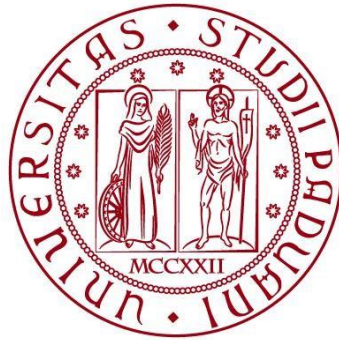


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

Virus emergenti trasmessi dalle zecche

Tutor: Prof. Cristiano Salata
Dipartimento di Medicina Molecolare

Laureanda: Sara Gueli Alletti

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

Indice

1. Abstract.....	1
2. Stato dell'arte	1
2.1 Distribuzione globale dei TBV	2
2.2 TBV in circolazione in Anatolia.....	4
3. Approccio sperimentale	7
4. Risultati e discussione.....	9
4.1 Limiti metodologici dello studio	10
5. Caso clinico: Individuazione di TcTV-1	11
5.1 Individuazione di TcTV-1 tramite LAMP	13
6. Caso clinico: Individuazione di TcTV-2	15
7. Conclusioni	16
7.1 Limiti della diagnosi e terapia delle infezioni da TBV	17
7.2 Impatto del cambiamento climatico e delle attività umane	18
8. Bibliografia	20

1. Abstract

Il seguente elaborato si pone l'obiettivo di fornire un quadro generale dei virus trasmessi dalle zecche (TBV) attualmente in circolazione, prestando un focus particolare sul territorio dell'Anatolia.

Quest'ultima mostra una eccezionale diversità di specie di vettori e patogeni da essi trasmessi, in quanto è caratterizzata da diverse zone climatiche e rappresenta un punto di incontro delle rotte migratorie degli uccelli.

Nello specifico vengono trattati due virus emergenti: Tacheng Tick Virus 1 (TcTV-1) e Tacheng Tick Virus 2 (TcTV-2), con presentazione di rispettivi casi clinici e metodi di diagnosi. Per TcTV-1 viene anche illustrato un metodo di rilevazione alternativo, che sfrutta l'amplificazione isotermica LAMP.

Dall'analisi dei dati emergono delle criticità riguardo ai metodi di diagnosi delle infezioni da TBV, sottolineando la necessità di sviluppare dei metodi per la rilevazione molecolare accessibili, semplici ed accurati.

Infine, viene affrontato il tema del cambiamento climatico e delle attività umane nel favorire la proliferazione delle zecche e il loro espandersi negli ambienti antropici.

2. Stato dell'arte

Le zecche sono artropodi ematofagi obbligati, che tipicamente vivono come esoparassiti sugli animali da allevamento e selvatici in quasi tutte le regioni del mondo. Dopo le zanzare sono i secondi più importanti vettori di patogeni, quali virus, batteri e protozoi, causando diverse manifestazioni cliniche negli animali e nell'uomo.

Le zecche sono dei vettori efficaci grazie ad una serie di caratteristiche biologiche uniche¹. Una di queste è la loro longevità (circa 2-3 anni), che permette loro di rimanere infette anche per l'intera esistenza, mantenendo il patogeno tramite la trasmissione trans-stadiale.

Un'altra peculiarità è l'ematofagia in ogni fase post-embrionale, unita ai lunghi periodi di alimentazione, che aumentano la probabilità della zecca di acquisire il patogeno. L'acquisizione naturale del patogeno avviene quando una zecca si nutre su un ospite vertebrato infetto o si nutre insieme a zecche infette su un ospite suscettibile non infetto.

¹ Mária Kazimírová, Saravanan Thangamani, Pavlína Bartíková, Meghan Hermance, Viera Holíková, Iveta Štibrániová, Patricia A Nuttall (2017), "Tick-Borne Viruses and Biological Processes at the Tick-Host-Virus Interface", *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 26 July 2017, Sec. Parasite and Host Volume 7 – 2017

Una volta acquisito, il patogeno entra nell'intestino medio dove replica, poi si diffonde nell'emolinfa ed infetta diversi tessuti, tra cui le ghiandole salivari, dove viene ulteriormente amplificato e reso disponibile alla trasmissione nel pasto successivo.

Per superare la prima barriera di difesa dell'ospite, la zecca inietta una miscela di sostanze, quali: inibitori del dolore e del prurito; anticoagulanti e antiaggreganti piastrinici; vasodilatatori; immunomodulatori, per reprimere la risposta immunitaria. La composizione della saliva delle zecche varia durante il pasto di sangue e anche in base all'ospite.

Per poter sopravvivere e proliferare all'interno del vettore, il patogeno deve eludere il sistema immunitario della zecca, superando barriere di difesa quali: fagocitosi da parte degli emociti, i peptidi antimicrobici (nel caso di infezione batterica) e RNA interferenti (in particolare nel caso delle infezioni virali).

Nonostante l'elevata capacità vettoriale delle zecche in generale, l'associazione tra una specie di zecca e un virus da esse trasmesso è molto specifica: si stima, infatti, che meno del 10% delle specie di zecche conosciute siano vettori competenti di virus. Tali specie appartengono ai generi di grandi dimensioni, ovvero le zecche molli dei generi *Ornithodoros*, *Carios* e *Argas*, e le zecche dure dei generi *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus*.

La coevoluzione biologica tra tali specie di vettori e i patogeni veicolati ha favorito l'insorgere di un numero sempre crescente di patologie ad impatto umano e veterinario. L'interesse verso le TBDs, ovvero *tick-borne diseases*, letteralmente "malattie trasmesse dalle zecche", è aumentato negli ultimi tre decenni, grazie alla progressiva identificazione di numerosi virus emergenti.

Vengono classificati come "virus emergenti" trasmessi dalle zecche quelli che non sono stati riconosciuti o descritti nella letteratura scientifica prima del 1990.

Dei molti TBV recentemente identificati, mancano informazioni cruciali riguardo la distribuzione geografica completa e il rischio di causare zoonosi. Uno dei fattori più pericolosi di questi virus è la capacità di *spillover*, quindi di fare un salto di specie all'uomo, prelieve condizioni ecologiche e genomiche favorevoli.

Per comprendere l'entità della minaccia zoonotica, è necessario analizzare in modo quantitativo la presenza e distribuzione dei virus emergenti su scala globale.

2.1 Distribuzione globale dei TBV

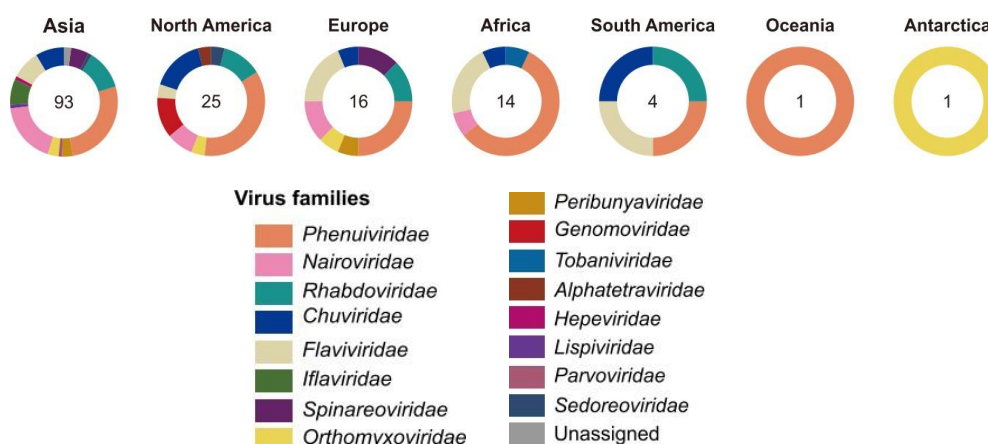
In questo studio², tramite consultazione di differenti database (PMC, WOS, PubMed e CNKI), sono stati identificati 230 TBV che rispondono ai criteri di virus emergenti. Dal punto di vista della struttura genomica i 230 virus sono così suddivisi: 186 sono a singolo filamento di RNA; 12 sono a doppio filamento di RNA; 32 sono a singolo filamento di DNA.

Le 5 famiglie virali maggiormente riscontrate in zecche, animali ed esseri umani sono: *Flaviviridae*, *Nairoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Chuviridae* e *Phenuiviridae*.

Tra le diverse specie vettrici alcune sono state identificate come “super-carriers”, tra cui rientrano: *Haemaphysalis longicornis* (47 TBVs), *Dermacentor silvarum* (30 TBVs), *Ixodes persulcatus* (30 TBVs), *Dermacentor nuttalli* (25 TBVs) e *Hyalomma marginatum* (20 TBVs).

Dei TBV emergenti finora identificati, 19 sono stati categorizzati come agenti infettivi nell’uomo, appartenenti prevalentemente alle famiglie *Nairoviridae* e *Flaviviridae*. I successivi approfondimenti molecolari tramite PCR/RT-PCR hanno delineato una ampia distribuzione geografica, confermando la presenza di 131 virus in 37 paesi diversi:

- 93 TBV sono stati identificati in 14 regioni dell’Asia
- 25 TBV appartengono esclusivamente al Nord America
- 16 TBV sono stati identificati in 11 stati europei
- 14 TBV sono esclusivi di 6 stati africani
- 4 TBV sono stati identificati in 3 paesi del Sud America
- 1 TBV è stato identificato in Australia
- 1 TBV è stato identificato in Antartica



Distribuzione globale dei TBV emergenti dal 1990 al 2024

Dei 19 TBV patogenici per l’uomo si è notata una distribuzione geografica limitata, ad eccezione di SFTSV (*Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus*), che mostra invece un’ampia diffusione nel continente asiatico. Per quanto riguarda la trasmissione all’uomo, il genere di zecca che più spesso è risultato essere un carrier di TBV patogenici per l’uomo è *Rhipicephalus*.

² Mei-Qi Zhang, Jing Li, Xiao-Long Lv, Simon I. Hay, Li-Qun Fang, Wei Liu (2026), “The diversity of emerging tick-borne viruses globally: From discoveries to zoonotic risk assessment”. Med Volume 7, Issue 3, 13 March 2026

È stato osservato che la famiglia *Flaviviridae* è quella con il maggior range di ospiti, quindi la sua capacità di infettare diversi vettori e animali può rappresentare un più elevato rischio di *spillover* nell'uomo.

Non sorprende che la maggior parte dei virus patogeni per l'uomo siano a RNA a singolo filamento, in quanto sono quelli maggiormente proni a mutazione³. Ci sono molteplici spiegazioni per questo fenomeno: in primo luogo manca la riparazione post-replicativa. Se questo sistema funziona bene per virus a doppio filamento di DNA, per i virus a RNA i sistemi cellulari di correzione degli errori non sono disponibili nella cellula ospite. L'unico momento in cui può avvenire la correzione del genoma a RNA è solo durante la copiatura del genoma stesso.

In secondo luogo, manca l'attività di *proof-reading*, ovvero un'attività di esonucleasi 3'→5' che corregge gli errori della polimerasi. Questo elemento strutturale è stato trovato solo nei coronavirus, che hanno genomi notevolmente più grandi rispetto a quelli di altri virus con genoma ad RNA.

Quindi, per la maggior parte dei virus ad RNA a singolo filamento, manca una correzione dell'errore sia durante che dopo la replicazione. Ciò comporta dei tassi di mutazione compresi nell'intervallo di 10^{-3} a 10^{-6} mutazioni incorporate per nucleotide copiato.

L'ampio tasso di mutazione si può correlare ad un maggior rischio di adattamento del virus ad un nuovo ospite, quindi di un possibile *spillover*. Tali fenomeni sono particolarmente accentuati in aree geografiche poste all'incrocio di diverse nicchie ecologiche e rotte migratorie, rendendo territori come la penisola anatolica uno degli *hotspot* epidemiologici più importanti a livello globale per la trasmissione di TBV.

2.2 TBV in circolazione in Anatolia

Localizzata nella zona del Paleartico, l'Anatolia occupa la porzione occidentale dell'Asia, costituendo una penisola tra il bacino del Mediterraneo e le regioni del Caucaso e del Medio Oriente⁴. Le catene montuose del Ponto a nord e del Tauro a sud costituiscono dei corridoi per le rotte migratorie degli uccelli, che possono seguire percorsi costieri evitando il mare aperto.

Essendo una regione cruciale per le rotte migratorie, l'Anatolia manifesta uno stretto legame con la diffusione di virus trasmessi da vettori tra i continenti del Vecchio Mondo.

³ Esteban Domingo, Carlos García-Crespo, Rebeca Lobo-Vega, Celia Perales (2021), "Mutation Rates, Mutation Frequencies, and Proofreading-Repair Activities in RNA Virus Genetics", *Viruses* 2021, 13, 1882

Gli uccelli migratori agiscono come dei veicoli di dispersione passiva per le zecche infette, che possono essere trasportate anche per migliaia di chilometri. Parallelamente, la concentrazione di diverse specie aviarie in territori circoscritti favorisce l'introduzione di nuovi ceppi virali e lo scambio di patogeni tramite *co-feeding* tra zecche che si nutrono simultaneamente sullo stesso ospite. La fauna ricca di vettori ed ospiti di amplificazione è sostenuta dalle condizioni climatiche ed ecologiche eterogenee dell'Anatolia. In questo contesto, l'agente infettivo endemico trasmesso da zecche storicamente più rilevante in Turchia è il CCHFV (virus della febbre emorragica Crimea-Congo), per cui sono stati registrati casi di infezione umana con costante incidenza annuale. Tuttavia, le recenti analisi metagenomiche condotte sul viroma delle zecche locali, hanno fatto emergere la presenza di altri virus ad alto potenziale zoonotico, quali JMTV e TcTV-2.

JMTV (*Jingmen Tick Virus*): isolato per la prima volta nel 2010 in Jingmen (Cina) e successivamente segnalato in Turchia e molti altri paesi, appartiene alla famiglia *Flaviviridae*. Presenta un genoma a RNA lineare segmentato, in cui sono presenti 4 segmenti: S1, S2, S3, S4. I segmenti S1 e S3 codificano proteine non strutturali (NSP1 e NSP2), geneticamente correlate alle proteine non strutturali (NS3 e NS5) dei flavivirus classici della famiglia *Flaviviridae*, mentre i segmenti S2 e S4 sono unici per il JMTV.

Il virus è stato rilevato più frequentemente nella zecca *Rhipicephalus microplus* e ha dimostrato di possedere un ampio spettro d'ospite, infettando animali domestici, selvatici e primati. Questa proprietà ne evidenzia un elevato potenziale zoonotico⁵, confermato dalla registrazione di diversi casi d'infezione umana.

Nei quattro pazienti infetti da JMTV in Cina i sintomi sono stati un'escara pruriginosa o dolorosa nel sito di puntura della zecca, con linfadenopatia, cui è seguito uno stato infiammatorio locale, reso manifesto dall'infiltrazione di neutrofili. Otto pazienti, identificati tramite test sierologici, hanno mostrato manifestazioni più gravi.

TcTV-2 (Tacheng tick virus-2): isolato per la prima volta nel 2019 nella Cina nord-occidentale, è stato successivamente rilevato in zecche del Kazakistan, Romania, Turchia, Polonia, Ucraina e Georgia. Appartiene al genere *Uukuvirus* della famiglia *Phenuviridae* e il suo genoma è a RNA a singolo filamento, composto da due segmenti: L e S. Ad oggi non è stato identificato il segmento M.

⁴ I dati e le informazioni riportati in questo paragrafo sono tratti e rielaborati dallo studio di Dinçer E, Timurkan MÖ, Oğuz B, Şahindokuyucu İ, Şahan A, Ekinci M, et al. (2022) : "Several tick-borne pathogenic viruses in circulation in Anatolia, Turkey", Vector-Borne And Zoonotic Diseases Volume 22, Number 2, 2022

⁵ Heng Rong, Zhiming Wu, Kangchen Zhao, Ying Ding, Shuang Ning, Yong Tian, Xiang Wang, Qing Qiao, Xiang Zhu, Tao Wu, Yanyan Ge, Hong Chu, Lunbiao Cui (2025), "Identification and characterization of Jingmen tick virus in Jiangsu, China", Virology Journal, Vol 22, article number 372, 12 November 2025

Il segmento L è a polarità negativa e codifica la RNA polimerasi RNA-dipendente. Il segmento S codifica due proteine in direzioni opposte: la nucleoproteina con orientamento a polarità negativa, mentre la proteina non strutturale NS5 è codificata con orientamento a polarità positiva.

Non sono ancora stati riconosciuti nei pazienti dei sintomi specifici nell'infezione da TcTV-2. Di solito, infatti, l'infezione è accompagnata da mal di testa, febbre, astenia, vomito, mialgia, eruzione cutanea e segni simil-meningitici.

Un paziente in Cina, infettato da TcTV-2, ha manifestato un rash localizzato a livello del sito di morso, con leggero dolore⁶. Ha poi sviluppato brividi, spossatezza estrema, mal di testa, inappetenza, nausea, vomito. Nei giorni seguenti si è manifestato un eritema nel sito di morso e rigidità del collo.

Sebbene nel presente studio non sia stato possibile isolare **TcTV-1** (Tacheng tick virus-1), la sua precedente identificazione in Anatolia ne conferma il rilevante potenziale zoonotico.

Isolato per la prima volta in Cina da *Dermacentur marginatus*, il virus appartiene alla famiglia *Nairoviridae*, nello specifico è un sierotipo del *Tamdy orthonairovirus*. Presenta un genoma a RNA a singolo filamento a polarità negativa, composto dal segmento S (piccolo), medio (M) e grande (L).

La capacità di infettare la specie umana è stata documentata da una paziente in Cina⁷, che in seguito al morso di zecca, ha manifestato un ingrossamento locale e dolorante nel sito di morso, che si è ulteriormente ingrandito, rilasciando anche secrezioni purulente. Si sono poi manifestati febbre e rash cutanei sugli arti che diffondevano gradualmente nel corpo, senza manifestazioni emorragiche o essudative, ma solo pruriginose.

Nel complesso, lo studio svolto in Anatolia pone l'obiettivo di fare uno screening sistematico dei TBV emergenti, già descritti come causa di infezione umana, e dei virus patogeni già noti.

L'intento è delineare un quadro il più completo possibile dei virus presenti nella regione, comprendere le dinamiche di trasmissione tra le specie animali coinvolte nella circolazione virale e identificare quelli a maggior rischio zoonotico.

⁶ Zhihui Dong, Meihua Yang, Zedong Wang, Shuo Zhao, Songsong Xie, Yicheng Yang, Gang Liu, Shanshan Zhao, Jing Xie, Quan Liu, Yuanzhi Wang. (2021), "Human Tacheng Tick Virus 2 Infection, China, 2019", *Emerging Infectious Diseases* Vol. 27 No. 2, February 2021

⁷ Ender Dincer, Mehmet Ozkan Timurkan, Deniz Yalcinkaya, Olcay Hekimoglu, Mehmet Berat Nayır, Tugce Zeynep Sertkaya, and Tarkan Yorulmaz (2023), "Molecular Detection of Tacheng Tick Virus-1 (TcTV-1) and Jingmen Tick Virus in Ticks Collected from Wildlife and Livestock in Turkey: First Indication of TcTV-1 Beyond China", *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*, Volume 23, Number 8, 2023

3. Approccio sperimentale

a. Campionamento

Il monitoraggio dei TBV in Anatolia è iniziato con il campionamento delle zecche nelle province di Çankırı, Kayseri e Konya, nell'Anatolia centrale; a İzmir e Kütahya, nella regione dell'Egeo; ad Antalya e Burdur, nella regione mediterranea; a Malatya e Bingöl, nell'Anatolia orientale; e ad Adıyaman e Şanlıurfa, nell'Anatolia sud-orientale, durante il periodo 2020–2021.

Le zecche adulte sono state rimosse da animali infestati, quali bovini (*bos taurus*), ovini (*ovis aries*), cani (*canis familiaris*) e gatti (*felis catus domesticus*). Gli artropodi sono stati identificati morfologicamente a livello di genere e specie, e poi divisi in diversi pool di 1-15 individui (in base al sito di raccolta) e conservati a -80°C.

I pool sono stati omogeneizzati mediante vortex con perline di carburo di tungsteno o acciaio inossidabile in 500–700 µL di terreno Eagle's Minimum Essential Medium, supplementato con siero fetale bovino al 5%, per favorire il mantenimento dell'integrità dei virus.

Dopo una centrifugazione di 4 minuti a 4000 rpm, gli acidi nucleici sono stati purificati dal surnatante utilizzando l'High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania), seguita dalla sintesi del DNA complementare (cDNA) con esameri casuali, mediante il RevertAid First-Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Hennigsdorf, Germania).

b. Screening virale

Per lo screening è stata utilizzata una selezione di test basati sulla PCR, mirati ai principali gruppi di virus patogeni trasmessi dalle zecche.

Per gli *orthonairovirus* è stata utilizzata una PCR a singolo ciclo con primer mirati al motivo centrale A della RNA polimerasi RNA-dipendente, localizzata sul segmento L. Una serie di virus appartenenti al genere *orthonairovirus* e rilevabili con questo test sono: CCHFV e il virus della malattia ovina di Nairobi, i virus Qalyub, Bandia, Raza, Farallon, Punta Salinas, Abu Hammad, Abu Mina, Hazara, Dugbe, Erve e Tillamook.

Lo screening di *flavivirus* nelle zecche è stato effettuato tramite un test pan-virus che incorpora primer degenerati, con target la regione conservata NS5. Questo test amplifica tutti i principali *flavivirus* patogeni trasmessi da zecche e zanzare, come il virus del Nilo occidentale (WNV), virus della dengue, virus della febbre gialla, virus dell'encefalite di Murray Valley, virus dell'encefalite di Saint Louis e virus Usutu.

Nel caso degli *orthonairovirus* l'elevata omogeneità di sequenza consente l'uso di primer mirati, per avere la massima sensibilità e specificità. Nei *flavivirus*, invece,

la proteina non strutturale NS5 mostra alta divergenza nucleotidica tra le specie, dovuta soprattutto a mutazioni sinonime del terzo residuo del codone; quindi, la miscela di primer degenerati copre tutte le possibili varianti nucleotidiche della regione conservata di NS5.

I virus trasmessi dalle zecche di recente scoperta sono stati analizzati singolarmente, tramite nested (RT-)PCR.

Il target per identificare JMTV è la proteina NS5-simile (nel segmento 1); per identificare TcTV-1 e TcTV-2 sono stati usati come target le rispettive proteine del nucleocapside a livello del segmento S.

Assay	Primer sequence (5'-3')	Target	Position	Product (bp)
Pan-naïrovirus	ATGATTGCAAYAGIAAYTTYAA ACAGCARTGIATIGGICCCCAATT	Segment L RdRp	6920-6942 7408-7385	489 ^a
Pan-flavivirus (nested)	GCATCTAYAWCAYNATGGG (outer) CCANACNYNRTTCCANAC (outer) GCNATNTGGTWYATGTGG (inner) CATRTCTTCNGTNGTCATCC (inner)	NS5 protein	9035-9053 10,146-10,129 9103-9120 10,122-10,103	1112 ^a 1020
JMTV (nested)	TGGCGATAAATAGGAGAGGTGCCAT (outer) TCTGCGTAGAGTCGGTAGAGGTGGTG (outer) GGACTGGAGACAAGACGTCAACACG (inner) CGCCATTCTTCATCCTCCGCTAG (inner)	Segment 1 NS5-like protein	1446-1471 1957-1932 1529-1553 1922-1899	512 ^b 394
Tacheng tick virus 1 (nested)	CGGCTCAGTGTATATCCC (outer) GTTGACCTCAGCGGTGTG (outer) CTTCTCACTTTCTCGGATGCTT (inner) TTCTTTTAGTGCTTCGTAGTT (inner)	Segment S Nucleocapsid protein	149-166 571-554 218-239 545-524	423 ^b 328
Tacheng tick virus 2 (nested)	ATCTCTCAACGGCAACTAT (outer) GACATGCGGTTCTTCATTTT (outer) TCAACGGCAACTATGAGGAT (inner) CTGGCTGTATTGGAAGGAC (inner)	Segment S Nucleocapsid protein	359-379 812-793 365-384 616-597	454 ^b 252

PCR assays usati per fare lo screening virale

I tipi di controlli positivi usati sono stati:

- Per *orthonaïrovirus* il ceppo noto CCHFV Ank-2
- Per *flavivirus* il ceppo TBEV Hypr
- Per virus specifici come JMTV, TcTV-1 e TcTV-2 sono stati usati dei pool di zecche risultati positivi precedentemente

Come controllo negativo è stata usata acqua priva di nucleasi, aggiunta alla miscela di reazione al posto dell'estratto RNA/cDNA del campione, per verificare l'assenza di contaminazioni.

c. Sequenziamento e analisi filogenetica

I prodotti di amplificazione in ciascun test sono stati purificati usando il kit PureLink PCR Purification (Thermo Fisher Scientific).

Per il sequenziamento sono stati utilizzati un analizzatore genetico ABI PRISM 3500xL Dx (Thermo Fisher Scientific) e il kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific). Geneious (versione 11.1.5) è stato utilizzato per l'elaborazione dei dati di sequenza grezzi.

Successivamente sono state fatte delle ricerche di similarità nel database NCBI, tramite gli algoritmi BLASTn e MEGABLAST.

CLUSTAL W è stato utilizzato per gli allineamenti nucleotidici delle sequenze

amminoacidiche dedotte.

MEGA X è stato usato per stimare il modello di sostituzione ottimale sui singoli allineamenti e per costruire alberi filogenetici e ricostruire la dinamica evolutiva del virus.

L'insieme degli approcci molecolari e bioinformatici presentati ha permesso di analizzare in modo dettagliato il materiale biologico raccolto, valutando la diffusione e variabilità genetica dei virus dei campioni, i cui esiti sono presentati e discussi di seguito.

4. Risultati e discussione

Nel complesso il monitoraggio ha interessato un totale di 901 esemplari di zecche, appartenenti a 6 specie, prelevate da animali domestici provenienti da 11 province in 5 regioni distinte dell'Anatolia. I campioni sono risultati così distribuiti dal punto di vista geografico: Anatolia sud-orientale: 272 esemplari (30,2%); Regione mediterranea: 222 esemplari (24,6%); Anatolia centrale: 167 esemplari (22,4%); Regione dell'Egeo: 167 esemplari (18,5%); Anatolia orientale: 38 esemplari (4,2%). Delle 6 specie di zecche distinte, il complesso *Rhipicephalus sanguineus* ($n = 397$; 44,1%) è risultato il più abbondante, seguito da *Rhipicephalus bursa* ($n = 345$; 38,3%), *Haemaphysalis parva* ($n = 65$; 7,2%) e altre specie meno rappresentate (10,4%).

Gli esemplari sono stati raccolti in 158 pool ed analizzati tramite saggi pan-virali (nel caso di orthonairovirus e flavivirus), mentre sono state eseguite delle singole nested PCR per JMTV, TcTV-1 e TcTV-2.

In totale, 12 pool su 158 sono risultati positivi allo screening virale e comprendevano esemplari di *R. bursa* ($n = 9$; 75%), *Dermacentor marginatus* ($n = 2$; 16,7%) e *Rhipicephalus turanicus* ($n = 1$; 8,3%) raccolti da *O. aries* ($n = 9$; 75%) e *B. taurus* ($n = 3$; 25%).

La caratterizzazione molecolare dei viromi ha evidenziato la presenza di:

- CCHFV (virus della febbre emorragica di Crimea-Congo) nel 3,2% dei pool (5 pool di *Rhipicephalus bursa*). Le varianti genetiche hanno confermato l'appartenenza del virus al lineage Europe 2, diffuso in Anatolia centrale e mediterranea.
- JMTV (Jingmen Tick Virus) in 5 pool (di *Rhipicephalus bursa* e *Rhipicephalus turanicus*) provenienti dall'Anatolia Mediterranea e Sud-orientale. L'analisi filogenetica del segmento 1 ha individuato un cluster tipico della Turchia e della Penisola balcanica.
- TcTV-2 (Tacheng Tick Virus) nell'1,3% dei pool (2 pool di *Dermacentor marginatus*), prelevati nell'Anatolia centrale. Dalle sequenze del nucleocapside analizzate, si è identificata una linea filogenetica di TcTV-2 diversa da quella precedentemente scoperta in Cina e Kazakistan.

I test per flavivirus generico e TcTV-1 hanno dato esiti negativi in tutti gli esemplari.

Un dato di rilievo è quello di un singolo pool di *R. bursa*, raccolte nella provincia di Antalya, che è risultato positivo sia a JMTV che al nairovirus generico, poi identificato come CCHFV.

Nonostante le informazioni sull'epidemiologia globale di TcTV-2 siano ancora scarse, la letteratura scientifica conferma che fanno parte dello spettro d'ospite sia *Dermacentor marginatus*, ma anche *Dermacentor nuttalli*, *Dermacentor salivarum* e *Hyalomma asiaticum*.

Test specifici eseguiti su un paziente affetto da malattia febbrile hanno individuato tracce di RNA virale nel sangue, ma soprattutto nel tampone faringeo, che apre la possibilità di trasmissione interumana tramite droplet, o per contatto diretto con fluidi corporei.

4.1 Limiti metodologici dello studio

L'interpretazione dei risultati deve tenere conto di alcune criticità riscontrate nella metodologia dello studio, primo tra tutti l'uso dei saggi pan-virali, progettati per rilevare interi generi di virus, anziché quelli specifici. C'è un alto rischio di falsi negativi, poiché, trattandosi di virus a RNA, la probabilità che mutino è molto alta e il primer progettato per la regione conservata potrebbe non riconoscere il target virale.

Inoltre, c'è un bias intrinseco nel saggio pan-virale, in quanto non ha la stessa sensibilità per tutti i membri della famiglia virale e potrebbe sovrastimare la presenza dei virus per cui ha maggiore sensibilità, sottostimando quelli per cui ne ha meno.

Un ulteriore limite è dato dall'uso di primer degenerati, che, pur ampliando lo spettro di rilevazione delle diverse varianti genetiche, non esclude la possibilità di legarsi a siti off-target (ad esempio il DNA della zecca stessa, o altri contaminanti), generando dei falsi positivi.

I ricercatori hanno descritto delle limitazioni intrinseche anche alla modalità di campionamento, ovvero la raccolta trasversale. Raccogliere le zecche in una finestra temporale molto ristretta esclude dalle analisi la variazione stagionale della loro attività, da cui potrebbe dipendere la composizione del viroma. Inoltre, non consente di identificare l'eventuale picco stagionale di circolazione dei singoli virus durante l'anno.

Per di più le zecche sono state raccolte staccandole direttamente dagli animali che avevano morso e non sono state invece raccolte dall'ambiente. Applicando questa modalità, non si può escludere che la zecca raccolta si sia infettata dopo aver morso un animale già viremico. Rimane dunque il dubbio se la zecca sia il vettore del virus nell'ambiente (nel caso di virus nuovi per i quali non è ancora stato dimostrato il ruolo vettoriale delle zecche), o se lo abbia semplicemente acquisito nutrendosi sull'ospite vertebrato.

Infine, la strategia di *pooling*, quindi il raggruppare più zecche nella stessa provetta, porta dei vantaggi temporali ed economici, tuttavia impedisce di associare un virus specifico ad un determinato individuo. Rende inoltre problematico il calcolo della carica virale nei singoli individui.

In conclusione, la rilevazione di virus emergenti a potenziale zoonotico, quali JMTV e TcTV-2, conferma la necessità di integrare questi virus nelle diagnosi differenziali delle infezioni umane associate a morso di zecca. Sono inoltre da approfondire le conoscenze riguardo lo spettro d'ospite dei virus, il loro meccanismo d'azione e la loro trasmissione.

In quest'ottica di approfondimento clinico e metodologico, le seguenti sezioni prendono in esame dei casi clinici documentati, in cui vengono analizzati la sintomatologia, la diagnosi e l'isolamento dei singoli virus, focalizzandosi in primo luogo su TcTV-1 e successivamente su TcTV-2.

Sebbene TcTV-1 non sia stato individuato nello studio di screening svolto in Anatolia, diverse evidenze confermano il potenziale zoonotico di questo virus, che ha dimostrato avere ampia distribuzione geografica.

5. Caso clinico: Individuazione di TcTV-1

Isolato per la prima volta in zecche *Dermacentor marginatus* nello Xinjiang, in Cina (Li et al., 2015), il Tacheng Tick Virus 1 (TcTV-1) è stato successivamente associato a malattia febbrile ed eruzioni cutanee in pazienti provenienti dalla stessa regione (Liu et al., 2020).

Ad oggi il virus è stato rilevato in zecche, bestiame e roditori in Cina, in alcune regioni della Turchia e in Polonia. TcTV-1 ha dimostrato di avere un'ampia distribuzione geografica e un ampio spettro di ospiti, per questo è necessaria una stretta sorveglianza epidemiologica del virus.

In Turchia il monitoraggio di TcTV-1 e JMTV nei vettori è stato condotto applicando un protocollo analogo a quello precedentemente descritto: sono stati raccolti campioni di zecca, divisi in pool e poi omogeneizzati; è stata quindi eseguita una nested-PCR, usando come target per TcTV-1 la sequenza completa del gene codificante la proteina del nucleocapside⁸.

È stato invece differente l'approccio diagnostico attuato per verificare l'infezione da TcTV-1 in un paziente⁹.

⁸Ender Dincer, Mehmet Ozkan Timurkan, Deniz Yalcinkaya, Olcay Hekimoglu, Mehmet Berat Nayır, Tugce Zeynep Sertkaya, and Tarkan Yorulmaz. (2023), "Molecular Detection of Tacheng Tick Virus-1 (TcTV-1) and Jingmen Tick Virus in Ticks Collected from Wildlife and Livestock in Turkey: First Indication of TcTV-1 Beyond China". VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES, Volume 23, Number 8, 2023

⁹Xiafei Liu, Xu Zhang, Zedong Wang, Zhihui Dong, Songsong Xie, Mengmeng. (2019), "A Tentative Tamdy Orthonairovirus Related to Febrile Illness in Northwestern China", Clinical Infectious Diseases, Volume 70, Number 10, 01 July 2019.

Il caso clinico risale al 2018, nella contea di Qinghe, nella regione dello Xinjiang in Cina, dove una donna di 62 anni che era stata morsa da una zecca manifestava febbre ed eruzioni cutanee.

I campioni biologici (sangue, liquido cerebrospinale, tamponi faringei e urina) prelevati al giorno 47 e 73 dall'esordio della malattia, sono stati sottoposti in primo luogo ad un'analisi metagenomica, per amplificare completamente il genoma di TcTV-1 (ceppo QH1). Le sequenze dei primer impiegati sono indicate nella Tabella Supplementare 1 nella referenza "Liu et al., 2019".

In secondo luogo, è stata fatta una nested RT-PCR di conferma, seguita da una Real time RT-PCR, per la quantificazione della carica virale. Come target è stata usata la sequenza codificante la proteina del nucleocapside di TcTV-1. I primer usati per queste amplificazioni sono riportati nella Tabella Supplementare 2, nella referenza "Liu et al., 2019".

Il genoma virale è stato assemblato tramite un approccio di amplificazione basato su RT-PCR, usando dei primer progettati sulla base dei risultati dell'analisi metagenomica. Successivamente i prodotti della PCR sono stati clonati nel vettore pMD18 e sequenziati con metodi standard.

Per l'isolamento del virus, i campioni raccolti dalla paziente (siero, liquor, tampone faringeo e urine) sono stati inoculati in cellule Vero (una linea cellulare renale di scimmia verde africana). Dopo l'incubazione, l'effetto citopatico si è verificato costantemente in tutte le colture derivate dai campioni positivi, ad eccezione dei campioni di siero.

La spiegazione più verosimile è che l'aumento del titolo anticorpale neutralizzante nel siero (1:40 al giorno 47 e 1:80 al giorno 73) è stato sufficiente a bloccare i virioni. Tramite microscopia elettronica a contrasto negativo si sono potuti visualizzare i virioni, che appaiono come delle particelle sferiche dotate di *envelope*, con un diametro di circa 80-90 nm.

Per verificare l'esposizione virale nella popolazione umana locale, sono stati raccolti 984 campioni di siero a Manasi, Xinjiang, e testati per la presenza di anticorpi specifici per TcTV-1 mediante un test ELISA indiretto con l'antigene ricombinante TcTV-1 NP. Circa il 15% delle persone è risultato sieropositivo, di cui il 10,1% positivo per IgG e il 4,8% per IgM. Tra gli individui positivi per IgG, circa il 50% è risultato positivo anche al test di neutralizzazione virale (VNT). Questi risultati hanno confermato un'esposizione a TcTV-1 nella popolazione locale dello Xinjiang.

Poiché TcTV-1 era stato rilevato da tamponi faringei e nelle urine della paziente, non si esclude la possibilità di trasmissione interumana, sia tramite droplet che tramite fluidi corporei.

Tuttavia, lo studio presenta una limitazione intrinseca, avendo presentato un quadro delle manifestazioni cliniche di TcTV-1 basandosi su un solo paziente. Sono necessari ulteriori approfondimenti per definire la sintomatologia e il meccanismo d'azione del virus.

5.1 Individuazione di TcTV-1 tramite LAMP

Il metodo precedentemente descritto per il rilevamento di TcTV-1 è estremamente preciso ma richiede tempi molto lunghi: prevede infatti una prima analisi metagenomica, seguita da una nested RT-PCR, e infine una real time RT-PCR.

LAMP (*loop-mediated isothermal amplification technique*) si offre come una tecnologia di rilevazione rapida del virus¹⁰, che non richiede altre apparecchiature al di fuori di un blocco riscaldante e i cui risultati sono visibili ad occhio, grazie ad un viraggio colorimetrico.

A differenza della PCR convenzionale, il saggio LAMP si basa sul principio dell'amplificazione isoterma, per cui decorre ad una temperatura costante (65° C per circa 35-60 minuti), senza richiedere l'uso del termociclatore.

L'elemento chiave, che permette che la reazione avvenga in condizioni isoterme, è una DNA polimerasi *strand-displacing* (Bst), ovvero una polimerasi che separa i filamenti di DNA bersaglio mentre sintetizza il nuovo filamento, senza aver bisogno di una denaturazione termica.

I primer sono stati disegnati ponendo come target la sequenza codificante la proteina del nucleocapside, utilizzando Primer Explorer V5 e specificando dei parametri

```

GATGCTTCGGACTAGACAGTTGGTTTAAGGACTTTGAAGCCAAGA
ACATCATGTCTGAGGAGTATACTAACTCCAAGAGCTTCTGTTTGAC
TcTV1-F3-1 TcTV1-F2-1
CTACGTATGGCCACAAGTGAAGAAGCTTCCGACTAGGGCAGAG
TcTV1-LF3-1 TcTV1-F1-1
AATGATGCTATGATTGCCCAACTTGTCCATGAAAGGCTGAAGACAT
TcTV1-B1c-1 TcTV1-LB-1
GTGCTCCAATAAAGGAGTTTGCATGGACTGCTTGCGACGGCATGGT
TcTV1-B2c-1
TGAACGAGGACTCAACTGGTTTGATAGAAACAAAGATAGAAACCAT
TcTV1-B3c-1
GACGTGGGCAGCCAACTAC

```

quali: contenuto di GC compreso tra il 40-60%; assenza di legame non specifico; stabilità alle estremità 3' e 5'; intervallo di temperatura di annealing di 50-60° C; assenza di strutture secondarie, come autodimeri e cross-dimeri.

Per la tecnologia LAMP un set completo comprende 6 primer, di cui: due esterni (F3 e B3), due interni (FIP e BIP) e due di loop (LF e LB).

¹⁰Il seguente paragrafo presenta una rielaborazione dei dati e delle informazioni esposti da Qiqi Guoz, Zheng Gui, Yuanning Ren, Ziyang Liu, Ning Liu, Liang Li, Zedong Wang and Jingfeng Yu. (2026), "Rapid and visual detection of Tacheng tick virus 1 using loop-mediated isothermal amplification technique", Cellular and Infection Microbiology, 07 January 2026

FIP, *forward inner primer*, è dato dal primer F1c (complementare a TcTV1-F1-1) unito a F2 (TcTV1-F2-1). BIP, *backward inner primer*, è dato da TcTV1-B1c-1 unito a TcTV1-B2c-1.

Al fine di dimostrare l'elevata specificità del saggio LAMP, il campione di partenza è stato un set di zecche positive a TcTV-1, SGLV, YEZV, TBEV, SFTSV e BJNV. Prima di procedere con l'amplificazione, l'RNA è stato estratto dai campioni di zecche omogeneizzate ed è stato retrotrascritto in cDNA.

La reazione LAMP è stata allestita con: 2,5 µL di tampone di amplificazione isotermica 10×; 1,5 µL di MgSO₄ (100 mM); 3,5 µL di dNTP Mix (10 mM); 1 µL di DNA polimerasi Bst 2.0; WarmStart (320 U/mL).

I set di primer sono stati aggiunti a concentrazioni finali di: 1,6 µM (FIP e BIP); 0,2 µM (F3 e B3); 0,4 µM (LF e LB).

Sono stati inoltre aggiunti: 1 µL di colorante EvaGreen; 1 µL di blu di idrossinaftolo (HNB); 1 µL di stampo di cDNA.

Il volume è stato portato a 25 µL con 8,5 µL di acqua ultrapura. L'acqua ultrapura è stata anche utilizzata al posto dello stampo di cDNA nel controllo negativo.

Inizialmente FIP e BIP si legano alle rispettive regioni interne ed iniziano la sintesi. F3 e B3 sono più esterni a FIP e BIP e, la DNA polimerasi Bst, allunga i filamenti e al contempo spiazza il filamento appena sintetizzato da FIP e BIP, liberandolo come singolo filamento.

Il singolo filamento si ripiega su sé stesso alle estremità, in quanto FIP e BIP presentano delle sequenze complementari a sé stesse. Si forma quindi una struttura "a manubrio", composta da 2 stem loop.

Dalle strutture a stem-loop, l'estremità 3' può fare self priming e la DNA polimerasi *strand-displacing* la allunga, usando come stampo il resto del filamento ripiegato. Trattandosi di uno stampo a doppio filamento, l'attività di *strand-displacement* della polimerasi permette di aprirlo, separando i due strand complementari, senza bisogno di denaturazione da calore.

Grazie ai primer LF e BF, che si legano ai loop a singolo filamento, viene fortemente accelerata la reazione di amplificazione. Alla fine della reazione vengono prodotte lunghe catene ripetitive di DNA ad altissimo rendimento.

In questo caso bastano 35 minuti per osservare l'eventuale positività del campione. È stato inoltre stabilito che 65° C è la temperatura ottimale per far decorrere la reazione.

Il sistema di rilevamento visivo è possibile grazie all'aggiunta di hydroxynaphthol blue (HNB), un indicatore colorimetrico che, percependo il calo di Mg²⁺ libero (viene prodotto pirofosfato di magnesio, dove il PPi deriva dalla sintesi degli acidi nucleici), vira dal viola all'azzurro, in caso di positività.

In termini di prestazioni, il saggio LAMP per TcTV-1 ha dimostrato una altissima specificità, senza reattività crociata con SLGV, YZEV, SFTSV o BJNV. Inoltre, la risposta colorimetrica si è rivelata robusta, con un evidente viraggio dal viola all'azzurro in caso di positività.

La possibilità di rilevare il risultato ad occhio nudo rappresenta un enorme vantaggio applicativo, poiché elimina la necessità di eseguire un'elettroforesi su gel e permette l'utilizzo della tecnologia LAMP in campo.

Pur non permettendo una valutazione quantitativa del numero di copie virali nel campione, la tecnica LAMP mantiene il punto di forza di non richiedere apparecchiature specifiche, né personale specializzato.

Tuttavia, lo studio presenta delle limitazioni. La principale è il fatto che il test LAMP per TcTV-1 sia stato eseguito su RNA che era già stato retrotrascritto in cDNA. Questo punto renderebbe la rilevazione sul campo complicata. Per ovviare al problema sarà opportuno ricorrere a dei kit RT-LAMP *one step*, che integrino nello stesso processo isotermico anche quello di retrotrascrizione.

Un'ulteriore criticità di questo studio consiste nell'aver rilevato il virus unicamente da campioni di zecche e non su bestiame o umani infetti da TcTV-1, a causa dell'assenza di campioni positivi.

Ciononostante, il saggio LAMP specifico per il TcTV-1 offre un metodo rapido e molto sensibile per il rilevamento del virus, ottimale (con perfezionamenti riguardo alla retrotrascrittasi) per verifiche sul campo, o con risorse limitate.

Questo approccio consente anche un monitoraggio efficiente riguardo all'epidemiologia molecolare dell'infezione da TcTV-1 in zecche, uomo e animali.

6. Caso clinico: Individuazione di TcTV-2

Parallelamente allo studio e allo sviluppo di saggi diagnostici per TcTV-1, l'attenzione della comunità scientifica si è rivolta anche a TcTV-2, un virus che ha dimostrato avere un elevato potenziale zoonotico e che pertanto necessita di una stretta sorveglianza epidemiologica e clinica.

TcTV-2 è stato identificato per la prima volta nel 2015 nelle zecche delle Cina nord-occidentale. Il rischio di patogenesi umana da questi virus non è ancora completamente noto, tuttavia, nel 2019, è stato identificato un primo caso di infezione in un paziente di 38 anni residente nella medesima regione geografica, che aveva frequenti contatti con cavalli e pecore¹¹.

¹¹Zhihui Dong, Meihua Yang, Zedong Wang, Shuo Zhao, Songsong Xie, Yicheng Yang, Gang Liu, Shanshan Zhao, Jing Xie, Quan Liu, Yuanzhi Wang. (2021), "Human Tacheng Tick Virus 2 Infection, China, 2019", *Emerging Infectious Diseases* Vol. 27 No. 2, February 2021

Dopo aver rimosso in autonomia la zecca dal braccio, l'uomo ha manifestato un'eruzione cutanea localizzata, con lieve dolore e fastidio. Poco più di due settimane dopo sono comparsi febbre, brividi, grave affaticamento, cefalea, inappetenza e vomito. In ospedale sono stati rilevati eritema nel sito di morso e rigidità nucale. Il trattamento con antibiotici non ha alleviato i sintomi ed è stata esclusa la possibilità di infezione batterica, ipotesi confermata da una coltura standard, seguita da una PCR a largo spettro per il gene dell'RNA ribosomiale 16S.

L'orientamento verso una natura virale dell'infezione ha aperto la strada alle indagini molecolari: dall'RNA estratto dalle cellule infette è stata eseguita una nested RT-PCR, mirata a molteplici sequenze di virus trasmessi dalle zecche (Tacheng tick virus 2, Tacheng tick virus 5, Bole tick virus 1, Bole tick virus 4). I primer utilizzati sono riportati nella Tabella Supplementare 1, nella referenza "Dong et al., 2021".

L'analisi ha evidenziato la presenza di TcTV-2 in campioni di sangue, tamponi faringei e urine del paziente. La successiva RT-PCR di conferma, condotta sugli isolati di RNA, ha permesso l'amplificazione dei segmenti L e S; non si è riusciti tuttavia ad individuare il segmento M.

I primer impiegati nella reazione di amplificazione sono riportati nella Tabella Supplementare 4, "Dong et al., 2021".

I test di amplificazione in vitro hanno mostrato l'assenza di crescita di TcTV-2 sia in fibroblasti umani, che in cellule renali di criceto, rilevando solo un livello minimo di crescita in SMMC-7221 (linea cellulare derivata da epatocarcinoma umano). Questo comportamento può indicare che il virus non è ben adattato ai mammiferi ed è probabilmente più diffuso tra gli artropodi.

Ciononostante, i risultati dello studio non escludono la possibilità di trasmissione interumana di TcTV-2, sia tramite droplet che tramite contatto con fluidi corporei.

In conclusione, la comparsa di infezione umana da TcTV-2, rende necessaria la sua inclusione nel pannello di monitoraggio diagnostico in pazienti febbrili con anamnesi da morso di zecca.

Sia per TcTV-2 che per TcTV-1 non sono ancora chiare le dinamiche di trasmissione e nemmeno le manifestazioni cliniche che essi causano. Sarà opportuno indagare più a fondo per comprendere l'entità del rischio che questi virus rappresentano per la salute umana.

7. Conclusioni

L'esame dei casi clinici presentati conferma la necessità di potenziare le strategie di identificazione e sorveglianza per i virus trasmessi dalle zecche. La tempestività della diagnosi eziologica è ostacolata ulteriormente dall'elevata biodiversità di questo gruppo virale: ad oggi sono stati identificati quasi 1500 TBV associati a 193 specie di zecche; 46 di questi virus (di cui 19 emergenti) sono riconosciuti come patogeni nell'uomo e negli animali.

Di conseguenza, risulta fondamentale approfondire lo studio riguardo il potenziale patogeno dei virus emergenti trasmessi dalle zecche. Il processo può essere sostenuto da un rafforzamento della sorveglianza ospedaliera sentinella, soprattutto per le famiglie virali di interesse umano.

7.1 Limiti della diagnosi e terapia delle infezioni da TBV

Le infezioni da TBV risultano spesso difficili da distinguere sia tra loro, sia dalle infezioni batteriche, motivo per cui molti pazienti tendono a trascurarle¹². La diagnosi clinica viene ulteriormente ostacolata durante l'anamnesi a causa della frequente omissione da parte dei pazienti di precedenti esposizioni a zecche.

L'insieme di questi fattori limita la diffusione delle conoscenze cliniche delle malattie da TBV emergenti e ne rende meno precisa la diagnosi differenziale.

Nelle fasi iniziali, le manifestazioni cliniche delle malattie causate da TBV possono assomigliare a quelle di altre malattie febbrili, rendendo difficile la diagnosi precoce. Sono necessari dei test eziologici specifici e la rilevazione virale di conferma avviene di solito tramite isolamento in linee cellulari. Tuttavia, il processo presenta due grandi limitazioni: 1. La viremia transitoria può ridurre la sensibilità della rilevazione tramite isolamento dei campioni; 2. L'isolamento virale richiede tempo ed ostacola la diagnosi precoce. Servono inoltre strutture con caratteristiche di biosicurezza appropriate.

La presenza del virus in campioni di sangue è solitamente rilevabile nella fase febbrile acuta, mentre i pazienti si presentano più frequentemente al medico quando sono già ad una fase di manifestazione specifica o comunque più avanzata, in cui il virus è principalmente localizzato in organi relativamente inaccessibili. Ciò complica la rilevazione tramite RT-PCR o NGS, rischiando di dare dei falsi negativi.

In alternativa al rilevamento di acidi nucleici si possono usare tecnologie come l'ibridazione in situ, che usa delle sonde specifiche per rilevare RNA virale nelle escare, così da diagnosticare l'infezione già dalla fase di replicazione locale, prima della diffusione sistemica. Un'altra opzione è il rilevamento dell'antigene, il cui l'utilizzo è però limitato e per di più mostra sensibilità inferiore per specifici virus (es. CCHFV). Anche i test di neutralizzazione virale sono attendibili, però richiedono la disponibilità di virus infettivi e devono essere eseguiti in laboratori con adeguate misure di contenimento.

Emerge quindi la necessità di metodi di diagnosi eziologica più pratici, semplici ed accurati. L'assenza di test diagnostici comunemente accessibili comporta una probabile sottostima dei casi di infezione da TBV a livello globale.

¹² Le informazioni riportate in questo paragrafo sono tratte dallo studio di Run-Ze Ye, Yu-Yu Li, iao-Yang Wang, Wu-Chun Cao (2026), "Tick-borne viruses: discovery, clinical aspects, influencing factors and control", Nature Reviews Microbiology, Volume 24, September 2026, 654-672

Vengono inoltre trascurate le infezioni asintomatiche, che possono giocare un ruolo cruciale nella trasmissione tramite contatto con sangue o fluidi corporei.

Sul fronte terapeutico, attualmente non sono disponibili dei trattamenti specifici per le malattie virali trasmesse dalle zecche. La terapia solitamente consiste in un intervento di supporto sintomatico, ricorrendo eventualmente ad una terapia antivirale, che richiede una precedente identificazione dello specifico virus infettante.

7.2 Impatto del cambiamento climatico e delle attività umane

Se da un lato le criticità diagnostiche e la mancanza di trattamenti specifici rendono complicata la gestione dei casi clinici, dall'altro i cambiamenti climatici e le attività umane stanno favorendo la diffusione dei TBV a livello globale¹³.

I flussi di circolazione dei TBV sono dettati da complesse interazioni tra virus, zecche vettrici, ospiti vertebrati e ambiente. Tra gli elementi contribuenti alla propagazione dei TBV ci sono: fattori climatici, ecologici e antropogenici.

I cambiamenti climatici, come il prolungamento delle stagioni calde, l'aumento delle temperature invernali, l'effetto serra, l'aridificazione e le forti piogge hanno influenzato lo spostamento dell'habitat delle zecche e prolungato il loro periodo di attività. Ciò ha aumentato la distribuzione geografica dei TBV e di conseguenza il rischio di infezione.

Le primavere precoci e le estati calde consentono alle zecche di avere pasti di sangue anticipati. Se normalmente in un ciclo vitale la zecca ha tre pasti di sangue (uno passando da larva a ninfa; uno da ninfa a adulto; uno da adulto per la deposizione delle uova¹⁴), con condizioni climatiche ottimali può avere anche due pasti di sangue nello stesso anno, accorciando il proprio ciclo vitale ed aumentando il potenziale riproduttivo. Inoltre, climi più caldi favoriscono l'attività umana all'aperto, aumentando le probabilità di incontri con le zecche.

Il riscaldamento globale permette anche alle zecche storicamente relegate a regioni temperate e sub-tropicali di espandersi al di fuori di questi territori, aumentando il rischio di emergenza transregionale di nuovi TBV. Un esempio è *I. ricinus*, vettore di TBEV, che si sta espandendo verso nord e altitudini sempre più elevate in Europa, aumentando al contempo la densità di popolazione nei climi più caldi.

Oltre ai cambiamenti climatici, le attività umane hanno rimodellato la distribuzione spaziale delle zecche e degli ospiti e, modificandone il comportamento, hanno aumentato il rischio di esposizione umana, favorendo la trasmissione di TBV.

¹³ Agustín Estrada-Peña, José de la Fuente, "The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases", Antiviral Research, Vol. 108, 2014 Aug.

¹⁴ Sarah E. Randolph (2004), "Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors", Parasitology, Vol. 129 Suppl:S37-65, 2004

Le principali attività antropiche comprendono:

- Cambiamenti distruttivi nell'uso del suolo, che compromettono il funzionamento degli ecosistemi e alterano i confini naturali degli habitat della fauna selvatica. Ciò agevola l'introduzione di animali selvatici e zecche nelle zone di attività umana.
- Attività di ripristino ecologico, che hanno portato notevoli benefici all'ambiente, creando al contempo nuovi habitat adatti alle zecche. Gli spazi verdi urbani sono anche habitat di mammiferi di medie dimensioni, che agiscono come ospiti urbani delle zecche, facilitando l'amplificazione e trasmissione di virus.
- Globalizzazione e commercio: i viaggi internazionali, il commercio globale e il traffico di fauna selvatica sono dei potenti amplificatori per la dispersione a lunga distanza delle zecche e dei patogeni ad esse associati.

Per contrastare la minaccia rappresentata dai TBV vengono adottate delle strategie di controllo basate sul concetto di One Health, che interconnette la salute di umani, animali ed ecosistemi. In conformità con questi principi il controllo delle zecche e TBV avviene in tre fasi: 1. Contenimento della fonte di infestazione; 2. Interruzione della trasmissione; 3. Protezione dei soggetti suscettibili, tramite vaccinazione.

Tali interventi sono accompagnati anche da campagne di educazione sanitaria e promozione dei Dispositivi di Protezione Individuale (DPI), quali l'uso di abbigliamento idoneo e di spray repellenti specifici.

Le strategie adottate per contenere i focolai di infestazione includono solitamente la bonifica dell'habitat, la gestione della vegetazione e la rimozione delle zecche dal bestiame. A questi interventi si affianca la combustione controllata, una pratica in grado di ridurre l'abbondanza di zecche, alterare la struttura della vegetazione, il microclima e i modelli di attività dell'ospite.

L'interruzione della trasmissione è in gran parte una diretta conseguenza del contenimento ambientale, ma è determinata anche da misure di prevenzione individuali, tra cui l'uso corretto dei DPI, l'auto-ispezione corporea per l'individuazione dei vettori e la loro appropriata estrazione.

La vaccinazione è fondamentale per la protezione dei soggetti vulnerabili. Tuttavia, al momento non sono disponibili vaccini contro virus altamente patogeni o emergenti, come CCHFV o SFTSV (virus della sindrome da febbre severa con trombocitopenia). Numerosi studi sono attualmente focalizzati sulla ricerca di vaccini efficienti contro questi patogeni.

In conclusione, lo sviluppo di vaccini efficaci ed accessibili, combinato con l'impiego di agenti di biocontrollo ecocompatibili, forniranno degli strumenti cruciali per un miglior contenimento nei prossimi anni delle infezioni da virus trasmessi dalle zecche.

8. Bibliografia

1. Dinçer E, Timurkan MÖ, Oğuz B, Şahindokuyucu İ, Şahan A, Ekinçi M, et al; “Several tick-borne pathogenic viruses in circulation in Anatolia, Turkey”. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases* Volume 22, Number 2, 2022
2. Mei-Qi Zhang, Jing Li, Xiao-Long Lv, Simon I. Hay, Li-Qun Fang, Wei Liu; “The diversity of emerging tick-borne viruses globally: From discoveries to zoonotic risk assessment”. *Med* Volume 7, Issue 3, 13 March 2026
3. Ender Dincer, Mehmet Ozkan Timurkan, Deniz Yalcinkaya, Olcay Hekimoglu, Mehmet Berat Nayır, Tugce Zeynep Sertkaya, and Tarkan Yorulmaz. “Molecular Detection of Tacheng Tick Virus-1 (TcTV-1) and Jingmen Tick Virus in Ticks Collected from Wildlife and Livestock in Turkey: First Indication of TcTV-1 Beyond China”. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*, Volume 23, Number 8, 2023
4. Qiqi Guoz, Zheng Gui, Yuanning Ren, Ziyang Liu, Ning Liu, Liang Li, Zedong Wang and Jingfeng Yu, “Rapid and visual detection of Tacheng tick virus 1 using loop-mediated isothermal amplification technique” *Cellular and Infection Microbiology*, 07 January 2026
5. Xiafei Liu, Xu Zhang, Zedong Wang, Zhihui Dong, Songsong Xie, Mengmeng. “A Tentative Tacheng Orthonairovirus Related to Febrile Illness in Northwestern China”, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 70, Number 10, 01 July 2019
6. Zhihui Dong, Meihua Yang, Zedong Wang, Shuo Zhao, Songsong Xie, Yicheng Yang, Gang Liu, Shanshan Zhao, Jing Xie, Quan Liu, Yuanzhi Wang, “Human Tacheng Tick Virus 2 Infection, China, 2019”, *Emerging Infectious Diseases* Vol. 27 No. 2, February 2021
7. Mária Kazimírová, Saravanan Thangamani, Pavlína Bartíková, Meghan Hermance, Viera Holíková, Iveta Štibrániová, Patricia A Nuttall, “Tick-Borne Viruses and Biological Processes at the Tick-Host-Virus Interface”, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 26 July 2017, Sec. Parasite and Host Volume 7 – 2017
8. Ender Dinçer, Mehmet Özkan Timurkan, Sebahattin Akca e Fatma Nur Yüce. (2026) “Molecular characterisation of emerging tacheng tick virus 2 in ticks collected from livestock and dogs in Türkiye”, *Experimental and Applied Acarology* (Springer), Vol. 97 No.1, June 2026
9. Sarah E. Randolph, “Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors”, *Parasitology*, Vol. 129 Suppl:S37-65, 2004
10. M. Labuda, P. A. Nuttall, “Tick-borne viruses”, *Parasitology*, Vol. 129 Suppl:S221-45, 2004
11. Agustín Estrada-Peña, José de la Fuente, “The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases” *Antiviral Research*, Vol. 108, 2014 Aug
12. Abulimiti Moming, Yuan Bai, Jun Wang, Yanfang Zhang, Shuang Tang, Zhaojun Fan, Fei Deng, Shu Shen, “The Known and Unknown of Global Tick-Borne Viruses” *Viruses*, 2024, 16(12), 1807
13. Run-Ze Ye, Yu-Yu Li, Xiao-Yang Wang, Wu-Chun Cao, “Tick-borne viruses: discovery, clinical aspects, influencing factors and control”, *Nature Reviews Microbiology*, Volume 24, September 2026, 654–672
14. Heng Rong, Zhiming Wu, Kangchen Zhao, Ying Ding, Shuang Ning, Yong Tian, Xiang Wang, Qing Qiao, Xiang Zhu, Tao Wu, Yanyan Ge, Hong Chu, Lunbiao Cui, “Identification and characterization of Jingmen tick virus in Jiangsu, China”, *Virology Journal*, Vol 22, article number 372, 12 November 2025
15. Esteban Domingo, Carlos García-Crespo, Rebeca Lobo-Vega, Celia Perales, “Mutation Rates, Mutation Frequencies, and Proofreading-Repair Activities in RNA Virus Genetics”, *Viruses* 2021, 13, 1882