

ZOONOSI TRASMESSE DA ZECCHЕ: UNGULATI SELVATICI COME *RESERVOIR*?

**Grassi L., Martini M., Mondin A., Cassini R., Pasotto D.,
Dotto G., Menandro M. L.**

DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE - Università di Padova

Riassunto

Negli ultimi decenni le malattie trasmesse da zecche hanno subito un incremento, in termini numerici e di distribuzione geografica, che è stato messo in relazione con il riscaldamento globale e con eventuali cambiamenti di gestione dei terreni agro-silvo-pastorali. Assieme alle suddette attività antropiche, un altro fattore che incide sulla diffusione delle malattie trasmesse da zecche è rappresentato dalle specie e dall'entità delle popolazioni di ungulati selvatici circolanti in un determinato territorio. A questo proposito negli ultimi anni si è assistito ad un incremento delle specie selvatiche legato alle politiche di salvaguardia della fauna silvestre applicate anche in Italia. La regione Friuli-Venezia-Giulia è endemica per TBE e morbo di Lyme; altri agenti eziologici trasmessi da zecche sono stati sporadicamente rilevati, ma studiati in misura molto minore. In questa ricerca si è deciso di indagare cinque agenti zoonosici, trasmessi dalla zecca *Ixodes ricinus*, ovvero *Borrelia burgdorferi* s. l., TBE virus, *Anaplasma* spp. e *Rickettsia* spp.. La ricerca, svoltasi tra il 2017 e il 2018, è stata effettuata su prelievi ematici di ungulati selvatici e sulle zecche presenti su di essi. Sono stati campionati: capriolo (*Capreolus capreolus*), cinghiale (*Sus scrofa*), cervo (*Cervus elaphus*), camoscio (*Rupicapra rupicapra*) e muflone (*Ovis musimon*). A seguito di analisi biomolecolari è stata messa in evidenza la circolazione di *Anaplasma* spp. e *Rickettsia* spp. sia negli animali selvatici che nelle zecche; *B. burgdorferi* s. l. è stata riscontrata solo nelle zecche. Non sono state evidenziate positività per TBE virus. Solo per *Anaplasma phagocytophilum* la prevalenza (>75%) nei ruminanti selvatici è stata tale da attestarne il ruolo di *reservoir*.

Abstract

Tick-borne zoonoses: wild ungulates as reservoir? – Tick-borne diseases (TBD) represent an increasing threat. Their spread is influenced by different factors such as climate change, increasing number, densities and movements of wild animals, land use and anthropic activities. TBE virus and *Borrelia burgdorferi* s. l. are endemic in Friuli Venezia Giulia. Other tick-borne agents have been sporadically detected, but investigated to a much lesser extent. The aim of this study was to evaluate the occurrence of five zoonotic tick-transmitted infectious agents: *B. burgdorferi* s. l., TBE virus, *Anaplasma* spp. and *Rickettsia* spp.. Biomolecular analyses were performed on blood and ticks collected from wild ungulates [roe deer (*Capreolus capreolus*), wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*), chamois (*Rupicapra rupicapra*) and muflon (*Ovis musimon*)] culled during the 2017-2018 hunting season in Friuli Venezia Giulia Alps. *Anaplasma* spp. and *Rickettsia* spp. were detected in both wild animals and ticks, while *B. burgdorferi* s. l. was detected only in ticks. All specimens tested negative for TBE virus. The high *Anaplasma phagocytophilum* prevalence (>75%), observed in wild ruminants, supports their role as reservoir of this pathogen.

Introduzione

Le malattie infettive trasmesse da zecche (TBD) rappresentano una tematica di particolare interesse sia per la sanità pubblica, sia per la sanità animale. Tra le patologie di interesse per la medicina umana alcune zoonosi, come la malattia di Lyme e la TBE, sono particolarmente studiate, ma molto rimane ancora da chiarire in relazione all'epidemiologia di questa tipologia di infezioni, che risulta particolarmente complessa in quanto influenzata da una moltitudine di fattori, tanto che una precisa previsione sul loro andamento viene considerato impossibile (Dantas-Torres, 2015).

L'emergenza delle TBD è, ovviamente, strettamente associata alla presenza di un idoneo vettore - la zecca - e alla diffusione degli agenti eziologici stessi in presenza di specie suscettibili.

La presenza di artropodi vettori e di agenti patogeni è a sua volta correlata alla presenza di determinate specie animali *reservoir*, le quali possono garantirne la presenza ed eventualmente aumentarne la diffusione, senza in genere sviluppare malattia. Poiché le zecche vivono soprattutto in ambiente silvestre, gli ospiti elettivi sono rappresentati principalmente dagli animali selvatici, mentre l'uomo e gli animali domestici risultano potenziali ospiti accidentali.

Tutte le componenti elencate fino ad ora convivono in un determinato territorio il quale, a sua volta, può facilitare o meno l'emergenza di tali malattie in relazione alle caratteristiche naturali intrinseche e all'uso da parte dell'uomo. Parametri come umidità, temperatura, vegetazione ed esposizione solare sono stati ampiamente studiati per capire come possano influenzare la sopravvivenza delle zecche (Medlock et al., 2013). Uniti a questi dati oggettivi, si ricorda come una diversa gestione silvo-agro-pastorale, possa notevolmente influenzare la presenza di questo artropode. Fenomeni che hanno interessato tutto l'arco alpino, come l'abbandono dei terreni in aree impervie e/o montane, il mancato pascolamento o sfalcio dei prati e il rimboschimento di tali aree, sono stati direttamente associati all'emergenza del vettore zecca. L'aumento del parassita, in concomitanza di un'espansione numerica della fauna selvatica, ha cambiato in modo importante l'epidemiologia delle infezioni in oggetto (Battaglini et al., 2014; Daszak et al., 2000). Emerge, quindi, come le attività antropiche influenzino pesantemente l'intero ecosistema.

In merito a questo, si ricorda che il cambiamento climatico, considerato uno dei principali fattori coinvolti, riveste un ruolo particolarmente importante nell'epidemiologia delle TBDs, dato che il clima influenza, direttamente o indirettamente, tutti le componenti prima elencate ed è, al tempo stesso, influenzato fortemente dalle attività umane (Dantas-Torres, 2015).

Nella regione Friuli-Venezia-Giulia tutte le componenti precedentemente indicate contribuiscono a creare un ambiente ideale per la presenza e diffusione delle TBDs, a partire dal morbo di Lyme, i cui primi casi riportati risalgono alla fine degli anni '80 (Cinco et al., 2004). Meno di vent'anni più tardi, nel 2003, si sono registrati i primi casi di meningo-encefalite da zecca (TBE) (sito web regione FVG, 2019).

Da allora sono stati condotti molti studi, sia in medicina umana che animale, e si sono approfondite le conoscenze relativamente a queste malattie, ma la disponibilità di dati aggiornati riguardanti la diffusione delle zecche e la circolazione dei patogeni negli animali selvatici è fondamentale per avere un quadro completo e attuale della situazione e per pianificare eventuali interventi di controllo.

Materiale e metodi

Per questo studio sono stati presi in considerazione tre Distretti venatori: Tarvisiano, Valli del Natisone e Colline Moreniche. Le Riserve di caccia coinvolte nel campionamento sono state 12, corrispondenti ai comuni di: Tarvisio-Malborghetto, Bordano, Venzona, Forgaria nel Friuli, Gemona del Friuli, Trasaghis, Artegna, Buja, Colloredo di Montealbano, Majano, Osoppo e Treppo Grande.

Il protocollo di campionamento è stato discusso con i Direttori di Riserva i quali hanno operato, previa istruzione e fornitura del materiale necessario, in modo indipendente. In particolare, nell'annata venatoria 2017/2018, su tutte le specie di ungulati selvatici cacciabili è stato effettuato un prelievo di sangue in provette con K₃EDTA e di zecche, se presenti.

Al termine della stagione venatoria e del campionamento, sono state svolte le analisi biomolecolari. I parassiti raccolti sono stati identificati morfologicamente allo stereomicroscopio, seguendo le chiavi dicotomiche di Giangaspero e Otranto, 2010 e di Walker *et al.*, 2007.

Le analisi biomolecolari sono state effettuate su entrambe le matrici ottenute, sangue e zecche, a seguito dell'estrazione degli acidi nucleici (sia DNA che RNA) usando il kit "AllPrep DNA/RNA Mini Kit" (Qiagen).

Gli agenti eziologici indagati sono *B. burgdorferi* s. l., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. e il virus agente della TBE. Lo *screening* dei patogeni è avvenuto attraverso metodiche di analisi biomolecolare diretta utilizzando *real-time* PCR oppure RT-*real-time* PCR seguendo le metodiche riportate in bibliografia per ciascun patogeno (Brinkley et al., 2008; Courtney et al., 2004; Rolain et al., 2009; Sirigireddy e Ganta, 2005). I campioni risultati positivi sono stati amplificati con adeguata metodica di PCR rispetto alla specie rilevata e successivamente sequenziati (Goodman et al., 1996; Labruna et al., 2004; Lee et al., 2003).

Risultati e discussione

I campioni ottenuti sono 109, prelevati da cinque specie diverse (Tab. 1). Tenendo conto della natura delle popolazioni esaminate e delle modalità di prelievo, è necessario precisare che il campionamento effettuato è un campionamento di convenienza e non statisticamente rappresentativo, né dal punto di vista delle dimensioni, né da quello della composizione.

Tabella 1 – Numero di campioni raccolti per specie animale

SPECIE ANIMALE	NUMERO CAMPIONI
Capriolo (<i>Capreolus capreolus</i>)	50
Cinghiale (<i>Sus scrofa</i>)	29
Cervo (<i>Cervus elaphus</i>)	17
Camoscio (<i>Rupicapra rupicapra</i>)	9
Muflone (<i>Ovis aries</i>)	4
Totale	109

Sui 109 animali, 45 sono risultati positivi alla presenza di zecche, per un totale di 139 esemplari raccolti. Per ogni animale positivo erano presenti un numero variabile di zecche, da una a più di una decina, in grande maggioranza, esemplari adulti (Fig. 1) e tutte appartenenti alla specie *Ixodes ricinus*. Visto l'elevato numero di esemplari raccolti, le zecche provenienti dallo stesso animale sono state analizzate in *pool* (massimo tre esemplari/*pool*), tenendo però in gruppi separati esemplari di diverso genere, stadio di sviluppo e fase del pasto (ingorgate e non ingorgate).

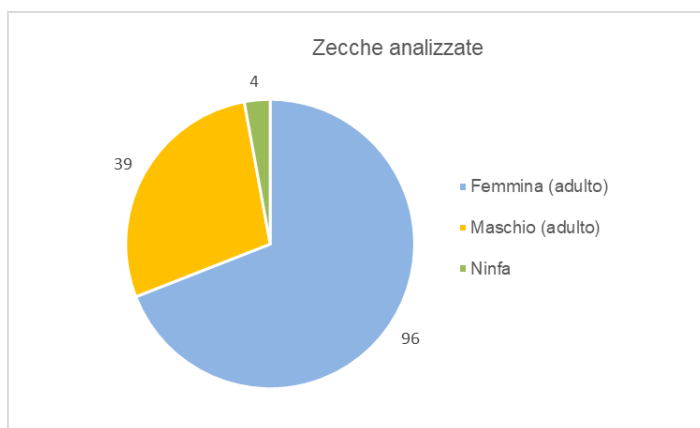


Figura 1 –Numero di zecche campionate divise per genere e stadio.

Gli esiti delle analisi biomolecolari sono riportati in Tab. 2.

Tabella 2 – Percentuale di positività riscontrata nelle zecche e nel sangue di ungulati selvatici

AGENTE PATOGENO	POOL ZECCH (n= 45)	SANGUE (n= 109)
<i>B. burgdorferi</i> s. l.	8.8 %	-
<i>Ehrlichia</i> spp.	2.2%	-
<i>Rickettsia</i> spp.	40%	1.8%
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	84.4%	63.3%
TBE virus	-	-

***Borrelia burdorferi* s. l.**

Le positività riscontrate confermano la presenza di questo batterio in regione FVG, endemica per questa zoonosi (Cinco et al., 2004). Allo stesso tempo, si conferma l'efficienza della specie *Ixodes ricinus* (4/45) nell'albergare il patogeno. Va inoltre segnalato come da alcuni esemplari siano state identificate le specie *B. garinii* e *B. afzelii*, rinomati agenti causali della borreliosi di Lyme nell'uomo (Steere et al., 2017).

Le zecche positive sono state prelevate da caprioli e da un cinghiale. Poiché tutti i campioni ematici hanno dato esito negativo per *Borrelia* spp., è ipotizzabile che il patogeno sia stato acquisito negli stadi precedenti (larve o ninfe) da reservoir competenti quali micromammiferi e/o uccelli (Rizzoli et al., 2011).

La negatività riscontrata nei campioni ematici indica che la trasmissione del patogeno – dall'animale ospite alla zecca - per via sistemica, ovvero attraverso il circolo ematico, è poco probabile. Allo stesso tempo, non si può escludere l'ipotesi che possa esserci passaggio del patogeno attraverso il *co-feeding*, ovvero la trasmissione del batterio da zecche infette a zecche non infette durante il pasto di sangue sull'ospite, quando questi parassiti si alimentano contemporaneamente in un distretto anatomico ristretto (Franke et al., 2013; Kjelland et al., 2011).

Gli ungulati selvatici sembrano svolgere un ruolo controverso nei confronti di questa zoonosi. Da un lato, essendo un importante fonte di nutrimento e diffusione per questo parassita ne amplificano la presenza aumentando la numerosità del vettore con il conseguente rischio di diffusione di malattie trasmesse da zecche (Handeland et al., 2013; Qviller et al., 2016). D'altro canto, al pari dei ruminanti domestici, non essendo *reservoir* competenti per *Borrelia* spp., sembra che la loro presenza possa ridurre la prevalenza di tale batterio nelle zecche libere nell'ambiente, in cerca d'ospite. (Franke et al., 2013; Richter e Matuschka, 2010; Rosef et al., 2009). Nonostante l'evidente complessità nel definire con chiarezza il ruolo

delle varie componenti implicate nell'epidemiologia del patogeno, la relazione tra gli ungulati selvatici e l'agente causale del morbo di Lyme rimane comunque indiscussa.

Rickettsia spp.

Le positività riportate confermano la presenza di questo batterio in regione FVG associandolo al competente vettore *I. ricinus* (Cinco et al., 2006).

I campioni di zecca positivi sono 18/45; *R. monacensis* e *R. helvetica* sono le specie maggiormente rilevate, in linea con i dati bibliografici riguardanti il Nord Italia (Otranto et al., 2014).

La bassa prevalenza negli ungulati (2/109) fa ritenere che essi non rientrino nel ciclo di mantenimento di questi agenti di zoonosi. Questi dati si mostrano particolarmente interessanti poiché, ad oggi, non è stato chiarito quali mammiferi possano essere specie serbatoio per *Rickettsia spp.*

Recentemente, in merito a questa lacuna, è stata avanzata l'ipotesi che *I. ricinus* possa fungere sia da vettore che da *reservoir*, poiché mostra un'efficiente trasmissione trans-stadiale e trans-ovarica (ovvero la trasmissione del batterio dalla femmina adulta positiva alle uova deposte) amplificando la presenza della rickettsia senza l'aiuto di un ospite animale amplificatore (Biernat et al., 2016).

Anaplasma spp.

Lo *screening* relativo alla specie *A. phagocytophilum*, ha dato esito positivo sia negli ungulati (69/109), che nelle zecche (38/45). Sono stati trovati ungulati positivi in tutte le Riserve di caccia campionate. I cinghiali sono risultati tutti negativi. Considerando quindi solo i ruminanti selvatici la percentuale di positività diventa ancora più alta, pari al 86% degli animali testati (69/80).

Sono stati calcolati, utilizzando il software WINEPI (<http://www.winepi.net>), la prevalenza e il relativo limite di confidenza al 95% delle prevalenze osservate, sulla base della dimensione delle popolazioni stimate delle diverse specie di ruminanti, delle dimensioni dei campioni esaminati, del numero di positività rinvenute e ipotizzando sensibilità e specificità del metodo diagnostico impiegato del 100% (Tab. 3).

I dati ottenuti sono in linea con quelli di altri studi europei e sostengono l'ipotesi che capriolo e cervo abbiano un ruolo di *reservoir* nel mantenimento di *A. phagocytophilum* (Stuen et al., 2013), al contrario del cinghiale. Risulta interessante, inoltre, la prevalenza ottenuta nei camosci e mufloni, anche se la bassa numerosità degli esemplari non permette di trarre delle conclusioni certe sul loro ruolo epidemiologico nel mantenimento e nella trasmissione di questo batterio.

Di rilievo risulta essere anche la positività per *A. phagocytophilum* riscontrata nelle zecche pari a 84,4% e spesso correlata alle positività ematiche degli animali da cui sono state prelevate.

Tabella 3 – Prevalenza e limiti di confidenza al 95% di *Anaplasma phagocytophilum* negli ungulati

<u>Specie</u>	<u>Prevalenza</u>	<u>I.C. 95%</u>
Capriolo	88%	79.0%, 97.0%
Cervo	88%	72.93%, 100%
Camoscio	77%	50.63%, 100%
Muflone	75%	32.62%, 100%
Cinghiale	9.8%*	-

* Per quanto riguarda il cinghiale, è stata calcolata la massima prevalenza possibile pari al 9.8%. Questo valore è stato calcolato considerando una popolazione stimata di 4000 individui e la negatività riscontrata in tutti i 29 soggetti esaminati

Questo studio ha permesso di evidenziare la relazione tra *A. phagocytophilum* e *I. ricinus*, riportata da molti autori e la cui diffusione è descritta in tutta Europa (Stuen et al., 2013) ed anche nella regione FVG (Beltrame et al., 2006). Poiché *A. phagocytophilum* riconosce diverse varianti con diversa patogenicità nei confronti dell'uomo, sarebbe interessante approfondire la ricerca in questo ambito, per poter individuare le motivazioni per cui, nonostante sia particolarmente diffuso tra gli animali e le zecche, venga raramente rilevato nell'uomo (Cinco et al., 2004).

TBE virus

La negatività di tutti i campioni testati mette in luce come questo virus sia di difficile rilevazione, a causa della bassa prevalenza, nonostante la regione FVG sia endemica per questa malattia (Carpi et al., 2009).

I dati ottenuti evidenziano come gli ungulati non siano *reservoir* del virus. Allo stesso tempo, al pari del morbo di Lyme, non si possono escludere dal ciclo epidemiologico di tale malattia in quanto garantiscono nutrimento e possibilità riproduttiva al parassita vettore.

Analizzando la negatività ottenuta nei campioni di zecche, poiché è risaputo che *I. ricinus* è efficiente vettore anche di questa infezione, non va esclusa la possibile presenza di tale patogeno al di sotto dei livelli di rilevazione legati alle dimensioni campionarie e/o alla sensibilità analitica (Frimmel et al., 2014).

Conclusioni

Gli agenti zoonosici indagati sono accomunati da molteplici fattori quali lo stesso vettore (zecca *Ixodes ricinus*), il coinvolgimento di specie animali selvatiche e la patogenicità nei confronti dell'uomo. È interessante notare come, nonostante le suddette somiglianze, i dati epidemiologici dei singoli patogeni siano molto diversi tra loro. Questo evidenzia l'importanza di uno studio analitico di queste infezioni le quali mostrano un andamento molto diversificato, rendendo i dati ottenuti utili al fine di una più approfondita comprensione del ciclo infettivo di tali patogeni.

Le positività riscontrate nelle zecche evidenziano come per la regione FVG questo rappresenti un problema attuale ed emergente. Nel prossimo futuro, sarebbe auspicabile poter approfondire ulteriormente lo studio degli agenti infettivi indagati, in particolare *A. phagocytophilum* e *Rickettsia* spp., rispetto ai quali i dati riportati in bibliografia sono minori rispetto al virus della TBE e al morbo di Lyme.

Bibliografia

- Battaglini, L., Bovolenta, S., Gusmeroli, F., Salvador, S., & Sturaro, E., 2014. *Environmental sustainability of Alpine livestock farms*. Italian Journal of Animal Science, 13(2): 431–443.
- Beltrame, A., Ruscio, M., Arzese, A., Rorato, G., Negri, C., Londero, A., rapis, M., Scudeller, L., Viale, P., 2006. *Human granulocytic anaplasmosis in Northeastern Italy*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1078: 106–109.
- Biernat, B., Stańczak, J., Michalik, J., Sikora, B., & Wierzbicka, A., 2016. *Prevalence of infection with Rickettsia helvetica in Ixodes ricinus ticks feeding on non-rickettsiemic rodent hosts in sylvatic habitats of west-central Poland*. Ticks and Tick-Borne Diseases, 7(1): 135– 141.
- Brinkley, C., Nolskog, P., Golovljova, I., Lundkvist, Å., & Bergström, T., 2008. *Tick-borne encephalitis virus natural foci emerge in western Sweden*. International Journal of Medical Microbiology, 298(1): 73–80.
- Carpi, G., Bertolotti, L., Rosati, S., & Rizzoli, A., 2009. *Prevalence and genetic variability of tick-borne encephalitis virus in host-seeking Ixodes ricinus in northern Italy*. Journal of General Virology, 90:2877–2883.
- Cinco, M., Barbone, F., Grazia Ciufolini, M., Mascioli, M., Anguero Rosenfeld, M., Stefanel, P., & Luzzati, R., 2004. *Seroprevalence of tick-borne infections in forestry rangers from northeastern Italy*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 10(12): 1056–1061.
- Cinco, M., Luzzati, R., Mascioli, M., Floris, R., & Brouqui, P., 2006. *Serological evidence of Rickettsia infections in forestry rangers in north-eastern Italy*. Clinical Microbiology and Infection, 12(5): 493–495.
- 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.
- Dantas-Torres, F., 2015. *Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: The butterfly effect*. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 4(3): 452–461.
- Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. 2000. *Emerging infectious Diseases of Wildlife - Threats to biodiversity and human health*. Science's Compass, 287(5452): 443–449.
- Franke, J., Hildebrandt, A., & Dorn, W., 2013. *Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes - Updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity*. Ticks and Tick-Borne Diseases. 4: 11-25.

- Frimmel, S., Krienke, A., Riebold, D., Loebermann, M., Littmann, M., Fiedler, K., Klaus, C., Suss, J., Reisinger, E. C., 2014. *Tick-borne encephalitis virus habitats in north East Germany: Reemergence of TBEV in ticks after 15 years of inactivity*. *BioMed Research International*, 2014, 8–11.
- Giangaspero A. e Otranto D., *Ectoparassiti ed artropodi vettori*, Taylor M., Coop L., Wall L., Parassitologia e Malattie Parassitarie degli Animali, 2010, 1°ed, EMSI, Roma.
- Goodman, J. L., Nelson, C., Vitale, B., Madigan, J. E., Dumler, J. S., Kurtti, T. J., & Munderloh, U. G., 1996. *Direct Cultivation of the Causative Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis*. *The New England Journal of Medicine*, 334(4): 209–215.
- Handeland, K., Qviller, L., Vikøren, T., Viljugrein, H., Lillehaug, A., & Davidson, R. K., 2013. *Ixodes ricinus infestation in free-ranging cervids in Norway-A study based upon ear examinations of hunted animals*. *Veterinary Parasitology*, 195(1–2): 142–149.
- Kjelland, V., Ytrehus, B., Stuen, S., Skarpaas, T., & Slettan, A., 2011. *Prevalence of Borrelia burgdorferi in Ixodes ricinus ticks collected from moose (Alces alces) and roe deer (Capreolus capreolus) in southern Norway*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2(2): 99–103.
- Labruna, M. B., Whitworth, Horta, M. C., T., Bouyer, D. H., McBride, J. W., Pinter, A., Popov, V., Gennari, S. M., Walker, D. H., 2004. *Rickettsia Species Infecting Amblyomma cooperi Ticks from an Area in the State of Sao Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic*. *Journal of clinical microbiology*, 42(1): 90–98.
- 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.
- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Bormane, A., Derdakova, M., Estrada-Peña, A., George, J. C., Golovljova, I., Jaenson, T. G. T., Jensen, J. K., Jensen, P. M., Kazimirova, M., Oteo, J. A., Papa, A., Pfister, K., Plantard, O., Randolph, S. E., Rizzoli, A., Santos-Silva, M. M., Sprong, H., Vial, L., Hendrickx, G., Zeller, H., Van Bortel, W., 2013. *Driving forces for changes in geographical distribution of Ixodes ricinus ticks in Europe*. *Parasites and Vectors*, 6(1): 1–11.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Giannelli, A., Latrofa, M. S., Cascio, A., Cazzin, S., Ravagnan, S., Montarsi, F., Zanzani, S. A., Manfredi, M. T., Capelli, G., 2014. *Ticks infesting humans in Italy and associated pathogens*. *Parasites and Vectors*, 7(328): 1–9.
- Qviller, L., Viljugrein, H., Loe, L. E., Meisingset, E. L., & Myrseter, A., 2016. *The influence of red deer space use on the distribution of Ixodes ricinus ticks in the landscape*. *Parasites and Vectors*, 9(545): 1–9.
- Richter, D., & Matuschka, F. R., 2010. *Elimination of lyme disease spirochetes from ticks feeding on domestic ruminants*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22): 7650–7652.
- Rizzoli, A., Hauffe, H. C., Carpi, G., Vourc, G. I., Neteler, M., & Rosà, R., 2011. *Lyme borreliosis in Europe*. *Euro Surveillance*, 16(27): 1–8.
- Rolain, J. M., Bitam, I., Buffet, S., Marié, J. L., Bourry, O., Portelli-Clerc, C., Beaucoumou, J. C., Parola, P., Fournier, P. E., Davoust, B., Raoult, D., 2009. *Presence or absence of plasmid in Rickettsia felis depending on the source of fleas*. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(2): 296–297.
- Rosef, O., Paulauskas, A., & Radzijeuskaja, J., 2009. *Prevalence of Borrelia burgdorferi sensu lato and Anaplasma phagocytophilum in questing Ixodes ricinus ticks in relation to the density of wild cervids*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51(47): 1–8.
- Sirigireddy, K. R., & Ganta, R. R., 2005. *Multiplex detection of Ehrlichia and Anaplasma species pathogens in peripheral blood by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. *Journal of Molecular Diagnostics*, 7(2): 308–316.
- Steere, A. C., Strle, F., Wormser, G. P., Hu, L. T., Branda, J. A., Hovius, J. W. R., Li, X., Mead, P. S., 2017. *Lyme Borreliosis*. *Nat Rev Dis Primers*, 2(16090): 1–44.
- Stuen, S., Granquist, E. G., & Silaghi, C., 2013. *Anaplasma phagocytophilum - A widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3: 1–33.
- Walker A. R., Bouattour A., Camicas J.-L., Estrada-Peña A., Horak I.G., Latif A.A., Pegram R.G., Prestonet P.M., *Ticks of Domestic Animals in Africa: a Guide to Identification of Species*. 2007, 2° edition, Bioscience Reports, U. K.

SITOGRAFIA

Sito web regione FVG, 2019: _Encefalite da zecca (TBE) in FVG: alcuni dati sulla patologia;
<http://www.regione.fvg.it/rafvfg/cms/RAFVG/salute-sociale/zecche/>; aggiornato al 10 dicembre 2019.