninfale nei periodi primaverili ed inizio estate, periodo che combacia con i nostri risultati.

Anche nel caso dei campioni positivi a *Rickettsia* spp., sono stati riscontrati fenomeni di cross-reattività tra le specie. Questi fenomeni sono ben noti nella letteratura soprattutto a causa di primer abbondantemente conservati, il che significa che il tratto di DNA utilizzato come target per primer e sonde è quasi identico tra specie diverse non contenendo abbastanza polimorfismi per la distinzione specie specifica. Per *Rickettsia* spp. si usano ripetutamente geni come *gltA*, nonostante amplificano quasi tutti i ceppi senza rischiare falsi negativi. In Real-Time PCR non sempre è possibile discriminare efficacemente tra specie definibili altamente omologhe, tanto è vero che le specie che cross-reagiscono maggiormente nei nostri campioni risultano essere *R. slovacca* e *R. massiliae*, per le quali è nota la forte omologia nei geni usati comunemente per lo screening. È importante notare come però, in fase di sequenziamento, i campioni che presentano cross-reattività slovacca-massiliae, risultano sempre *R. massiliae* (Mum et al., 2008; Harrus et al., 2010). Questo è coerente con l’ecologia dei vettori in quanto, come già analizzato, *R. slovacca* è legata soprattutto a *Dermacentor* spp, non

rinvenuta nei nostri campioni positivi a *Rickettsia* spp., mentre *R. massiliae* è tipica di *Rhipicephalus*, specie riscontrata nei nostri campioni (Cicculli et al., 2019; Blanda et al., 2020; Marques et al., 2024).

Per quanto riguarda le altre specie, dal momento che le SFG condividono antigeni e regioni genomiche conservate, il fenomeno della cross-reattività per *R. aeschlimannii*, *R. massiliae*, *R. monacensis* e *R. helvetica* non fa eccezione e la specie viene definita solamente in fase di sequenziamento (Simser et al., 2002; Jansen et al., 2008; Michelet et al., 2014; Klitgaard et al., 2019).

Nonostante ciò, alcune specie non sono risultate mai presenti nello stesso campione: *R. monacensis*-*R. slovacca*, *R. helvetica*-*R. massiliae*-*R. slovacca*, *R. slovacca*-*R. aeschlimannii* (Pistone et al., 2017; Melis et al., 2023). La motivazione potrebbe essere il tipo di ospite a cui sono legate, se non vi è riscontro di *Dermacentor* spp nei campioni, mi aspetto di rilevare *R. slovacca* in quantità minime.

L'elevata specificità invece viene osservata nel ritrovamento di zecche positive a *R. helvetica* o *R. monacensis*, le due specie comuni presenti in *I. ricinus* (Pistone et al., 2017; Cafiso et al., 2021; Rosso et al., 2024). Probabilmente in questo caso le sonde e i primer sono progettati su posizioni variabili rendendo la PCR molto discriminante ed essendo specie di riferimento per i test, i primer e le sonde sono state ottimizzate e validate nel tempo rendendo le prestazioni più affidabili (Scarpulla et al., 2018; Daněk et al., 2024;).

5. CONCLUSIONI

In conclusione, l'impiego della microfluidica nell'analisi del DNA estratto da zecche presenta una sensibilità superiore, permettendo il rilevamento di DNA patogeno che viene indicato come assente o presente in quantità ridotte mediante tecniche come la Real-Time PCR, caratterizzate da valori di CT significativamente più elevati.

In aggiunta, questa metodologia mostra una specificità maggiore, permettendo l'identificazione immediata della specie patogena presente, a differenza delle tecniche tradizionali che si limitano a riconoscere solamente *B. afzelii* e *B. miyamotoi*, necessitando di sequenziamento per la conferma d'identità della specie.

La microfluidica si configura quindi come uno strumento di elevato impatto in ambito epidemiologico, poiché facilita la comprensione della distribuzione delle specie. In aggiunta fornisce un quadro chiaro della prevalenza delle specie patogene e delle fasi del ciclo vitale delle zecche.

In prospettiva, potrebbe diventare un metodo standard per indagini epidemiologiche su diversi patogeni, aumentando il numero di saggi per i target da analizzare. Tuttavia, il principale limite risiede nel disegno di saggi specifici, rendendo fondamentale l'impiego di primer progettati in modo più mirato per garantire una maggiore specificità, al fine di prevenire la rilevazione simultanea di più specie dovuto al fenomeno della cross-reazione.

BIBLIOGRAFIA

Accorsi, A., Schiavetti, I., Listorti, V., Dellepiane, M., Masotti, C., Ercolini, C., Guardone, L., & Razzuoli, E. (2022). Hard Ticks (Ixodidae) from Wildlife in Liguria, Northwest Italy: Tick Species Diversity and Tick-Host Associations. *Insects*, *13*(2), 199. <https://doi.org/10.3390/insects13020199>

Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (2008). Biology of ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*, *22*(2), 195–215. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.006>

Audino, T., Pautasso, A., Bellavia, V., Carta, V., Ferrari, A., Verna, F., Grattarola, C., Iulini, B., Pintore, M. D., Bardelli, M., Cassina, G., Tomassone, L., Peletto, S., Blanda, V., Torina, A., Caramelli, M., Casalone, C., & Desiato, R. (2021). Ticks infesting humans and associated pathogens: a cross-sectional study in a 3-year period (2017–2019) in northwest Italy. *Parasites & Vectors*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04603-x>

Beati, L., & Klompen, H. (2018). Phylogeography of Ticks (Acari: Ixodida). *Annual Review of Entomology*, *64*(1), 379–397. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043027>

Bertola, M., Montarsi, F., Obber, F., Da Rold, G., Carlin, S., Toniolo, F., Porcellato, E., Falcaro, C., Mondardini, V., Ormelli, S., & Ravagnan, S. (2021). Occurrence and Identification of *Ixodes ricinus* Borne Pathogens in Northeastern Italy. *Pathogens*, *10*(9), 1181. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091181>

Blanda, V., D'Agostino, R., Giudice, E., Randazzo, K., La Russa, F., Villari, S., Vullo, S., & Torina, A. (2020). New Real-Time PCRs to Differentiate *Rickettsia* spp. and *Rickettsia conorii*. *Molecules*, *25*(19), 4431. <https://doi.org/10.3390/molecules25194431>

Blanda, V., Torina, A., La Russa, F., D'Agostino, R., Randazzo, K., Scimeca, S., Giudice, E., Caracappa, S., Cascio, A., & De La Fuente, J. (2017). A retrospective study of the characterization of *Rickettsia* species in ticks collected from humans. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 8(4), 610–614. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.04.005>

Botelho-Nevers, E., Socolovschi, C., Raoult, D., & Parola, P. (2012). Treatment of *Rickettsia* spp. infections: a review. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10(12), 1425–1437. <https://doi.org/10.1586/eri.12.139>

Buczek, W., Koman-Izko, A., Buczek, A., Buczek, A., Bartosik, K., Kulina, D., & Ciura, D. (2020). Spotted fever group rickettsiae transmitted by *Dermacentor* ticks and determinants of their spread in Europe. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 27(4), 505–511. <https://doi.org/10.26444/aaem/120602>

Bunikis, J., Garpmo, U., Tsao, J., Berglund, J., Fish, D., & Barbour, A. G. (2004). Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. *Microbiology*, 150(6), 1741–1755. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26944-0>

Burgdorfer, W., & Brinton, L. P. (1975). MECHANISMS OF TRANSOVARIAL INFECTION OF SPOTTED FEVER RICKETTSIAE IN TICKS. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 266(1), 61–72. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb35088.x>

Cafiso, A., Olivieri, E., Floriano, A. M., Chiappa, G., Serra, V., Sasseria, D., & Bazzocchi, C. (2021). Investigation of Tick-Borne Pathogens in *Ixodes ricinus* in a Peri-Urban Park in Lombardy (Italy) Reveals the Presence of Emerging Pathogens. *Pathogens*, 10(6), 732. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060732>

Castro, L. R., Gabrielli, S., Iori, A., & Cancrini, G. (2015). Molecular detection of Rickettsia, Borrelia, and Babesia species in Ixodes ricinus sampled in northeastern, central, and insular areas of Italy. *Experimental and Applied Acarology*, 66(3), 443–452. <https://doi.org/10.1007/s10493-015-9899-y>

Chapman, A. S., Bakken, J. S., Folk, S. M., Paddock, C. D., Bloch, K. C., Krusell, A., Sexton, D. J., Buckingham, S. C., Marshall, G. S., Storch, G. A., Dasch, G. A., McQuiston, J. H., Swerdlow, D. L., Dumler, S. J., Nicholson, W. L., Walker, D. H., Eremeeva, M. E., & Ohl, C. A. (2006). Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis--United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. *PubMed*, 55(RR-4), 1–27. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16572105>

Chiappa, G., Perini, M., Cafiso, A., Nodari, R., Wilhelmsson, P., Lindgren, P., Omazic, A., Ullman, K., Moutailler, S., Kjellander, P., Bazzocchi, C., & Grandi, G. (2022). A Novel High Discriminatory Protocol for the Detection of Borrelia afzelii, Borrelia burgdorferi Sensu Stricto and Borrelia garinii in Ticks. *Pathogens*, 11(11), 1234. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111234>

Ciculli, V., Maestrini, O., Casabianca, F., Villechenaud, N., Charrel, R., De Lamballerie, X., & Falchi, A. (2019). Molecular Detection of Spotted-Fever Group Rickettsiae in Ticks Collected from Domestic and Wild Animals in Corsica, France. *Pathogens*, 8(3), 138. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030138>

Cinco, M., Padovan, D., Murgia, R., Poldini, L., Frusteri, L., Pol, I., Kruif, N. V., Rijpkema, S., & Maroli, M. (1998). Rate of infection of Ixodes ricinus ticks with Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borrelia garinii, Borrelia afzelii and group VS116 in an endemic focus of Lyme disease in Italy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 17(2), 90–94. <https://doi.org/10.1007/bf01682162>

Comstedt, P., Bergström, S., Olsen, B., Garpmo, U., Marjavaara, L., Mejlom, H., Barbour, A. G., & Bunikis, J. (2006). Migratory passerine birds as reservoirs of lyme borreliosis in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 12(7), 1087–1102. <https://doi.org/10.3201/eid1207.060127>

Comstedt, P., Jakobsson, T., & Bergström, S. (2011). Global ecology and epidemiology of *Borrelia garinii* spirochetes. *Infection Ecology & Epidemiology*, *1*(1), 9545. <https://doi.org/10.3402/iee.v1i0.9545>

Cupp, E. W. (1991). Biology of ticks. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, *21*(1), 1–26. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(91\)50001-2](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(91)50001-2)

Curto, P., Riley, S. P., Simões, I., & Martinez, J. J. (2019). Macrophages infected by a pathogen and a non-pathogen spotted fever group rickettsia reveal differential reprogramming signatures early in infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00097>

Daněk, O., Hrbatová, A., Volfová, K., Ševčíková, S., Lesiczka, P., Nováková, M., Ghodrati, S., Hrazdilova, K., Veneziano, V., Napoli, E., Otranto, D., Montarsi, F., Mihalca, A. D., Mechouk, N., Adamík, P., Modrý, D., & Zurek, L. (2024). Italian peninsula as a hybridization zone of *Ixodes inopinatus* and *I. ricinus* and the prevalence of tick-borne pathogens in *I. inopinatus*, *I. ricinus*, and their hybrids. *Parasites & Vectors*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06271-z>

Daniel, M., Malý, M., Danielová, V., Kříž, B., & Nuttall, P. (2015). Abiotic predictors and annual seasonal dynamics of *Ixodes ricinus*, the major disease vector of Central Europe. *Parasites & Vectors*, *8*(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1092-y>

Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, *152*(3–4), 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>

Dennis, D. T., & Hayes, E. B. (2002). Epidemiology of Lyme borreliosis. In *CABI Publishing eBooks* (pp. 251–280). <https://doi.org/10.1079/9780851996325.0251>

Estrada-Peña, A. (2001). Forecasting habitat suitability for ticks and prevention of tick-borne diseases. *Veterinary Parasitology*, 98(1–3), 111–132. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00426-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00426-5)

Estrada-Peña, A., Cutler, S., Potkonjak, A., Vassier-Tussaut, M., Van Bortel, W., Zeller, H., Fernández-Ruiz, N., & Mihalca, A. D. (2018). An updated meta-analysis of the distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in ticks in Europe. *International Journal of Health Geographics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12942-018-0163-7>

Garcia-Vozmediano, A., Giglio, G., Ramassa, E., Nobili, F., Rossi, L., & Tomassone, L. (2020). *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus*, and Their Infection by SFG Rickettsiae and Francisella-Like Endosymbionts, in Mountain and Periurban Habitats of Northwestern Italy. *Veterinary Sciences*, 7(4), 157. <https://doi.org/10.3390/vetsci7040157>

Gern, L. (2008). *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of Lyme borreliosis: life in the wilds. *Parasite*, 15(3), 244–247. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153244>

Gern, L., Estrada-Peña, A., Frandsen, F., Gray, J., Jaenson, T., Jongejan, F., Kahl, O., Korenberg, E., Mehl, R., & Nuttall, P. (1998). European Reservoir Hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralblatt Für Bakteriologie*, 287(3), 196–204. [https://doi.org/10.1016/s0934-8840\(98\)80121-7](https://doi.org/10.1016/s0934-8840(98)80121-7)

Grassi, L., Menandro, M. L., Cassini, R., Mondin, A., Pasotto, D., Grillini, M., Rocca, G., & Drigo, M. (2022). High Prevalence of Tick-Borne Zoonotic *Rickettsia slovaca* in Ticks from Wild Boars, Northeastern Italy. *Animals*, 12(8), 967. <https://doi.org/10.3390/ani12080967>

Guardone, L., Nogarol, C., Accorsi, A., Vitale, N., Listorti, V., Scala, S., Brusadore, S., Miceli, I. N., Wolfsgruber, L., Guercio, A., Di Bella, S., Grippi, F., Razzuoli, E., & Mandola, M. L. (2024). Ticks and Tick-Borne Pathogens: Occurrence and Host Associations over Four Years of Wildlife Surveillance in the Liguria Region (Northwest Italy). *Animals*, 14(16), 2377. <https://doi.org/10.3390/ani14162377>

Guccione, C., Colomba, C., Tolomeo, M., Trizzino, M., Iaria, C., & Cascio, A. (2021). Rickettsiales in Italy. *Pathogens*, *10*(2), 181. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020181>

Habálek, Z., & Halouzka, J. (1997). Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *European Journal of Epidemiology*, *13*(8), 951–957. <https://doi.org/10.1023/a:1007426304900>

Hanincova, K., Taragelova, V., Koci, J., Schäfer, S. M., Hails, R., Ullmann, A. J., Piesman, J., Labuda, M., & Kurtenbach, K. (2003). Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with Songbirds in Slovakia. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(5), 2825–2830. <https://doi.org/10.1128/aem.69.5.2825-2830.2003>

Harrus, S., Perlman-Avrahami, A., Mumcuoglu, K., Morick, D., & Baneth, G. (2010). Molecular detection of *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia sibirica mongolitimonae* and *Rickettsia conorii israelensis* in ticks from Israel. *Clinical Microbiology and Infection*, *17*(2), 176–180. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03224.x>

Hoornstra, D., Azagi, T., Van Eck, J. A., Wagemakers, A., Koetsveld, J., Spijker, R., Platonov, A. E., Sprong, H., & Hovius, J. W. (2022). Prevalence and clinical manifestation of *Borrelia miyamotoi* in Ixodes ticks and humans in the northern hemisphere: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Microbe*, *3*(10), e772–e786. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(22\)00157-4](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(22)00157-4)

Huppertz, H., & Girschick, H. (2016). Lyme borreliosis. In *Technical report* (pp. 465–469). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63596-9.00022-0>

Jansen, A., La Scola, B., Raoult, D., Lierz, M., Wichmann, O., Stark, K., & Schneider, T. (2008). Antibodies against *Rickettsia* spp. in Hunters, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, *14*(12), 1961–1963. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080229>

Jongejan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, *129*(S1), S3–S14. <https://doi.org/10.1017/s0031182004005967>

Klitgaard, K., Højgaard, J., Isbrand, A., Madsen, J. J., Thorup, K., & Bødker, R. (2019). Screening for multiple tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks from birds in Denmark during spring and autumn migration seasons. *Ticks and Tick-borne Diseases*, *10*(3), 546–552. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.01.007>

Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schäfer, S. M., Sewell, H., Brade, V., & Kraiczy, P. (2002). Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato – the key role of host complement. *Trends in Microbiology*, *10*(2), 74–79. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)02298-3](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02298-3)

Lindgren, E., & Jaenson, T. G. (2006). Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. *World Health Organization 2006*. https://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0006/96819/E89522.pdf

Linee guida per la diagnosi e il trattamento della malattia di Lyme. (n.d.). *Evidence 2018;10(9): E1000188*, e1000188. <https://doi.org/10.4470/E1000188>

MacConnachie, K., & Tishkowski, K. (2023, July 3). *Boutonneuse fever*. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560914/>

Mannelli, A., Bertolotti, L., Gern, L., & Gray, J. (2011). Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(4), 837–861. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00312.x>

Marques, H. G., Ribeiro, A. J., De Oliveira Alfenas Gadelha, A. K., Resende, C. a. A., Da Silva, D. R., De Deus, D. P. M., Barcelos, I. C. D. S., Pereira, I. M., De Paula, I. T. S., Da Silva Lopes, L., Silva, L. S., Da Paz Lopes, M. C., Chávez-Fumagalli, M. A., Coelho, E. a. F., Giunchetti, R. C., Gonçalves, A. a. M., & Galdino, A. S. (2024). Spotted fever diagnosis using molecular methods. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 57. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0226-2024>

Martello, E., Selmi, M., Ragagli, C., Ambrogi, C., Stella, M. C., Mannelli, A., & Tomassone, L. (2013). Rickettsia slovaca in immature Dermacentor marginatus and tissues from Apodemus spp. in the northern Apennines, Italy. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 4(6), 518–521. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.07.002>

Matuschka, F., Fischer, P., Musgrave, K., Richter, D., & Spielman, A. (1991). Hosts on Which Nymphal Ixodes ricinus Most Abundantly Feed. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44(1), 100–107. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.100>

Melis, S., Biffignandi, G. B., Olivieri, E., Galon, C., Vicari, N., Prati, P., Moutailler, S., Sassera, D., & Castelli, M. (2023). High-throughput screening of pathogens in Ixodes ricinus removed from hosts in Lombardy, northern Italy. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 15(1), 102285. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102285>

Mendoza-Roldan, J. A., Colella, V., Lia, R. P., Nguyen, V. L., Barros-Battesti, D. M., Iatta, R., Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2019). Borrelia burgdorferi (sensu lato) in ectoparasites and reptiles in southern Italy. *Parasites & Vectors*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3286-1>

Michelet, L., Delannoy, S., Devillers, E., Umhang, G., Aspan, A., Juremalm, M., Chirico, J., Van Der Wal, F. J., Sprong, H., Pihl, T. P. B., Klitgaard, K., BÅ,Dker, R., Fach, P., & Moutailler, S. (2014). High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00103>

Moutailler, S., Moro, C. V., Vaumourin, E., Michelet, L., Tran, F. H., Devillers, E., Cosson, J., Gasqui, P., Van, V. T., Mavingui, P., Vourc'h, G., & Vayssier-Taussat, M. (2016). Co-infection of ticks: The rule rather than the exception. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(3), e0004539. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004539>

Mum, A., Masala, G., Tola, S., Satta, G., Fois, F., Pirns, P., Rolain, J., Raoult, D., & Parola, P. (2008). First direct detection of rickettsial pathogens and a new rickettsia, “Candidatus Rickettsia barbariae”, in ticks from Sardinia, Italy. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*(11), 1028–1033. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02082.x>

Mysterud, A., Stigum, V. M., Jaarsma, R. I., & Sprong, H. (2019). Genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato detected in 16 mammal species and questing ticks from northern Europe. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41686-0>

Nava, S. (2009). An overview of systematics and evolution of ticks. *Frontiers in Bioscience*, *Volume*(14), 2857. <https://doi.org/10.2741/3418>

Nicholson, W. L., Allen, K. E., McQuiston, J. H., Breitschwerdt, E. B., & Little, S. E. (2010). The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends in Parasitology*, *26*(4), 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.007>

Olivieri, E., Rigamonti, S., Vicari, N., Bertoletti, I., Bianchi, A., Karaman, I., Lodola, C. M., Polonini, G., Grassi, A., Pesciaroli, M., Tranquillo, V., & Prati, P. (2025). Tick-borne pathogens in ticks removed from humans in Northern Italy, 2018-2023. *Acta Tropica*, 107582. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2025.107582>

Ortega, N., Arcenillas-Hernández, I., Villa, M., González, M., & Caro. (2024). Molecular identification of *Borrelia* and SFG *Rickettsia* spp. in hard ticks parasitizing domestic and wild animals in southeastern Spain. *Veterinary Research Communications*, *48*(3), 1785–1790. <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10292-x>

Oteo, J. A., & Portillo, A. (2012). Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3(5–6), 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.035>

Otranto, D., Dantas-Torres, F., Giannelli, A., Latrofa, M., Cascio, A., Cazzin, S., Ravagnan, S., Montarsi, F., Zanzani, S., Manfredi, M., & Capelli, G. (2014). Ticks infesting humans in Italy and associated pathogens. *Parasites & Vectors*, 7(1), 328. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-328>

Parola, P. (2004). Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 27(5), 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.006>

Parola, P., Paddock, C. D., & Raoult, D. (2005). Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 719–756. <https://doi.org/10.1128/cmr.18.4.719-756.2005>

Pintore, M. D., Ceballos, L., Iulini, B., Tomassone, L., Pautasso, A., Corbellini, D., Rizzo, F., Mandola, M. L., Bardelli, M., Peletto, S., Acutis, P. L., Mannelli, A., & Casalone, C. (2014). Detection of Invasive *Borrelia burgdorferi* Strains in North-Eastern Piedmont, Italy. *Zoonoses and Public Health*, 62(5), 365–374. <https://doi.org/10.1111/zph.12156>

Pistone, D., Pajoro, M., Novakova, E., Vicari, N., Gaiardelli, C., Viganò, R., Luzzago, C., Montagna, M., & Lanfranchi, P. (2017). Ticks and bacterial tick-borne pathogens in Piemonte region, Northwest Italy. *Experimental and Applied Acarology*, 73(3–4), 477–491. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0202-2>

Ragagli, C., Bertolotti, L., Giacobini, M., Mannelli, A., Bisanzio, D., Amore, G., & Tomassone, L. (2010). Transmission Dynamics of *Borrelia lusitaniae* and *Borrelia afzelii* Among *Ixodes ricinus*, Lizards, and Mice in Tuscany, Central Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(1), 21–28. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0195>

Raoult, D., & Parola, P. (2007). *Rickettsial diseases*. CRC Press.

Rauter, C., & Hartung, T. (2005). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies in *Ixodes ricinus* Ticks in Europe: a Metaanalysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7203–7216. <https://doi.org/10.1128/aem.71.11.7203-7216.2005>

Robinson, M. T., Satjanadumrong, J., Hughes, T., Stenos, J., & Blacksell, S. D. (2019). Diagnosis of spotted fever group *Rickettsia* infections: the Asian perspective. *Epidemiology and Infection*, 147. <https://doi.org/10.1017/s0950268819001390>

Roos, K. (2014). Lyme Disease. In *Elsevier eBooks* (p. 941). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385157-4.00361-4>

Rosso, F., Ferrari, G., Weil, T., Tagliapietra, V., Marini, G., Dagostin, F., Arnoldi, D., Girardi, M., & Rizzoli, A. (2024). Temporal Changes in Tick-Borne Pathogen Prevalence in Questing *Ixodes ricinus* Across Different Habitats in the North-Eastern Italian Alps. *MicrobiologyOpen*, 13(6). <https://doi.org/10.1002/mbo3.70010>

Rubel, F., Brugger, K., Pfeffer, M., Chitimia-Dobler, L., Didyk, Y. M., Leverenz, S., Dautel, H., & Kahl, O. (2015). Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* in Europe. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7(1), 224–233. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.10.015>

Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., & Oliver, J. H. (2011). Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2(3), 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.04.002>

Sala, V., & De Faveri, E. (2016). Epidemiology of lyme disease in domestic and wild animals. *The Open Dermatology Journal*, 10(1), 15–26. <https://doi.org/10.2174/1874372201610010015>

Santibáñez, S., Portillo, A., Santibáñez, P., Palomar, A. M., & Oteo, J. A. (2012). Usefulness of rickettsial PCR assays for the molecular diagnosis of human rickettsioses. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 31(5), 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.08.001>

Scarpulla, M., Barlozzari, G., Salvato, L., De Liberato, C., Lorenzetti, R., & Macrì, G. (2018). *Rickettsia helvetica* in Human-Parasitizing and Free-Living *Ixodes ricinus* from Urban and Wild Green Areas in the Metropolitan City of Rome, Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 18(8), 404–407. <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2235>

Selmi, M., Bertolotti, L., Tomassone, L., & Mannelli, A. (2008). *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor marginatus* and Tick-borne Lymphadenopathy, Tuscany, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 14(5), 817–820. <https://doi.org/10.3201/eid1405.070976>

Silaghi, C., Gilles, J., Höhle, M., Pradel, I., Just, F. T., Fingerle, V., Küchenhoff, H., & Pfister, K. (2008). Prevalence of Spotted Fever Group *Rickettsiae* in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Southern Germany. *Journal of Medical Entomology*, 45(5), 948–955. <https://doi.org/10.1093/jmedent/45.5.948>

Simser, J. A., Palmer, A. T., Fingerle, V., Wilske, B., Kurtti, T. J., & Munderloh, U. G. (2002). *Rickettsia monacensis* sp. nov., a Spotted Fever Group *Rickettsia*, from Ticks (*Ixodes ricinus*) Collected in a European City Park. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4559–4566. <https://doi.org/10.1128/aem.68.9.4559-4566.2002>

Smith, R. P., Schoen, R. T., Rahn, D. W., Sikand, V. K., Nowakowski, J., Parenti, D. L., Holman, M. S., Persing, D. H., & Steere, A. C. (2002). Clinical Characteristics and Treatment Outcome of Early Lyme Disease in Patients with Microbiologically Confirmed Erythema Migrans. *Annals of Internal Medicine*, 136(6), 421. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-136-6-200203190-00005>

Socolovschi, C., Mediannikov, O., Raoult, D., & Parola, P. (2009). The relationship between spotted fever group *Rickettsiae* and Ixodid ticks. *Veterinary Research*, 40(2), 34. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009017>

Sojka, D. (2015). Book review: Sonenshine D.E. & Roe R.M. 2013: *Biology of Ticks*. 2nd ed. *European Journal of Entomology*, 112(3). <https://doi.org/10.14411/eje.2015.069>

- Spernovasilis, N., Markaki, I., Papadakis, M., Mazonakis, N., & Ierodiakonou, D. (2021). Mediterranean spotted fever: current knowledge and recent advances. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 6(4), 172. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6040172>
- Stanek, G., Satz, N., Strle, F., & Wilske, B. (1993). Epidemiology of Lyme Borreliosis. In *Springer eBooks* (pp. 358–370). https://doi.org/10.1007/978-3-642-77614-4_29
- Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J., & Strle, F. (2011). Lyme borreliosis. *The Lancet*, 379(9814), 461–473. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)60103-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(11)60103-7)
- Steere, A. C., Coburn, J., & Glickstein, L. (2004). The emergence of Lyme disease. *Journal of Clinical Investigation*, 113(8), 1093–1101. <https://doi.org/10.1172/jci21681>
- Strnad, M., Hönig, V., Růžek, D., Grubhoffer, L., & Rego, R. O. M. (2017). Europe-Wide Meta-Analysis of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Prevalence in Questing *Ixodes ricinus* Ticks. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(15). <https://doi.org/10.1128/aem.00609-17>
- Taylor, A. D., Trzebny, A., Łośko, M., Michalik, J. F., & Dabert, M. (2025). A novel FLAB Gene-Based profiling approach for the rapid and accurate detection of borreliella and borrelia species in ticks. *Pathogens*, 14(5), 506. <https://doi.org/10.3390/pathogens14050506>
- Tilly, K., Rosa, P. A., & Stewart, P. E. (2008). Biology of Infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), 217–234. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.013>
- Trevisan, G., Ruscio, M., Cinco, M., Nan, K., Forgione, P., Di Meo, N., Tranchini, P., Nacca, M., Trincone, S., Rimoldi, S. G., Giacomet, V., Ricci, M., Melandri, D., Artioli, S., Monteforte, P., Stinco, G., & Bonin, S. (2023). The history of Lyme disease in Italy and its spread in the Italian territory. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1128142>

Van Duijvendijk, G., Coipan, C., Wagemakers, A., Fonville, M., Ersöz, J., Oei, A., Földvári, G., Hovius, J., Takken, W., & Sprong, H. (2016). Larvae of *Ixodes ricinus* transmit *Borrelia afzelii* and *B. miyamotoi* to vertebrate hosts. *Parasites & Vectors*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1389-5>

Varma, M. (1999). The ticks of the world. Nomenclature, described stages, hosts, distribution (acarida, ixodida). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(2), 223. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(99\)90317-6](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(99)90317-6)

Wolcott, K. A., Margos, G., Fingerle, V., & Becker, N. S. (2021). Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: A review. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 12(5), 101766. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101766>