

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea a ciclo unico in

MEDICINA VETERINARIA

Borrelia spp. e tick-borne encephalitis virus

in zecche prelevate da uccelli migratori

in Nord-Est Italia

Relatore

Prof.ssa Maria Luisa Menandro

Correlatore

Dott.ssa Laura Grassi

Fulvio Barbarino

Laureanda

Sofia Grillo

Matricola n. 1151845

ANNO ACCADEMICO 2020/2021

INDICE

ABBREVIAZIONI UTILIZZATE	1
RIASSUNTO	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	4
1.1 La problematica delle malattie trasmesse da vettori	4
Il ruolo delle zecche	5
1.2 Le zecche	7
Classificazione scientifica	7
Morfologia	7
Identificazione di specie	8
Ciclo biologico	11
1.3 Gli uccelli migratori	14
Progetto Alpi	15
Malga Confin	16
Specie di uccelli	17
Cincia mora (<i>Periparus ater</i>)	18
Fringuello (<i>Fringilla coelebs</i>)	19
Merlo (<i>Turdus merula</i>)	20
Peppola (<i>Fringilla montifringilla</i>)	22
Pettiroso (<i>Erithacus rubecola</i>)	24
Spioncello (<i>Anthus spinoletta</i>)	25
Tordo bottaccio (<i>Turdus philomelos</i>)	26
Tordo sassello (<i>Turdus iliacus</i>)	28
1.4 Il ruolo delle zecche dure e degli uccelli migratori nella trasmissione delle malattie	30
<i>Borrelia</i> spp.	31
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. – Malattia di Lyme	31
<i>Borrelia miyamotoi</i> - Febbre ricorrente (TBRF)	35

<i>Borrelia</i> spp. e uccelli migratori	36
<i>Tick-borne encephalitis virus</i> (TBEV)	42
SCOPO DEL LAVORO	46
2. MATERIALI E METODI	47
2.1 Area di studio e animali campionati	47
2.2 Campionamento	47
2.3 Identificazione di specie	48
2.4 Analisi biomolecolari	49
Estrazione DNA e RNA	49
<i>Screening</i> dei patogeni	49
Real-time PCR e RT real-time PCR	49
Ricerca del controllo interno – DNA	50
Ricerca di <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l.	50
Ricerca del controllo interno RNA - <i>Tick Borne Encephalitis virus</i> (TBEV)	50
2.5 PCR	52
Ricerca di <i>Borrelia</i> spp.	52
2.6 Sequenziamento	53
2.7. Analisi Statistica	53
3. RISULTATI	54
3.1 Animali e zecche	54
3.2 Analisi biomolecolari	58
Controllo interno - DNA	58
<i>Screening Borrelia burgdorferi</i> s.l.	58
Controllo interno – RNA	58
<i>Screening</i> TBEV	58
3.3 PCR	59
Ricerca di <i>Borrelia</i> spp.	59

3.4 Sequenziamento	60
Sequenziamento con specifiche sui dati relativi alle zecche	60
Sequenziamento con specifiche sui dati relativi agli uccelli	63
3.5 Analisi statistica	68
4. DISCUSSIONE	69
4.1 Affidabilità del campionamento e delle metodiche utilizzate	69
4.2 <i>Borrelia</i> spp.	69
4.3 TBEV	74
5. CONCLUSIONI	75
BIBLIOGRAFIA	77
WEBGRAFIA	85
DOCUMENTI NORMATIVI	86
RINGRAZIAMENTI	87

ABBREVIAZIONI UTILIZZATE

B. burgdorferi s.l.: *Borrelia burgdorferi* sensu latu

B. burgdorferi s.s.: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control

ISPRA: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale

MuSe: Museo delle Scienze di Trento

s.l.m.: sul livello del mare

TBDs: Tick-Borne Diseases

TBE: Tick-Borne Encephalitis

TBEV: *Tick-Borne Encephalitis Virus*

TBFV: *Tick-borne Flavivirus*

TBRF: Tick-borne relapsing fever

VBDs: Vector-borne diseases

VBZDs: Vector-borne zoonotic diseases

RIASSUNTO

Il presente progetto di tesi tratta il ruolo degli uccelli migratori nella diffusione delle zecche e nella disseminazione dei patogeni ad esse associati, nel Nord-Est Italia. In questa zona infatti, ed in particolare in Friuli Venezia Giulia, le malattie zoonosiche trasmesse da zecche hanno assunto importanza crescente, dal momento che si riscontrano frequentemente casi di malattia dovuta a TBDs nell'uomo. Si è deciso di indagare due agenti infettivi trasmessi da zecche, ovvero *Borrelia* spp. e *tick-borne encephalitis virus*, responsabili rispettivamente della malattia di Lyme e dell'encefalite virale da zecche, che sono entrambe malattie endemiche in Friuli Venezia Giulia. L'obiettivo era quello di capire se, e in che termini, gli uccelli migratori possano effettivamente contribuire all'epidemiologia di questi due patogeni.

Le zecche sono state prelevate dalle specie avicole migratorie durante le procedure di inanellamento svolte nella stazione Malga Confin, situata nelle Prealpi Giulie, tra settembre e novembre del 2019 e del 2020; questo periodo corrisponde al passaggio autunnale degli uccelli migratori intrapaleartici che seguono la rotta europea Nord-Est Sud-Ovest, in direzione Sud-Ovest. Le zecche sono state poi identificate morfologicamente allo stereomicroscopio e microscopio. La ricerca di *Borrelia* spp. e TBEV è stata realizzata con metodiche biomolecolari di *real-time* PCR e PCR.

Durante l'inanellamento di 3414 esemplari totali, sono state prelevate ed in un secondo momento analizzate 209 zecche albergate da 88 uccelli, appartenenti a 8 specie migratorie diverse; tutte le zecche appartenevano alla specie *I. ricinus*, eccetto una *I. frontalis* prelevata da un pettirosso (*Erithacus rubecula*) e una *I. acuminatus* prelevata da un tordo sassello (*Turdus iliacus*).

I risultati hanno evidenziato come gli uccelli migratori siano generalmente poco infestati dalle zecche (2,58%), ma quasi la metà di esse (48,8%) siano positive a *Borrelia* spp. Gli uccelli del genere *Turdus* (*Turdus merula*, *Turdus iliacus* e *Turdus philomelos*) sono risultati i più infestati e quelli che albergano la maggior parte delle zecche positive. Il sequenziamento di *Borrelia* spp. ha identificato 4 genospecie: la più prevalente è *B. garinii*, specie neurotrofa classificata dall'ECDC come una delle principali responsabili di borreliosi di Lyme nell'uomo, seguita da *B. valaisiana*, *B. afzelii* e *B. miyamotoi*.

Non sono state invece evidenziate positività per il TBEV.

Il confronto di questi risultati con quelli riportati in letteratura ha permesso di sviluppare alcune considerazioni sul ruolo epidemiologico delle varie specie di uccelli migratori e sulla loro capacità di diffusione degli agenti infettivi indagati, sia a livello dell'area del campionamento, sia a livello più ampio, in relazione all'arco alpino e ai paesi europei attraversati dalla stessa rotta migratoria.

ABSTRACT

This dissertation highlights the role of migratory birds in the spread of ticks and in the dissemination of tick-borne pathogens in the northeast of Italy. In this area, particularly in the Friuli Venezia Giulia region, the importance of tick-borne zoonotic diseases has increased, as cases of human TBDs occur frequently. We decided to examine the infectious agents of two endemic diseases in Friuli Venezia Giulia, namely, *Borrelia* spp. and tick-borne encephalitis virus, which cause Lyme disease and tick-borne encephalitis respectively. This study aimed to understand if migratory birds could effectively contribute to the epidemiology of these two pathogens.

Ticks were collected from migratory birds captured at the “Malga Confin” station, located in the Julian prealps, during the bird ringing procedures from September to November 2019 and 2020; this period corresponds to the autumn migration of intrapaleartic species, which follow the Northeast-Southwest European route heading southwest. Then, tick species and developmental stage were morphologically identified under stereomicroscope and microscope. The presence of *Borrelia* spp. bacteria and TBEV was determined by real-time PCR and PCR biomolecular analysis.

During the ringing of 3414 birds, 209 ticks from 88 birds belonging to 8 migratory species were collected and subsequently analyzed: all were *I. ricinus* except one *I. frontalis* found on a European robin (*Erithacus rubecula*) and one *I. acuminatus* carried by a redwing (*Turdus iliacus*).

Overall, migratory birds are mildly infested by ticks (2,58%), but almost half of these arthropods (48,8%) were positive to *Borrelia* spp. Bird species belonging to the *Turdus* genus (*Turdus merula*, *Turdus iliacus* and *Turdus philomelos*) were the most frequently infested and they were also carrying the most frequently infected ticks. The *Borrelia* species detected were 4: the most prevalent was *B. garinii*, which causes neurologic Lyme borreliosis and is regarded, by the ECDC, the main European cause of human disease, followed by *B. valaisiana*, *B. afzelii* and *B. miyamotoi*.

All ticks were negative for TBEV.

The comparison between our results and those found in the literature has allowed us to develop some interesting considerations on the epidemiological role of migratory birds and on their ability to spread the two pathogens examined, both at the sampling area level, and in relation to the Alpine arch and the other European countries crossed by the same migratory route.

1. INTRODUZIONE

1.1 La problematica delle malattie trasmesse da vettori

Le malattie trasmesse da vettori (VBDs), secondo la definizione dell'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), sono un gruppo di malattie infettive causate da parassiti, virus e batteri trasmesse dal morso di artropodi infetti, tra cui più comunemente vari tipi di insetti e zecche (<https://www.ecdc.europa.eu/en/climate-change/climate-change-europe/vector-borne-diseases>). I vettori sono quindi artropodi ematofagi in cui il patogeno, una volta ingerito dal sangue di un vertebrato, replica ed è conseguentemente trasmesso con il successivo pasto di sangue (Swei et al., 2020).

Molte di queste VBDs rappresentano malattie emergenti o ri-emergenti in Europa, cioè malattie che si presentano in aumento perché nuove, o recentemente espansive in termini di distribuzione, o perché aumentate in termini di prevalenza. Le VBDs richiedono particolare attenzione, dato che *in primis* la globalizzazione, con il continuo incremento dei commerci e viaggi internazionali, costituisce un importante fattore di rischio per l'introduzione di nuovi patogeni e vettori nel continente (Gilbert, 2021). Anche il cambiamento climatico incrementa notevolmente le possibilità di comparsa e di diffusione dei vettori prima assenti in Europa, o presenti solo in numero limitato (ECDC, 2019; Semenza & Suk, 2018). La sensibilità degli artropodi al clima, infatti, comporta che, tra le malattie infettive, le VBDs siano quelle più influenzate dal riscaldamento globale. I principali fattori climatico-ambientali implicati nei fenomeni suddetti sono rappresentati dall'aumento delle temperature, soprattutto ad alte latitudini, cambiamenti nella frequenza e intensità delle precipitazioni, variabilità climatica ed eventi climatici estremi. Tutti questi mutamenti incidono sull'emergenza o ri-emergenza delle VBDs sotto vari punti di vista (Nick H. Ogden & Lindsay, 2016).

Il problema principale è rappresentato dalle malattie trasmesse da vettori che colpiscono l'uomo (Fig. 1); esse, nel loro insieme, costituiscono il 17% del carico mondiale delle malattie trasmissibili, ed è stimato che l'80% della popolazione mondiale sia a rischio di contrarre almeno una delle VBDs (World Health Organization, 2017).

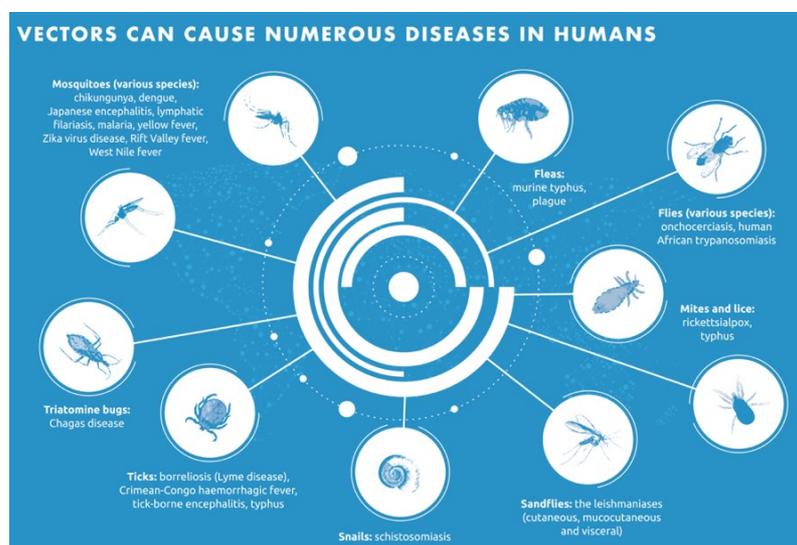


Figura 1: panoramica dei vettori e malattie da essi trasmesse all'uomo (World Health Organization, 2017)

Tra le VBDs, uno dei maggiori gruppi di malattie infettive emergenti è quello delle *vector borne zoonotic diseases* (VBZDs), cioè le malattie infettive trasmesse da vettore all'uomo che riconoscono in un animale il *reservoir* dell'agente patogeno; il loro tasso di crescita è più elevato rispetto alle malattie infettive trasmesse direttamente, cioè senza artropodi vettori (Swei et al., 2020).

La diffusione di queste malattie è favorita dalla presenza di un'interfaccia tra uomo, animali e ambiente e la loro incidenza è maggiore quando l'uomo vive in stretto contatto con gli animali o quando incontra animali in nuove regioni geografiche (Cots et al., 2020). Per questo, dal 2006 è stato riconosciuto e promosso il fatto che la salute umana, animale e dell'ecosistema siano intrinsecamente collegate e che sia necessaria una strategia per migliorare e difendere la salute e il benessere di tutte le specie, attraverso la collaborazione tra medici umani e veterinari e tutte le professioni scientifiche coinvolte in problematiche ambientali (<https://onehealthinitiative.com/mission-statement/>). Questo concetto va sotto il nome di “*One Health*” e l'ECDC utilizza questo approccio per monitorare e controllare le minacce alla salute pubblica e individuare come le malattie si diffondano tra le persone, gli animali e l'ambiente. Una parte fondamentale di questo lavoro è la sorveglianza sull'introduzione e diffusione dei vettori delle principali malattie, svolto attraverso il VectorNet, *database* in comune con la European Food Safety Authority (EFSA). Tale network, in attività dal 2009, raccoglie tutti i dati europei sulla presenza e distribuzione dei vettori e dei patogeni ad essi associati e correlati alla salute umana e animale, e viene continuamente aggiornato (ECDC, 2019).

Il ruolo delle zecche

Tra i vettori artropodi responsabili di VBZDs, hanno fondamentale importanza le zecche. Esse sono infatti responsabili della trasmissione di più tipologie di agenti patogeni dell'uomo e degli animali domestici di ogni altro vettore invertebrato (Gilbert, 2021). In particolare, le zecche dure (famiglia Ixodidae) sono il vettore più comunemente coinvolto in Europa, dove il 40% delle VBZDs emergenti e documentate è indotto da Ixodidae (Swei et al., 2020).

È un dato di fatto che la popolazione delle zecche stia aumentando, sia a livello numerico che a livello di espansione geografica, e così, stanno aumentando la prevalenza e la trasmissione delle *tick-borne diseases* (TBDs), tanto da essere considerato un problema rilevante di salute pubblica (Madison-Antenucci et al., 2020). Su questo incremento ha avuto un impatto importante il cambiamento climatico, attraverso l'interazione degli effetti che esso comporta sulla salute degli animali, dell'uomo e dell'ecosistema. Le condizioni climatiche odierne, infatti, incidono positivamente sulla presenza e abbondanza delle zecche e dei patogeni da esse trasmessi, sia in modo diretto, aumentandone la sopravvivenza nell'ambiente a latitudini e altitudini maggiori rispetto al passato, prolungandone l'attività stagionale e incrementandone il tasso riproduttivo e di importazione da paesi tropicali e subtropicali (Nick H. Ogden & Lindsay, 2016), che in modo indiretto, modificando l'habitat e la distribuzione geografica dei loro ospiti, inclusi roditori e uccelli migratori (El-Sayed & Kamel, 2020).

Predire quanto il riscaldamento globale comporterà l'estinzione di alcune specie ospite delle zecche o la modifica della loro estensione geografica tuttavia può essere difficile, come del resto è molto dibattuto il fatto che i cambiamenti riguardanti le specie ospite possano effettivamente impattare sulla trasmissione dei patogeni *tick-borne* (Gilbert, 2021; Nicholas H Ogden et al., 2020); è dato condiviso invece, che le patologie trasmesse da zecche emergano e subiscano gli effetti dei cambiamenti climatici molto più lentamente e su lungo periodo rispetto alle malattie trasmesse da altri vettori, come le zanzare, proprio per le loro caratteristiche biologiche (El-Sayed & Kamel, 2020; Nick H. Ogden & Lindsay, 2016).

In ogni caso, ad oggi, le zecche della specie *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) sono presenti in gran parte dell'Europa continentale e il confronto con la distribuzione degli anni precedenti dimostra la loro espansione a latitudini e altitudini maggiori (Fig. 2).

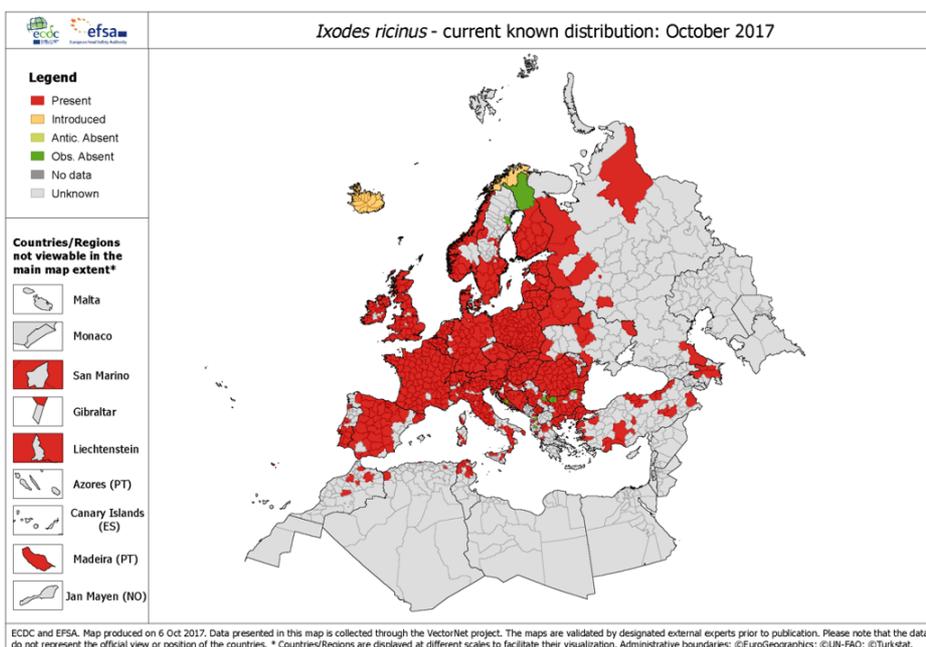
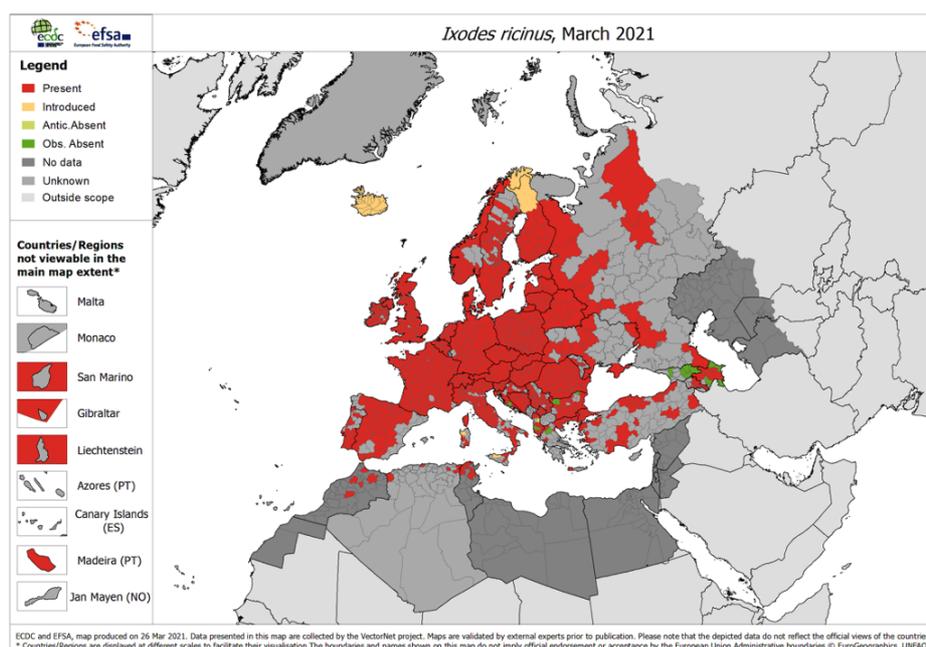


Figura 2. Confronto tra la distribuzione di *I. ricinus* in Europa nel 2017 (in alto) e nel 2021 (in basso).

Dalle mappe, acquisite dall'ECDC attraverso lo strumento VectorNet, è evidente che *I. ricinus* ha espanso la sua distribuzione nei paesi del Nord-Europa, come la Finlandia, la Norvegia e la Svezia e si è spinta anche in aree ad altitudini elevate, come tutta la catena montuosa delle Alpi ed altre zone montuose della Germania. Il 2017 è stato il primo anno in cui l'ECDC ha elaborato la *tick-map*.

(European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. Tick maps [internet]. Stockholm: ECDC; 2018; ECDC 2021. Available from:



<https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/tick-maps>

1.2 Le zecche

Le zecche sono descritte come ectoparassiti ematofagi obbligati e temporanei. Ciò significa che parassitano un ospite, animale o umano, rimanendo sulla superficie del suo corpo per un tempo limitato e assumendo un pasto di sangue, necessario per la loro sopravvivenza e sviluppo (Cringoli et al., 2005).

Classificazione scientifica

A livello tassonomico, esse appartengono al Phylum degli Artropodi, del quale, tra gli altri, fanno parte anche gli insetti ed i crostacei, e alla classe degli Arachnida. All'interno di questa sono annoverate tra gli Acari nel sottordine degli Ixodida. (Cringoli et al., 2005).

Esistono circa 900 specie di zecche, la maggior parte delle quali appartengono a due famiglie: Argasidae (conosciute come zecche molli) e Ixodidae (conosciute come zecche dure). Esiste anche una terza famiglia, quella delle Nuttalliellidae, con solo una specie (*Nuttalliella namaqua*) che mostra caratteristiche condivise sia con le zecche dure sia con le molli (Estrada-Pena, 2015).

Classificazione scientifica	
Regno	Animalia
Phylum	Arthropoda
Classe	Arachnida
Sottoclasse	Acari
Ordine	Acarina
Sottordine	Ixodida
Famiglia	Ixodidae
Genere	<i>Ixodes</i>

Nel presente elaborato ci concentreremo sulle zecche dure del genere *Ixodes*, che sono state oggetto del nostro campionamento.

Morfologia

La struttura morfologica di una zecca comprende due parti: la parte anteriore denominata *capitulum* o rostro, che corrisponde allo gnatosoma degli altri acari (ma a differenza di questo, nella zecca è mobile) e l'idiosoma, o corpo della zecca.

Le parti buccali si trovano sul *capitulum* ed includono due palpi, una coppia di cheliceri e l'ipostoma (Fig. 3). I palpi sono formati da quattro segmenti, di cui il quarto distale quali è dotato di recettori sensoriali (*setae*); esso è inserito in una cavità del terzo segmento nelle Ixodidae, mentre nelle Argasidae è apicale (Cringoli et al., 2005). I palpi non entrano nella ferita con il morso, ma rimangono posizionati lateralmente, orizzontali sulla cute.

I cheliceri si estendono dalla base del *capitulum*, sono posizionati medialmente ai palpi e dorsalmente all'ipostoma e sono dotati di estremità molto taglienti in modo da essere usati dalla zecca per lacerare i tessuti dell'ospite e quindi inserire più agevolmente l'ipostoma.

L'ipostoma è il pezzo buccale mediano, formato da una faccia esterna convessa e munita di file di denti ventrali retroversi. La dimensione e la forma dell'ipostoma, insieme alla conformazione dentaria varia tra le

specie ed è usata per l'identificazione (Anderson & Magnarelli, 2008). La porzione basale del *capitulum* è ancorata al corpo della zecca da una membrana.

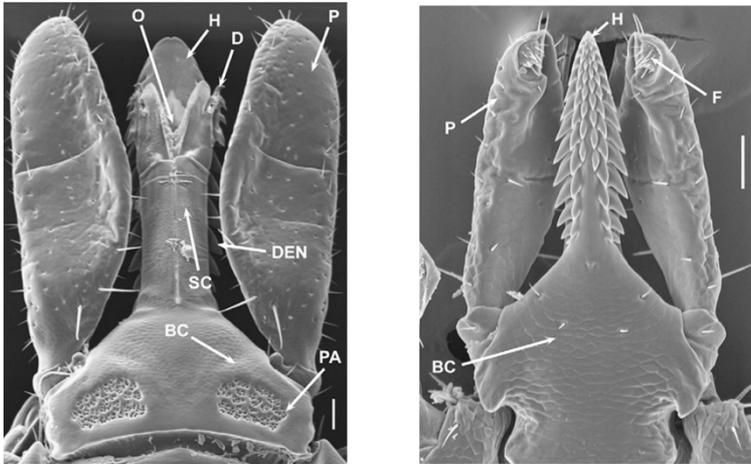


Figura 3: veduta dorsale (a sinistra) e ventrale (a destra) del *capitulum*. BC, base del *capitulum*; D, *digits* dei cheliceri; DEN, denti dell'ipostoma; F, quarto segmento del palpo; H, ipostoma; O, apertura del canale nutritivo; P, palpo; PA, area porosa; SC, cheliceri. Foto tratte da Anderson & Magnarelli, 2008.

L'idiosoma è la regione che segue il *capitulum*: ventralmente, nella sua parte anteriore esso presenta l'apertura genitale e nella sua parte posteriore, l'ano. Nella porzione ventrale del corpo si vede anche l'attaccatura delle zampe, che sono articolate su delle piastre chitinee denominate *coxae* e numerate, in senso cranio-caudale, con numeri romani (Cringoli et al., 2005).

Dorsalmente invece, nel corpo, le zecche dure hanno lo *scutum*. Quelle del genere *Ixodes* non sono dotate di occhi, che in altre specie si possono trovare sul margine laterale dello scudo dorsale (Walker et al., 2007). Tutta la superficie corporea delle zecche è infine dotata di sensilli, recettori sensoriali meccanici, termici, tattili e olfattivi, variamente distribuiti e denominati *setae*.

Identificazione di specie

L'identificazione di specie si effettua attraverso lo stereomicroscopio, utilizzando chiavi dicotomiche. Nel presente elaborato tratteremo solo l'identificazione di tre specie di zecche dure, in particolare: *I. ricinus*, *Ixodes acuminatus* (*I. acuminatus*) e *Ixodes frontalis* (*I. frontalis*), dal momento che sono state le uniche raccolte durante il campionamento.

La prima distinzione da fare è quella relativa alla famiglia di appartenenza. Le zecche della famiglia Ixodidae, rispetto alle zecche molli, si individuano per alcune caratteristiche morfologiche essenziali che si apprezzano in veduta dorsale (fig. 4):

- cuticola dura e spessa e presenza dello *scutum*; l'estensione di quest'ultimo ci permette di capire anche lo stadio e l'eventuale sesso della zecca, in quanto negli stadi immaturi e nelle femmine copre solo la porzione anteriore del corpo, mentre nei maschi copre il corpo per intero (Anderson & Magnarelli, 2008). Durante il pasto il corpo, con eccezione dello *scutum*, si espande notevolmente per fare spazio al sangue ingerito.
- *Capitulum* in posizione apicale e visibile anche quando la zecca è posizionata dorsalmente, in tutti gli stadi (Cringoli et al., 2005).



Figura 4: veduta dorsale di una zecca immatura della famiglia Ixodidae. Si vedono lo *scutum* (S), che non copre l'intero corpo della zecca ed il *capitulum* (C). Foto scattata attraverso lo stereomicroscopio, durante l'identificazione di specie.

Posizionando la zecca in veduta ventrale si può poi procedere all'identificazione del genere. Nel genere *Ixodes*, infatti, il solco anale forma un semicerchio che passa anteriormente all'ano ed è rivolto posteriormente (fig.5), mentre negli altri generi di Ixodidae esso passa posteriormente all'ano o è assente (Walker et al., 2007).

Da questa prospettiva possiamo anche individuare definitivamente lo stadio di maturazione della zecca, attraverso due peculiarità:

- il poro genitale, posto nella parte anteriore del corpo, all'altezza circa della IV *coxa*; esso non si vede nelle larve e nelle ninfe, mentre è aperto negli adulti.
- l'attaccatura delle zampe; le larve hanno sempre 3 paia di zampe, mentre le ninfe e gli adulti ne hanno 4 (Anderson & Magnarelli, 2008).

Figura 5: Veduta ventrale di una ninfa del genere *Ixodes*. Si può apprezzare il solco anale rivolto posteriormente, l'assenza del poro genitale (*) e la presenza di 4 paia di zampe. P = palpo; I = ipostoma; BC = base del *capitulum*; A = ano.

Foto scattata allo stereomicroscopio durante l'identificazione di specie.



L'ultimo passaggio è l'identificazione della specie:

- *I. ricinus* si riconosce per la presenza nella parte interna della *coxa* I di una spina diritta evidente in veduta ventrale, che supera il margine anteriore della *coxa* II (fig.6) ed è nettamente più lunga della spina esterna; le *coxae* II-IV sono prive di spine. L'ipostoma ha l'apice arrotondato ed ha dentizione basale 2/2 e apicale 3/3 (Cringoli et al., 2005).
- *I. acuminatus* si riconosce perché la *coxa* I ha una spina interna lunga e dritta, ma anche le *coxae* II-III sono dotate spine interne; l'ipostoma ha un'estremità appuntita ed è uniformemente dentellato con file 2/2 (Cringoli et al., 2005; Manilla G., 1998).
- *I. frontalis* ha gli articoli dei palpi fusi tra di loro e un'ipostoma fusiforme con estremità appuntita.

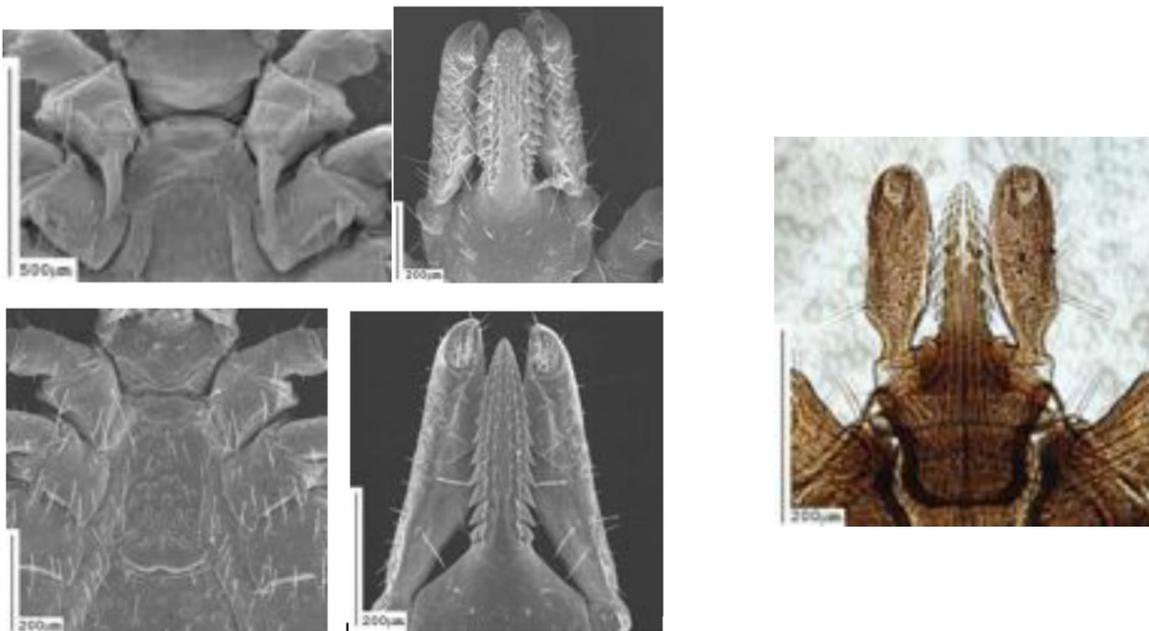


Figura 6: confronto tra *Ixodes ricinus* (in alto a sinistra), *Ixodes acuminatus* (in basso a sinistra) e *Ixodes frontalis* (a destra). Delle prime si può apprezzare la differenza nella conformazione delle spine della *coxae* e dell'ipostoma; per *Ixodes frontalis* notiamo solo la differenza nell'ipostoma e nei palpi.

Foto tratte da Cringoli et al., 2005.

Ciclo biologico

Gli ixodidi hanno un ciclo biologico che prevede 3 stadi nei quali si comportano come parassiti ematofagi obbligati, ovvero organismi per cui è sempre necessario un pasto di sangue per mutare allo stadio successivo. Dall'uovo embrionato schiude la larva, che, dopo essersi nutrita su un ospite di piccole dimensioni, si stacca e muta in ninfa. Essa, dopo aver trovato un ospite adatto, si nutre e ritorna nell'ambiente per mutare in adulto, che sua volta deve trovare un terzo ospite su cui nutrirsi ed accoppiarsi. Le femmine a questo punto, una volta ingorgate, depongono migliaia di uova nell'ambiente tra la vegetazione in decomposizione, in siti con alta umidità relativa che ne assicura la sopravvivenza, e così il ciclo ricomincia (Estrada-Peña & De La Fuente, 2014) (fig.7).

Il passaggio da uno stadio al successivo avviene sempre attraverso la muta, preceduta da un adeguato pasto di sangue: per fare questo le zecche penetrano la cute dell'ospite attraverso i cheliceri e l'ipostoma e poi si nutrono del sangue e della linfa rilasciati nelle lesioni da loro stesse causate. Le Ixodidae si nutrono una volta per ogni stadio, quindi il loro pasto, dato che prevede l'ingestione di una grande quantità di sangue, è lento, dura alcuni giorni, in modo da permettere alle pareti corporee di crescere (differentemente dalle zecche molli) (Estrada-Pena, 2015). Le larve impiegano dai 3 ai 5 giorni per ingorgarsi completamente, le ninfe tra i 4 e gli 8 e gli adulti femmina dai 5 ai 20 giorni (Walker et al., 2007). Le femmine devono completare il pasto di sangue per permettere la maturazione degli ovociti, mentre i maschi del genere *Ixodes* si nutrono quanto necessario per la maturazione dei loro organi riproduttivi e non si ingorgano mai tanto quanto le femmine. Secondo altri autori, quando i maschi mutano dallo stadio di ninfa hanno già gli organi riproduttivi maturi e quindi da adulti possono anche non nutrirsi affatto (Walker et al., 2007).

Quando la zecca è completamente ingorgata, si stacca dall'ospite e finisce nell'ambiente, dove rimane per compiere la muta, finché non trova un altro ospite adatto allo stadio successivo. Questo tipo di comportamento è definito esofilico, e caratterizza tutte le specie oggetto del nostro campionamento. Per quanto riguarda la ricerca dell'ospite, le zecche esofiliche riescono a trovarlo attraverso il *questing*, comportamento particolare che si può tradurre come una sorta di "attesa" sulla vegetazione. Nel momento in cui passa un ospite idoneo, la zecca si aggrappa e inizia a spostarsi sul suo corpo per trovare la zona dove attaccarsi e nutrirsi (Walker et al., 2007). Le *Ixodes* spp. sono prive di occhi, per cui l'individuazione dell'ospite avviene attraverso i loro recettori sensoriali, che veicolano informazioni olfattive, meccaniche e tattili e sono in grado di percepire le vibrazioni e la temperatura radiante dal corpo dell'ospite; le *setae* presenti nei palpi e sui cheliceri sono usate per selezionare il punto più favorevole per l'attacco sulla cute (Anderson & Magnarelli, 2008).

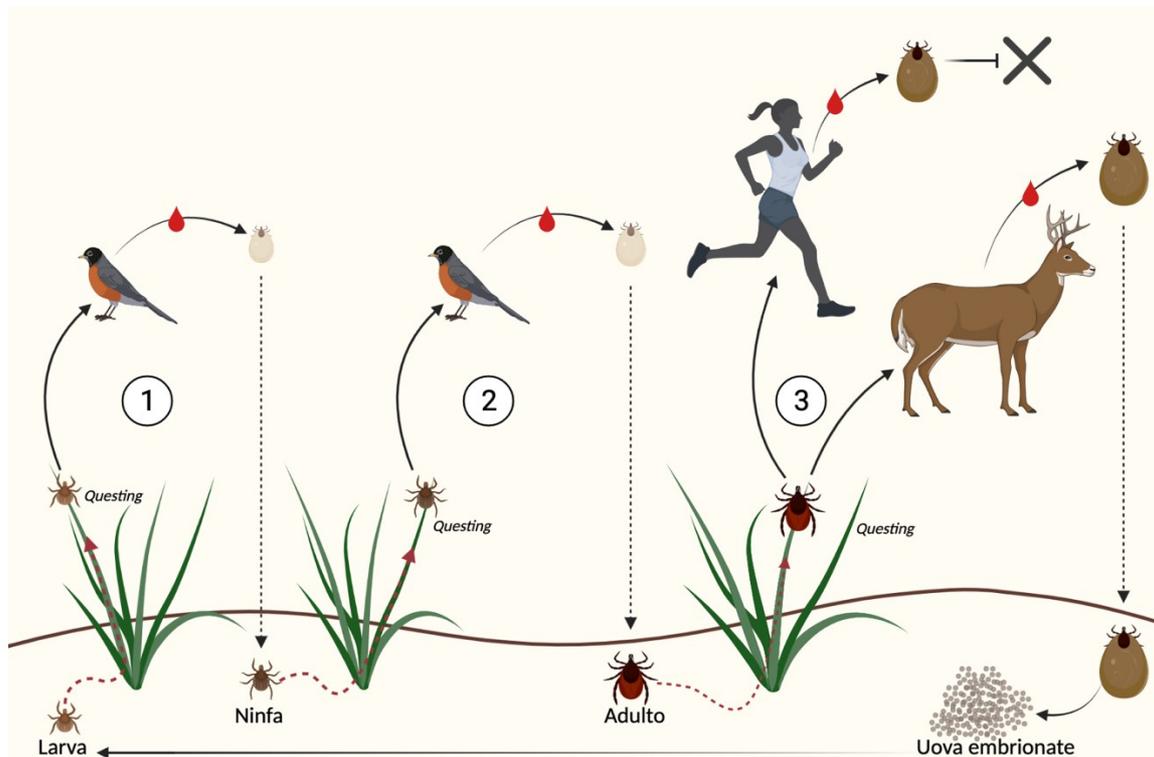


Figura 7: schematizzazione del ciclo biologico a 3 ospiti delle zecche del genere *Ixodes*. 1) la larva si arrampica su steli d'erba attendendo il primo ospite adatto (*questing*) su cui svolge il pasto di sangue. Il primo ospite comunemente è di piccole dimensioni e nell'immagine è rappresentato da un uccello. Una volta ingorgata, la larva si stacca e finisce di nuovo nell'ambiente dove avviene la prima muta a ninfa. 2) La ninfa attua di nuovo il *questing*, per poi completare il pasto di sangue su un secondo ospite; una volta ingorgata si stacca e torna nell'ambiente, dove muta in adulto. 3) L'adulto, maschio o femmina, cerca il terzo ospite, rappresentato solitamente da un animale di più grandi dimensioni o dall'uomo. Le femmine ingorgate infine si staccano e tornano nell'ambiente, dove depongono le uova embrionate, da cui si schiuderanno le larve. Disegno creato con BioRender.com.

Il tipo di ciclo vitale più comune è quello che prevede il coinvolgimento di 3 specie di ospiti diversi, uno per la larva, uno per la ninfa e uno per l'adulto. Per le zecche *Ixodes* è comune che gli stadi immaturi, cioè larve e ninfe, infestino animali di piccole dimensioni come uccelli e roditori, mentre gli adulti prediligono grandi carnivori e ungulati, ma possono infestare anche l'uomo. L'uomo rappresenta di solito un ospite accidentale e a fondo cieco per la zecca, perché da qui viene normalmente eliminata. Gli animali selvatici invece, sono ospiti cosiddetti di mantenimento (Walker et al., 2007), perché adatti per la riproduzione delle zecche adulte. Questo comportamento non è comunque valido per tutte le specie di zecca, anche all'interno dello stesso genere, dato che alcune possono essere altamente specifiche per un particolare ospite animale (Estrada-Pena, 2015).

Tra le specie individuate nel campionamento:

- *I. ricinus* è una specie generalista, ovvero a bassissima specificità, che attacca mammiferi di tutte le dimensioni, uccelli, rettili e anche l'uomo;

- *I. acuminatus* è un parassita degli uccelli, dei micromammiferi insettivori e roditori, ed è stata rinvenuta anche sui mustelidi, mentre raramente sull'uomo.
- *I. frontalis* invece, è una specie esclusivamente ornitofila (Cringoli et al., 2005).

La durata del ciclo biologico ha elevata variabilità: alcune specie completano i 3 stadi in alcune settimane o mesi, altre in qualche anno, in maniera dipendente dalla facilità di reperimento dell'ospite e della temperatura e condizioni climatiche, che regolano prevalentemente lo sviluppo delle fasi ambientali della zecca, cioè quelle in cui non alberga su un ospite.

Anche la vita media delle zecche è variabile e dipende da quanta energia sono riuscite ad ottenere dal precedente pasto di sangue e dallo stress causato dal clima (Estrada-Peña & De La Fuente, 2014).

1.3 Gli uccelli migratori

Gli uccelli migratori sono un potenziale ospite di zecche. Essi svolgono un particolare ruolo, perché, dal momento che migrano regolarmente, permettono la diffusione delle zecche che infestano la loro cute da un habitat ad un altro. Se trovano condizioni favorevoli, le zecche possono così colonizzare nuovi ambienti e riprodursi con successo (A. M. Buczek et al., 2020).

Gli uccelli migratori viaggiano da aree adatte alla riproduzione ad aree in cui non si riproducono e viceversa, sia su ampi fronti che su rotte definite. Uno dei più comuni *pattern* migratori è quello da Nord a Sud, tipico degli uccelli che si riproducono nelle aree temperate del Nord dell'emisfero boreale durante l'estate, per poi svernare durante la stagione non riproduttiva nelle zone più calde dei tropici. Alcune specie mostrano invece una componente longitudinale rilevante da Est a Ovest o al contrario (Galbraith et al., 2014).

L'Italia è posta sulla rotta migratoria Nord-Sud denominata "*Black Sea-Mediterranean Flyway*" (Galbraith et al., 2014), attraverso la quale gli uccelli migratori intrapaleartici si spostano dalle terre paleartiche del Nord-Est Europa dove si riproducono, in direzione Sud-Ovest, verso le zone del Nord del Sahara, dove svernano; lungo questa rotta viaggiano anche i migratori transahariani, specie avicole migratorie a lunga distanza, che dal Nord Africa proseguono attraversando il Sahara per svernare a Sud di esso. In prossimità dell'Europa meridionale si assiste ad un frazionamento della direzionalità della rotta in due componenti: una che volge verso oriente e una che continua in direzione Sud-occidentale, probabilmente per permettere l'evitamento di barriere biogeografiche, come catene montuose o ampie zone di mare aperto (Pedrini et al., 2008). Da recenti ricerche sembra che il flusso migratorio che attraversa le Alpi italiane sia sensibilmente alimentato da una corrente italo-ispánica che da Est percorre la fascia Prealpina, verso la Francia meridionale e la Spagna (Pedrini et al., 2008).

Durante la migrazione post-riproduttiva, le Alpi rappresentano l'ostacolo principale che gli uccelli provenienti da Nord e svernanti nel bacino del Mediterraneo devono affrontare, in quanto costituiscono una vera e propria barriera fisica tra le regioni continentali del centro Europa e quelle meridionali. La maggior parte degli animali tende ad evitare la catena montuosa, giungendo dall'Europa centrale e orientale per poi piegare verso Ovest e addossarsi al versante meridionale delle Prealpi italiane in Friuli Venezia Giulia; solo una piccola parte dei migratori sembra attraversare le Alpi con direzione nettamente meridionale arrivando dal centro e Nord Europa e transitando sul versante transalpino svizzero. Quando le condizioni meteorologiche sono avverse, il flusso può subire delle deviazioni o addirittura arrestarsi (Pedrini et al., 2012).

Progetto Alpi

Il Progetto Alpi nasce nel 1997, grazie alla collaborazione tra il Museo Tridentino di Scienze Naturali (oggi MuSe) e l'Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica (oggi ISPRA), come un programma pluriennale di breve periodo (1997-2002) di monitoraggio, volto a descrivere e monitorare la migrazione post-riproduttiva degli uccelli nelle Alpi italiane (Pedrini et al., 2003).

Il progetto era rivolto agli inanellatori che intendessero monitorare la migrazione con metodi di cattura esclusivamente passiva, cioè solo attraverso reti, senza l'ausilio di richiami acustici e spauracchi e con metodi ripetibili, in forma standardizzata al fine di permettere comparazioni all'interno del settore italiano e con quello svizzero d'oltralpe. Proprio la standardizzazione ha rappresentato lo sforzo principale, per arrivare all'utilizzo di metodologie accurate di rilevamento biometrico e dell'habitat in grado di fornire dati confrontabili tra stazioni di inanellamento e operatori diversi (Negra et al., 2014).

Successivamente il programma è stato prolungato sul lungo termine e ha portato alla creazione di una rete di stazioni che hanno avviato uno scambio di informazioni tale da permettere di avere molti dati relativamente ai tempi e modalità di attraversamento della catena alpina di numerose specie, sia intrapaleartiche che transahariane. Le specie intrapaleartiche attraversano le Alpi nel periodo autunnale (fine settembre-fine ottobre), mentre quelle transahariane nella tarda estate (<http://progetto-alpi.muse.it/it/il-progetto/>).

Nel 2020 al programma di inanellamento hanno collaborato 43 stazioni distribuite su tutto l'arco alpino italiano, con il coinvolgimento di oltre cento inanellatori, che operano in maniera coordinata seguendo le indicazioni di un Manuale Metodologico di campo, progressivamente aggiornato negli anni (<http://progetto-alpi.muse.it/it/il-progetto/>).

Le stazioni che partecipano sono prevalentemente "stazioni di valico", ovvero comprendenti località poste su valichi montani, quindi idonee al monitoraggio della migrazione attiva diurna e notturna alle medie e alte quote (Pedrini et al., 2008); qui viene monitorato il transito in quota dei migratori, mentre nelle "stazioni di fondovalle" e "di versante" viene campionata essenzialmente la sosta degli uccelli ed il loro spostamento.

Per quanto riguarda il periodo di attività, si distinguono stazioni che operano entro l'intero periodo migratorio (dalla seconda decade di agosto a tutto ottobre), quelle che operano in periodi continuativi ma più brevi, a monitoraggio della sola migrazione tardo estiva (pentadi 46-54) o autunnale (pentadi 55-61), e le stazioni attive per periodi brevi (pentadi o almeno due giornate per pentade) o quelle sperimentali (<http://progetto-alpi.muse.it/it/il-progetto/>).

Malga Confin

La stazione di inanellamento in cui è avvenuto il campionamento è la Malga Confin. Essa è una stazione di valico che ha iniziato la sua attività nel 2017 ed è localizzata nelle Alpi orientali, in Friuli-Venezia Giulia, al confine con il Parco Naturale delle Prealpi Giulie, nel territorio della Val Venzonassa (fig. 8). È attiva per il periodo autunnale, di solito da fine settembre a inizio novembre, dalla pentade 54 alla 60 o 61, in relazione alle condizioni metereologiche.



Figura 8: la Malga Confin vista dalla strada di accesso (via Pragièl). L'ovale in giallo mostra il posizionamento della malga Confin. Sullo sfondo svetta la Cima di Campo.

Foto scattata in un giorno di campionamento.

La fascia vegetazionale latitudinale è caratterizzata da pascolo con poche piante di pino nero e arbusti di rosa canina nella fascia superiore, muggheta e faggeta, chiuso ad Est da faggeta con sorbi; in particolare, la vegetazione alle reti comprende specie arboree quali pino nero, faggio, pino mugo e arbusti di rosa canina e sorbi (<http://progetto-alpi.muse.it/it/stations-index/malga-confin/>).

La Malga Confin si occupa dell'inanellamento di varie specie di uccelli migratori intrapaleartici durante la loro migrazione autunnale (post-riproduttiva), prevalentemente passeriformi; ha registrato 2818 catture nel 2017, 871 nel 2018, 2738 nel 2019 e 676 nel 2020 (<http://progetto-alpi.muse.it/it/stations-index/malga-confin/>). Tra le 60 specie inanellate nei quattro anni di attività risulta che la specie più catturata in assoluto è la cincia mora (*Periparus ater*), seguita dal pettirosso (*Erithacus rubecola*). Altra specie inanellata molto di frequente è il regolo (*Regulus regulus*).

Molte delle catture riguardano specie appartenenti alla famiglia dei turdidi, in particolare nei 4 anni di attività sono stati inanellati in ordine di frequenza:

- il tordo bottaccio (*Turdus philomelos*),
- il merlo (*Turdus merula*),
- la tordela (*Turdus viscivorus*),
- il tordo sassello (*Turdus iliacus*),
- il merlo dal collare (*Turdus torquatus*),
- la cesena (*Turdus pilaris*).

Secondariamente sono molto catturate anche le specie appartenenti alla famiglia dei fringillidi, in particolare in ordine di frequenza:

- il fringuello (*Fringilla coelebs*),
- la peppola (*Fringilla montifringilla*),
- il lucherino (*Carduelis spinus*),
- il cardellino (*Carduelis carduelis*),
- il ciuffolotto (*Pyrrhula pyrrhula*),
- il frosone (*Coccothraustes coccothraustes*),
- l'organetto (*Carduelis flammes*).

Altre specie rilevanti sono il codiroso spazzacamino (*Phoenicurus ochruros*) e lo spioncello (*Anthus spinoletta*), seguiti dalla cinciallegra (*Parus major*), la passera scopaiola (*Prunella modularis*), il lui piccolo (*Phylloscopus collybita*), lo zigolo muciatto (*Emberiza cia*), la pispola (*Anthus pratensis*), la cinciarella (*Cyanistes caeruleus*), il codiroso comune (*Phoenicurus phoenicurus*) e lo scricciolo (*Troglodytes troglodytes*). Risultano invece catturate con una frequenza molto inferiore tutte le altre specie, in ordine: codibugnolo (*Aegithalos caudatus*), la cincia alpestre (*Poecile montanus*), la cincia bigia (*Poecile palustris*), il crociere (*Loxia curvirostra*), il picchio rosso maggiore (*Dendrocopos major*), il rampichino alpestre (*Certhia familiaris*), il fiorrancino (*Regulus ignicapilla*), la nocciolaia (*Nucifraga caryocatactes*), il picchio muratore (*Sitta europaea*), la balia nera (*Ficedula hypoleuca*), il culbianco (*Oenanthe oenanthe*), la becaccia (*Scolopax rusticola*), la bigiarella (*Sylvia curruca*), la capinera (*Sylvia atricapilla*), la civetta capogrosso (*Aegolius funereus*), la ghiandaia (*Garrulus glandarius*), lo sparviere (*Accipiter nisus*), la ballerina gialla (*Motacilla cinerea*), la cincia dal ciuffo (*Lophophanes cristatus*), la coturnice (*Alectoris graeca*), la civetta nana (*Glaucidium passerinum*), il forapaglie macchiettato (*Locustella naevia*), il lui grosso (*Phylloscopus trochilus*), il picchio cenerino (*Picus canus*).

Un solo individuo in 4 anni è stato catturato di: il beccafico (*Sylvia borin*), il cuculo (*Cuculus canorus*), il fagiano di monte (*Tetrao tetrix*), il frullino (*Lymnocyptes minimus*), il gheppio (*Falco tinnunculus*), il picchio nero (*Dryocopus martius*), il prispolone (*Anthus trivialis*), il rampichino comune (*Certhia brachydactyla*), la tottavilla (*Lullula arborea*), il verzellino (*Serinus serinus*).

Specie di uccelli

Le specie che prendiamo in considerazione, in quanto oggetto del campionamento sono: la cincia mora (*Periparus ater*), il fringuello (*Fringilla coelebs*), il merlo (*Turdus merula*), la peppola (*Fringilla montifringilla*), il pettirosso (*Erithacus rubecola*), lo spioncello (*Anthus spinoletta*), il tordo bottaccio (*Turdus philomelos*) e il tordo sassello (*Turdus iliacus*).

Cincia mora (*Periparus ater*)

La cincia mora è un uccello di circa 10-11 cm di lunghezza, appartenente alla famiglia dei Paridi. È caratterizzata da una macchia bianca sulla nuca, mentre il resto della testa è nera, ha le guance bianche con un bavaglino nero, mentre la parte inferiore del corpo va dal giallastro al biancastro e i fianchi sono di color camoscio. Le ali sono di colore grigio piombo o olivastro, con una doppia barra alare. (fig. 9)

Classificazione scientifica	
Ordine	Passeriformes
Famiglia	Paridae
Genere	<i>Periparus</i>
Specie	<i>P. ater</i>

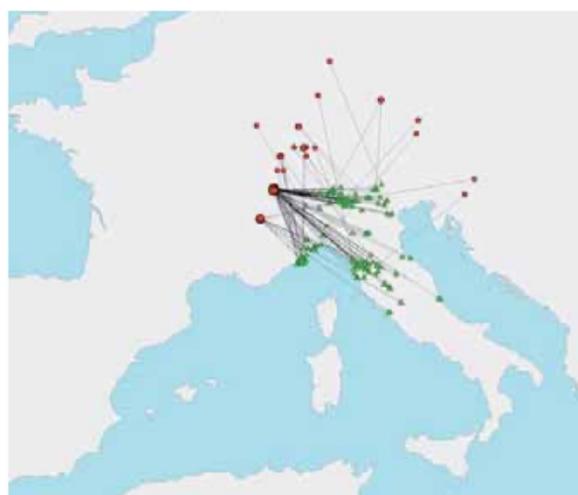


Figura 9: individuo adulto di cincia mora. Foto tratta da (https://it.wikipedia.org/wiki/Periparus_ater).

La cincia mora è un migratore intrapaleartico: le popolazioni che nidificano nei settori Nord-orientali dell'areale riproduttivo sono migratrici, mentre quelle che si riproducono nella zona Sud-occidentale sono generalmente sedentarie. I movimenti più estesi a livello europeo hanno direzione da Nord-Est a Ovest o Sud-Ovest, mentre per quanto riguarda i soggetti ricatturati in Italia, seguono prevalentemente una rotta Sud-Est. Essi risultano infatti provenire per la maggior parte da aree vicine ai nostri confini nazionali, intorno all'arco alpino, ed in particolare dalla Francia e dalla Svizzera, mentre pochi soggetti dalla Germania, dall'Austria e dalla Slovenia (fig. 10). Gli spostamenti della cincia mora sono quindi piuttosto brevi, con una media di 200-300 km, fino ad un massimo di 500 km (Volponi e Spina, 2008).

È una specie tipicamente autunnale di media e alta quota, con l'inizio dei movimenti migratori post-riproduttivi sulle Alpi alla fine di agosto ed il passo più cospicuo ad ottobre e novembre (picco nella pentade 60 e 61) (Pedrini et al., 2008).

Figura 10: rotta migratoria post-riproduttiva verso l'Italia della cincia mora. I punti rossi sono le zone di nidificazione primaverile-estiva, mentre i triangoli verdi sono le aree di ricattura in autunno in Italia. Foto tratta da Volponi e Spina, 2008.



È una specie presente in Eurasia e Africa Nord-occidentale; nel paleartico occidentale popola le zone a clima boreale temperato, mediterraneo e montano, dove predilige i boschi di conifere. È comune nei paesi dell'Europa centro-settentrionale, mentre ha una distribuzione frammentata alle latitudini inferiori.

In Italia è una specie nidificante, migratrice regolare e anche svernante, invasiva in alcune annate; è presente soprattutto nel settore montano, in particolare alpino, prealpino e appenninico, ed anche in Sicilia e Sardegna, mentre la sua presenza è inferiore a quote più basse ed è localizzata nelle aree costiere e di pianura (Volponi e Spina, 2008).

I movimenti all'interno dei nostri confini nazionali sono molto limitati, di solito di pochi km intorno all'area di svernamento.

Fringuello (*Fringilla coelebs*)

Classificazione scientifica	
Ordine	Passeriformes
Famiglia	Fringillidae
Genere	<i>Fringilla</i>
Specie	<i>F. coelebs</i>

Il fringuello è un uccello di dimensioni medio piccole (18 cm di lunghezza), appartenente alla famiglia dei Fringillidi. Ha un piumaggio che mostra forte dicromatismo sessuale: il maschio in stagione riproduttiva (fig. 11) è inconfondibile per forma e colorazione rispetto alle altre specie che transitano in Europa, in quanto presenta la fronte nera e vertice, nuca e spalle di colore grigio-azzurro, mentre il resto della testa ed il petto sono rosso ruggine, che

ventralmente si fa più chiaro fino a diventare bianco nel sottocoda. I fianchi sono grigiastri e il dorso rosso bruno, mentre le ali sono nere, con una banda bianca trasversale. I colori mutano in stagione post-riproduttiva, facendosi più sbiaditi (<https://ebird.org/species/comcha>).

Le femmine invece sono di una colorazione di fondo bruno giallastra su gran parte del corpo, che è più scuro dorsalmente e più chiaro ventralmente, ma mantiene il *pattern* cromatico del maschio nelle ali.

Figura 11: individuo maschio di fringuello in stagione riproduttiva.

Foto tratta da <https://ebird.org/species/comcha>.



Il fringuello è un migratore intrapaleartico, spiccatamente gregario e diurno, più attivo al mattino; spesso forma gruppi misti con la peppola (*Fringilla montifringilla*). Le varie popolazioni hanno comunque diverse strategie migratorie, in quanto alcune sono sedentarie altre sono completamente migratrici. Ha un areale riproduttivo che comprende le zone boreali temperate del Mediterraneo e di gran parte del Palearctico occidentale, con una distribuzione che comprende tutti i paesi europei fino a latitudini estreme in Scandinavia e Siberia (Volponi e Spina, 2008).

In Europa le principali vie di migrazione autunnale sono lungo la direttrice Nord-Est Sud-Ovest, per raggiungere le coste meridionali del Mediterraneo, fino anche al Marocco e alla Libia. L'Italia è connessa ad un bacino geografico molto vasto, anche se i maggiori paesi di provenienza dei fringuelli nel periodo

autunnale post-riproduttivo sono la Russia, la Repubblica Ceca, l’Austria, la Slovenia, la Francia e, in minima parte, la Finlandia (fig. 12). Gli spostamenti medi compiuti da questi soggetti sono di 1000 km, ed in alcuni casi arrivano anche a 2000 km. La numerosità dei contingenti derivanti dalla Slovenia e dall’Austria, suggerisce l’importante ruolo di accesso alle aree prealpine italiane rivestito dal Friuli, passaggio che consente di evitare l’attraversamento diretto della catena alpina (Volponi e Spina, 2008).

L’inizio del passo si registra a fine settembre (pentade 55) e le catture sono numerose per tutto ottobre e proseguono fino a inizio novembre (pentade 60-61) (Pedrini et al., 2008).

Figura 12: rotta migratoria post-riproduttiva verso l’Italia del fringuello. I punti rossi sono le zone di nidificazione primaverile-estiva, mentre i triangoli sono le aree di ricattura in autunno in Italia. Foto tratta da Volponi e Spina, 2008.



È presente in quasi tutti gli ambienti boschivi naturali e antropizzati, dal livello del mare fino a 2000 m. s.l.m. di tutta la penisola italiana e delle isole maggiori, anche se le densità più elevate si raggiungono nelle regioni prealpine del Nord. Numeri rilevanti, tuttavia, sono riscontrati anche in alcune aree costiere, in particolare Emilia-Romagna e Marche sul Mar Adriatico e Liguria, Toscana e Campania sul Mar Tirreno (Volponi e Spina, 2008). I fringuelli svernanti in Italia sono fedeli al sito dell’inverno precedente ed i movimenti entro i confini nazionali nel medesimo inverno sono limitati, con pochi spostamenti tra i due versanti della penisola.

Merlo (*Turdus merula*)

Il merlo appartiene alla famiglia dei turdidi, uccelli di taglia medio-piccola con alcuni tratti morfologici comuni, cioè: il tarso lungo rispetto alle dimensioni corporee, il piumaggio mimetico e solitamente punteggiato, soprattutto nei giovani, e una formazione caratteristica della siringe.

Gli adulti hanno la parte inferiore del corpo più o meno macchiata, il becco è di media lunghezza, di solito la mandibola superiore sporge leggermente

Classificazione scientifica	
Ordine	Passeriformes
Famiglia	Turdidae
Genere	<i>Turdus</i>
Specie	<i>T. merula</i>

rispetto alla inferiore e la punta è rivolta verso il basso. Le zampe ed i piedi sono robusti e l’ala risulta più lunga nelle popolazioni migratrici e che vivono in ambienti aperti e più corta in quelle sedentarie o residenti in ambiente boschivo.

A differenza delle altre specie di turdidi, il merlo ha una colorazione scura del piumaggio, in particolare: il maschio adulto (fig. 13) è nero e presenta le palpebre gialle ed il becco giallo-arancio, la femmina adulta (fig. 14) ha una colorazione marrone scura con delle striature bianco-grigiastre inferiormente sulle penne della gola e del mento, mentre sul petto la colorazione di fondo tende al rossiccio ed il sottocoda è nero pallido. Il becco ha una colorazione variabile, dal bruno scuro al giallo o giallo-arancio. Il soggetto giovane è marrone-rossiccio, simile alla femmina, ma distinguibile per il piumaggio più pallido. Il becco è inizialmente scuro e poi diventa completamente giallo all'inizio della stagione riproduttiva (Andreotti et al., 2010).



Figura 13: individuo maschio di merlo. Foto tratta <https://birdsoftheworld.org/bow/species/eurbla/cur/introduction>.

Figura 14: individuo femmina di merlo. Foto tratta da Andreotti et al., 2010



Il merlo è diffuso in tutti i paesi europei e le diverse popolazioni geografiche mostrano variabilità nel comportamento migratorio: esistono popolazioni sedentarie, parzialmente o completamente migratrici. È un migratore intrapaleartico regolare, che sverna nelle regioni mediterranee, ma in Italia è anche una delle specie nidificanti più diffuse ed abbondanti (Volponi e Spina, 2008).

Gli individui nidificanti in Europa settentrionale e centrale migrano verso Ovest e Sud-Ovest e svernano nei limiti più meridionali dell'areale riproduttivo (Francia centrale e occidentale, Spagna, Portogallo, Baleari, Corsica, Italia settentrionale e Malta), mentre le popolazioni più orientali mantengono una direzione migratoria rivolta prevalentemente ad Ovest. I soggetti che nidificano a latitudini europee inferiori (per es. in Italia), invece, tendono ad essere sedentari o effettuare solo brevi spostamenti altitudinali.

In particolare, i merli che raggiungono l'Italia provengono essenzialmente da due zone distinte: in gran parte arrivano dall'Europa centro-orientale (Ungheria, Polonia, Repubblica Ceca, Slovenia e Croazia settentrionale) o da latitudini più settentrionali, fino alla Finlandia meridionale, e seguono una direttrice Nord-Est Sud-Ovest fino a raggiungere la valle del Po; le popolazioni più orientali attraversano invece i Balcani e il Mar Adriatico, per transitare sull'Italia peninsulare e sulla Sicilia, seguendo una direttrice rivolta ad Ovest (fig. 15). La quota principale delle catture italiane avviene nel mese di ottobre, ma i primi merli arrivano a partire da fine agosto (Andreotti et al., 2010).

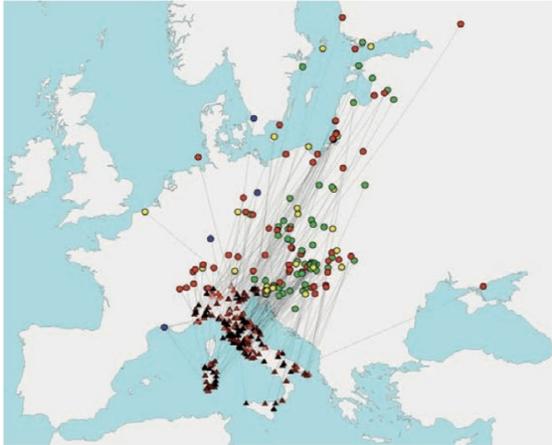


Figura 15: rotta migratoria post-riproduttiva verso l'Italia del merlo. I punti colorati rappresentano i siti di nidificazione europei in primavera-estate, i triangoli le ricatture italiane in autunno. Foto tratta da Volponi e Spina, 2008.

La maggior parte dei soggetti che transitano in Italia restano a svernare nel nostro paese, in particolare in Italia settentrionale quelli che originano dall'Europa Nord-orientale, nelle coste tirreniche quelli che provengono dai settori più orientali, fino alla Sardegna e Sicilia per quelli che seguono le rotte più occidentali. Tuttavia, in Italia esiste anche una consistente popolazione nidificante, in larga misura sedentaria, diffusa in tutta la penisola e nelle isole maggiori e minori, scarsa solo in aree della Puglia, per cui il nostro paese potrebbe risultare più importante per lo svernamento piuttosto che per il transito per questo motivo (Andreotti et al., 2010).

Per quanto riguarda l'habitat, il merlo è diffuso in ambienti alberati, dal livello del mare fino al limite della vegetazione arborea, e anche in ambienti urbani e suburbani; in effetti, tollera molto bene la presenza dell'uomo e di conseguenza ha colonizzato anche parchi e giardini di grandi insediamenti urbani.

All'interno dei confini nazionali i movimenti del merlo sono limitati, di pochi km, e non mostrano andamenti particolari (Volponi e Spina, 2008).

Peppola (*Fringilla montifringilla*)

La peppola è un piccolo passeriforme (14-16 cm di lunghezza) appartenente alla famiglia dei Fringillidi.

È molto simile al fringuello (*Fringilla coelebs*), con livrea distintiva a forte dicromatismo sessuale: il maschio in stagione riproduttiva ha la testa nera, dorso scuro petto e fianchi rossicci e ventralmente è bianco (fig. 16). in



stagione post-riproduttiva i colori diventano più pallidi, come nel fringuello.

Classificazione scientifica	
Ordine	Passeriformes
Famiglia	Fringillidae
Genere	<i>Fringilla</i>
Specie	<i>F. montifringilla</i>

Figura 16: individuo maschio di peppola in stagione riproduttiva.

Foto tratta da <https://ebird.org/species/brambl>

Le femmine invece sono di colore bruno a livello di testa e dorso, mentre il petto e le parti ventrali sono più chiare.

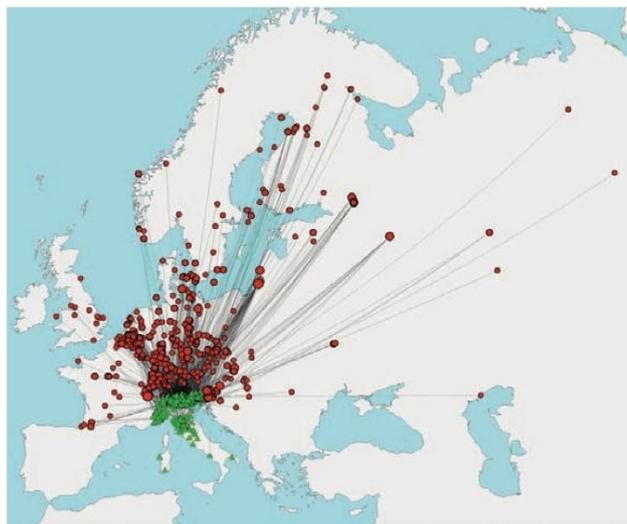
Questa specie ha distribuzione euroasiatica, ampiamente presente in Scandinavia e Russia settentrionale ed irregolarmente presente nei paesi dell'Europa centro-occidentale e baltica.

Tutte le popolazioni sono migratrici intrapaleartiche e si dirigono prevalentemente verso Sud-Ovest in autunno, dai siti di nidificazione. L'estensione di questi spostamenti è dettata dalla disponibilità di cibo, cosa che provoca forti variazioni numeriche ed anche il verificarsi di alcuni fenomeni invasivi, tanto che è qualificata come una specie a carattere irruttivo (Volponi e Spina, 2008). Un'altra particolarità è che i maschi tendono a rimanere più a Nord rispetto alle femmine, in modo da poter arrivare il più precocemente possibile nelle aree di riproduzione a primavera.

In Italia la peppola è un nidificante raro sulle Alpi e migratore e svernante regolare. Nel nostro paese arrivano individui da una vasta area geografica (fig. 17): provengono dalla Francia e dal Regno Unito, con una direttrice di spostamento verso Sud-Est, che quindi differisce dallo standard di migrazione della peppola a livello europeo, e da tutte le zone dell'Europa centrale, fino alla Scandinavia e aree siberiane. Il contingente più ampio sembra provenire dai paesi dell'Europa centro-settentrionale direttamente a Nord dell'Italia, principalmente dalla Germania, ma anche dalla Svizzera, dall'Austria e dall'Olanda, con numeri importanti anche dalla Slovenia, cosa che conferma l'importanza del Friuli come area di ingresso verso l'Italia. I movimenti compiuti da questa specie sono quindi molto vasti, fino a superare i 3000 km (Volponi e Spina, 2008).

La maggior parte delle ricatture italiane è concentrata a ottobre, fino alla prima decade di novembre (pentade 60-61) (Pedrini et al., 2008).

Figura 17: rotta migratoria post-riproduttiva verso l'Italia della peppola. I punti rossi rappresentano i siti di nidificazione europei in primavera-estate, i triangoli verdi sono le ricatture italiane in autunno-inverno. Foto tratta da Volponi e Spina, 2008.



In Italia la peppola sverna soprattutto nei rilievi dell'arco alpino e sulle Prealpi, a quote medie e alte, associato a faggete e latifoglie miste (Pedrini et al., 2012). Mostra una buona numerosità anche a Sud degli appennini, in particolare in Liguria, Toscana settentrionale e Marche, mentre è scarsamente presente in pianura e nelle regioni centro-meridionali. Non mostra fedeltà al sito di svernamento, caratteristica coerente con l'origine irruttiva dei suoi movimenti e la dipendenza di questi dalla disponibilità di alimento (Volponi e Spina, 2008).

I movimenti in inverno entro i confini nazionali sono concentrati nel Veneto e nella Lombardia, con prevalenza di spostamenti su breve distanza.

Pettirosso (*Erithacus rubecola*)

Il pettirosso è un piccolo passeriforme (13-14 cm di lunghezza) appartenente alla famiglia dei Muscicapidae, in passato classificato come un turdide.

Gli adulti sono a sessi non distinguibili, hanno il petto le guance e la fronte di colore rosso- arancio, contornato di grigio, mentre il resto del piumaggio è bruno oliva, col ventre bianco sporco (fig. 18).



Classificazione scientifica	
Ordine	Passeriformes
Famiglia	Muscicapidae
Genere	<i>Erithacus</i>
Specie	<i>E. rubecola</i>

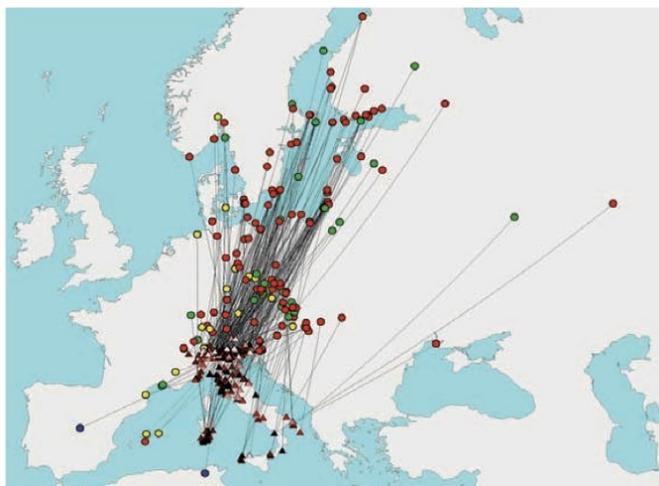
Figura 18: individuo adulto di pettirosso. Foto tratta da <https://ebird.org/species/eurrob1>.

È un migratore notturno intrapaleartico a corto raggio, e la maggior parte delle popolazioni sono migratrici parziali; tuttavia, quelle che nidificano nella porzione più Nord-orientale dell'areale sono completamente migratrici, mentre le popolazioni che abitano i paesi dell'Europa meridionale e del Nord-Africa sono largamente sedentarie.

La direttrice di migrazione principale, anche per questa specie è quella Nord-Est Sud-Ovest, con l'Italia che rappresenta un crocevia per gli uccelli provenienti da vaste aree geografiche (fig. 19). Le zone di provenienza principali sono quelle dei paesi del Baltico centro meridionale, dell'Europa centro-orientale e delle aree a Nord dell'arco alpino, ma anche Ungheria, Austria e Slovenia per i soggetti che seguono una direttrice più spiccatamente Est-Ovest. Le distanze percorse dal pettirosso sono molto variabili, tra poche centinaia di km e oltre i 2500 km (Volponi e Spina, 2008).

Transita sulle alpi nel periodo autunnale a tutte le quote (Pedrini et al., 2012), con un inizio dei movimenti nei primi di settembre (pentade 50), fino a un massimo stagionale ad ottobre (pentade 56) e una decrescita rapida nell'ultima decade di ottobre (Pedrini et al., 2008).

Figura 19: rotta migratoria post-riproduttiva verso l'Italia del pettirosso. I punti colorati rappresentano i siti di nidificazione europei in primavera-estate, i triangoli sono le ricatture italiane in autunno. Foto tratta da Volponi e Spina, 2008.



In Italia è migratore, svernante e nidificante regolare, presente dal livello del mare fino al limite della vegetazione arborea, ampiamente distribuito su tutta la penisola e nelle isole maggiori, ad eccezione della Pianura Padana orientale e la costa dell'Adriatico settentrionale; ha una minore densità nell'Italia centro-meridionale. Ha un habitat di preferenza negli ambienti boscati di varia natura, su substrati umidi e con un buon sottobosco, ma si trova anche in parchi e giardini ricchi di cespugli (Sorace et al., 2018). Entro la medesima stagione di svernamento, gli spostamenti del pettirosso entro i confini italiani possono essere considerevoli, in direzione Sud-Ovest, cioè verso aree le di svernamento Nord-Africane (Volponi e Spina, 2008).

Spioncello (*Anthus spinoletta*)

Lo spioncello è un passeriforme di dimensioni piccole (15-17 cm di lunghezza), della famiglia dei Motacillidi a sessi difficilmente distinguibili.

L'adulto in stagione riproduttiva (fig. 20) presenta un piumaggio grigiastro dorsalmente, striato di marrone, mentre ventralmente è più chiaro, sul biancastro. Ha la testa grigia (le femmine un po' più scura) con sopraccigli bianchi. In stagione non riproduttiva la colorazione è invece più tendente al brunastro, col ventre chiaro e striato di marrone.

Classificazione scientifica	
Ordine	Passeriformes
Famiglia	Motacillidae
Genere	<i>Anthus</i>
Specie	<i>A. spinoletta</i>



Figura 20: individuo adulto di spioncello in stagione riproduttiva.

Foto tratta da <https://ebird.org/species/watpip1>.

Lo spioncello è un migratore intrapaleartico completo o parziale. In Europa si riproduce nei Pirenei, nelle aree montuose della Francia, della Svizzera e della Germania, e su Alpi, Appennini e Carpazi.

In Italia è nidificante sulla catena alpina in pascoli e praterie d'altitudine, ma è anche migratore regolare e svernante.

I movimenti migratori verso l'Italia si sviluppano entro 500 km, con origine da aree vicine ai confini settentrionali delle Alpi (Francia, Svizzera e Austria), sporadicamente dalla Repubblica Ceca e da zone dell'Europa più settentrionale (fig. 21) (Volponi e Spina, 2008).



Figura 21: rotta migratoria post-riproduttiva verso l'Italia dello spioncello. I punti rossi rappresentano l'areale di nidificazione primaverile-estiva, mentre i triangoli i luoghi di ricattura in autunno-inverno in Italia.

Foto tratta da Volponi e Spina, 2008.

I primi movimenti migratori si registrano a fine agosto, ma il transito dello spioncello si svolge in buona parte da settembre fino a ottobre (pentade 59) (Pedrini et al., 2008).

In Italia è presente su tutta la catena alpina, più scarso e localizzato lungo la dorsale appenninica, assente in Sicilia e poco presente in ambito peninsulare e in Sardegna.

Gli spostamenti entro i confini nazionali sono su breve distanza, con prevalenza verso Sud-Ovest, soprattutto da siti lombardi verso aree piemontesi (Volponi e Spina, 2008).

Tordo bottaccio (*Turdus philomelos*)

Oltre alle caratteristiche comuni di tutti i turdidi, il tordo bottaccio adulto ha un piumaggio caratterizzato da tonalità brune, olivastre sul dorso e sopracoda e bianco-crema con macchiettature nerastre ventralmente, su petto e fianchi. L'addome tende al bianco-crema e nel sottoala è di un colore camoscio (fig. 22). L'iride varia dal marrone al nocciola scuro e il becco è marrone nerastro, con la base della mandibola inferiore gialla. Le zampe e i piedi sono color rosa

Classificazione scientifica	
Ordine	Passeriformes
Famiglia	Turdidae
Genere	<i>Turdus</i>
Specie	<i>T. philomelos</i>



pallido. È di taglia medio piccola (20 cm di lunghezza) e i sessi non sono distinguibili (Andreotti et al., 2010).

Figura 22: Individuo adulto di tordo bottaccio. Foto tratta da (Andreotti et al., 2010)

L'attitudine migratoria del tordo bottaccio è quella di un migratore intrapaleartico, notturno e parziale, cioè a seconda dell'area di origine o della sottospecie possono compiere migrazioni più o meno lunghe o essere sedentarie. La tendenza a migrare è propria delle popolazioni che nidificano in Europa centrale, settentrionale e orientale, che in autunno si muovono in direzione Sud-Ovest o Sud-Est.

L'Italia rappresenta un vero e proprio crocevia nella migrazione del tordo bottaccio: gli individui che migrano verso l'Italia provengono da un vasto bacino, comprendente la quasi totalità dei paesi europei, in quanto si estende da Est a Ovest, dalla Francia centro-orientale alla Russia centrale, e da Nord a Sud dalla Finlandia alla Penisola Balcanica. I numeri più elevati sembrano tuttavia provenire dall'Europa centro-orientale, quindi Ungheria, Repubblica Ceca, Germania, Svizzera, Polonia e Russia, con un ruolo importante anche della Scandinavia e delle Repubbliche baltiche (Volponi e Spina, 2008).

In particolare, ci sono tre principali direttrici di migrazione seguite dai soggetti che raggiungono l'Italia nel periodo autunnale (fig. 23): la prima origina dalle regioni baltiche e ha una direzione Sud Sud-Ovest; la seconda dall'Europa centro-orientale con una direttrice verso Sud-Ovest è percorsa da individui che evitano le Alpi, attraversando la parte settentrionale del Mar Adriatico. La terza invece è rivolta verso Sud-Est ed è seguita da soggetti provenienti dall'Europa centrale.

Per quanto riguarda il periodo di migrazione, è concentrato da metà settembre alla fine di ottobre (pentade 59) (Andreotti et al., 2010; Pedrini et al., 2008).

Figura 23: rotta migratoria post-riproduttiva verso l'Italia del tordo bottaccio.

I punti rossi rappresentano l'areale di nidificazione primaverile-estiva, mentre i triangoli i luoghi di ricattura in autunno-inverno in Italia. Foto tratta da Volponi e Spina, 2008.



I soggetti che raggiungono l'Italia in parte vi si fermano a svernare, con le maggiori concentrazioni rilevate lungo la costa tirrenica dalla Liguria alla Campania e in Sardegna, mentre in parte si dirigono verso i paesi sul Mediterraneo occidentale. Il tordo bottaccio mostra una spiccata fedeltà ai quartieri di svernamento, entro il cui areale gli individui effettuano movimenti regolari (Andreotti et al., 2010).

Relativamente alle preferenze ambientali, il tordo bottaccio in ambiente mediterraneo occupa una grande varietà di habitat, comprendente zone di macchia, arbusteti, foreste sempreverdi e pinete, ma anche ambienti coltivati e parchi urbani: in Italia sverna principalmente al centro-Sud, in ambienti collinari e pianiziali, ad un'altitudine inferiore a 600m s.l.m. e sporadicamente a quote maggiori. A Nord è presente in bassa densità in Pianura Padana e occasionalmente nel settore alpino (Andreotti et al., 2010).

Tordo sassello (*Turdus iliacus*)

È un tordo di taglia piccola (21 cm di lunghezza), a sessi non distinguibili, come il tordo bottaccio.

L'adulto presenta le guance marrone scuro e sopraccigli ed i lati del collo bianco-camoscio, mentre le parti dorsali sono brune tendenti all'oliva e le parti inferiori bianco crema screziate di bruno scuro sulla gola, petto e lati dell'addome. La colorazione di fondo è rosso-arancio, tipica anche del sottoala ed i fianchi hanno striature marroni (fig. 24).

Il becco è marrone nerastro con la base della mandibola inferiore gialla o giallo-arancio (Andreotti et al., 2010).

Classificazione scientifica	
Ordine	Passeriformes
Famiglia	Turdidae
Genere	<i>Turdus</i>
Specie	<i>T. iliacus</i>

Figura 24: individuo adulto di tordo sassello. Foto tratta da Andreotti et al., 2010.



Il tordo sassello è un migratore intrapaleartico completo o parziale, che in Italia transita regolarmente soprattutto tra ottobre e dicembre e può anche svernare o nidificare; non è fedele alle aree di svernamento (Volponi e Spina, 2008). La peculiarità di questa specie è che sfrutta moltissimo le condizioni meteorologiche, ed in particolare sembra che i venti influenzino i tempi e le rotte di migrazione, fino a determinare la scelta dei quartieri di svernamento: uno stesso individuo può iniziare la migrazione autunnale con venti da Est e quindi migrare verso Sud-Ovest un anno, mentre l'anno successivo seguire una rotta verso Sud-Est per sfruttare un regime di venti diverso (Andreotti et al., 2010).

La maggior parte dei soggetti che raggiungono il nostro paese proviene dalla Finlandia meridionale, dalla Svezia Sud-orientale e dall'Estonia, mentre in numero minore dalla Finlandia settentrionale e dalla Russia centro-occidentale fino alla Siberia. Essi in parte seguono una rotta che dalla penisola scandinava li porta all'Europa centro-orientale e dopo aver attraversato il Baltico si dirigono verso Sud-Ovest alla volta del Mediterraneo centrale e occidentale evitando le Alpi (fig. 25). Un altro contingente invece segue la costa orientale del Mare del Nord e attraversa l'Europa centrale e le Alpi (Andreotti et al., 2010).

Le ricatture maggiori in Italia si registrano dalla metà di ottobre (pentade 57), fino a novembre (picco nella pentade 61) e dicembre (Pedrini et al., 2008), soprattutto nelle regioni settentrionali, meno nelle aree meridionali della penisola.

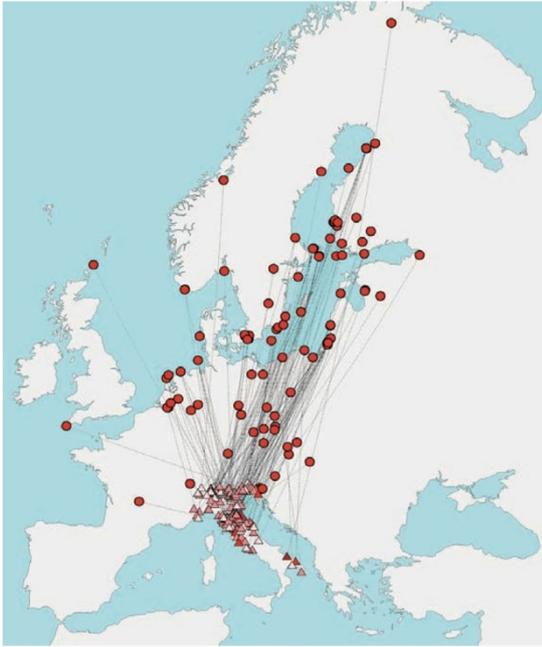


Figura 25: rotta migratoria post-riproduttiva verso l'Italia del tordo sassello. I punti rossi rappresentano le aree di nidificazione primaverile-estiva, mentre i triangoli i siti di ricattura italiani in autunno-inverno. Foto tratta da (Volponi e Spina, 2008).

I tordi sasselli svernano soprattutto nelle regioni centrali dell'Italia, in particolare nel versante tirrenico, mentre quelli che proseguono la rotta giungono nella costa mediterranea della Francia e in Corsica. Pochi soggetti si spingono più a Sud, raggiungendo l'Africa settentrionale o la Penisola iberica.

Per quanto riguarda le preferenze ambientali, i suoi ambienti di svernamento sono molto diversi rispetto a quelli riproduttivi: le massime densità nel periodo post-riproduttivo si registrano nei frutteti, soprattutto oliveti e vigneti, ma anche nei boschi mediterranei e campagne alberate. In Italia lo troviamo su tutto il territorio nazionale e nelle isole maggiori, più concentrato al Nord e al centro, in ambienti pianiziali o collinari, dove frequenta la macchia mediterranea e i boschi di latifoglie; occasionalmente sverna sulle Alpi, al di sotto dei 1000 m. di quota (Andreotti et al., 2010).

1.4 Il ruolo delle zecche dure e degli uccelli migratori nella trasmissione delle malattie

Considerando il ciclo biologico delle zecche Ixodidae, si può dedurre che esse hanno la possibilità di integrarsi nella catena epidemiologica della trasmissione degli agenti patogeni eventualmente presenti negli ospiti, e lo fanno secondo diverse modalità.

In primo luogo, la zecca deve infettarsi. Questo può avvenire tramite l'assunzione del sangue infetto di un ospite in seguito al pasto, o tramite il meccanismo del *co-feeding*.

Nel primo caso giocano un ruolo essenziale gli ospiti cosiddetti *reservoir*, in cui si ha infezione sistemica, ma allo stesso tempo solitamente non si manifesta la malattia. Le zecche inoltre, alternando durante il pasto l'introduzione di saliva all'assunzione di sangue dall'ospite, possono essere coinvolte nella trasmissione dei patogeni in entrambe le direzioni, cioè dalla zecca infetta all'ospite e dall'ospite infetto alla zecca (A. M. Buczek et al., 2020).

Nel caso del *co-feeding* invece, il meccanismo di trasmissione consiste nel passaggio del patogeno da una zecca infetta a una non infetta, anche in assenza di infezione sistemica nell'ospite, semplicemente attraverso il pasto simultaneo su un medesimo sito; la trasmissione si verifica anche se c'è un minimo di separazione fisica tra le due zecche che si stanno nutrendo nello stesso momento, o se la zecca non infetta si nutre dal sito in cui si è nutrita la zecca infetta, anche dopo che questa si è staccata (Randolph et al., 1996). Il *co-feeding* ha il vantaggio di permettere l'evasione alla risposta immunitaria dell'ospite, che invece domina nell'infezione sistemica (Voordouw, 2015).

Secondo un recente studio, che tuttavia necessita di ulteriori ricerche, sembrerebbe possibile un'ulteriore via di trasmissione microbica tra le zecche, cioè il contatto oro-anale: la zecca adulta maschio potrebbe infettarsi con i microrganismi presenti nel tratto alimentare o nelle feci della femmina, per poi trasferirli in ad un'altra femmina conspecifica non infetta durante la copula o ad un ospite durante il pasto (A. Buczek et al., 2018).

Il mantenimento del patogeno all'interno della popolazione zecche può poi avvenire con due modalità: con la trasmissione verticale o trans-ovarica, per cui il patogeno una volta assunto dalla zecca, deve essere in grado di passare dalla femmina ingorgata alle uova, o con la trasmissione trans-stadiale o orizzontale. In base a quest'ultima, perché un patogeno trasmesso da zecche persista nell'ambiente, esso deve essere stato acquisito durante il pasto su un ospite infetto, passato nel successivo stadio di sviluppo della zecca e poi trasferito con successo al nuovo ospite (Estrada-Peña & De La Fuente, 2014).

Anche il cambio di specie ospite durante il ciclo promuove la circolazione e la diffusione dei patogeni eventualmente introdotti o assunti dalla zecca e inoltre, se consideriamo gli uccelli migratori come potenziali ospiti, se ne comprende ancora di più la grande importanza epidemiologica nel promuovere la rapida ed estesa diffusione nell'ambiente dei patogeni zoonosici trasmessi da zecche (A. M. Buczek et al., 2020). Gli uccelli migratori, lungo le loro rotte migratorie, possono agire come "veicoli" per diversi microrganismi

patogeni associati alle zecche, alcuni dei quali sono mantenuti solo negli uccelli, altri solo nelle zecche, altri in entrambi (Wilhelmsson et al., 2020). Gli uccelli migratori intrapaleartici in particolare, sono definiti come *long-distance dispersal vectors*, perché si muovono stagionalmente su lunghe distanze superando grandi barriere geografiche, si fermano in siti con caratteristiche ambientali simili lungo le loro rotte migratorie, aumentando la probabilità di successo di stabilizzazione dei patogeni propagati, e sono di varie specie, abbondanti e ubiquitari (Viana et al., 2016). Sono più comuni e abbondanti nelle regioni temperate dell'emisfero boreale e possono trasportare le zecche entro l'Eurasia e tra Eurasia e Africa e con esse anche i patogeni zoonosici da loro trasmessi.

L'ECDC descrive le malattie trasmesse da zecche come endemiche in Europa (<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/small-bites-big-problems-tick-borne-diseases-europe>), e tra gli agenti di TBDs riscontrati in zecche prelevate da uccelli migratori troviamo molti batteri, virus e parassiti, ed anche più agenti patogeni simultaneamente. In particolare, i più comunemente trasmessi sono batteri appartenenti alle famiglie delle Spirochaetaceae e Rickettsiaceae (Rochlin & Toledo, 2020; Wilhelmsson et al., 2020); per quanto riguarda i virus, i più frequentemente riscontrati sono quelle delle famiglie Flaviviridae, Bunyaviridae e Togaviridae (Rochlin & Toledo, 2020; Swei et al., 2020). Le patologie associate a questi sono per la maggior parte delle zoonosi, e l'uomo rappresenta di solito un ospite accidentale a fondo cieco per l'agente infettivo, non svolgendo nessun ruolo nella trasmissione e mantenimento del patogeno nel ciclo enzootico (Rochlin & Toledo, 2020). Nel presente elaborato ci concentreremo su due agenti di queste TBD: *Borrelia* spp., appartenente alla famiglia delle Spirochaetaceae, e *tick-borne encephalitis virus* (TBEV), appartenente alla famiglia delle Flaviviridae.

***Borrelia* spp.**

Il genere *Borrelia*, appartenente all'ordine delle Spirochaetales e famiglia Spirochaetaceae, comprende due gruppi di specie: il complesso *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.) responsabile della malattia di Lyme o Borreliosi di Lyme, che nel 2015 è stato separato in un nuovo genere denominato *Borrelia* (ma questa nomenclatura non è largamente utilizzata) e il gruppo delle specie che causano la febbre ricorrente (Tick-borne relapsing fever – TBRF), appartenente al genere *Borrelia* (Madison-Antenucci et al., 2020). La TBRF è principalmente trasmessa da zecche molli, a parte la specie *Borrelia miyamotoi* (*B. miyamotoi*), trasmessa da zecche dure (Boulanger et al., 2019).

***Borrelia burgdorferi* s.l. – Malattia di Lyme**

B. burgdorferi s.l. è una spirocheta Gram negativa, patogeno zoonosico trasmesso dal morso di una zecca infetta del genere *Ixodes*. È altamente invasiva, tanto che infetta più persone in Europa, Asia e Nord America di ogni altro batterio trasmesso da zecche (Madison-Antenucci et al., 2020) e la malattia di cui è agente eziologico, ovvero la malattia di Lyme, è classificata come la TBD con maggiore prevalenza nelle aree

temperate delle zone geografiche sopra elencate, con una distribuzione in aumento (<https://www.ecdc.europa.eu/en/borreliosis/facts/factsheet>). Tra le VBD, la borreliosi per numero di casi è seconda solo alla malaria (<https://www.epicentro.iss.it/zecche/borreliosi>).

Il complesso *B. burgdorferi* s.l. comprende minimo 15 genospecie, anche se solo poche sono significativamente patogene per l'uomo (<https://www.ecdc.europa.eu/en/borreliosis/facts/factsheet>). In Europa, *Borrelia afzelii* (*B. afzelii*) e *Borrelia garinii* (*B. garinii*) sono quelle più frequentemente causa di borreliosi di Lyme (<https://www.ecdc.europa.eu/en/borreliosis/facts/factsheet>; Steere et al., 2017), *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (*B. burgdorferi* s.s.) è presente solo in alcune parti in Europa, mentre è la principale specie individuata in Nord America, seguita da *Borrelia mayonii* (*B. mayonii*), identificata nel 2016 (Madison-Antenucci et al., 2020). *Borrelia bavariensis* (*B. bavariensis*), *Borrelia lusitaniae* (*B. lusitaniae*), *Borrelia spielmanii* (*B. spielmanii*) e *Borrelia valaisiana* (*B. valaisiana*) invece, causano raramente malattia nell'uomo (<https://www.ecdc.europa.eu/en/borreliosis/facts/factsheet>).

Il vettore più comune in Europa per *B. afzelii* e *B. garinii* è *I. ricinus*, ma, essendo in Asia *Ixodes persulcatus* (*I. persulcatus*), in alcune aree dell'Est Europa l'habitat di queste due specie si sovrappone; negli USA il vettore principale è invece *Ixodes scapularis* (Madison-Antenucci et al., 2020).

In Europa, i *reservoirs* di *B. burgdorferi* s.l. includono molte specie di piccoli e medi roditori (topi, ratti, scoiattoli, lepri e conigli), come anche varie specie di uccelli, soprattutto passeriformi, rettili e insettivori; al contrario, molti vertebrati di grandi dimensioni selvatici o domestici, come i cervi e le pecore, sono considerati *reservoirs* non competenti, non permettendo la trasmissione di *Borrelia* alla zecca che si nutre su di loro (Rizzoli et al., 2011). In particolare, i *reservoirs* di *B. afzelii* e *B. burgdorferi* s.s. sono i roditori, dove la spirocheta causa un'infezione sistemica molto duratura che facilita il passaggio del patogeno alla zecca; *B. garinii* e *B. valaisiana* sono, invece, specie adattate agli uccelli, i quali non sviluppano però infezione sistemica a seguito del morso di una zecca infetta con *B. afzelii* (D. J. A. Heylen et al., 2017). In questa associazione tra le specie di *Borrelia* e gli ospiti vertebrati, gioca un ruolo importante l'immunità innata degli ospiti, ed in particolare il sistema del complemento: *B. afzelii* e *B. burgdorferi* s.s. sono tolleranti al complemento dei roditori, per cui questi rappresentano i loro *reservoirs*; *B. garinii* e *B. valaisiana* invece, sono tolleranti al complemento degli uccelli e non a quello dei roditori, per cui sono maggiormente riscontrate negli uccelli (Voordouw, 2015).

Per quanto riguarda la modalità di trasmissione alla zecca, *B. burgdorferi*, *B. afzelii* e *B. garinii* sono trasmesse per via sistemica, quasi esclusivamente con modalità trans-stadiale, il che significherebbe che le larve non sono in grado di trasmettere la malattia all'uomo (Steere et al., 2017); una recente ricerca ha tuttavia individuato la possibilità di una trasmissione transovarica per *B. burgdorferi* s.l., sebbene non sia una via molto efficiente dato che la prevalenza di *B. burgdorferi* s.l. nelle larve è risultata molto variabile, dallo 0% al 25,8% (Hauck et al., 2020). Il meccanismo del *co-feeding* è stato dimostrato per *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* e *B. valaisiana*; questo sembra essere molto meno efficace rispetto alla trasmissione sistemica, ma

sembra esprimersi al meglio nel sistema europeo di *B. afzelii* e *I. ricinus* (D. J. A. Heylen et al., 2017; Voordouw, 2015). In effetti, è stato anche dimostrato che le ninfe di *I. ricinus* infettatesi con *B. afzelii* allo stadio larvale attraverso il *co-feeding*, sono infettive per i loro ospiti *reservoirs* vertebrati, ossia i roditori (Belli et al., 2017). Questo meccanismo di trasmissione permetterebbe inoltre a *Borrelia* di acquisire anche dei vantaggi in termini di *fitness*: le zecche, infatti, potrebbero trasmettersi la spirocheta in questo modo, mentre si nutrono su un *reservoir* non competente (Rizzoli et al., 2011) e inoltre alcuni studi hanno dimostrato la trasmissione di *B. garinii* e *B. valaisiana* tra zecche immature del genere *Ixodes* in *co-feeding* su topi di laboratorio, il cui complemento altrimenti ucciderebbe la spirocheta. Altri studi condotti su uccelli, hanno evidenziato che le zecche in *co-feeding* su questi vertebrati hanno 4 volte più possibilità di infettarsi con *B. afzelii* (Voordouw, 2015). Il *co-feeding* inoltre potrebbe avere anche il vantaggio di facilitare l'incontro tra le specie di *Borrelia* i cui *reservoirs* occupano nicchie ecologiche differenti, come i roditori e gli uccelli rispettivamente per *B. afzelii* e *B. garinii*, che potrebbero così incontrarsi frequentemente nella zecca vettore (Voordouw, 2015).

Il ciclo biologico di *B. burgdorferi* s.l. segue quindi quello delle zecche *I. ricinus* in Europa, dove le ninfe, che attuano il *questing* più attivamente dalla primavera all'autunno, sono ritenute maggiormente responsabili della borreliosi umana (Rizzoli et al., 2011).

Per quanto concerne la prevalenza delle specie appartenenti al complesso *B. burgdorferi* s.l., sono stati condotti degli studi sulla distribuzione di questo patogeno nelle ninfe di *I. ricinus*; essi mostrano che le specie di *B. burgdorferi* s.l. più riportate in Europa hanno la stessa distribuzione spaziale del loro vettore *I. ricinus*, ma a una prevalenza diversa. Questo significa che esiste una nicchia ambientale che guida la prevalenza delle tre specie più comuni di *Borrelia* nelle zecche in Europa, ovvero *B. afzelii*, *B. garinii* e *B. valaisiana*. Il patogeno esiste a tassi variabili ovunque esista il suo vettore, ma la massima prevalenza è registrata in Europa centrale: tende a essere meno prevalente nelle aree più fredde, dove le zecche sono meno presenti, come le regioni Baltiche, o nelle zone in cui mancano i *reservoirs* adeguati (come il Regno Unito). In particolare, *B. afzelii* sembra essere più comune nelle regioni con clima continentale, soprattutto in Europa centrale e settentrionale, mentre *B. garinii* e *B. valaisiana* sono più prevalenti nelle zone montuose del Mediterraneo. È risultato comunque, che *B. afzelii*, *B. garinii* e *B. valaisiana* si sovrappongono ampiamente in tutta Europa e la maggiore prevalenza si riscontra in aree con una temperatura annuale media tra i 7°C e i 17°C e salita lenta delle temperature in primavera (Estrada-Peña et al., 2018). È chiaro che il cambiamento climatico potrà modificare la distribuzione di queste specie di *Borrelia*, per cui le proiezioni indicano una futura divergenza nella distribuzione dei *reservoirs*, con probabile impatto sulla distribuzione anche dei patogeni. In particolare, sembra che nel 2030 *B. garinii* si potrà espandere in aree europee più settentrionali, alcune parti dell'Europa centrale, fino ai paesi baltici, zone in cui *I. ricinus* non è ancora presente a causa delle basse temperature (Fernández-Ruiz & Estrada-Peña, 2020).

L'ECDC stima una prevalenza media delle genospecie di *B. burgdorferi* nelle zecche europee in *questing* del 12%, più elevata negli adulti piuttosto che nelle ninfe; la maggiore infestazione è anche in questo caso

riscontrata in Europa Centrale (ninfe >10%; zecche adulte >20%), specificatamente in Austria, Repubblica Ceca, Sud della Germania, Svizzera, Slovacchia e Slovenia (<https://www.ecdc.europa.eu/en/borreliosis/facts/factsheet>).

Questa descrizione sulla prevalenza nelle zecche di *I. ricinus* rappresenta un'indicazione sulla possibilità di esposizione a *B. burgdorferi* s.l. per l'uomo, ma non rispecchia l'incidenza umana della malattia di Lyme, il cui rischio di infezione è molto difficile da determinare (Estrada-Peña et al., 2018). Un'accurata descrizione epidemiologica della borreliosi di Lyme non è infatti possibile, perché non è una malattia obbligatoriamente notificabile in tutti i paesi (van den Wijngaard et al., 2017). Al 2011 in Europa, il numero medio di casi notificati di borreliosi di Lyme erano più di 65.400, con un'incidenza nei vari paesi che andava da 1 a 350 casi ogni 100.000 persone (Rizzoli et al., 2011). Dal 22 giugno 2018, la Commissione Europea con la decisione 2018/945, ha aggiunto nella lista delle malattie coperte dalla sorveglianza epidemiologica dell'Unione Europea da parte dell'ECDC la neuroborreliosi di Lyme, in quanto è la manifestazione più frequente e fattibile da standardizzare, per una migliore valutazione dell'incidenza spaziale e temporale della malattia di Lyme (van den Wijngaard et al., 2017). L'ECDC ha pianificato l'inizio di questo monitoraggio e di raccolta dei dati per il 2019 ed i dati non sono ancora stati pubblicati.

In Italia la reale incidenza della malattia di Lyme nell'uomo è sconosciuta (Barlozzari, 2021). Il Ministero della Sanità circa 20 anni fa ha emesso la circolare n. 10 del 13 luglio del 2000, in cui ha rilevato circa un migliaio di casi verificatisi in Italia tra il 1992 e il 1998 (<https://www.epicentro.iss.it/zecche/borreliosi>); qui, le regioni più interessate erano considerate il Friuli-Venezia Giulia, la Liguria, il Veneto, l'Emilia-Romagna e il Trentino Alto-Adige. Ad oggi la malattia di Lyme è considerata endemica in tutte queste regioni più la Lombardia, mentre è valutata essere sporadica nelle regioni centro-meridionali e nelle isole. Dati epidemiologici più recenti, presi dal Sistema informativo malattie infettive (SimiWEB), realizzato dall'Istituto Superiore di Sanità e che si basa sulle segnalazioni dei medici e sui riepiloghi compilati da ogni Azienda sanitaria locale (<https://www.epicentro.iss.it/infettive/sorveglianza>), riportano 312 casi accertati dal 2010 al 2014, per la maggior parte in Veneto, seguito dalla Valle d'Aosta, dalla Sicilia e dall'Abruzzo (Barlozzari, 2021). In particolare, nella regione autonoma Friuli Venezia Giulia, alcuni dati sono riportati dall'Azienda sanitaria universitaria Giuliana Isontina (ASU GI) relativamente a Trieste, dove le notifiche hanno subito un incremento nel corso degli anni 90, con un picco di 72 casi registrati nel 1996, per poi decrescere in maniera irregolare fino a 12 casi notificati nel 2003 (https://asugi.sanita.fvg.it/export/sites/aas1/it/documenti/all_dip/mat_info/dip_isp_la_malattia_di_lyme.pdf). La borreliosi di Lyme è in effetti inserita tra le malattie con obbligo di notifica nella classe V (Decreto Ministeriale 15 dicembre 1990 – GU Serie Generale n.6 del 08-01-1991), che prevede che le unità sanitarie locali comunichino annualmente il riepilogo della malattia alla regione, e questa al Ministero. Il Dlgs. 191/2006, in attuazione della direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, ha inoltre citato la borreliosi nell'elenco delle patologie che possono essere sottoposte a

sorveglianza da parte delle regioni e province autonome in funzione della situazione epidemiologica (art. 4, comma 3 e Allegato 1 – parte B). Il Piano nazionale integrato 2011-2014, raggruppando queste indicazioni, impone per la borreliosi di Lyme un obbligo di segnalazione scritta da parte del Medico della Zona Territoriale entro 48 ore alle autorità locali competenti e una segnalazione entro 24 ore in caso di focolaio epidemico (<https://www.salute.gov.it/pianoNazionaleIntegrato/paginaInternaMenuPianoNazionaleIntegrato.jsp?id=3941&lingua=italiano&menu=capitolo3&sottomenu=2157>).

A livello di manifestazione clinica, tutte le genospecie patogene per l'uomo provocano un'infezione che inizia con un'inflammatione cutanea che si espande dal sito del morso della zecca in maniera centrifuga, conosciuto come eritema migrante; esso si manifesta nel 70-80% dei casi circa 7 giorni dopo il morso della zecca e può essere accompagnato da sintomi influenzali, come febbre e mal di testa. Se non trattato, può essere seguito da uno stadio più tardivo di disseminazione in vari tessuti, con manifestazioni soprattutto neurologiche, articolari o cardiache, dipendentemente dalla specie coinvolta (Steere et al., 2017). L'eterogeneità delle specie di *B. burgdorferi* s.l. sembra in effetti essere il principale fattore responsabile delle differenze di espressione clinica della borreliosi di Lyme: *B. afzelii* infatti è conosciuta come prevalentemente cutanea, correlata alla acrodermatite atrofica cronica e raramente al linfocitoma cutaneo (*lymphadenosis benigna cutis*), mentre *B. garinii* è più neurotropica, responsabile della sindrome di Bannwarth; *B. burgdorferi* s.s. è invece particolarmente artritogena (Madison-Antenucci et al., 2020).

***Borrelia miyamotoi* - Febbre ricorrente (TBRF)**

B. miyamotoi è correlata lontanamente a *B. burgdorferi* ed è geneticamente distinta dal complesso di *B. burgdorferi* s.l., mentre risulta più vicina al gruppo delle specie che causano la febbre ricorrente (Madison-Antenucci et al., 2020): questo annovera 25 specie di *Borrelia*, principalmente trasmesse da zecche molli, mentre *B. miyamotoi* è trasmessa da zecche dure del genere *Ixodes* (Kubiak et al., 2021).

Il primo ritrovamento di questa specie è avvenuto in Giappone nel 1994 in una zecca adulta di *I. persulcatus* (Kubiak et al., 2021), mentre il primo caso di febbre ricorrente da *B. miyamotoi* nell'uomo risale al 2011 in Russia. Dal 1994 è stata trovata in zecche *Ixodes* in molti paesi dell'Asia, del Nord America e dell'Europa, dove i vettori principali sono *I. ricinus* e *I. persulcatus* e al momento la sua prevalenza è maggiormente studiata nelle zecche piuttosto che nell'uomo (Madison-Antenucci et al., 2020). La prevalenza di *B. miyamotoi* in questi artropodi del genere *Ixodes* nel mondo è tra lo 0,2% e il 10%, mentre in Europa è stata individuata nelle popolazioni di *I. ricinus* della maggior parte dei paesi: in particolare, nello 0,1-2% delle larve, nello 0,4-2,8% delle ninfe e nel 3,0-4,3% degli adulti (Kubiak et al., 2021). In Italia è stata trovata per la prima volta nel 2016 in due studi condotti indipendentemente ad Est e a Ovest dell'arco alpino: la prevalenza totale di *B. miyamotoi* qui riscontrata nelle ninfe di *I. ricinus* è dello 0,74% (Ravagnan et al., 2018). Gli studi epidemiologici hanno per ora stabilito che le aree endemiche per *B. miyamotoi* si sovrappongono a quelle di *B. burgdorferi* s.l., e infatti nelle indagini sono state individuate zecche co-infette con entrambe le specie,

sebbene la prevalenza di *B. burgdorferi* s.l. sia molto superiore rispetto a quella di *B. miyamotoi* (Cutler et al., 2019).

Nelle zecche *Ixodes* *B. miyamotoi* può essere trasmessa sia orizzontalmente che verticalmente, rendendo possibile alle zecche in tutti gli stadi di trasmettere la malattia. A differenza delle specie appartenenti al complesso *B. burgdorferi* s.l. infatti, la modalità di trasmissione trans-ovarica (dalla femmina adulta alle uova) è molto efficiente in questa specie di *Borrelia*, e ciò spiega l'elevata percentuale di larve di *I. ricinus* non ancora ingorgate ma infette, individuate in Europa (Kubiak et al., 2021).

I *reservoirs* competenti provati sperimentalmente sono solo 3 specie di roditori (*Apodemus* spp., *M. glareolus* e *P. leucopus*), ma *B. miyamotoi* è stata identificata in molte altre specie di questi, come anche in alcuni uccelli, il che non esclude che anch'essi possano esserne un *reservoir*, sebbene siano necessarie ulteriori indagini (Cutler et al., 2019). Sembra che il tasso di infezione di questa spirocheta nei roditori sia comunque inferiore a quello di *B. burgdorferi* s.l., ma ci sono ancora pochi dati sul modello di infezione animale (Talagrand-Reboul et al., 2018)

I casi di malattia da *B. miyamotoi* nell'uomo riportati in Europa sono 7, di cui 2 avvenuti in Olanda, 2 in Svezia, uno in Germania, uno in Polonia e uno in Austria, ma sono in aumento soprattutto nelle zone più settentrionali (Kubiak et al., 2021). La sintomatologia clinica è piuttosto aspecifica e condivide delle caratteristiche con l'anaplasmosi, con cui deve essere messa in diagnosi differenziale (Talagrand-Reboul et al., 2018); include episodi di febbre che si manifestano circa due settimane dopo il morso della zecca e possono ricorrere una o più volte (Talagrand-Reboul et al., 2018) ed, in aggiunta, si possono osservare mialgia, spossatezza e sintomi influenzali in generale, ma anche artralgia, linfadenopatia e possibile eritema migrante (Madison-Antenucci et al., 2020). La meningoencefalite è una delle possibili gravi conseguenze di questa malattia, che ad oggi è classificata come una importante TBD emergente (Kubiak et al., 2021).

***Borrelia* spp. e uccelli migratori**

Negli uccelli migratori, considerati i più importanti *carriers* di zecche nelle lunghe distanze (Buczek et al., 2020), è rilevante la presenza di questi parassiti i quali spesso sono positivi a varie specie di *Borrelia*. Gli studi di ricerca più recenti riguardo *Borrelia* spp. nelle zecche prelevate da varie specie avicole migratorie condotti nei diversi paesi in Europa sono riportati in tabella 1.

Le zecche sono trasportate da uccelli che mostrano abitudini molto diverse fra loro, cioè uccelli migratori a breve, media e lunga distanza così come gli stanziali, residenti in aree specifiche; tra i migratori, la maggiore prevalenza dell'infestazione da zecche è individuata negli uccelli terricoli, specialmente quelli dell'ordine dei Passeriformi (Wilhelmsson et al., 2020). Un ruolo importante nel trasporto delle zecche è svolto dagli uccelli del genere *Turdus*, nei quali sono state individuate prevalenze molto elevate in tutta Europa, soprattutto nel merlo, nel tordo bottaccio e nel tordo sassello, seguiti dal pettirosso (A. M. Buczek et al., 2020; Klaus et al., 2016; Lommano et al., 2014; Pajoro et al., 2018).

La specie di zecca più prevalente negli uccelli migratori durante la migrazione autunnale in direzione Sud è *I. ricinus* nell'Europa del Nord (più del 90% di tutte le zecche prelevate da uccelli migratori in Olanda, Belgio, delta del Danubio e regioni baltiche) e nell'Europa centrale, mentre a Sud del continente, sotto al 42° parallelo, si trovano soprattutto zecche del genere *Hyalomma* (A. M. Buczek et al., 2020), che sono individuate negli studi che coinvolgono gli uccelli durante la migrazione primaverile (Pascucci et al., 2019; Rollins et al., 2021; Luciano Toma et al., 2014). *I. frontalis* e *I. acuminatus* sono specie riscontrate negli uccelli migratori, ma molto meno frequentemente.

Si evidenzia una percentuale di infestazione degli uccelli migratori tra il 2 % e il 21,5% e considerando la prevalenza di *B. burgdorferi* s.l. varia tra lo 0% (Pascucci et al., 2019) ed il 43,36% (Mtierová et al., 2020). L'individuazione di *B. myiamotoi* invece è stata effettuata in pochissimi studi (Heylen et al., 2017; Klitgaard et al., 2019; Lommano et al., 2014; Pedersen et al., 2020; Wilhelmsson et al., 2020), ma le prevalenze riscontrate sono sempre molto basse (0,12%-1,12%).

La prevalenza delle spirochete di *Borrelia* negli uccelli infestati da *I. ricinus* in varie aree europee mostra che *B. garinii*, *B. valaisiana* sono quelle maggiormente riscontrate nelle zecche infette, con percentuali rispettivamente tra l'1,41% nella regione baltica della Russia (Movila et al., 2013) ed il 22,5% in Slovacchia (Mtierová et al., 2020) e tra lo 0,94 nella regione baltica della Russia ed il 13,4% in Danimarca (Klitgaard et al., 2019). Interessante è notare che è stata riscontrata anche l'associazione tra *B. garinii* e *B. valaisiana* in vari studi europei, in particolare in Danimarca, Lettonia, Slovacchia e Svizzera (Capligina et al., 2014; Hanincova et al., 2003; Klitgaard et al., 2019; Lommano et al., 2014).

Secondariamente è stata riscontrata *B. afzelii*, con una prevalenza nettamente inferiore rispetto alle due precedenti, ovvero tra lo 0% in Lettonia (Capligina et al., 2014) e il 4,8% in Nord Italia (Pajoro et al., 2018). Sporadicamente sono state individuate *B. bavariensis*, *B. burgdorferi* s.s. e *B. lusitaniae*, ma con prevalenze limitatissime, vicine allo 0%.

Tabella 1: specie di *Borrelia* spp. rilevata negli studi condotti in Europa su zecche prelevate da uccelli migratori.

Paese	Uccelli	N. uccelli in festati/totale catturati (% infestazione)	Specie di zecca prevalente	<i>Borrelia</i> spp.	Prevalenza zecche pos/tot analizzate (%)	Specie di <i>Borrelia</i> sequenziate	Prevalenza zecche pos/tot zecche sequenziate con successo (%)	Riferimento bibliografico
Belgio e Olanda	Migratori, maggior parte <i>Turdus</i>	Non riportato	<i>I. ricinus</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	227/670 (33,9%)	<i>B. garinii</i>	77/670 (11,49%)	(Heylen et al., 2017)
						<i>B. valaisiana</i>	55/670 (8,21%)	
						<i>B. afzelii</i>	26/670 (3,88%)	
				<i>B. miyamotoi</i>	4/670 (0,6%)			
Danimarca	Migratori in autunno e primavera	86/807 (10,7%)	<i>I. ricinus</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	64/179 (35,75%)	<i>B. valaisiana</i>	24/179 (13,4%)	(Klitgaard et al., 2019)
						<i>B. garinii</i>	22/179 (12,3%)	
						<i>B. afzelii</i>	1/179 (0,6%)	
				<i>B. miyamotoi</i>	2/179 (1,12%)			
Germania	Migratori e sedentari,	725/23949 (3,01%)	<i>I. ricinus</i>	<i>Borrelia</i> spp.	6.50–9.63%	<i>B. garinii</i>	10/18	(Klaus et al., 2016)

	maggior parte <i>Turdus</i>				(analisi su pool di zecche)		(analisi su pool di zecche)	
						<i>B. valaisiana</i>	6/18 (analisi su pool di zecche)	
						<i>B. burgdorferi</i>	1/18 (analisi su pool di zecche)	
						<i>B. afzelii</i>	1/18 (analisi su pool di zecche)	
Grecia	Migratori in estate e autunno	7/403 (2%)	<i>Ixodes</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	0/15 (0%)	-	-	(Diakou et al., 2016)
Lettonia	Migratori in autunno	Non riportato	<i>I. ricinus</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	17/93 (18,28%)	<i>B. valaisiana</i>	10/93 (10,75%)	(Capligna et al., 2014)
						<i>B. garinii</i>	8/93 (8,60%)	
						<i>B. afzelii</i>	0/93 (0%)	
Norvegia	Migratori e residenti in autunno e primavera	152/3539 (4,29%)	<i>I. ricinus</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	50/815 (6,13%)	<i>B. garinii</i>	30/815 (3,68%)	(Pedersen et al., 2020)
						<i>B. valaisiana</i>	9/815 (1,10%)	
						<i>B. afzelii</i>	9/815 (1,10%)	
						<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1/815 (0,12%)	

				<i>B. miyamotoi</i>	1/815 (0,12%)			
Russia (regione baltica)	Migratori in primavera	107/577 (18,5%)	<i>I. ricinus</i>	<i>Borrelia spp.</i>	8/212 (3,77%)	<i>B. garinii</i>	3/212 (1,41%)	(Movila et al., 2013)
						<i>B. afzelii</i>	3/212 (1,41%)	
						<i>B. valaisiana</i>	2/212 (0,94%)	
Slovacchia	Migratori in primavera e autunno	78/363 (21,49%)	<i>I. ricinus</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	160/369 (43,36%)	<i>B. garinii</i>	83/369 (22,49%)	(Mtierová et al., 2020)
						<i>B. valaisiana</i>	40/369 (10,84%)	
						<i>B. afzelii</i>	9/369 (2,44%)	
Svizzera	Migratori in autunno, maggior parte <i>Turdus</i>	504/4525 (11.1%)	<i>I. ricinus</i>	<i>Borrelia spp</i>	210/1123 (18,7%)	<i>B. garinii</i>	91/1123 (8,10%)	(Lommano et al., 2014)
						<i>B. valaisiana</i>	75/1123 (6,68%)	
						<i>B. afzelii</i>	18/1123 (1,60%)	
						<i>B. bavariensis</i>	8/1123 (0,71%)	
						<i>B. miyamotoi</i>	6/1123 (0,53%)	
						<i>B. burgdorferi</i> ss	3/1123 (0,27%)	
Svezia	Migratori in primavera e autunno	749/4788 (15,65%)	<i>I. ricinus</i>	<i>Borrelia spp</i>	290/1124 (25.8%)	<i>B. garinii</i>	49/1124 (4,36%)	(Wilhelmsson et al., 2020)
						<i>B. valaisiana</i>	42/1124 (3,74%)	
						<i>B. afzelii</i>	30/1124 (2,67%)	
						<i>B. miyamotoi</i>	12/1124 (1,07%)	
						<i>B. burgdorferi</i> ss	2/1124 (0,18%)	

						<i>B. lusitaniae</i>	1/1124 (0,09%)	
Nord Italia (Como)	Migratori in autunno, maggior parte <i>Turdus</i>	124/2793 (4,44%)	<i>I. ricinus</i>	<i>Borrelia</i> spp.	74/251 (29,48%)	<i>B. garinii</i>	49/251 (19,5%)	(Pajoro et al., 2018)
						<i>B. afzelii</i>	12/251 (4,8%)	
						<i>B. valaisiana</i>	6/251 (2,4%)	
						<i>B. lusitaniae</i>	1/251 (0,4%)	
Centro Italia (Lazio)	Migratori in primavera	249/3444 (7,2%)	<i>Hyalomma</i>	<i>Borrelia</i> spp.	0/443 (0%)			(Pascucci et al., 2019)
Centro Italia (Lazio)	Migratori in primavera e autunno	Non riportato	<i>Hyalomma</i>	<i>Borrelia</i> spp.	39/127 (30,71%)			(Luciano Toma et al., 2014)
Centro Italia (Ponza)	Migratori in primavera	16/151 (10,60%)	<i>Hyalomma</i>	<i>Borrelia</i> spp.	4/18 (22,22%)			(Rollins et al., 2021)

Tick-borne encephalitis virus (TBEV)

Il TBEV è il più importante *Flavivirus* trasmesso da zecche che colpisce i mammiferi ed è l'agente causale dell'encefalite virale da zecche (TBE), zoonosi neurologica potenzialmente fatale per l'uomo (Mansfield et al., 2009). Il genere *Flavivirus* è un grande gruppo di arbovirus capaci di infettare molti vertebrati e, in relazione ai tipi di vettori che li veicolano, possono essere divisi in *Flavivirus* trasmessi da zecche (*tick-borne Flavivirus TBFV*), *Flavivirus* trasmessi da zanzare e *Flavivirus* a vettore sconosciuto. Tra i TBFV, sono riconosciuti due gruppi, uno che infetta i mammiferi e uno che infetta gli uccelli marini, e TBEV fa parte del primo (Shi et al., 2018). TBEV include tre sottotipi patogeni strettamente correlati geneticamente e antigenicamente, nominati in associazione alla loro distribuzione geografica: il sottotipo estremo oriente (Far Eastern), endemico nelle zone più a Est della Russia e nelle regioni boschive di Cina e Giappone; il sottotipo siberiano (Siberian), endemico nella regione degli Urali, in Siberia e nelle zone più orientali della Russia e anche in alcune aree del Nord-Est Europa ed il sottotipo europeo (Western European), prima conosciuto come encefalite centro europea (Madison-Antenucci et al., 2020), endemico nelle aree rurali e boschive dell'Europa centrale, settentrionale e orientale (<https://www.ecdc.europa.eu/en/tick-borne-encephalitis/facts/factsheet>).

Il vettore principale del sottotipo europeo è *I. ricinus*, mentre per gli altri due sottotipi è *I. persulcatus*. Raramente, questa patologia può essere trasmessa attraverso prodotti lattiero-caseari non pastorizzati, mentre non può essere trasmessa da uomo a uomo, eccetto la via verticale dalla madre infetta al feto, sono stati riportati anche casi di infezione accidentale in laboratorio, via aerosol o da ferita da puntura con ago (<https://www.ecdc.europa.eu/en/tick-borne-encephalitis/facts/factsheet>).

Relativamente ai *reservoirs*, sembra che gli stessi vettori abbiano questo ruolo per il TBEV; infatti, il virus è mantenuto nella popolazione delle zecche attraverso la trasmissione trans-stadiale e verticale e quindi la zecca infetta è portatrice del virus in tutti i suoi stadi evolutivi, comprese le uova. Inoltre, sembra che il TBEV influenzi anche il comportamento delle zecche infette, provocando un aumento dell'attività di *questing* (Michelitsch et al., 2019). Tuttavia, per un efficiente mantenimento e circolazione del virus sono necessari altri ospiti, individuati in piccoli mammiferi selvatici, principalmente insettivori e soprattutto piccoli roditori, che si comportano come ospiti di mantenimento, di amplificazione e *reservoirs* (Shi et al., 2018). I piccoli roditori in particolare, sembrano essere un eccellente *reservoir* di amplificazione, perché si infettano facilmente, mantengono il virus per lungo tempo senza manifestare sintomi gravi e hanno un alto tasso riproduttivo, il che garantisce la presenza costante di nuovi individui non infetti. Oltretutto, degli studi hanno dato evidenza della possibilità di TBEV di essere trasmessa verticalmente da roditori infetti del genere *Microtus* (arvicole o campagnoli) alla prole, capacità

che permetterebbe al virus di circolare nella popolazione dei roditori anche senza un vettore (Michelitsch et al., 2019). Altri ospiti che supportano la circolazione del virus indirettamente, cioè permettendo la moltiplicazione delle zecche in quanto ospiti di zecche adulte, sono mammiferi domestici e selvatici di dimensioni maggiori, incluse volpi, lepri, cervidi, cinghiali, pecore, capre, bovini e cani; l'uomo è invece un ospite accidentale e a fondo cieco (<https://www.ecdc.europa.eu/en/tick-borne-encephalitis/facts/factsheet>). Il ruolo degli uccelli nella circolazione del TBEV non è completamente compreso. Molti passeriformi sembrano capaci di infettarsi e qualcuno di essi potrebbe essere anche capace di trasmettere il virus alla prole: la capacità degli uccelli migratori di superare barriere geografiche permetterebbe alle zecche da essi trasportate di distribuire il virus laddove trovino condizioni di clima e fauna favorevoli (Michelitsch et al., 2019). Tuttavia, gli studi condotti in Europa sulle zecche prelevate dagli uccelli migratori sono pochi e le positività riscontrate sono molto basse; 3 positività su 1205 zecche analizzate sono state descritte in Svizzera nel 2014 (Lommano et al., 2014) e 1 su 212 nella regione baltica della Russia nel 2013 (Movila et al., 2013), mentre in Germania e Svezia non è stato trovato TBEV (Klaus et al., 2016; Wilhelmsson et al., 2020). In Italia lo studio più interessante è quello di Alfano et al., realizzato nel 2018 su zecche *I. ricinus* in *questing* nella Provincia di Trento, luogo scelto in base alla localizzazione dei casi umani riportati negli anni precedenti: qui sono state riscontrate solo 4 zecche positive su 2410 analizzate (Alfano et al., 2020). Inoltre il TBEV è stato cercato anche nello studio condotto sull'isola di Ponza, ma non sono state individuate positività (Rollins et al., 2021).

Oltre alle modalità di trasmissione orizzontale e verticale, nel TBEV è provata la capacità di essere trasmesso dalle zecche via *co-feeding*: in effetti questo virus è stato uno dei primi patogeni per cui è stata scoperta questa modalità di trasmissione sui roditori. In questi animali, è stato anche dimostrato che il *co-feeding* può permettere la trasmissione del TBEV tra zecche che si nutrono su individui immuni a questo virus (Labuda et al., 1997).

La TBE ha assunto un crescente interesse di salute pubblica in Europa, dato che il numero dei casi nelle regioni endemiche europee è cresciuto del 400% negli ultimi 30 anni. Inoltre, le aree a rischio sono aumentate e sono stati scoperti nuovi focolai (<https://www.ecdc.europa.eu/en/tick-borne-encephalitis/facts/factsheet>). Il rischio di contrarre la TBE dipende dalla densità delle zecche, dal loro tasso di infezione e dal comportamento tenuto dall'uomo. L'ECDC asserisce che il rischio di infezione è basso e la maggior parte delle zecche non sono infette con TBEV, dato che nelle aree a rischio, solo una percentuale tra lo 0,1% e il 5% è portatrice del virus. I paesi a rischio TBE sono ritenuti essere l'Austria, la Slovenia, la Slovacchia, l'Ungheria, la Repubblica Ceca, i paesi baltici, il Sud della Germania e il Sud e Est della Svezia, oltre che tutta la Russia

(<https://www.ecdc.europa.eu/en/tick-borne-encephalitis/facts/key-messages>). Il primo sforzo di raccolta dei dati relativi alla TBE nei paesi dell'Unione europea e dell'associazione europea di libero scambio (EFTA) risale al 2012, quando l'ECDC ha pubblicato il primo report (ECDC, 2012); in questo anno la meningoencefalite da zecche è infatti diventata notificabile in Europa e dal 2014 sono annualmente redatti report epidemiologici. Nell'ultimo di questi, relativo al 2019, l'ECDC evidenzia che sono stati riportati 3.246 casi confermati di TBE (0,7 casi ogni 100.000 persone) da 25 paesi europei (Cipro, Danimarca, Islanda, Malta, Liechtenstein e Portogallo non hanno fatto report), con il maggior tasso di notifica in Lituania, Repubblica Ceca e Estonia. Sebbene la Danimarca non abbia fatto report attraverso i canali della sorveglianza dell'ECDC, qui sono stati identificati 3 casi. Inoltre, nel 2019 è stato anche individuato il primo caso nel Regno Unito (ECDC, 2021). La maggior parte dei casi è diagnosticata durante i mesi più caldi, cioè tra Maggio e Novembre, con un picco a Luglio (ECDC, 2021).

In Italia la TBE è stata identificata per la prima volta nel 1978 in Toscana, per poi ricomparire nel 1994 in provincia di Belluno e si è diffusa in alcune regioni, tra cui il Veneto, il Friuli Venezia Giulia, Trento e Bolzano. L'ECDC nel 2012 ha classificato l'Italia come un paese ad incidenza molto ridotta e ristretta al centro e Nord-Est della penisola fig. 26, descrivendo una positività agli anticorpi per TBEV tra lo 0,1% della Toscana e il 4,3% del Friuli Venezia Giulia, dove è stata confermata la circolazione del virus nelle zecche (ECDC, 2012).



Figura 26: incidenza media annua dei casi di TBE su 100.000 abitanti in Italia, relativo al periodo di sorveglianza 2001-2010. Mappa tratta da ECDC, 2012.

Il Ministero della Salute dal 2000 al 2016 ha raccolto segnalazioni relative a 456 casi di TBE (Piano Nazionale di sorveglianza e risposta all'encefalite virale da zecche e altre arbovirosi e hantavirus non sottoposti a specifici piani di sorveglianza e risposta –

2018) e nel 2017 è stata istituita una sorveglianza nazionale delle infezioni da virus TBE. Nel 2018 sono stati segnalati 40 casi di infezione neuroinvasiva confermata in 4 regioni o province autonome: Friuli-Venezia Giulia, Veneto, Trento e Bolzano (Ministero della Salute -Piano nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi (PNA) 2020-2025) (https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2947_allegato.pdf). Il Piano nazionale

Arbovirosi del 2020-2025 impone che la sorveglianza dei casi di TBE sia estesa per tutto l'anno, anche se nel periodo di maggiore attività vettoriale essa deve essere potenziata in termini di tempestività e sensibilità su tutto il territorio nazionale. Questo documento normativo riporta anche le modalità di segnalazione dei casi confermati di infezione da TBEV: in questi casi, il medico deve segnalare l'infezione entro 24 ore all'Azienda sanitaria competente e inviare i campioni per conferma attraverso la diagnosi da parte di laboratori di riferimento.

Per quanto concerne la manifestazione clinica, circa due terzi delle infezioni umane sono asintomatiche. I casi clinici si presentano spesso con un andamento bifasico, che prevede un iniziale periodo di viremia con sintomi aspecifici, come febbre, affaticamento e mialgia, seguiti da un intervallo asintomatico di 2-10 giorni. In seguito, se la malattia progredisce, si ha la seconda fase con coinvolgimento del sistema nervoso centrale e quindi meningite, meningoencefalite, mielite, paralisi e/o radicolite (Mansfield et al., 2009). Il sottotipo europeo è associato a una forma lieve, con interessamento neurologico nel 20-30% dei casi e basso tasso di mortalità (0,5-2%) (Ministero della Salute - Piano nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi (PNA) 2020-2025). Per la prevenzione di questa infezione nell'uomo è comunque disponibile un vaccino, raccomandato per i soggetti professionalmente esposti, lavoratori in aree endemiche e per la popolazione residente in aree rurali a rischio (Ministero della Salute - Piano Nazionale Prevenzione Vaccinale (PNPV) 2017-2019).

Oltre che nell'uomo, sintomi clinici si possono raramente manifestare anche nel cane, nei cavalli, nelle pecore e nelle capre (Michelitsch et al., 2019).

SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo di questo progetto di tesi è quello di valutare la presenza e la prevalenza di due agenti infettivi zoonosici trasmessi da vettori in zecche prelevate dagli uccelli migratori in transito sulle Prealpi Giulie in Friuli Venezia Giulia, per poter fare delle considerazioni epidemiologiche sul ruolo svolto da questi animali nella diffusione di tali patogeni lungo le loro rotte migratorie.

Si è deciso di ricercare *B. burgdorferi* s.l. e TBEV basandosi sulla loro importanza sanitaria in medicina umana, dato il loro impatto zoonosico, e sulla probabilità di circolazione di questi agenti infettivi nell'area e negli animali indagati. Stando ai precedenti studi condotti in Europa e in Italia su *B. burgdorferi* s.l., gli uccelli migratori sono considerati animali *reservoir*, mentre ne è ancora sconosciuto il ruolo per quanto riguarda la TBE. Per questa malattia, infatti, ci sono pochi studi correlati agli uccelli migratori e la sua circolazione sembra essere molto bassa nelle zecche in Europa ed in Italia nelle aree limitrofe al Friuli Venezia Giulia, nonostante siano sempre presenti segnalazioni di casi di malattia umana in questa regione, soprattutto negli stati limitrofi. L'entità di circolazione dei due agenti infettivi è stata valutata, dopo aver analizzato le zecche raccolte durante le procedure di inanellamento degli uccelli migratori del personale della stazione di inanellamento "Malga Confin", attraverso metodiche biomolecolari, per cercare di capire se e quanto questi animali partecipino al ciclo di trasmissione della borreliosi di Lyme, della febbre ricorrente da *Borrelia* e dell'encefalite virale da zecche, stante la limitatezza delle ricerche presenti a riguardo in tutta Europa.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Area di studio e animali campionati

Il campionamento si è svolto prelevando zecche da uccelli migratori catturati nella stazione di inanellamento “Malga Confin”, situata nelle Alpi orientali ad un’altitudine di 1332 m s.l.m., in Provincia di Udine e Comune di Venzone (localizzazione: 46.342,13.2179). In particolare, il territorio di riferimento per l’attività della Malga Confin è la Val Venzonassa, delimitata dal gruppo montuoso Monte Plauris – Monte Lavera, dotato di un orientamento Est – Ovest e di un’altitudine massima, attribuita al Monte Plauris, di 1958 m s.l.m. (<http://progetto-alpi.muse.it/stations-index/malga-confin/>).

Le zecche sono state prelevate dalle seguenti specie di uccello: cincia mora (*Periparus ater*); fringuello (*Fringilla coelebs*); peppola (*Fringilla montifringilla*); pettirosso (*Erithacus rubecula*); merlo (*Turdus merula*); tordo bottaccio (*Turdus philomelos*); tordo sassello (*Turdus iliacus*); spioncello (*Anthus spinoletta*).

2.2 Campionamento

Il campionamento si è svolto negli anni 2019 e 2020 durante la stagione di inanellamento degli uccelli migratori della Malga Confin; in particolare, nel 2019 la stazione è stata attivata per 8 pentadi nel periodo tra il 23 settembre e il 1° novembre, per un totale di 36 giornate di attività effettiva, mentre nel 2020 i giorni di apertura delle reti sono stati 26, durante lo stesso periodo. All’interno delle pentadi del 2019, seguendo le indicazioni del “Progetto Alpi”, l’attività di inanellamento è stata svolta in maniera continuativa per almeno due giorni, possibilmente consecutivi, aprendo le reti un’ora prima dell’alba e chiudendole dopo il tramonto (Negra et al., 2014). Nel 2020, invece, l’attività è stata svolta in maniera ridotta, compatibilmente con la minore disponibilità numerica del personale volontario a causa delle restrizioni imposte per il contenimento dell’epidemia da COVID-19 e le esigenze dettate dal maltempo.

Il protocollo di campionamento è stato accordato con il referente della Malga Confin ed i suoi collaboratori, i quali, durante la procedura di inanellamento degli uccelli e di raccolta dei dati obbligatori per il “Progetto Alpi”, hanno prelevato le zecche eventualmente trovate sugli esemplari catturati. Tutte le zecche presenti su un singolo uccello sono state inserite insieme in una provetta vuota, etichettata con un numero progressivo e con il nome della specie avicola da cui erano state raccolte.

Al contempo, veniva compilata anche una scheda anamnestica, identificata con un numero progressivo e riportante la data di cattura, la specie, il sesso e l'età dell'individuo inanellato e il numero di zecche inserite nella provetta corrispondente (Fig. 27).

UNIVERSITÀ DI PADOVA – DIP. MAPS – Scienze veterinarie
SCHEDA DI SEGNALAMENTO: UCCELLI IN MIGRAZIONE POST RIPRODUTTIVA
MALGA CONFIN

SCHEDA NUMERO _____

SPECIE _____ 

DATA CATTURA ____ / ____ / ____

SESSO: MASCHIO
 FEMMINA

ETÀ _____

ZECCHE RACCOLTE IN PROVETTA: 

UNA DUE TRE QUATTRO CINQUE SEI SETTE _____

STATO DI SALUTE GENERALE/COMMENTI

Fig 27: scheda anamnestica del campionamento

Questa fase è stata svolta completamente in autonomia dagli operatori presenti presso la stazione di inanellamento.

Successivamente, nella provetta è stato aggiunto alcol etilico al 70% e i campioni sono stati poi conservati in congelatore a -20° C fino al momento delle analisi biomolecolari.

2.3 Identificazione di specie

Il primo passaggio è stato quello dell'identificazione di specie, realizzata attraverso lo stereomicroscopio e microscopio seguendo le chiavi dicotomiche di Cringoli G. *et al.* (Cringoli et al., 2005) e grazie all'aiuto di esperti entomologici dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

2.4 Analisi biomolecolari

Estrazione DNA e RNA

L'estrazione degli acidi nucleici delle zecche è stata effettuata utilizzando il kit "*AllPrep DNA/RNA Mini Kit*" Qiagen, che purifica simultaneamente da un singolo campione biologico il DNA genomico e l'RNA totale.

Si è scelto di analizzare ogni zecca singolarmente, per cui le zecche prelevate dallo stesso animale sono state numerate con lo stesso numero arabo, ma lettera alfabetica progressiva.

Inizialmente le zecche sono state omogeneizzate con l'aiuto di un pestello monouso all'interno di una provetta Eppendorf da 1,5 ml contenente 350 µl di buffer di lisi. Prima di iniziare l'estrazione, ad ogni campione è stata aggiunta una quantità di 3 µl di controllo interno di RNA e 10 µl di controllo interno di DNA, secondo le concentrazioni indicate da "*QuantiNova Pathogen + IC Kit*" (Qiagen).

Le operazioni successive di estrazione sono state svolte secondo le istruzioni indicate dal produttore in "*AllPrep DNA/RNA Mini Handbook*" (Qiagen), utilizzando un volume di eluizione finale di 100 µl per il DNA e 30 µl per l'RNA.

Screening dei patogeni

Real-time PCR e RT real-time PCR

Tutte le reazioni sono state eseguite su un volume finale di 7 µl, di cui 2 µl di acido nucleico *target*; sono stati utilizzati i reagenti del kit "*QuantiNova Pathogen + IC Kit*" (Qiagen) e lo strumento LightCycler96 (Roche).

Per ogni ciclo di reazione sono sempre stati inseriti un bianco ed almeno un controllo positivo, mentre tutti i campioni sono stati testati in doppio.

Per quanto concerne il *forward primer*, il *reverse primer* e la sonda TaqMan, sono state inserite secondo le concentrazioni consigliate dal fornitore, ovvero 0,8 µM di *primer* e 0,25 µM di sonda. Il profilo termico è stato impostato con un primo passaggio a 95° C per 2 minuti per favorire l'attivazione della sonda TaqMan, aggiungendo una precedente incubazione a 50° C per 10 minuti in caso di RT *real-time* PCR.

I campioni sono stati considerati come positivi o negativi nel caso che i due replicati avessero dato risultato congruente, ossia entrambi positivi o entrambi negativi; al contrario, in caso di un replicato positivo e uno negativo il risultato veniva classificato come dubbio e il campione veniva ritestato.

Ricerca del controllo interno – DNA

Per ogni campione è stata valutata la qualità di estrazione del DNA e la presenza di inibitori della Taq Polimerasi, realizzando una *multiplex real-time* PCR per la ricerca del DNA inserito come controllo interno (IC) in sede di estrazione e di *Bartonella* spp., patogeno non oggetto della presente tesi.

La concentrazione di *primer* e sonda (marcata con HEX) utilizzati sono quelli forniti dal produttore del kit.

Il profilo termico di amplificazione utilizzato è stato il seguente:

	Temperatura	Tempo	Cicli
Denaturazione	95°C	5 s	50
Annealing – estensione	60°C	30 s	

Ricerca di *Borrelia burgdorferi* s. l.

A questo scopo si è utilizzato un saggio fluorogenico *multiplex* per la ricerca simultanea di *B. burgdorferi* s.l. e *Anaplasma phagocytophilum* (non oggetto del presente elaborato). Il *target* di amplificazione per *B. burgdorferi* s.l. corrisponde alla regione del gene 23S rRNA, il quale codifica per la subunità ribosomiale 23S (Courtney et al., 2004).

I *primer* e la sonda usati sono quelle descritte da Courtney J.W. *et al.* (Courtney et al., 2004):

- Bb23S_f: 5'-CGAGTCTTAAAAGGGCGATTTAGT-3'
- Bb23S_r: 5'-GCTTCAGCCTGGCCATAAATAG-3'
- Bb23S_p: 5'-HEX-AGATGTGGTAGACCCGAAGCCGAGTG-3'

Il profilo termico di amplificazione utilizzato è stato il seguente:

	Temperatura	Tempo	Cicli
Denaturazione	95°C	5 s	50
Annealing	60°C	5 s	
Estensione	72° C	30 s	

Ricerca del controllo interno RNA - *Tick Borne Encephalitis virus* (TBEV)

Per ogni campione è stata realizzata una *multiplex RT real-time* PCR che ha consentito di valutare la qualità di estrazione dell'RNA e la presenza di inibitori della Taq Polimerasi ricercando l'RNA inserito come controllo interno (IC) in sede di estrazione, e contemporaneamente di cercare TBEV.

La combinazione di *primer* e sonda (marcata con HEX) per l'amplificazione dell'IC è fornita dal produttore del kit.

Il *target* di amplificazione della reazione per la ricerca di TBEV è una porzione della regione 3' non codificante del genoma del virus, conservata in tutti i sottotipi di TBEV; i *primer* e la sonda utilizzati sono quelli indicati da Brinkley *et al.* (Brinkley et al., 2008):

- TBE_f: 5'-TGGGCGGTTCTTGTCTCC-3'
- TBE_r: 5'-TCACACATCACCTCCTTGTCAGA-3'
- TBE_p: 5'-FAM-CTGAGCCACCATCACCCAGACACAG-3'

Il profilo termico di amplificazione usato, dopo le fasi di incubazione e quella di retrotrascrizione (a 95° C per 2 min) è stato il seguente:

	Temperatura	Tempo	Cicli
Denaturazione	95°C	5 s	50
Annealing – estensione	60°C	30 s	

2.5 PCR

I campioni risultati positivi in real-time PCR sono stati successivamente amplificati mediante PCR classica. Le reazioni sono state eseguite in un volume finale di 25 μ l, di cui 5 μ l di DNA target; sono stati utilizzati i reagenti del kit "Phire Hot Start II PCR Master Mix" (Thermoscientific), e lo strumento T-Gradient (Biometra). Per ogni ciclo di reazione sono sempre stati inseriti un bianco ed un controllo positivo. Per quanto concerne i *primer*, sono stati inseriti secondo le concentrazioni consigliate dal fornitore del kit, ovvero 0,3 μ M. Il profilo termico è stato impostato con un primo passaggio a 98° C per 1 minuto per favorire l'attivazione della Taq Polimerasi.

I prodotti della PCR sono stati valutati mediante elettroforesi, analizzando 5 μ l del prodotto ottenuto da ciascun campione in gel di Agarosio al 2% in Tris Borate EDTA (TBE) *buffer*, contenente un'adeguata quantità di SybrSafe DNA gel stain.

Il risultato è stato foto documentato mediante lo strumento GelDoc EZ Imager (BioRad).

Ricerca di *Borrelia* spp.

Il *target* di amplificazione della reazione corrisponde ad una porzione del gene *groEL*, che codifica per la *heat-shock protein* GroEL, proteina altamente conservata e essenziale per la sopravvivenza delle cellule.

I *primer* usati sono quelli descritti da Lee *et al.* (Lee et al., 2003):

- G_f: 5'-TACGATTTCTTATGTTGAGGG-3'
- G_r: 5'-CATTGCTTTTCGTCTATCACC-3'

Il profilo termico di amplificazione usato è stato il seguente:

	Temperatura	Tempo	Cicli
Denaturazione	98°C	5 s	50
Annealing	59°-57°C (TD - 0,5°C/ciclo)	5 s	
Estensione	72° C	7 s	

2.6 Sequenziamento

Gli amplificati ottenuti dai campioni risultati positivi alla reazione di PCR sono stati sottoposti a purificazione mediante digestione enzimatica con “CleanSweep PCR Purification kit” (Applied Biosystems) secondo le istruzioni indicate dal produttore e inviati alla società tedesca StarSeq GmbH per il sequenziamento nucleotidico.

I cromatogrammi sono stati dapprima analizzati utilizzando il software FinchTV v1.4.0 (GeoSpiza Inc) e successivamente utilizzati per ottenere la sequenza consenso mediante l’utilizzo del software ChromasPro v.2.1.8 (Technelysium Pty Ltd).

Le sequenze consenso ottenute sono state confrontate con quelle presenti nei database online utilizzando Blastn

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LO C=blasthome).

2.7. Analisi Statistica

Le informazioni associate a ciascun animale campionato (i.e. specie, presenza di infestazione da zecche, numero di zecche raccolte) sono state unite in un unico database assieme ai dati inerenti alle relative zecche (stadio di sviluppo, positività in PCR a *Borrelia* e risultati del sequenziamento).

L’associazione fra specie di volatile e stato di infestazione è stata valutata tramite un modello di regressione logistica. Similmente si è proceduto a valutare la relazione fra stadio di sviluppo della zecca e positività a *Borrelia* spp.

Per valutare l’associazione fra positività delle zecche a *Borrelia* e la specie di uccello è stato invece necessario ricorrere ad un modello più complesso. Infatti, per tenere conto del fatto che più zecche sono state campionate dallo stesso animale, è stato utilizzato un modello logistico gerarchico (ossia comprendente più livelli, in cui il livello “zecca” risulta incluso nel livello superiore “uccello”) utilizzando la libreria *lme4* in R. il livello di significatività statistica è stato fissato a $p\text{-value} < 0.05$.

3. RISULTATI

3.1 Animali e zecche

Nel 2019 sono stati inanellati 2738 uccelli. Tra le varie specie di uccelli solo alcune sono risultate infestate da zecche, in particolare il pettirosso (*Erithacus rubecula*), il fringuello (*Fringilla coelebs*), la peppola (*Fringilla montifringilla*), il merlo (*Turdus merula*), il tordo bottaccio (*Turdus philomelos*), lo spioncello (*Anthus spinoletta*) e il tordo sassello (*Turdus iliacus*). Di queste specie, il numero di individui inanellati è stato di 771 pettirossi, 104 fringuelli, 90 peppole, 68 merli, 67 tordi bottacci, 41 spioncelli, 13 tordi sasselli (<http://progetto-alpi.muse.it/it/stations-index/malga-confin/>).

Sono state prelevate 164 zecche da 63 uccelli, di cui 106 da 29 merli, 29 da 13 peppole, 17 da 11 pettirossi, 5 da 3 tordi sasselli, 3 da 3 fringuelli, 3 da 3 tordi bottacci e 1 da uno spioncello.

Di queste, 162 zecche sono state identificate come *I. ricinus*, di cui 31 larve e 131 ninfe, 1 zecca come *I. acuminatus* e 1 come *I. frontalis*, entrambe allo stadio larvale (Tabella 2).

È stato annotato anche lo stato di ingorgamento, risultando che 101 erano ingorgate (18 larve e 83 ninfe), 59 parzialmente ingorgate (14 larve e 45 ninfe) e 4 non ingorgate (1 larva e 3 ninfe)

Tabella 2: campioni raccolti nell'anno 2019. La tabella riporta le specie di uccelli migratori parassitate, la loro percentuale di infestazione ed i dati delle zecche raccolte per ogni specie di uccello campionata.

Dati uccelli		Dati zecche				
Specie	N. Parassitati/N. inanellati (%)	N. <i>I. ricinus</i> /N. zecche (%)	N. <i>I. acuminatus</i> / N. zecche (%)	N. <i>I. frontalis</i> / N. zecche (%)	N. larve/ N. zecche (%)	N. ninfe/ N. zecche (%)
Merlo <i>Turdus merula</i>	29/68 (42,65%)	106/106 (100%)	0/106 (0%)	0/106 (0%)	11/106 (10,38%)	95/106 (89,62%)
Peppola <i>Fringilla montifringilla</i>	13/90 (14,44%)	29/29 (100%)	0/29 (0%)	0/29 (0%)	9/29 (31,03%)	20/29 (68,97%)
Pettiroso <i>Erithacus rubecula</i>	11/771 (1,47%)	16/17 (94,12%)	0/17 (0%)	1/17 (5,88%)	10/17 (58,82%)	7/17 (41,18%)
Tordo sassello <i>Turdus iliacus</i>	3/13 (23,08%)	4/5 (80%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	4/5 (80%)
Fringuello <i>Fringilla coelebs</i>	3/104 (2,88%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/3 (33,33%)	2/3 (66,67%)
Tordo bottaccio <i>Turdus philomelos</i>	3/67 (4,48%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/3 (33,33%)	2/3 (66,67%)
Spioncello <i>Anthus spinoletta</i>	1/41 (2,44%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)
Totale uccelli	63/2738 (2,3%)	162/164 (98,78%)	1/164 (0,61%)	1/164 (0,61%)	33/164 (20,12%)	131/164 (79,88)

Nel 2020 sono stati inanellati 676 individui appartenenti a 32 specie diverse. In dettaglio, il totale degli individui inanellati, considerando solo le specie risultate infestate da zecche, è: 197 pettirossi (*Erithacus rubecula*), 36 fringuelli (*Fringilla coelebs*), 20 merli (*Turdus merula*), 13 cincie more (*Periparus ater*), 12 tordi bottacci (*Turdus philomelos*), 1 tordo sassello (*Turdus iliacus*) (<http://progetto-alpi.muse.it/it/stations-index/malga-confin/>).

In totale sono state prelevate 45 zecche da 25 uccelli, di cui 16 da 12 pettirossi, 22 da 8 merli, 2 da 2 fringuelli, 1 da una cincia mora, 1 da un tordo bottaccio e 3 da un tordo sassello.

Tutti i 45 campioni sono risultati appartenere alla specie *I. ricinus* allo stadio immaturo e, in particolare, sono state identificate 15 larve e 30 ninfe (Tabella 3).

È stato annotato anche lo stato di ingorgamento, risultando che 26 zecche erano ingorgate, di cui 9 larve e 17 ninfe e 19 zecche erano parzialmente o non ingorgate, di cui 5 larve e 13 ninfe.

Tabella 3: campioni raccolti nell'anno 2020. La tabella riporta le specie di uccelli migratori parassitate, la loro percentuale di infestazione ed i dati delle zecche raccolte per ogni specie di uccello campionata.

Dati uccelli		Dati zecche		
Specie	N. Parassitati/N. inanellati (%)	N. <i>I. ricinus</i> /N. zecche (%)	N. larve/ N. zecche (%)	N. ninfe/ N. zecche (%)
Pettiroso <i>Erithacus rubecula</i>	12/197 (6,09%)	16/16 (100%)	10/16 (62,5%)	6/16 (37,5%)
Merlo <i>Turdus merula</i>	8/20 (40%)	22/22 (100%)	5/22 (22,73%)	17/22 (77,27%)
Fringuello <i>Fringilla coelebs</i>	2/36 (5,55%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)
Cincia more <i>Periparus ater</i>	1/13 (7,69%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)
Tordo bottaccio <i>Turdus philomelos</i>	1/12 (8,33%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)
Tordo sassello <i>Turdus iliacus</i>	1/1 (100%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)
Totale uccelli	25/676 (3,70%)	45/45 (100%)	15/45 (33,33%)	30/45 (66,67%)

3.2 Analisi biomolecolari

Controllo interno - DNA

Tutti i 209 campioni analizzati, comprensivi di entrambi gli anni 2019 e 2020, sono risultati positivi per il controllo interno per il DNA, a prova che l'estrazione dell'acido nucleico è avvenuta correttamente e che non erano presenti agenti aspecifici in grado di inibire le reazioni di amplificazione del materiale genetico.

Screening Borrelia burgdorferi s.l.

Nelle analisi dei campioni del 2019, la *real-time* PCR ha evidenziato 97 positivi su 164. In particolare, essi erano stati prelevati da 25 merli (N=85/97), 3 peppole (N=6/97), 2 tordi sasselli (N=2/97), un fringuello (N=1/97), un pettirosso (N=2/97) e un tordo bottaccio (N=1/97).

Per quanto riguarda i campioni ottenuti nel 2020, la *real-time* PCR ha individuato 17 positivi su 45. In dettaglio, i campioni positivi sono stati raccolti da 5 merli (N=11/17), 2 fringuelli (N=2/17), 1 tordo bottaccio (N=1/17) e 1 tordo sassello (N=3/17).

In totale, sono quindi risultati positivi allo *screening* per *B.burgdorferi* s.l. 114 campioni su 209 analizzati (54,55%).

Controllo interno – RNA

Tutti i 209 campioni analizzati negli anni 2019 e 2020 sono risultati positivi alla verifica del controllo interno per l'RNA, a prova che l'acido nucleico era stato estratto correttamente e che non erano presenti agenti aspecifici inibenti le reazioni di amplificazione del materiale genetico.

Screening TBEV

Tutti i 209 campioni analizzati sono risultati negativi allo *screening* mediante RT *real-time* PCR per TBEV.

3.3 PCR

Ricerca di *Borrelia* spp.

I campioni risultati positivi allo *screening* sono stati saggiati con metodica PCR, per amplificare il materiale genetico del patogeno.

I risultati delle analisi dei campioni del 2019 hanno confermato la positività di 88 campioni; 9 sono invece risultati negativi.

Relativamente ai campioni del 2020, l'analisi PCR ha confermato la positività di 14 campioni, mentre 3 sono risultati negativi. Fig. 28

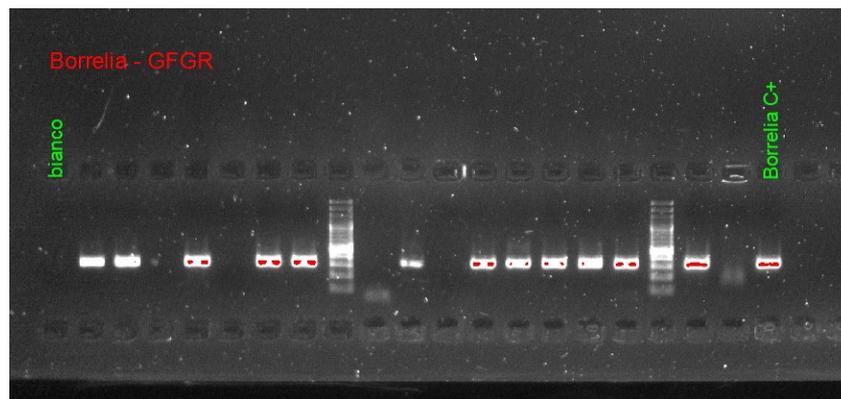


Figura 28: foto-documentazione di parte delle analisi PCR, realizzata con lo strumento GelDoc EZ Imager (BioRad). L'immagine riporta l'esito della corsa elettroforetica degli amplificati del gene *groEL* di *Borrelia*. La presenza della fluorescenza alla stessa altezza del controllo positivo per *Borrelia* (*Borrelia* C+) indica i campioni positivi. Gli amplificati dei campioni sono stati posti nel gel intervallati dal "marker di peso molecolare" che indica le dimensioni della sequenza di DNA amplificata, ovvero ~300 pb.

3.4 Sequenziamento

Il confronto delle sequenze spediteci dalla società tedesca StarSeq GmbH con quelle presenti nel database online di Blastn, ha permesso di identificare le seguenti specie di *Borrelia*, in ordine di frequenza:

- *B. garinii*
- *B. valaisiana*
- *B. afzelii*
- *B. miyamotoi*

Sequenziamento con specifiche sui dati relativi alle zecche

Nei campioni relativi all'anno 2019 si sono identificate:

- 56 *B. garinii*. I campioni positivi corrispondevano a 51 zecche prelevate da 17 merli, di cui 6 larve (1 ingorgate e 5 parzialmente ingorgate) e 45 ninfe (26 ingorgate, 18 parzialmente ingorgate e 1 non ingorgata); 3 zecche prelevate da 3 peppole, di cui una larva ingorgata e 2 ninfe, entrambe parzialmente ingorgate; 1 da un tordo bottaccio, allo stadio di larva, ingorgata; 1 da un tordo sassello, allo stadio di ninfa, non ingorgata.
- 26 *B. valaisiana*; le zecche positive in questo caso erano così distribuite: 23 prelevate da 11 merli, di cui 4 larve (2 ingorgate e 2 parzialmente ingorgate) e 19 ninfe (15 ingorgate e 4 parzialmente ingorgate); 2 prelevate da una peppola, entrambe ninfe ed entrambe parzialmente ingorgate; 1 da un tordo sassello, allo stadio di larva, parzialmente ingorgata. Questa zecca apparteneva alla specie *I. acuminatus*.
- 4 *B. afzelii*; in questo caso i campioni positivi erano state prelevati da 2 merli. In particolare, 3 da un individuo, tutte allo stadio di ninfa (2 ingorgate e una non ingorgata), e 1 da un altro esemplare, allo stadio di ninfa, parzialmente ingorgata.
- 2 *B. miyamotoi*, da una zecca prelevata da un fringuello, allo stadio di ninfa, ingorgata e da un'altra zecca prelevata da un pettirosso, allo stadio di ninfa, parzialmente ingorgata.

Nei campioni dell'anno 2020 sono state identificate:

- 9 *B. garinii*; i campioni positivi corrispondevano a 6 zecche prelevate da 4 merli, tutte allo stadio di ninfa, di cui 2 ingorgate e 4 parzialmente ingorgate; 3 zecche da 1 tordo sassello, tutte allo stadio di ninfa e tutte ingorgate.

- 2 *B. valaisiana*, da una zecca prelevata da un merlo e l'altra zecca da un tordo bottaccio. Entrambe le zecche erano allo stadio di ninfa ed entrambe ingorgate.
- 2 *B. afzelii*. In questo caso le zecche positive erano state prelevate da 2 fringuelli ed erano entrambe allo stadio di ninfa, ingorgate.
- 1 *Borrelia* spp. Per un campione non si è riusciti a identificarne la specie, perché la sequenza è risultata di scarsa qualità. La zecca era una larva parzialmente ingorgata.

Concludendo si è riusciti ad amplificare e sequenziare 102 campioni dei 209 totali (48,8%). L'insieme dei risultati ottenuti dalle analisi PCR e di sequenziamento effettuate nei campioni del 2019 e del 2020 è riassunto in tabella 4.

Tabella 4: totale delle specie di *Borrelia* spp. identificate, divise secondo la specie di uccello da cui sono state prelevate le zecche ed i dati relativi alle zecche.

Specie di provenienza	N Zecche positive/ tot analizzate (%)	N. <i>B. garinii</i> / N zecche positive (%)	L	N	<i>B. valaisiana</i> / N zecche positive (%)	L	N	<i>B. afzelii</i> / N zecche positive (%)	N	<i>B. miyamotoi</i> / N zecche positive (%)	N	<i>Borrelia</i> spp./ N zecche positive (%)
Fringuello <i>Fringilla coelebs</i>	3/209 (1,44%)	0/3 (0%)	0	0	0/3 (0%)	0	0	2/3 (66,67%)	2	1/3 (33,33%)	1	0/3 (0%)
Merlo <i>Turdus merula</i>	86/209 (41,15%)	57/86 (66,27%)	6	51	24/86 (27,90%)	4	20	4/86 (4,65%)	4	0/86 (0%)	0	1**/86 (1,16%)
Peppola <i>Fringilla montifringilla</i>	5/209 (2,4%)	3/5 (60%)	1	2	2/5 (40%)	0	2	0/5 (0%)	0	0/5 (0%)	0	0/5 (0%)
Pettiroso <i>Erithacus rubecula</i>	1/209 (0,48%)	0/1 (0%)	0	0	0/1 (0%)	0	0	0/1 (0%)	0	1/1 (100%)	1	0/1 (0%)
Tordo bottaccio <i>Turdus philomelos</i>	2/209 (0,96%)	1/2 (50%)	1	0	1/2 (50%)	0	1	0/2 (0%)	0	0/2 (0%)	0	0/2 (0%)
Tordo sassello <i>Turdus iliacus</i>	5/209 (2,4%)	4/5 (80%)	0	4	1*/5 (20%)	1	0	0/5 (0%)	0	0/5 (0%)	0	0/5 (0%)
Totale	102/209 (48,8%)	65/102 (63,73%)	8	57	28/102 (27,45%)	5	23	6/102 (5,88%)	6	2/102 (1,96%)	2	1/102 (0,98%)

Legenda: L = larva; N = ninfa; * = da *Ixodes acuminatus*. ** = larva.

Sequenziamento con specifiche sui dati relativi agli uccelli

Per i campioni dell'anno 2019, il totale delle zecche risultate positive, divise secondo la specie di uccello da cui sono state prelevate:

- **Merli:** 23 individui su 29 parassitati presentavano zecche positive. In particolare, 10 avevano zecche positive solo a *B. garinii*; essi albergavano rispettivamente 10, 6, 5, 2, tre 3 zecche e tre 1 zecca (35 zecche in totale), tutte positive. 4 avevano zecche positive solo a *B. valaisiana*: di questi, 2 albergavano rispettivamente 2 e 1 zecca, tutte positive; uno albergava 5 zecche, di cui 3 positive e 2 negative; uno ne albergava 2, di cui una positiva e una negativa.

Negli altri 7 merli, *B. garinii* e *B. valaisiana* sono risultate associate nello stesso uccello. In dettaglio: un merlo albergava 7 zecche, di cui 2 risultate positive a *B. garinii*, una a *B. valaisiana* e 4 negative; uno albergava 2 zecche, una risultata positiva a *B. garinii* e una positiva per *B. valaisiana*. Due albergavano 4 zecche, di cui 2 positive per *B. garinii* e 2 per *B. valaisiana* in entrambi gli uccelli. Uno albergava 11 zecche, di cui 4 risultate positive per *B. garinii* e 7 per *B. valaisiana*. Uno ne albergava 5, di cui 3 positive per *B. garinii* e 2 per *B. valaisiana*. Un altro ne albergava 5, di cui 2 positive a *B. garinii*, una positiva *B. valaisiana* e 2 negative.

Le zecche presenti su 2 merli invece sono risultate positive a *B. afzelii*: in particolare uno albergava 2 zecche, di cui una negativa e una positiva; uno ne albergava 7, di cui 3 positive 4 negative.

- **Peppole:** 3 individui con zecche positive su 13 parassitati. Delle 3 peppole: una albergava 7 zecche, di cui solo una positiva a *B. garinii*; una 1 zecca, positiva a *B. garinii*; una albergava 5 zecche, di cui una positiva a *B. garinii*, 2 positive a *B. valaisiana* e 2 negative.
- **Fringuelli:** 1 individuo con zecche positive su 3 parassitati. Esso albergava una sola zecca, positiva a *B. miyamotoi*.
- **Pettirossi:** 1 individuo con zecche positive su 11 parassitati. Questo esemplare albergava 2 zecche, di cui una positiva a *B. miyamotoi* e una negativa.

I risultati ottenuti dal sequenziamento di *Borrelia* spp. nel 2019, divisi per specie di uccello da cui erano state prelevate le zecche è riportato in tabella 5.

Tabella 5: sequenziamento di *Borrelia* spp. nelle zecche prelevate durante il campionamento del 2019, divise per specie di uccello.

Specie uccello	N. uccelli con zecche positive	Grado infestazione n. zecche/uccello	N. zecche positive a <i>B. garinii</i>	N. zecche positive a <i>B. valaisiana</i>	N. zecche positive a <i>B. afzelii</i>	N. zecche positive a <i>B. miyamotoi</i>	N. zecche negative
Merlo	1	10	10/10	-	-	-	-
	1	6	6/6	-	-	-	-
	1	5	5/5	-	-	-	-
	1	2	2/2	-	-	-	-
	3	3	3/3	-	-	-	-
	3	1	1/1	-	-	-	-
	1	2	-	2/2	-	-	-
	1	1	-	1/1	-	-	-
	1	5	-	3/5	-	-	2/5
	1	2	-	1/2	-	-	1/2
	1	7	2/7	1/7	-	-	4/7
	1	2	1/2	1/2	-	-	-
	2	4	2/4	2/4	-	-	-
	1	11	4/11	7/11	-	-	-
	1	5	3/5	2/5	-	-	-
	1	5	2/5	1/5	-	-	2/5
	1	2	-	-	1/2	-	1/2
1	7	-	-	3/7	-	4/7	
Peppola	1	7	1/7	-	-	-	6/7
	1	5	1/5	2/5	-	-	2/5
	1	1	1/1	-	-	-	-
Fringuello	1	1	-	-	-	1/1	-
Pettiroso	1	2	-	-	-	1/2	1/2

Per i campioni dell'anno 2020, il totale delle zecche risultate positive, divise secondo la specie di uccello da cui sono state prelevate:

- **Merli:** su 8 parassitati, 5 individui presentavano zecche positive. 4 di questi sono risultati positivi a *B. garinii* e, in particolare: uno albergava 7 zecche, di cui solo una positiva, a *B. garinii*; uno ne albergava 4, di cui 2 positive a *B. garinii* e due negative. Un altro merlo albergava 4 zecche, di cui 2 positive per *B. garinii*, una negativa e una positiva per *Borrelia* spp. Uno ne albergava una, positiva. Uno è risultato positivo a *B. valaisiana*. Esso albergava 3 zecche, di cui solo una positiva.
- **Fringuelli:** 2 individui con zecche positive su 2 parassitati. Entrambi i fringuelli albergavano una sola zecca, positiva in entrambi a *B. afzelii*.
- **Tordi bottacci:** 1 individuo con zecche positive su 1 parassitato. Questo individuo albergava una sola zecca, positiva a *B. valaisiana*.
- **Tordi sasselli:** 1 individuo con zecche positive su 1 parassitato. Esso albergava 3 zecche, positive a *B. valaisiana*.

I risultati ottenuti dal sequenziamento di *Borrelia* spp. nel 2020, divisi per specie di uccello da cui erano state prelevate le zecche è riportato in tabella 6.

La totalità dei dati relativi ai campioni prelevati e analizzati nei due anni di campionamento è riassunta in tabella 7.

Tabella 6: sequenziamento di *Borrelia* spp. nelle zecche prelevate durante il campionamento del 2020, divise per specie di uccello.

Specie uccello	N. uccelli con zecche positive	Grado infestazione n. zecche/uccello	N zecche positive a <i>B. garinii</i>	N. zecche positive a <i>B. valaisiana</i>	N zecche positive a <i>B. afzelii</i>	N. zecche positive a <i>B. spp</i>	N zecche negative
Merlo	1	7	1/7	-	-	-	6/7
	1	4	2/4	-	-	-	2/4
	1	4	2/4	-	-	1/4	1/4
	1	1	1/1	-	-	-	-
	1	3	-	1/3	-	-	2/3
Fringuello	1	1	-	-	1/1	-	6/7
	1	1	-	-	1/1	-	2/5
Tordo bottaccio	1	1	-	1/1	-	-	-
Tordo sassello	1	3	-	3/3	-	-	-

Tabella 7: panoramica riassuntiva dei dati relativi agli uccelli e alle zecche prelevate nei 2 anni di campionamento, compreso il sequenziamento di *Borrelia* spp.

Specie uccello di provenienza	Numero uccelli inanellati	Numero uccelli infestati	% infestazione	N zecche analizzate	N zecche positive	% zecche positive	N. <i>B. garinii</i> / N zecche analizzate	<i>B. valaisiana</i> / N zecche analizzate	<i>B. afzelii</i> / N zecche analizzate	<i>B. miyamotoi</i> / N zecche analizzate	<i>Borrelia</i> spp./ N zecche analizzate
Fringuello	140	5	3,57%	5	3	60%	0/5	0/5	2/5	1/5	0/5
Merlo	88	37	42,05%	128	86	67,19%	57/128	24/128	4/128	0/128	1/128
Peppola	90	13	14,44%	29	5	17,24%	3/29	2/29	0/29	0/29	0/29
Pettiroso	968	23	2,38%	33	1	3,03%	0/33	0/33	0/33	1/33	0/33
Tordo bottaccio	79	4	5,06%	4	2	50%	1/4	1/4	0/4	0/4	0/4
Tordo sassello	14	4	28,57%	8	5	62,5%	4/8	1/8	0/8	0/8	0/8
Spioncello	41	1	2,44%	1	0	0%	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Cincia mora	13	1	7,69%	1	0	0%	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Altre specie	1981	0	0	0	0	0%	-	-	-	-	-
Totale	3414	88	2,58%	209	102	48,80%	65/209 (31,10%)	28/209 (13,40%)	6/209 (2,87%)	2/209 (0,95%)	1/209 (0,48%)

3.5 Analisi statistica

Lo stadio di ninfa ha dimostrato un odds ratio superiore, i.e. 4.78 [95CI = 1.069-21.456] (p-value= 0.045), di essere positivo a *Borrelia* spp. rispetto alle larve.

I soli merli hanno dimostrato un odds significativamente superiore, 8.705 [95CI = 1.608-62.070], (p-value= 0.018) di esser infestati rispetto alla baseline, rappresentata dalla cincia mora.

In termini di positività delle zecche a *Borrelia* spp., è stato possibile identificare un'associazione significativa con diverse specie di uccelli. In particolare, dopo esclusione dalle analisi delle specie in cui la numerosità di animali infestati era eccessivamente bassa, e assumendo il pettirosso come livello di riferimento, il merlo ha dimostrato un odds ratio significativamente superiore, i.e. 73.025 [95CI = 14.872-132.15], (p-value<0.001) di albergare zecche positive. Sebbene meno evidente, un analogo fenomeno è stato osservato per il tordo tassello, 53.333 [95CI = 6.208-123.417], (p-value=0.001).

Per gli altri parametri presi in considerazione non sono state riscontrate associazioni o differenze statisticamente significative.

4. DISCUSSIONE

4.1 Affidabilità del campionamento e delle metodiche utilizzate

Il prelievo delle zecche è stato svolto dalle stesse persone e con le stesse manualità in entrambi gli anni di campionamento, ed in fase di analisi si è scelto di scartare le zecche danneggiate, per le quali le analisi di laboratorio non avrebbero garantito un risultato affidabile.

L'estrazione del materiale genetico e le successive reazioni di amplificazione possono in alcuni casi andare incontro a un'inibizione legata alla matrice particolarmente complessa. Per questo, l'uso del controllo interno per il DNA e per l'RNA è stato fondamentale per valutare l'idoneità dei campioni analizzati.

Considerando l'esito sempre positivo della ricerca del controllo interno sia per il DNA che per l'RNA, i risultati ottenuti per entrambi i patogeni analizzati sono da considerarsi attendibili.

4.2 *Borrelia* spp.

I risultati emersi dalle analisi confermano la presenza di *Borrelia* spp. negli uccelli migratori che seguono la rotta verso Sud passante dall'arco alpino ed in particolare dalle Prealpi del Friuli Venezia Giulia. La specie di zecca prevalentemente individuata è *I. ricinus*, il che conferma la competenza di questo vettore nell'albergare le spirochete del complesso *B. burgdorferi* s.l. e anche *B. miyamotoi*.

L'aver identificato quasi esclusivamente *I. ricinus* potrebbe essere legato al fatto che il campionamento per entrambi gli anni è stato svolto solo in autunno, poiché le restrizioni per il contenimento dell'emergenza epidemiologica da COVID-19 hanno impedito gli spostamenti per effettuare il campionamento in primavera, momento in cui è possibile trovare altre specie di zecca. In bibliografia, infatti, risulta che la specie prevalentemente individuata sugli uccelli nel periodo autunnale durante la migrazione verso Sud è proprio *I. ricinus* (Tabella 1), mentre è riportato da Toma et al. che le zecche trasportate dagli uccelli in entrata in Italia provenienti dall'Africa durante la migrazione primaverile, appartengono principalmente al genere *Hyalomma* ed in minor parte al genere *Ixodes*. *Hyalomma* spp. è la specie più diffusa nelle regioni africane (Toma et al., 2021) e quindi quella che con maggiore probabilità può essere trasportata dai migratori intrapaleartici e trans-sahariani in ingresso in Italia, rilevamento coerente con quanto risulta dagli altri studi realizzati nel centro Italia durante la migrazione primaverile verso Nord (Pascucci et al., 2019; Rollins et al., 2021; Toma et al., 2014).

Nonostante si fosse indicato lo stato di ingorgamento delle zecche in fase di identificazione, si è deciso di non prenderlo in considerazione come elemento rilevante. Tutte le zecche analizzate sono state considerate ingorgate in quanto raccolte da un animale e allo stadio immaturo, per

il quale è necessario il pasto di sangue. Presumendo che nessuna zecca si fosse attaccata nei minuti precedenti al prelievo e durando il pasto di sangue dai 3 agli 8 giorni, si è dedotto che fossero tutte, anche minimamente, ingorgate.

Relativamente alla ricerca di *Borrelia* spp., bisogna premettere che le positività ottenute con lo *screening* attraverso *real-time* PCR (54,55%) non corrispondono con quelle ottenute attraverso l'analisi PCR (48,8%). Questo è probabilmente dovuto al fatto che la quantità di DNA presente in alcune zecche era molto bassa, a tal punto da non potere essere amplificato con la PCR classica. Inoltre, è doveroso premettere anche che il confronto con i dati ottenuti in Europa è possibile, ma non completamente affidabile, in quanto le metodiche utilizzate negli studi europei considerati sono diverse tra loro e diverse anche da quelle utilizzate da noi.

Considerando il 48,8% di positività a *Borrelia* spp. ottenuta con l'analisi PCR, il dato da noi individuato è simile a quello riportato in Slovacchia (43,46%) (Mtierová et al., 2020), mentre è più alto rispetto alle percentuali di positività a *Borrelia* spp. del resto di Europa. Nei paesi del Nord del continente la prevalenza si aggira intorno al 25% (Svezia) - 35% (Belgio, Danimarca e Olanda), a parte il caso della Norvegia dove la prevalenza riscontrata è del 6% circa (Pedersen et al., 2020) e della regione baltica della Russia, dove si assesta sul 4% circa (Movila et al., 2013). Anche in confronto allo studio condotto nel Nord Italia si è individuata una prevalenza maggiore, visto che lì era stata descritta una percentuale di positività del 30% circa (Pajoro et al., 2018). Confrontando il dato relativo alle migrazioni autunnali del nostro studio e di quello di Pajoro et al. con quello degli studi svolti nel centro Italia durante la migrazione primaverile invece, vediamo che mediamente la prevalenza è più bassa in quest'ultimo caso: è compresa in un *range* tra lo 0% (Pascucci et al., 2019) e il 22% (Rollins et al., 2021), anche se nel secondo studio il numero di uccelli e di zecche analizzato era molto esiguo (rispettivamente 151 e 18) e quindi probabilmente poco rappresentativo. Quello che emerge è quindi che la *Borrelia* spp. è sicuramente presente in tutta Europa, ma con una distribuzione spaziale e prevalenza molto variabili, che non sono indicativi di *pattern* specifici.

Il 63,3% delle zecche positive albergavano la specie *B. garinii*, mentre il 27,45% *B. valaisiana*. Queste due specie insieme, costituiscono quindi più del 90% delle specie sequenziate e quasi il 50% di positività sul totale delle zecche analizzate. Delle 209 zecche totali, infatti, il 31% è *B. garinii* ed il 13,4% è *B. valaisiana*. Per confrontare questo risultato con quelli delle ricerche dei vari paesi europei, si è cercato di uniformare tutti gli studi svolti in Europa rapportando la prevalenza delle zecche positive al numero totale di zecche analizzate, e non alle zecche positive (Tabella 1). I dati delle ricerche europee, infatti, sono spesso riportati in maniera diversa l'uno dall'altro, ed in questo modo è stato possibile avere dei numeri raffrontabili tra loro. Dal

confronto emerge che *B. garinii* e *B. valaisiana* sono le specie maggiormente prevalenti anche nei nostri campioni, in linea con quanto descritto da tutti gli studi europei, anche se in termini numerici assoluti la positività a noi è risultata più elevata rispetto alle prevalenze riscontrate in Europa.

La terza specie più prevalente è *B. afzelii*, che costituisce il 5,88% delle positività per *Borrelia* spp., mentre rappresenta il 2,87% delle zecche totali analizzate. Anche per questo dato il risultato è in linea con l'Europa, con le stesse considerazioni sopra riportate.

Le uniche eccezioni a questo ordine di prevalenza sono riportate nello studio italiano di Pajoro et al. e nello studio russo di Movila et al., in cui *B. garinii* è la specie maggiormente prevalente, ma *B. afzelii* è stata individuata con una prevalenza maggiore rispetto a *B. valaisiana*.

Questi risultati confermano comunque che *B. garinii* e *B. valaisiana* sono le specie più adattate agli uccelli e quelle più frequentemente riscontrate, anche perché è riportato che questi animali ne sono *reservoir*. Per quanto riguarda *B. afzelii*, invece, la bibliografia riferisce che gli uccelli non ne sono *reservoir*, in quanto questa genospecie è sensibile al loro complemento e quindi le specie avicole non possono sviluppare infezione sistemica a seguito del morso di una zecca infetta (D. J. A. Heylen et al., 2017; Voordouw, 2015). La presenza di positività per *B. afzelii* potrebbe essere quindi correlata al meccanismo del *co-feeding*, per cui il passaggio del patogeno da una zecca infetta a una non infetta avviene anche in assenza di infezione sistemica nell'ospite, ma semplicemente attraverso il pasto simultaneo su un medesimo sito. Questa deduzione è sostenuta dal fatto che delle 6 *B. afzelii* sequenziate, 3 provenivano da ninfe raccolte dal medesimo merlo; le altre 3 invece provenivano da uccelli diversi. Le zecche erano comunque allo stadio di ninfa, il che potrebbe significare anche che si erano infestate durante lo stadio di larva in qualche altro ospite e hanno poi mantenuto l'infezione per passaggio trans-stadiale.

Bisogna ricordare che secondo l'ECDC le specie che più frequentemente causano malattia di Lyme nell'uomo sono *B. garinii* e *B. afzelii*, responsabili rispettivamente della forma neurologica e dell'acrodermatite atrofica cronica: in base ai risultati ottenuti, gli uccelli migratori potrebbero giocare un ruolo nella distribuzione di *B. garinii*. Per *B. valaisiana* invece, la preoccupazione è minore, in quanto causa una malattia lieve e riscontrata di rado nell'uomo.

È un dato interessante il fatto che sia stata sequenziata anche *B. miyamotoi*, sebbene con una prevalenza molto bassa. È stata riscontrata nell'1,96% delle zecche positive, mentre nello 0,95% se si considerano tutte le zecche analizzate. Questo risultato è perfettamente in linea con quanto rilevato dagli studi europei, che hanno sequenziato questa genospecie in percentuale mai superiore al 1,12% (Klitgaard et al., 2019) sul totale delle zecche analizzate. *B. miyamotoi* è l'unica *Borrelia* appartenente al gruppo delle specie che causano la febbre ricorrente ad essere

trasmessa da zecche dure ed è discusso il fatto che gli uccelli possano esserne *reservoir*. Bisogna ricordare però che rispetto a *B. burgdorferi* s.l., è certo che la *B. miyamotoi* sia trasmessa nelle zecche anche per via trans-ovarica, per cui non è detto che la positività riscontrata sia legata al fatto che gli uccelli da cui erano state prelevate le zecche fossero infetti a livello sistemico: il fringuello ed il merlo potrebbero aver semplicemente operato da vettori meccanici di zecche già infette. Di conseguenza, sono necessarie ulteriori indagini per comprendere quanto incida la modalità di trasmissione verticale nel mantenimento del patogeno nelle zecche rispetto all'infezione sistemica da parte degli uccelli, ma anche per definire il ruolo svolto dai migratori nella diffusione di questa TBRF.

Le due *B. miyamotoi* identificate nel 2019 sono una al 99,63% e una al 100% identiche a quelle sequenziate nel 2019 in Repubblica Ceca (Janeček et al., 2020) e nei Paesi Bassi (Kuleshov et al., 2019). Questo potrebbe essere coerente con l'ipotesi del trasporto di zecche infette sulla rotta migratoria Nord-Est Sud-Ovest seguita in particolare dal fringuello (fig. 12) e dal pettirosso (fig. 19), che sono le due specie da cui sono state prelevate le zecche positive a questa specie.

La percentuale di infestazione del totale degli uccelli inanellati del 2,58% (88/3414), che è un valore piuttosto basso, ma dentro il *range* individuato in Europa; è simile ai risultati ottenuti in Germania (Klaus et al., 2016) ed al valore ottenuto nell'unico studio simile condotto nel Nord Italia, dove si riscontrava il 4,4% di infestazione (Pajoro et al., 2018). Questo significa che mediamente gli uccelli migratori non sono molto infestati da zecche e men che meno da zecche positive a *Borrelia* spp. Gli uccelli del genere *Turdus* sono quelli più infestati dalle zecche e quelli che albergano la maggior parte delle zecche risultate positive.

Guardando le singole specie in tabella 7 e come confermato dall'analisi statistica, il dato che spicca di più è quello relativo al merlo (*Turdus merula*): il 42% degli individui inanellati nei due anni di campionamento è risultato infestato, con il 67% delle zecche risultato positivo ad almeno una specie di *Borrelia*. In particolare, nel 44,5% dei casi si è riscontrata *B. garinii* e nel 19% dei casi *B. valaisiana*. Nel 2019 dal merlo sono anche state prelevate 4 delle 6 zecche totali risultate positive *B. afzelii*, ma la prevalenza di questa genospecie nel merlo (3%) non sembra essere rilevante. Questi risultati potrebbero far concludere che il merlo sia un *reservoir* di *B. garinii*, e svolga un ruolo evidente nella sua diffusione, considerando anche il suo habitat, che comprende parchi e giardini urbani. La rotta migratoria dei merli che raggiungono l'Italia origina dal centro-Nord-Est Europa per terminare in molti casi proprio nella nostra penisola, dove questa specie resta a svernare: il merlo potrebbe quindi trasportare patogeni dai paesi di partenza o da quelli che incontra lungo la sua via verso l'Italia. Tuttavia, bisogna considerare che in Italia esiste anche una larga popolazione nidificante e sedentaria, per cui le ninfe che si trovano su questa specie

potrebbero essersi infettate anche su altri ospiti appartenenti alla popolazione locale. In questo caso il merlo non diffonderebbe patogeni tra paesi diversi, ma opererebbe solo come un vettore per le zecche positive nel suo areale abitativo.

Altra specie da considerare è il tordo sassello (*Turdus iliacus*), specie poco inanellata, ma con una percentuale di infestazione piuttosto elevata (28,6%), con zecche positive al 62,5%; la maggior parte delle positività sono state riscontrate per *B. garinii*. Anche in questo caso quindi, questa specie potrebbe giocare un ruolo nella diffusione di *Borrelia* spp., considerando che l'analisi statistica ha confermato che il tordo sassello ha maggiore probabilità di albergare zecche positive, anche se in misura inferiore rispetto al merlo e considerando che la sua rotta migratoria nella maggior parte dei casi origina dalla penisola scandinava per terminare in Italia, costa mediterranea della Francia o, in pochi casi, Africa settentrionale.

Il pettirosso (*Erithacus rubecola*) invece, per quanto sia molto numeroso, ha una percentuale di infestazione bassissima (2,4%), con una percentuale di zecche positive altrettanto bassa (3%), per cui non risulta rilevante nelle considerazioni sulla disseminazione di eventuali patogeni. Una delle due *B. miyamotoi* è stata tuttavia trovata proprio in un pettirosso. La numerosità delle catture potrebbe essere dovuta al fatto che la sua rotta migratoria vede l'Italia come un crocevia sia per gli esemplari provenienti dal Baltico e dall'Europa centro-orientale che seguono una direzione Nord-Est Sud-Ovest verso il Nord-Africa, sia per quelli provenienti da zone ad Est dell'arco alpino, come l'Austria e la Slovenia, che seguono una direttrice spiccatamente Est-Ovest; oltre a questo, bisogna considerare che le popolazioni che abitano nell'Europa meridionale sono largamente sedentarie, anche se non dovrebbero essere stati inanellati molti pettirossi sedentari durante il nostro campionamento, in quanto l'habitat preferito da questa specie prevede altitudini meno elevate.

Per quanto riguarda le altre specie, risultano infestate con percentuali più basse: dal 3,6% del fringuello (*Fringilla coelebs*), al 5,06% del tordo bottaccio (*Turdus philomelos*), al 14,4% della peppola (*Fringilla montifringilla*), per cui non risultano molto importanti nel trasporto dei vettori di TBDs.

Nel fringuello il 60% delle zecche analizzate è risultato positivo, per la maggior parte (2/5) a *B. afzelii*; queste due zecche erano state prelevate da due fringuelli diversi, ed il sequenziamento ha identificato le due stesse sequenze (identità 100%) isolate dall'uomo in Germania in due momenti diversi (Bontemps-Gallo et al., 2018; Casjens et al., 2011). Questo rilevamento potrebbe essere coerente con l'ipotesi del trasporto della spirocheta lungo la rotta migratoria seguita dai fringuelli.

La peppola è risultata avere il 17% delle zecche positive, perlopiù a *B. garinii*. I dati trovati su questa specie sono confortanti, poiché la peppola arriva in Italia da una vastissima area

geografica che copre quasi tutto il centro Europa ed è considerata una specie a carattere irruttivo, capace di fenomeni invasivi, per cui il fatto che sia mediamente poco infestata rende meno probabile il trasporto di patogeni trasmessi da zecche.

Nonostante in bibliografia sia riportato che la peppola e il fringuello formano spesso gruppi migratori misti (Volponi e Spina, 2008), questo non si rispecchia nei patogeni individuati, poiché in queste due specie essi sono completamente diversi gli uni dagli altri.

La cincia mora e lo spioncello infine, oltre a essere poco infestati, non hanno riportato zecche positive; la loro attitudine migratoria inoltre mostra la percorrenza di distanze piuttosto ridotte da zone limitrofe all'arco alpino, con pochi soggetti migratori per tratti più lunghi, per cui il loro ruolo di trasporto sarebbe comunque limitato.

4.3 TBEV

Nessuna positività è stata riscontrata per TBEV. Questo risultato è coerente con quanto rilevato nei pochi studi europei sulle zecche prelevate dagli uccelli migratori, dove le prevalenze riscontrate erano inferiori allo 0,5% (Lommano et al., 2014; Movila et al., 2013). È anche in linea con la prevalenza individuata nello studio italiano di Alfano et al. (0,17%), che tuttavia considerava zecche in *questing* prelevate dall'ambiente, per cui questo dato non è confrontabile ma evidenzia come anche in zone considerate endemiche, la prevalenza di TBE sia bassa.

Gli uccelli migratori, quindi, non sembrano svolgere un ruolo primario nel trasporto di TBEV né tantomeno essere *reservoir* di questo patogeno, ma rimane molto spazio per ulteriori studi di approfondimento.

5. CONCLUSIONI

Gli uccelli migratori, valutati nel loro complesso, sono risultati essere poco infestati dalle zecche, per cui possono essere considerati dei disseminatori dei patogeni *tick-borne* poco efficienti: le zecche da essi prelevate infatti sono poche e quindi sono limitate anche le positività. Tuttavia, considerando le singole specie di uccello in relazione con i patogeni ricercati, per alcune di esse (merlo e tordi), si possono trarre conclusioni diverse. Inoltre, è dimostrato che i migratori passeriformi possano contribuire al trasporto di varie specie di *Borrelia* tra i paesi europei lungo la loro rotta migratoria principale in direzione Nord-Est Sud-Ovest e, in particolare, durante la migrazione autunnale verso Sud-Ovest, che è stata l'oggetto della nostra osservazione. La specie di zecca più identificata è *I. ricinus* e le genospecie di *B. burgdorferi* s.l. più riscontrate sono *B. garinii* e *B. valaisiana*, di cui gli uccelli passeriformi sono considerati *reservoir*: la preoccupazione maggiore è principalmente destata da *B. garinii*, agente eziologico della forma neurologica della borreliosi di Lyme, considerata dall'ECDC la principale responsabile di malattia nell'uomo. Per *B. valaisiana* invece, l'allerta è minore, in quanto causa raramente malattia in Europa, ma in questo caso la sua implicazione nella malattia potrebbe essere sottostimata in quanto spesso, nell'ambito umano, non si arriva alla diagnosi biomolecolare.

È un dato interessante il fatto che sia stata sequenziata anche *B. miyamotoi*, sebbene con una prevalenza molto bassa, per cui sono necessarie ulteriori indagini per definire il ruolo svolto dagli uccelli migratori nella diffusione di questa TBRF. Essa è l'unica *Borrelia* appartenente al gruppo delle specie che causano la febbre ricorrente ad essere trasmessa da zecche dure ed è discusso il fatto che gli uccelli possano esserne *reservoir*. Rispetto a *B. burgdorferi* s.l., è certo che la *B. miyamotoi* sia trasmessa nelle zecche anche per via trans-ovarica, per cui sono necessarie ulteriori ricerche per comprendere quanto incida questa modalità nel mantenimento del patogeno nelle zecche rispetto all'infezione sistemica da parte degli uccelli.

Per quanto riguarda il *tick-borne encephalitis virus*, non è stato trovato nelle nostre analisi, ma considerando le prevalenze bassissime riportate nelle zecche, non si può concludere che i passeriformi migratori non siano specie rilevanti nell'epidemiologia di questo patogeno.

È auspicabile, comunque, che ulteriori studi siano realizzati in Italia sia per *Borrelia* spp. che per TBEV, magari estendendo l'indagine anche alle zecche in ingresso, cioè quelle trasportate dai migratori primaverili provenienti dall'Africa e diretti a Nord. In questi ultimi, sarebbe importante ampliare la ricerca anche su altri agenti zoonosici, dato che le specie di zecca più presenti nelle zone dell'Africa di provenienza degli uccelli migratori, ovvero *Hyalomma* spp., sono vettori di TBD emergenti di crescente attenzione, come la *Crimean-Congo hemorrhagic fever*.

Altro elemento critico da poter sviluppare, è quello della mancanza dei dati riguardo alla sorveglianza della malattia di Lyme. Mentre per la TBE è evidente lo sforzo europeo nella

redazione periodica di report epidemiologici, nella borreliosi di Lyme questa iniziativa è deficitaria: l'ECDC ha pianificato il monitoraggio e la raccolta dei dati per il 2019, ma ancora non esistono pubblicazioni in merito. A livello italiano la situazione è ancora più carente, in quanto la malattia di Lyme è tra le patologie di classe V del D.M. 15 dicembre 1990, ma ci sono mancanze da parte di tutte le regioni nell'invio del riepilogo annuale, con conseguenti lacune di dati su questa malattia e sottostima dei casi nazionali.

Sarebbe auspicabile in una prospettiva futura prevedere anche una coordinazione tra la medicina umana e la medicina veterinaria, per avere una panoramica completa sulla distribuzione, prevalenza e incidenza dei patogeni agenti di malattie infettive che circolano tra animali, uomo e ambiente in Italia e in Europa e per poter realizzare appieno il principio guida della *One Health*.

BIBLIOGRAFIA

- Alfano, N., Tagliapietra, V., Rosso, F., Ziegler, U., Arnoldi, D., & Rizzoli, A. (2020). Tick-borne encephalitis foci in northeast Italy revealed by combined virus detection in ticks, serosurvey on goats and human cases. *Emerging Microbes and Infections*, *9*(1), 474–484. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1730246>
- 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>
- Andreotti, A., Pirrello, S., Tomasini, S., & Merli, F. (2010). *I Tordi in Italia -Biologia e conservazione delle specie del genere Turdus* (ISPRA – Istituto Superiore per la protezione e la ricerca ambientale (ed.)).
- Barlozzari, G. (2021). “Focus sulla conoscenza ” Zecche e Sanità Pubblica.
- Belli, A., Sarr, A., Rais, O., Rego, R. O. M., & Voordouw, M. J. (2017). Ticks infected via co-feeding transmission can transmit Lyme borreliosis to vertebrate hosts. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05231-1>
- Bontemps-Gallo, S., Lawrence, K. A., Richards, C. L., & Gherardini, F. C. (2018). Genomic and phenotypic characterization of *Borrelia afzelii* BO23 and *Borrelia garinii* CIP 103362. *PLoS ONE*, *13*(6), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199641>
- Boulanger, N., Boyer, P., Talagrand-Reboul, E., & Hansmann, Y. (2019). Ticks and tick-borne diseases. *Medicine et Maladies Infectieuses*, *49*(2), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.01.007>
- Brinkley, C., Nolskog, P., Golovljova, I., & Bergstro, T. (2008). Tick-borne encephalitis virus natural foci emerge in western Sweden. *298*, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.12.005>
- Buczek, A., Bartosik, K., Buczek, W., Buczek, A. M., Kulina, D., Kulisz, J., & Tomasiewicz, K. (2018). A unique phenomenon of oral-anal contact between ticks observed in two tick species *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *25*(4), 686–689. <https://doi.org/10.26444/aaem/99054>
- Buczek, A. M., Buczek, W., Buczek, A., & Bartosik, K. (2020). The potential role of migratory birds in the rapid spread of ticks and tick-borne pathogens in the changing climatic and environmental conditions in Europe. *International Journal of Environmental Research and*

Public Health, 17(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph17062117>

- Capligina, V., Salmane, I., Keišs, O., Vilks, K., Japina, K., Baumanis, V., & Ranka, R. (2014). Prevalence of tick-borne pathogens in ticks collected from migratory birds in Latvia. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(1), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.08.007>
- Casjens, S. R., Mongodin, E. F., Qiu, W. G., Dunn, J. J., Luft, B. J., Fraser-Liggett, C. M., & Schutzer, S. E. (2011). Whole-Genome sequences of two *Borrelia afzelii* and two *Borrelia garinii* Lyme disease agent isolates. *Journal of Bacteriology*, 193(24), 6995–6996. <https://doi.org/10.1128/JB.05951-11>
- Cots, J. M., Alós, J., Bárcena, M., & Boleda, X. (2020). *Emerging Infectious Diseases*. January.
- Courtney, J. W., Kostelnik, L. M., Zeidner, N. S., & Massung, R. F. (2004). Multiplex Real-Time PCR for Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 3164–3168. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3164>
- Cringoli, G., Iori, A., Rinaldi, L., Veneziano, V., & Genchi, C. (2005). Zecche. In *Mappe Parassitologiche* (Rolando Ed, Vol. 6). file:///Users/alex.neumann/Documents/Mendeley Desktop/Edited by Edited by/World/[Darren_Swanson]_Creating_Adaptive_Policies_A_Gui(BookSee.org).pdf
- Cutler, S. J., Vayssier-Taussat, M., Estrada-Peña, A., Potkonjak, A., Mihalca, A. D., & Zeller, H. (2019). A new *Borrelia* on the block: *Borrelia miyamotoi* - A human health risk? *Eurosurveillance*, 24(18). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.18.1800170>
- Diakou, A., Norte, A. C., Lopes de Carvalho, I., Nuncio, S., Nováková, M., Kautman, M., Alivizatos, H., Kazantzidis, S., Sychra, O., & Literák, I. (2016). Ticks and tick-borne pathogens in wild birds in Greece. *Parasitology Research*, 115(5), 2011–2016. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4943-3>
- ECDC. (2012). Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and European Free Trade Association countries. In *ECDC Technical Report*.
- ECDC. (2019). *A spatial modelling method for vector surveillance*. 1–24. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/spatial-modelling-method-vector-surveillance> (Accessed: 3/4/2020)
- ECDC. (2021). *Tick-borne encephalitis - Annual epidemiological report for 2019* (Issue March).

- El-Sayed, A., & Kamel, M. (2020). Climatic changes and their role in emergence and re-emergence of diseases. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(18), 22336–22352. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08896-w>
- Estrada-Pena, A. (2015). Ticks as Vectors. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 34(1), 53–65. https://doi.org/10.1007/978-3-662-43978-4_3182
- Estrada-Peña, A., Cutler, S., Potkonjak, A., Vassier-Tussaut, M., 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), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12942-018-0163-7>
- Estrada-Peña, A., & De La Fuente, J. (2014). The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Research*, 108(1), 104–128. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.05.016>
- Fernández-Ruiz, N., & Estrada-Peña, A. (2020). Could climate trends disrupt the contact rates between *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) and the reservoirs of *Borrelia burgdorferi* s.l. *PLoS ONE*, 15(5), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233771>
- Galbraith, C. A., Jones, T., Kirby, J., Mundkur, T., Ana, A., García, B., Donkor, F. K., & Luqman, H. (2014). A Review of Migratory Bird Flyways and Priorities for Management. *CMS Technical Series*, 27, 164.
- Gilbert, L. (2021). The Impacts of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Disease Risk. *Annual Review of Entomology*, 66, 273–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-052720-094533>
- Hanincova, K., Taragelova, V., Koci, J., Schafer, 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>
- Hauck, D., Jordan, D., Springer, A., Schunack, B., Pachnicke, S., Fingerle, V., & Strube, C. (2020). Transovarial transmission of *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp. And *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* under field conditions extrapolated from DNA detection in questing larvae. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04049-7>
- Heylen, D., Fonville, M., Docters Van Leeuwen, A., Stroo, A., Duisterwinkel, M., Van Wieren, S.,

- Diuk-Wasser, M., De Bruin, A., & Sprong, H. (2017). Pathogen communities of songbird-derived ticks in Europe's low countries. *Parasites and Vectors*, *10*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2423-y>
- Heylen, D. J. A., Sprong, H., Krawczyk, A., Van Houtte, N., Genné, D., Gomez-Chamorro, A., Van Oers, K., & Voordouw, M. J. (2017). Inefficient co-feeding transmission of *Borrelia afzelii* in two common European songbirds. *Scientific Reports*, *7*(January), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep39596>
- Janeček, J., Nováková, M., Oppelt, J., Pospíšilová, P., Cunha, A., Silva, A. C., Dantong, L., & Šmajš, D. (2020). Complete Chromosomal Sequences of Two *Borrelia miyamotoi* Samples Obtained from *Ixodes ricinus* Eggs in Czechia. *Microbiology Resource Announcements*, *9*(14), 11–13. <https://doi.org/10.1128/mra.01504-19>
- Klaus, C., Gethmann, J., Hoffmann, B., Ziegler, U., Heller, M., & Beer, M. (2016). Tick infestation in birds and prevalence of pathogens in ticks collected from different places in Germany. *Parasitology Research*, *115*(7), 2729–2740. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5022-5>
- 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>
- Kubiak, K., Szczotko, M., & Dmitryjuk, M. (2021). *Borrelia miyamotoi*—an emerging human tick-borne pathogen in europe. *Microorganisms*, *9*(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010154>
- Kuleshov, K. V., Hoornstra, D., Sprong, H., Platonov, A. E., & Hovius, J. W. (2019). *Draft Whole-Genome Sequences of Two Western European Borrelia miyamotoi Isolates*. *8*(50), 1–3.
- Labuda, M., Kozuch, O., Zuffová, E., Elecková, E., Hails, R. S., & Nuttall, P. A. (1997). *Tick-borne encephalitis virus* transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology*, *235*(1), 138–143. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8622>
- Lee, S. H., Lee, J. H., Park, H. S., Jang, W. J., Koh, S. E., Yang, Y. M., Kim, B. J., Kook, Y. H., & Park, K. H. (2003). Differentiation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato through groEL gene analysis. *FEMS Microbiology Letters*, *222*(1), 51–57. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00237-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00237-4)

- Lommano, E., Dvořák, C., Vallotton, L., Jenni, L., & Gern, L. (2014). Tick-borne pathogens in ticks collected from breeding and migratory birds in Switzerland. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(6), 871–882. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.001>
- Madison-Antenucci, S., Kramer, L. D. ., Gebhardt, L. L. ., & Kauffman, E. (2020). Emerging Tick-Borne Diseases. *American Society of Microbiology - Clinical Microbiology Reviews*, 33(2), 1–34.
- Mansfield, K. L., Johnson, N., Phipps, L. P., Stephenson, J. R., Fooks, A. R., & Solomon, T. (2009). Tick-borne encephalitis virus - A review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology*, 90(8), 1781–1794. <https://doi.org/10.1099/vir.0.011437-0>
- Michelitsch, A., Wernike, K., Klaus, C., Dobler, G., & Beer, M. (2019). Exploring the reservoir hosts of tick-borne encephalitis virus. *Viruses*, 11(7), 1–17. <https://doi.org/10.3390/v11070669>
- Movila, A., Alekseev, A. N., Dubinina, H. V., & Toderas, I. (2013). Detection of tick-borne pathogens in ticks from migratory birds in the Baltic region of Russia. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(1), 113–117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01037.x>
- Mtierová, Z., Derdáková, M., Chvostáč, M., Didyk, Y. M., Mangová, B., Taragel'ová, V. R., Selyemová, D., Šujanová, A., & Václav, R. (2020). Local population structure and seasonal variability of *Borrelia garinii* genotypes in ixodes ricinus ticks, Slovakia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(10). <https://doi.org/10.3390/ijerph17103607>
- Negra, O., Pedrini, P., & Spina, F. (2014). *Progetto alpi - Manuale metodologico di campo*. 29.
- Ogden, Nicholas H, Ben Beard, C., Ginsberg, H. S., & Tsao, J. I. (2020). Possible Effects of Climate Change on Ixodid Ticks and the Pathogens They Transmit: Predictions and Observations. *Journal of Medical Entomology*, 0(X), 1–10. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa220>
- Ogden, Nick H., & Lindsay, L. R. (2016). Effects of Climate and Climate Change on Vectors and Vector-Borne Diseases: Ticks Are Different. *Trends in Parasitology*, 32(8), 646–656. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.015>
- Pajoro, M., Pistone, D., Boccazzi, I. V., Mereghetti, V., Bandi, C., Fabbì, M., Scattorin, F., Sasserà, D., & Montagna, M. (2018). Molecular screening for bacterial pathogens in ticks (*Ixodes ricinus*) collected on migratory birds captured in northern Italy. *Folia Parasitologica*, 65, 4–9. <https://doi.org/10.14411/fp.2018.008>

- Pascucci, I., Di Domenico, M., Capobianco Dondona, G., Di Gennaro, A., Polci, A., Capobianco Dondona, A., Mancuso, E., Cammà, C., Savini, G., Cecere, J. G., Spina, F., & Monaco, F. (2019). Assessing the role of migratory birds in the introduction of ticks and tick-borne pathogens from African countries: An Italian experience. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *10*(6), 101272. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101272>
- Pedersen, B. N., Jenkins, A., & Kjelland, V. (2020). Tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected from migratory birds in southern Norway. *PLoS ONE*, *15*(4), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230579>
- Pedrini, P., Rossi, F., Rizzolli, F., & Spina, F. (2008). Le Alpi italiane quale barriera ecologica nel corso della migrazione post-riproduttiva attraverso l'Europa. Risultati generali della prima fase del Progetto Alpi (1997-2002). *Biol. Cons. Fauna*, *116*, 1–336.
- Pedrini, P., Spina, F., Negra, O., Rizzolli, F., Pallaveri, A., & Rossi, F. (2003). Il Progetto Alpi. In *Rivista Italiana di Ornitologia* (Vol. 72, Issue 2, pp. 185–194).
- Pedrini, P., Spina, F., & Tenan, S. (2012). *La migrazione postriproduttiva degli Uccelli attraverso le Alpi italiane: fenologia e andamenti*. Museo delle Scienze.
- Randolph, S. E., Gern, L., & Nuttall, P. A. (1996). Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology Today*, *12*(12), 472–479. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(96\)10072-7](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(96)10072-7)
- Ravagnan, S., Tomassone, L., Montarsi, F., Krawczyk, A. I., Mastroianni, E., Sprong, H., Milani, A., Rossi, L., & Capelli, G. (2018). First detection of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes ricinus* ticks from northern Italy. *Parasites and Vectors*, *11*(1), 2016–2019. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2713-z>
- Rizzoli, A., Hauffe, H. C., Carpi, G., Vourc'h, G. I., Neteler, M., & Rosà, R. (2011). Lyme borreliosis in Europe. *Eurosurveillance*, *16*(27), 1–8. <https://doi.org/10.2807/ese.16.27.19906-en>
- Rochlin, I., & Toledo, A. (2020). Emerging tick-borne pathogens of public health importance: a mini-review. *Journal of Medical Microbiology*, *69*(6), 781–791. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001206>
- Rollins, R. E., Schaper, S., Kahlhofer, C., Frangoulidis, D., Strauß, A. F. T., Cardinale, M., Springer, A., Strube, C., Bakkes, D. K., Becker, N. S., & Chitimia-Dobler, L. (2021). Ticks (Acari: Ixodidae) on birds migrating to the island of Ponza, Italy, and the tick-borne pathogens they carry.

- Ticks and Tick-Borne Diseases*, 12(1), 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101590>
- Semenza, J. C., & Suk, J. E. (2018). Vector-borne diseases and climate change: A European perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 365(2), 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx244>
- Shi, J., Hu, Z., Deng, F., & Shen, S. (2018). Tick-Borne Viruses. *Virologica Sinica*, 33(1), 21–43. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0019-0>
- Sorace, A., Trotta, M., Mirabile, M., Lorenzetti, E., Monti, P., Petrella, S., Taffon, D., Teofili, C., & Battisti, C. (2018). Atlante degli uccelli nidificanti nella riserva naturale di Decima Malafede - dati faunistici per la gestione di un'area protetta. *Quaderni - Natura e Biodiversità - ISPRA*, 9, 311.
- Steere, A. C., Strle, F., Wormser, G. P., Hu, L. T., Branda, J. A., Hovius, W. R., Li, X., & Mead, P. S. (2017). Lyme borreliosis. *Nat Rev Dis Primers*, 44. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.90.Lyme>
- Swei, A., Couper, L. I., Coffey, L. L., Kapan, D., & Bennett, S. (2020). Patterns, Drivers, and Challenges of Vector-Borne Disease Emergence. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 20(3), 159–170. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2432>
- Talagrand-Reboul, E., Boyer, P. H., Bergström, S., Vial, L., & Boulanger, N. (2018). Relapsing fevers: Neglected tick-borne diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(APR). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00098>
- Toma, L., Mancuso, E., d'Alessio, S. G., Menegon, M., Spina, F., Pascucci, I., Monaco, F., Goffredo, M., & Di Luca, M. (2021). Tick species from Africa by migratory birds: a 3-year study in Italy. *Experimental and Applied Acarology*, 83(1), 147–164. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00573-4>
- Toma, Luciano, Mancini, F., Di Luca, M., Cecere, J. G., Bianchi, R., Khoury, C., Quarchioni, E., Manzia, F., Rezza, G., & Ciervo, A. (2014). Detection of microbial agents in ticks collected from migratory birds in central Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14(3), 199–205. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1458>
- van den Wijngaard, C. C., Hofhuis, A., Simões, M., Rood, E., van Pelt, W., Zeller, H., & Van Bortel, W. (2017). Surveillance perspective on Lyme borreliosis across the European Union and European Economic Area. *Eurosurveillance*, 22(27), 1–9. <https://doi.org/10.2807/1560->

7917.ES.2017.22.27.30569

- Vandekerckhove Olivia, De Buck Emmy & Van Wijngaerden Eric (2021). Lyme disease in Western Europe: an emerging problem? A systematic review, *Acta Clinica Belgica*, 76:3,244-252, DOI: 10.1080/17843286.2019.1694293
- Viana, D. S., Santamaría, L., & Figuerola, J. (2016). Migratory Birds as Global Dispersal Vectors. *Trends in Ecology & Evolution*, 31(10), 763–775. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.07.005>
- Volponi, S., & Spina, F. (2008). L'Atlante della migrazione degli uccelli in Italia. 2. Passeriformi. In *Le Autostrade Del Cielo Rotte Di Migrazione Dell'Avifauna Attraverso Le Alpi* (Tipografia). Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale.
- Voordouw, M. J. (2015). Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology*, 142(2), 290–302. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001486>
- Walker, A. ., Bouattor, A., Camicas, J.-L., Estrada-Pena, A., Horak, I. G., Latiff, A. A., Pegram, R. G., & Preston, P. . M. (2007). *Ticks of domestic animals in Africa, a guide to identification of species*.
- Wilhelmsson, P., Jaenson, T. G. T., Olsen, B., Waldenström, J., & Lindgren, P. E. (2020). Migratory birds as disseminators of ticks and the tick-borne pathogens *Borrelia* bacteria and tick-borne encephalitis (TBE) virus: a seasonal study at Ottenby Bird Observatory in South-eastern Sweden. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04493-5>
- World Health Organization. (2017). Global Vector Control Response 2017 – 2030: A strategic approach to tackle vector-borne diseases. *Who*, 0–3. http://www.who.int/vector-control/publications/WHO_HTM_GVCR_2017.01/en/
- World Health Organization 2017. (2017). *Global vector control response 2017–2030*.

WEBGRAFIA

- <http://progetto-alpi.muse.it/it/il-progetto/> al 31 maggio 2021
- <http://progetto-alpi.muse.it/it/stations-index/malga-confin/> al 31 maggio 2021
- https://asugi.sanita.fvg.it/export/sites/aas1/it/documenti/all_dip/mat_info/dip_isp_la_malattia_di_lyme.pdf al 25 giugno 2021
- <https://ebird.org/species/comcha> al 4 giugno 2021
- <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/tick-maps> al 18 maggio 2021
- https://gestione.izsler.it/izs_bs/allegati/5753/2_DM_15121190.pdf al 4 luglio 2021
- <https://onehealthinitiative.com/mission-statement/> al 17 maggio 2021
- <https://www.ecdc.europa.eu/en/borreliosis/facts/factsheet> al 22 giugno 2021
- <https://www.ecdc.europa.eu/en/climate-change/climate-change-europe/vector-borne-diseases> al 18 maggio 2021
- <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/ixodes-ricinus-current-known-distribution-march-2021>
- <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/ixodes-ricinus-current-known-distribution-october-2017> al 27 maggio 2021
- <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/small-bites-big-problems-tick-borne-diseases-europe> al 21 maggio 2021
- <https://www.ecdc.europa.eu/en/tick-borne-encephalitis/facts/key-messages> al 25 giugno 2021
- <https://www.epicentro.iss.it/zecche/borreliosi> al 22 giugno 2021
- <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1991/01/08/091A0055/sg> al 25 giugno 2021
- https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2947_allegato.pdf al 6 luglio 2021
- <https://www.salute.gov.it/pianoNazionaleIntegrato/paginaInternaMenuPianoNazionaleIntegrato.jsp?id=3941&lingua=italiano&menu=capitolo3&sottomenu=2157> al 25 giugno 2021

DOCUMENTI NORMATIVI

Commission Implementing Decision (EU) 2018/945 of 22 June 2018 on the communicable diseases and related special health issues to be covered by epidemiological surveillance as well as relevant case definitions (Text with EEA relevance.)
http://data.europa.eu/eli/dec_impl/2018/945/oj

Ministero della Salute - Piano Nazionale di sorveglianza e risposta all'encefalite virale da zecche e altre arbovirosi e hantavirus non sottoposti a specifici piani di sorveglianza e risposta – 2018

Ministero della Salute -Piano nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi (PNA) 2020-2025 (2019)

Ministero della Salute - Piano Nazionale Prevenzione Vaccinale (PNPV) 2017-2019

Ministero della sanità - D.M. 15/12/1990. Sistema informativo delle malattie infettive e diffusive. Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale 8 gennaio 1991, n. 6.

RINGRAZIAMENTI

In primo luogo, ringrazio la Prof.ssa Maria Luisa Menandro, per la costante disponibilità dimostrata e per il prezioso lavoro che ha svolto a sostegno della stesura di questa tesi.

Vorrei ringraziare anche la Dott.ssa Laura Grassi, la quale ha sempre dimostrato entusiasmo nei confronti del mio lavoro e ha saputo guidarmi nelle pratiche di laboratorio, nonché per avermi fatto conoscere le meravigliose montagne del suo Friuli Venezia Giulia.

I miei sentiti ringraziamenti vano anche a tutto il personale della Malga Confin, in particolare a Fulvio Barbarino, che mi ha gentilmente accolto durante una giornata di campionamento e da cui vorrei assolutamente tornare.

Ringrazio la mia mamma ed il mio babbo, che sebbene fossero scettici all'inizio di questo cammino, hanno poi saputo accettare e sostenere la mia scelta.

La mia nonna Fiorenza, colonna portante della famiglia, zia Gabriella e zio Roberto, che qualche anno fa è stato il primo a mettermi la pulce nell'orecchio, facendomi chiedere se stessi facendo quello che volevo davvero.

I miei cugini, Jacopo, sostenitore e confidente di lunghe chiacchierate e Duccio, col quale finalmente dividerò la professione. Con voi, indipendentemente da dove siamo, mi sento a casa.

Vorrei poi ringraziare tutti i miei amici, a partire dalle mie "Ric", senza le quali al momento non so immaginarmi nel mondo della veterinaria e che hanno arricchito e completato questo percorso, ognuna con il suo contributo; mi avete insegnato che la differenza di età è solo un numero, ma infondo non conta davvero niente. Ele, compagna delle studiate più matte della mia vita, ma anche amica di risate, nottate, yoga e tirocini, nonché organizzatrice delle mie (forse uniche) domeniche in montagna, che hanno reso l'ultimo inverno incredibilmente speciale; grazie per avermi sorpreso, migliorando te stessa ogni anno di più. Giulia, per tutti la Fausta, ma che io continuerò a chiamare Giulia, compagna di studio e organizzazione millimetrica degli esami, che ha saputo essere un esempio trainante in tutti questi cinque anni e spero che continuerà ad esserlo nei prossimi. Graziana, per avermi dimostrato che si può vivere senza essere organizzati in niente e per avermi fatto scoprire che la Toscana è talmente bella che ci sono i cipressi fuori dall'autostrada, ma anche per avermi fatto fare una delle cose a cui avevo sempre pensato, ma che non avrei mai creduto di essere capace di fare. Laura, una delle persone più pazze che abbia mai incontrato, che il primo giorno di università mi ha detto che assomigliavo alla sua ex fidanzata e che mi ha fatto conoscere ed amare un mondo a me totalmente estraneo.

Benedetta, per avermi insegnato che la bontà incondizionata esiste davvero e per avermi creato dei podcast personalizzati. La Marti, per essere sempre rosa, in tutti i sensi, perché ogni tanto forse bisogna esserlo ed io non sono tanto abituata. La Tyna, piccola grande forza della natura; Sofia, l'unica persona che è talmente tragica da essere comica e Carlotta, che è una domanda vivente.

E poi ci sono tutte le mie amiche storiche, sempre presenti negli anni e sostenitrici instancabili. Elena, compagna di ogni avventura e sventura possibile e immaginabile, per essere un punto fisso quotidiano e perché ormai *"su casa es mi casa"*. Costanza, per tutte le nostre chiacchierate esistenziali. Luna, amica di vacanze in giro per l'Italia e per il mondo, che sa sempre rinominare i posti a sua invenzione, ma mi piace così, perché è vera e per me c'è sempre. Zisa, amicizia ventennale, magari non quotidiana, ma una di quelle che "quando ci si sente è come se fosse passato un giorno". Iso e Marghe, perché anche se sono una a Nord e una a Sud, quando ci incontriamo al centro è come se fossimo sempre al liceo. Alessia, Alice, Benedetta, Camilla, Laura, Ludovica, Matilde e Vittoria, le prime vere entusiaste del mio cambiamento di direzione, per continuare ad essere Quelle di sempre, condividere con me le loro vite ed essere dei punti di riferimento costanti.

Da brava (quasi) medico veterinario devo ringraziare anche la mia Aryetta, per avermi salvato da un triste inverno e Yago, arrivato da poco ma portatore sano di gioia incondizionata.

Infine, vorrei dedicare un piccolo contributo anche a me stessa, perché, nonostante tutto, posso dire di avercela fatta.