

Batrachochytrium dendrobatidis

Il killer silenzioso

Anche in Alto Adige la malattia fungina
che minaccia gli anfibii



Batrachochytrium dendrobatidis

Il killer silenzioso

**Anche in Alto Adige la malattia fungina
che minaccia gli anfibì**

Impressum:

Herpeton ©

Associazione Erpetologica Altoatesina
Südtiroler Herpetologen Verein
Union di erpatologs dl Südtirol

idea:

Herpeton

coordinamento:

Ivan Plasinger

testi:

Isabella Stofler

in collaborazione con:

Laboratorio biologico di Laives,
Stefano Barbacetto, Anna Rita Di Cerbo, Giada Imperiale, Giulia Isetta

foto e disegni:

Elisa Poznanski, Isabella Stofler, Michele Dellagiacoma,
Stefano Barbacetto, Tetraon

si ringraziano:

Museo di Scienze Naturali dell'Alto Adige, Bolzano,
Technisches Büro für Biologie, Absam (A)

Con il gentile sostegno di:

Ripartizione Natura, paesaggio e sviluppo del territorio
Provincia Autonoma di Bolzano, Fondazione Cassa di Risparmio

gefördert von
Stiftung Südtiroler Sparkasse
Fondazione Cassa di Risparmio
sostenuto da

Febbraio 2018

INDICE

PREMESSA	4/5
Gli anfibi	6
Il ruolo degli anfibi	8
Anfibi in pericolo	8
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd)	10
Meccanismo di infezione	11
Situazione nel mondo	13
La presenza di Bd in Europa	14
Bd in Italia	14
Bd in Alto Adige	15
Un nuovo pericoloso agente patogeno: <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>	16
Campionamento	18
Analisi del DNA di <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	22
Rilevazione del DNA di chitridio	22
Estrazione del DNA	23
Amplificazione del DNA	23
Risultati	24
Tentativi terapeutici per combattere <i>B. dendrobatidis</i> e <i>B. salamandrivorans</i>	26
Come possiamo prevenire la diffusione del chitridio? Avvertenze per escursionisti, pescatori, tecnici, erpetologi	27
Come possiamo contribuire alla conservazione degli anfibi?	30
Bibliografia	31



Dott.ssa Alberta Stenico

Direttrice del Laboratorio biologico
dell'Agenzia provinciale per l'ambiente
Provincia Autonoma di Bolzano - Alto Adige

Cari esperti e non,

gli anfibi hanno un ruolo fondamentale nel nostro ecosistema e il loro habitat naturale negli stadi larvali è legato all'acqua. Poiché è proprio l'habitat acquatico ad essere minacciato dalla pressione antropica, che di fatto riduce i corpi idrici a disposizione degli anfibi, è cruciale preservare l'habitat per la tutela di questa classe di animali, che è tra le più a rischio nella Provincia di Bolzano.

Un altro pericolo per alcune specie di questa classe è la presenza del fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, microorganismo patogeno che, se presente, può decimare popolazioni intere di anfibi.

Questa pubblicazione presenta i dati di un rilevamento pionieristico della presenza di questo patogeno, effettuato su larga scala nella popolazione di anfibi nell'Alto Adige. Il lavoro ha richiesto competenze trasversali ed è stato reso possibile grazie alla collaborazione tra l'associazione volontaria Herpeton, il Museo di Scienze Naturali dell'Alto Adige e il Laboratorio biologico dell'Agenzia per l'ambiente. Per la ricerca sono state utilizzate tecniche di rilevamento e campionamento in campo combinate con analisi biomolecolari in laboratorio. Il monitoraggio si è svolto nell'arco di più anni, con diverse stagioni di campionamento e analisi, i cui risultati sono qui presentati.

Care lettrici, cari lettori,

la chitridiomicosi è una malattia fungina, diffusa in tutto il mondo e fu scoperta nel 1990. La IUCN (Unione Internazionale per la conservazione della natura) ha dichiarato che la chitridiomicosi è una delle malattie infettive più impattanti per gli anfibi, a livello mondiale. In Italia, i primi casi di chitridiomicosi furono registrati in Emilia Romagna. L'infezione è stata poi riscontrata anche in altre regioni ed è nota anche negli stati confinanti al nostro, come per esempio l'Austria e la Svizzera.

Per questo motivo "Herpeton", Associazione erpetologica altoatesina, ha considerato di fondamentale importanza sviluppare una ricerca anche nella regione autonoma Trentino-Alto Adige, dove ancora non erano state avviate indagini sulla chitridiomicosi. L'associazione ha dunque avviato un progetto di ricerca specifico in provincia di Bolzano, propedeutico alla pianificazione di interventi mirati di controllo e prevenzione.

La ricerca si è svolta dal 2014 fino al 2017 ed ha riguardato diverse zone umide in tutto l'Alto Adige. Si è trattato di uno screening, approfondito con indagini sul campo e istologiche e microbiologiche, applicando vari protocolli di routine.

Questo libretto presenta una panoramica degli studi effettuati, con i risultati della ricerca. Inoltre contiene una serie importantissima di istruzioni per il personale del settore e gli escursionisti, affinché tutti possano svolgere al meglio le proprie attività nell'interesse dei nostri anfibi.

Buona lettura.



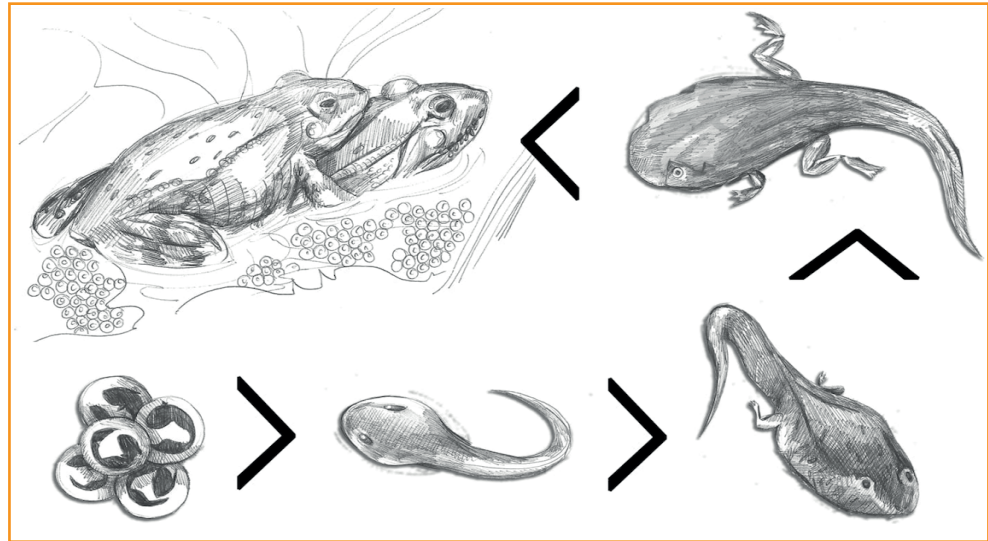
Ivan Plasinger

Presidente dell'Associazione
Erpetologica Altoatesina

Gli anfibi

furono i primi vertebrati a mettere piede sulle terre emerse. Come progenitori di tutti i vertebrati terricoli ci permettono di intuire i passaggi evolutivi che dai pesci hanno portato alla comparsa dei rettili. Il termine “anfibia” deriva dall'unione di due parole greche: *amphí* e *bíos*, le quali significano “doppia vita”. Il riferimento indica la stretta relazione che lega questi animali all'acqua dolce. Le uova, di consistenza gelatinosa, vengono generalmente deposte in acqua, e da esse si sviluppano le larve che, nel caso degli anuri (p.e. rane e rospi) prendono il nome di girini. Il girino ha un aspetto molto diverso da quello dell'individuo adulto e ricorda un piccolo pesce, dotato di coda ondulata, denti cheratinizzati ed è privo di zampe nelle prime fasi di sviluppo. Compie la sua metamorfosi nell'acqua e in questo periodo compaiono gradualmente gli arti per la locomozione terricola ed i polmoni per respirare sulla terraferma, ove si trasferirà immediatamente dopo la metamorfosi. La maggior parte delle specie di anfibi allo stadio adulto, sono in grado di vivere autonomamente sulla terraferma, ma restando comunque legati all'ambiente acquatico, dove depongono le loro uova.

L'immagine mostra le fasi dello sviluppo di una rana. Dall'uovo fecondato si sviluppa l'embrione costituito dai vari foglietti embrionali, ciascuno dei quali andrà a costituire un organo specifico. La larva viene detta girino, ha polmoni inattivi e a 6 giorni di vita compaiono le branchie esterne e poi quelle interne. A due mesi di vita compaiono gli abbozzi delle zampe posteriori mentre dopo circa 3 mesi, la metamorfosi termina.



Gli anfibi (assieme a pesci e rettili) sono vertebrati eterotermi (cioè “a sangue freddo”). Ciò significa che la loro temperatura corporea varia in base a quella dell'ambiente e che quindi, non possiedono meccanismi per regolarla. Questi animali utilizzano vari accorgimenti per non andare incontro ad eccessivo riscaldamento o raffreddamento, quali la termoregolazione al sole, l'ibernazione e l'estivazione. Gli anfibi attuali sono suddivisi in tre ordini:

- Apodi: privi di arti e dall'aspetto vermiforme, come le cecilie delle zone tropicali;
- Anuri: privi di coda da adulti, come rane, rospi e raganelle;
- Urodeli o Caudati: provvisti di coda sia allo stadio larvale che da adulti, come tritoni e salamandre.

In Alto Adige sono presenti numerose specie di anfibi autoctoni (Bovero et al., 2013; Plasinger et al. 2017), molte delle quali facilmente osservabili a diverse altitudini, presso stagni e laghi o durante le gite in montagna:

- Anuri: rospo comune (*Bufo bufo*), rospo smeraldino (*Bufo viridis*), rana montana (*Rana temporaria*), rana agile (*R. dalmatina*), rane verdi (*Pelophylax spp.*), raganella italiana (*Hyla intermedia*), ululone dal ventre giallo (*Bombina variegata*)
- Urodeli: salamandra nera (*Salamandra atra*), salamandra pezzata (*Salamandra salamandra*), tritone alpino (*Ichthyosaura alpestris*), tritone punteggiato italiano (*Lissotriton vulgaris meridionalis*).

Il ruolo degli anfibì

Gli anfibì, anche se agli occhi e alle orecchie di qualcuno possono apparire inutili, fastidiosi a causa del loro gracidio e talvolta sgradevoli di aspetto, ricoprono in realtà diversi importanti ruoli, ecologici che, nel complesso, risultano essenziali per la sopravvivenza di molte specie animali, compresa la nostra. La loro presenza è fondamentale per l'equilibrio dell'ecosistema. Essi sono:

- sia predatori che prede di altri animali. Gli anfibì si nutrono di una grande quantità di insetti, tra cui molti vettori di malattie mortali che possono essere trasmesse all'uomo, come la malaria. Essi predano anche artropodi parassiti e molluschi (limacce e chioccioline) contribuendo in modo significativo ai buoni raccolti in agricoltura;
- ottimi bioindicatori di un ambiente sano, in quanto la loro pelle è permeabile

a molte sostanze chimiche tossiche, che si possono accumulare nel loro organismo;

- animali di grande valore in medicina, infatti – sempre attraverso la pelle – producono una vasta gamma di sostanze antivirali ed antibatteriche, in grado di inibire batteri quali *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus*;
- una componente importante degli ecosistemi, perché con le loro migrazioni riproduttive rendono possibili scambi di materia ed energia tra habitat acquatici e terrestri.



Anfibì in pericolo

In tutto il mondo la distribuzione degli anfibì è in forte regresso e quasi un terzo delle specie esistenti è minacciato da molteplici fattori, quali:

- la riduzione dell'habitat.

Gli ambienti naturali che ospitano gli anfibì – innanzi tutto i siti riproduttivi nelle zone umide – vengono troppo spesso distrutti dalle attività dell'uomo. Ad esempio i riempimenti di stagni e fossati, le bonifiche di paludi e prati, la scomparsa di siepi e piccoli boschi, la diffusione di monoculture intensive, la cementificazione di suolo in campagna, sono ormai i pericoli, che determinano perdita di habitat;

- i cambiamenti climatici comportano più siccità, con la conseguenza che gli stagni e le altre zone umide si prosciugano. Così gli anfibì perdono i corpi idrici, necessari per la riproduzione, dai quali dipende la sopravvivenza della maggior

parte delle specie. Inoltre, gli anfibi hanno una pelle molto sottile e sono molto sensibili anche ai minimi cambiamenti di temperatura. Il sistema immunitario si indebolisce ed aumenta la loro vulnerabilità verso fattori ambientali sfavorevoli;

- gli anfibi assorbono direttamente attraverso la pelle sostanze tossiche, come pesticidi e fertilizzanti.

In agricoltura si usano sempre più prodotti di sintesi. Queste tossine causano disturbi nello sviluppo o anche la morte di questi animali;

- le specie introdotte: abbandonare in natura individui di specie non autoctone, come il pesce rosso o le tartarughe esotiche, è pericoloso e irresponsabile, perché il rilascio di nuovi predatori è fonte di squilibri per la catena alimentare naturale. Molti animali indigeni, anfibi compresi, risultano infatti totalmente indifesi di fronte a questi predatori alloctoni, considerando che non li conoscono e non hanno



sviluppato le difese antipredatorie adeguate.

- la rete stradale e le canalizzazioni. Nei loro spostamenti migratori, specialmente nella stagione riproduttiva, gli anfibi vengono spesso investiti mortalmente dagli automezzi, o muoiono intrappolati nei tombini delle fognature e nei pozzi d'aerazione delle cantine;
- la cattura di rane a scopo culinario. In vari paesi europei (Italia, Francia, Belgio), nell'Asia meridionale, in Estremo Oriente come pure in parti dell'Africa, le cosce di rana sono una tradizionale specialità alimentare. Purtroppo le rane adoperate a tal fine vengono solitamente

prelevate in natura o nelle risaie, e solo di rado sono il prodotto di allevamenti certificati;

- i predatori: La vita degli anfibi non si esaurisce in lunghi, contemplativi riposi ad ammirare lo stagno dalle foglie di ninfea. In realtà queste bestiole lottano continuamente per la propria vita. Nella catena alimentare, infatti, esse non occupano una posizione di vertice, ma stanno in qualche modo ad un livello intermedio. Gli anfibi devono quindi guardarsi da numerosi nemici: uccelli, pesci, bisce, mammiferi e persino insetti, nella cui dieta essi costituiscono una parte fondamentale;

- le malattie: colpiscono gli anfibi numerosi agenti patogeni: virus, batteri e funghi, favoriti anche dai cambiamenti climatici. Una delle principali attuali cause di morte degli anfibi, seppur poco conosciuta, è dovuta alla diffusione del fungo chitride *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd).

***Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd)**

Batrachochytrium dendrobatidis (Bd) è un fungo che causa una patologia potenzialmente fatale per gli anfibii: la chitridiomicosi, (Hyatt et al., 2007; Fisher et al., 2009), responsabile del declino globale delle popolazioni di anfibii, come riscontrato in Australia, Nuova Zelanda, USA, America Centrale, Sud America ed Europa. Il fungo colpisce due ordini di anfibii (Anura e Caudata), 14 famiglie e circa 200 specie (Hyatt et al. 2007; Hudson et al., 2016). Il patogeno agisce insediandosi negli strati superficiali dell'epidermide e distruggendo drammaticamente l'omeostasi della fisiologia della pelle causando la morte degli individui.

Bd è stato isolato per la prima volta nel 1997 e determinato nel 1999. È ampiamente diffuso in tutti i continenti ad eccezione dell'Antartide,



dove non sono presenti anfibii. Si pensa che Bd sia stato introdotto in nuove aree, a causa dello spostamento di anfibii infetti, o tramite acqua o terreno contaminati da zoospore.

Il termine chitridio deriva dal greco *chytrídion*, che significa “piccola pentola”, e sta ad indicare la forma della struttura che contiene le spore. I funghi appartenenti

a *Batrachochytrium* si riproducono attraverso zoospore mobili che possono sopravvivere sia in ambienti acquatici che terrestri, nutrendosi di chitina, residui vegetali, esuvie di insetti, e nel caso di *B. dendrobatidis* della cheratina degli anfibii, che si trova negli strati profondi della pelle degli individui metamorfosati e nei denti (cheratodonti) dei girini.

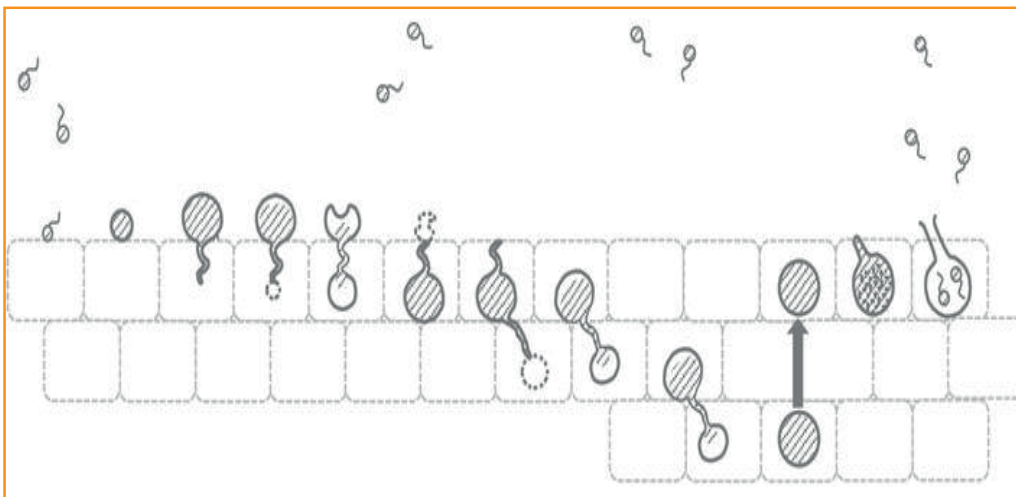
Meccanismo d'infezione

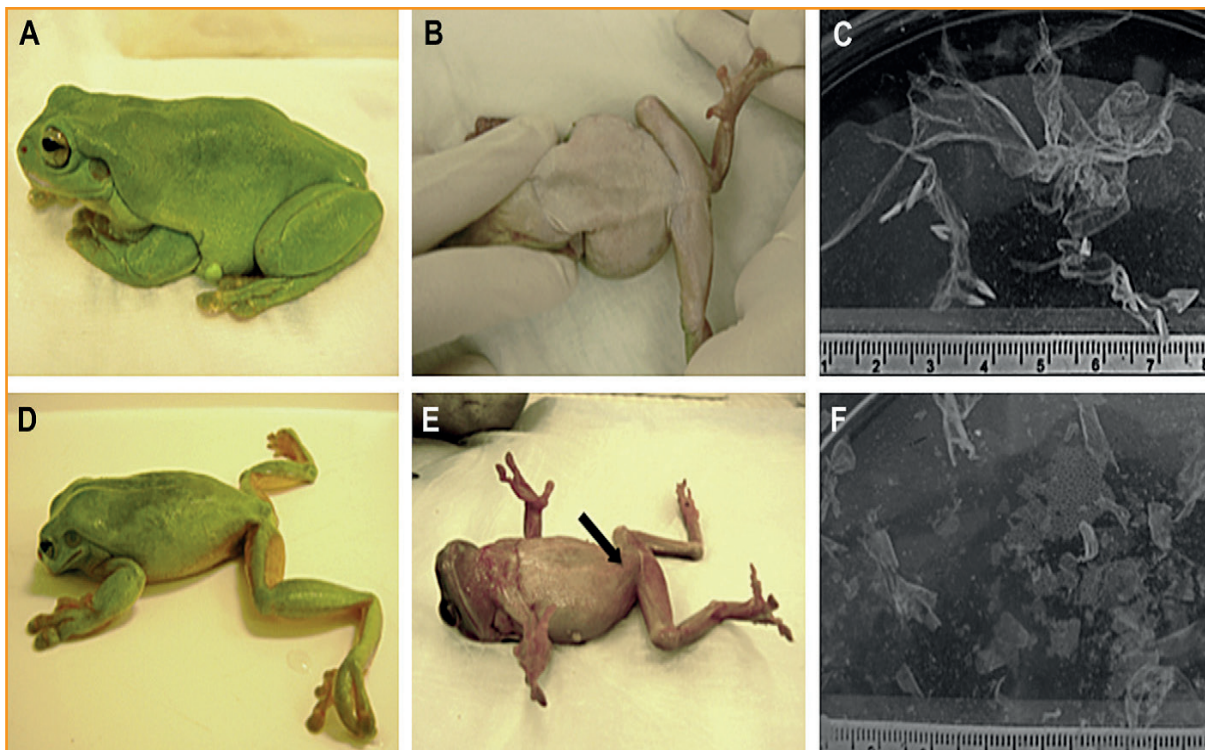
Il fungo si sviluppa sulla superficie della pelle degli anfibi e si incista nelle cellule dell'epidermide, probabilmente anche grazie all'intervento di enzimi che facilitano il processo di colonizzazione (Berger et al., 2005). Sebbene nel corso degli anni tale patogeno si sia ben adattato all'epidermide di tali animali, la sua sopravvivenza è strettamente correlata al fattore

temperatura, che risulta ottimale attorno ai 17-23°C; il fungo però cresce anche a temperature più basse (Piotrowski et al., 2004; Woodhams et al., 2008). Dopo l'infezione da Bd, rane, salamandre, rospi e tritoni possono o meno presentare i segni caratteristici tipici della malattia. Sebbene siano stati rinvenuti individui malati che non presentavano sintomi conclamati (ciò è strettamente correlato alla quantità di zoospore presenti), generalmente l'animale può presentare:

- letargia;
 - inappetenza;
 - eritemi cutanei e macchie rossastre, soprattutto nella zona dell'interno delle cosce, dove è presente un'intensa vascolarizzazione (il cosiddetto cerotto pelvico);
 - desquamazione irregolare.
- Tale fenomeno è considerato un probabile meccanismo di difesa dell'animale per eliminare il patogeno;
- postura anomala, con gambe posteriori estese e perdita del riflesso di raddrizzamento (Voyles et al., 2009; Berger et al., 2009).

Ciclo di vita di Bd in un ospite. Il ciclo di vita comprende l'invasione mediata dal tubo germinativo, la creazione di un tallo intracellulare il quale, successivamente, si sviluppa negli strati più profondi della pelle e, infine, la migrazione delle cellule epidermiche differenziate verso gli strati più superficiali della pelle per rilasciare le zoospore (Van Rooij et al., 2015).





Aspetto e comportamento della raganella australiana *Litoria caerulea*, sana ed affetta da chitridiomicosi. A), B) Sezioni laterali e ventrali di una raganella in buona salute. C) Sezione di muta della pelle da una raganella sana. D) Una raganella affetta da chitridiomicosi grave. Presenta una postura anomala con testa abbassata ed estensione delle gambe posteriori. E) Una raganella in decubito dorsale che non è in grado di riorientarsi ed ha un eritema cutaneo (freccia) nell'epidermide ventrale. F) Mute della pelle di una raganella con grave chitridiomicosi. (Voyles et al., 2009).

Batrachochytrium dendrobatidis invade inizialmente gli strati più superficiali dell'epidermide, per poi insediarsi negli strati più profondi, causando successivamente degenerazioni a livello

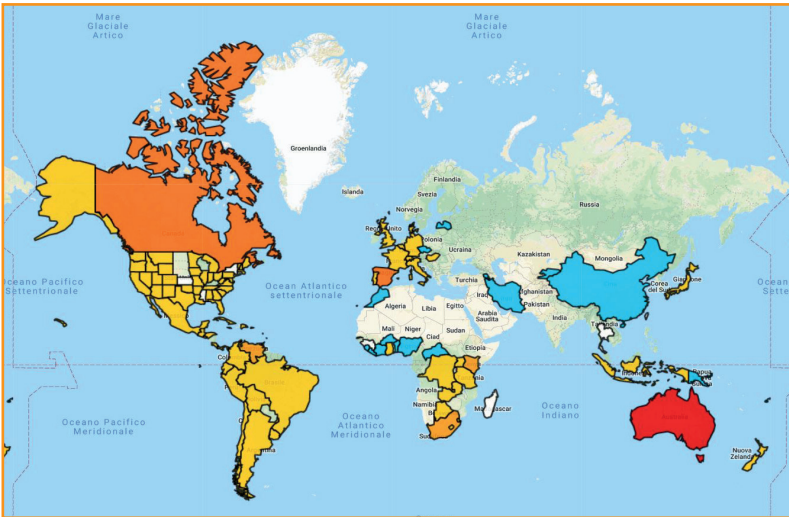
cellulare e del funzionamento cutaneo.

Ricordiamo che gli anfibi respirano e secernono importanti sostanze tramite la cute. Quindi il cattivo funzionamento di questa può causare l'arresto cardiaco.

L'umidità e la differenziazione delle cellule dello strato corneo in cheratinociti, contenenti appunto cheratina, permettono alle zoospore di insediarsi perfettamente negli strati profondi dell'epidermide dell'animale.

Situazione nel mondo

La prima testimonianza pubblicata di Bd risale ad un esemplare di *Xenopus laevis* raccolto nel 1938 nelle pianure del Western Cape, in Sud Africa (Weldon et al., 2004). Il fungo si è rapidamente espanso successivamente in Nord America, Australia, Sud America, America



Distribuzione mondiale del BD (tratta dal sito <http://www.bd-maps.net/>)

Anno	Luogo	Specie colpita	Riferimento bibliografico
1938	Africa, Western Cape	<i>Xenopus laevis</i>	Weldon et al., 2004
1961	Nord America, Québec	<i>Lithobates clamitans</i>	Ouellet et al., 2005
1978	Australia	<i>Litoria gracilentia</i>	Skerratt et al., 2007
1980	Sud America, Ecuador	<i>Atelopus bomolochos</i>	Lips et al., 2008
1983	America centrale, Messico	<i>Lithobates tarahumarae</i>	Hale et al., 2005
1997	Europa, Spagna	<i>Alytes obstetricans</i>	Bosch et al., 2001
1999	Oceania	<i>Litoria raniformis</i>	Waldman et al., 2001
2007	Sud-est asiatico, Indonesia	<i>Rhacophorus javanus</i> , <i>Chalcorana chalconota</i> , <i>Leptobrachium hasseltii</i> e <i>Limnonectes microdiscus</i>	Kusrini et al., 2008
2008	Giappone	<i>Andrias japonicus</i> e <i>Lithobates catesbeianus</i>	Goka et al., 2009

centrale, Europa, Oceania, Sud-est asiatico e Giappone. Ciò mostra la rapida globalizzazione di *Batrachochytrium dendrobatidis* a partire dall'Africa, avvenuta dal 1938 ad oggi. Sono stati proposti due siti ancestrali di diffusione della patologia, uno a partire dall'Africa attraverso il commercio di *Xenopus* spp. (Weldon et al., 2004) ed uno in Nord America attraverso il commercio di rana toro *Lithobates catesbeianus* (Fisher e Garner, 2007; Garner et al., 2006).

La presenza di *Batrachochytrium dendrobatidis* in Europa

Il primo caso di Bd in Europa risale al 1997 nel parco naturale di Peñalara in Spagna, dove vennero rinvenuti migliaia di individui

morti di rospo ostetrico, *Alytes obstetricans*. I rospi sparirono dall'86% degli stagni, dove vivevano normalmente e si riproducevano. Iniziò così uno studio per comprendere la causa di tale sparizione e tramite l'utilizzo di tecniche istologiche e microscopiche, si riuscì ad attribuire una causa alla loro morte: il fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bosch et al., 2001). La patologia venne rinvenuta successivamente in altre specie di anfibì in Francia (Touratier, 1992), Germania (Ohst et al., 2013), Austria (Sztatecsny e Glaser, 2011), Regno Unito, Repubblica Ceca, Ungheria e Svizzera (Olson et al., 2013).

... in Italia

I primi casi in Italia interessarono individui di ululone appenninico *Bombina pachypus* nelle colline emiliane. Iniziò così nel 2000 un progetto di ripopolamento della specie, allevando in vasche girini, uova e individui giovani prelevati

sul posto. Tale progetto si concluse tristemente con la morte di tutti gli individui, i quali vennero infettati probabilmente da strumentazione infetta (Stagni et al., 2004; cfr. Daszak et al., 1999). Successivamente si estesero i controlli ad altre regioni italiane e si riscontrò la positività al Bd in Umbria (Simoncelli et al., 2005), in Sardegna (Bovero et al., 2008), a Torino (Federici et al., 2008) e in prossimità del delta del fiume Po (Ficetola et al., 2011).



... in Alto Adige

In Alto Adige la presenza di questo patogeno non era mai stata monitorata fino al 2014. Considerando la prossimità degli episodi di infezione da Bd in territorio tedesco ed austriaco e in alcune regioni del Nord Italia, è emersa la necessità di effettuare uno studio al fine di verificare l'eventuale presenza e diffusione della chitridiomicosi negli anfibi altoatesini. Per svolgere il presente lavoro è stata quindi necessaria una stretta collaborazione tra tutte le istituzioni che si occupano in territorio altoatesino di monitoraggio, tutela e salvaguardia degli ambienti naturali (protetti e non, quali corsi d'acqua e biotopi).

Grazie a questa sinergia è stato possibile pianificare la ricerca in tutti i suoi aspetti: dalle specie target ai siti da monitorare. Tali siti sono distribuiti in buona parte del territorio provinciale (che si estende per 7.400 km²), con una presenza maggiore di



campionamenti nei settori orientali e nella Bassa atesina (Val d'Adige).

Il lavoro qui descritto si è articolato in due fasi principali:

- una prima parte focalizzata principalmente la messa a punto di un sistema per la rilevazione del Bd, svolto presso il Laboratorio biologico dell'Agenzia Provinciale per l'Ambiente (APPA) di Bolzano (oggetto di tesi di laurea, lavoro non coperto da finanziamento e i cui risultati sono

stati pubblicati in Stofler et al. 2016);

- una seconda fase cofinanziata dall'associazione erpetologica altoatesina Herpeton e dall'Ufficio 28. Natura, paesaggio e sviluppo del territorio della Provincia Autonoma di Bolzano riguardante il campionamento di anfibi in alcuni siti del territorio provinciale, per il rilevamento della presenza di Bd in Alto Adige, in collaborazione tra Herpeton, Technisches Büro für Biologie (Absam), Museo di Scienze Naturali dell'Alto Adige e Laboratorio biologico dell'Agenzia Provinciale per l'Ambiente (APPA) di Bolzano.

Un nuovo pericoloso agente patogeno: *Batrachochytrium salamandrivorans*

Le salamandre, appartenenti alla famiglia dei Salamandridi, sono molto sensibili alle malattie (Martel et al., 2013). Infatti oltre ad essere colpite dal fungo *B. dendrobatidis* (Bd), sono anche esposte a *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal), un patogeno di più recente

scoperta, descritto nel 2013. Si ipotizza che Bsal sia originario dell'Asia e si sia diffuso attraverso il commercio internazionale di animali domestici verso l'Europa. Qui la sua presenza è stata correlata alla moria di salamandre pezzate (Yap et al., 2017). Questa ipotesi è supportata dal recente riscontro di Bsal a livelli endemici in popolazioni del Vietnam. Bsal è stato finora rilevato nei Paesi Bassi, in Belgio, in Germania e in Vietnam (Laking et al., 2017,

Sabino-Pinto et al., 2015, Spitzen-van der Sluijs et al., 2016) oltre che in individui in cattività nel Regno Unito e in Germania (Sabino-Pinto et al., 2015, Cunningham, et al., 2015). In un articolo apparso sul New York Times nel gennaio 2016, il Fish and Wildlife Service, agenzia degli Stati Uniti per la conservazione, la tutela e la valorizzazione di pesci, fauna selvatica, piante e loro habitat ha imposto un blocco nell'importazione e nel trasporto attraverso i confini di stato di 201 specie di anfibi caudati, con lo scopo di arginare la diffusione della patologia. Questi individui (possibili portatori sia di *B. dendrobatidis* che di *B. salamandrivorans*) potrebbero fungere da serbatoi dell'infezione. Anche il rospo ostetrico (*Alytes obstetricans*) ha dimostrato di mantenere infezioni subcliniche di Bsal per diverse settimane e può fungere da riserva di infezione (Stegen, et al., 2017).





Campionamento

Lo studio del fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* ha previsto una fase di campo per il campionamento di anfibî nei principali ambienti umidi dell'Alto Adige con prelievo di materiale organico da sottoporre ad analisi genetiche presso il Laboratorio biologico dell'APPA di Laives. Al fine di poter svolgere la ricerca è stato necessario richiedere e ottenere le seguenti autorizzazioni: Autorizzazione speciale di ingresso in tutti i biotopi della Provincia Autonoma di Bolzano (Prot. 394255, 02.07.2015), Autorizzazione Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (Prot. 0011870, 01.06.2016), Autorizzazione speciale alla raccolta di animali rigorosamente protetti



Mappa 3D dell'Alto Adige I punti in bianco rappresentano i siti campionati tra il 2014 e il 2017.

(Art. 11 della LP N.6/2010 – allegato A) ISPRA Prot. 28557 T-A31, 16.05.2016.

Il campionamento è stato di tipo conservativo e non distruttivo, seguendo una procedura basata sul prelievo delle cellule e spore del fungo tramite l'uso di tamponi (Sztatecsny e Glaser, 2011). Il prelievo è stato ripetuto in modo omogeneo per ciascun individuo, strofinando i tamponi per il medesimo numero di

volte e sulle stesse zone del corpo, in modo da ottenere risultati confrontabili tra loro. Il numero di individui campionati, suddivisi per specie, rappresenta una percentuale rappresentativa delle popolazioni studiate. Sono state inoltre tenute in considerazione le abitudini circadiane delle diverse specie di anfibî, pertanto alcune di esse, quali *Salamandra salamandra* e *Pelophylax* spp. sono state campionate anche di notte. I campionamenti sono stati effettuati in collaborazione con l'Associazione Erpetologica Altoatesina "Herpeton", il

Campionamento 2014-2015 270 campioni prelevati

(lavoro per tesi di laurea, non oggetto del presente finanziamento svolto presso il Laboratorio biologico dell'Agenzia Provinciale per l'Ambiente di Bolzano: cfr. Stofler et al., 2016)

Campionamento 2016-2017 545 campioni prelevati

815 campioni totali - 69 siti

tampone nel loro apparato boccale e passarlo sui cheratodonti. Dopo aver effettuato lo strofinamento, il tampone è stato posto nella microprovetta, avendo cura di non toccare o contaminare altri materiali. Le microprovette sono state conservate in una borsa frigo con ghiaccio. I dati ambientali e relativi al singolo campione sono stati riportati nelle apposite schede di campionamento. Per evitare di riprelevare e ricampionare gli stessi individui, gli animali già campionati sono stati posti temporaneamente in secchi con un po' d'acqua, immersi presso zone ombreggiate della riva, e poi rilasciati esattamente nel punto di prelievo. Un aspetto non trascurabile è la possibile alterazione dei microhabitat durante le ricerche in campo. Per limitare al massimo l'impatto, ciascun rilevatore ha sempre avuto l'accortezza di riportare le condizioni ambientali originarie una volta catturato l'animale. Ad



AUTONOME PROVINZ BOZEN - SÜDTIROL

Abteilung 29 – Landesagentur für Umwelt
 Amt 29.9 – Biologisches Labor



PROVINCIA AUTONOMA DI BOLZANO - ALTO ADIGE

Ripartizione 29 – Agenzia provinciale per l'ambiente
 Ufficio 29.9 – Laboratorio biologico



esempio se il ritrovamento avveniva sotto un sasso o sotto rami, dopo la cattura il materiale veniva riposizionato esattamente come era. Una volta concluso il prelievo, il materiale da campo (p.e. stivali e retino) è stato pulito con acqua potabile e con disinfettanti specifici (p.e. amuchina diluita) e, nel caso di operazioni diurne con condizioni meteo favorevoli, è stato lasciato asciugare al sole fino al completo disseccamento. Tale procedura deve essere applicata soprattutto nel caso in cui vengono effettuati vari prelievi durante lo stesso giorno, in siti diversi. Si riduce così al minimo il rischio di contaminazioni incrociate da un sito all'altro e di falsare il dato del campionamento, poiché il materiale può fungere da vettore del chitridio. Conclude le fasi di campo i tamponi sono stati portati in laboratorio in borse refrigerate con piastre eutettiche e conservati in freezer ad una temperatura di -20 °C fino all'analisi.

Analisi del DNA di *Batrachochytrium dendrobatidis*

Di routine, il laboratorio biologico dell'Agenzia per l'ambiente di Laives si occupa di svolgere le analisi microbiologiche con tecniche classiche e molecolari su campioni di alimenti ed ambientali e grazie a questo progetto ha affrontato per la prima volta la tematica delle infezioni degli anfibi da chitridiomicosi. Per questo motivo, in fase preliminare è stato necessario mettere a punto la strumentazione e le procedure corrette al fine di applicare il protocollo specifico per le analisi molecolari (estrazione e amplificazione) del DNA di questo patogeno.

Rilevazione del DNA di chitridio

Presupposto fondamentale per la riuscita dello studio

era l'allestimento di un assay di estrazione del materiale genetico e successiva rilevazione in PCR sufficientemente sensibile da rilevare anche quantitativi molto esigui del patogeno e robusto dal punto di vista dell'affidabilità del risultato, ossia che non fornisse falsi positivi, né tantomeno falsi negativi. L'assunto era infatti che non essendoci ad oggi evidenze di morie di anfibi o avvistamenti di anfibi recanti i segni della chitridiomicosi, la ricerca del patogeno avrebbe facilmente potuto dare esito negativo. Era dunque necessario esser certi che un esito negativo fosse da collegare all'assenza di Bd e non ad un'inefficace procedura di estrazione del DNA. Al tempo stesso il metodo doveva essere sufficientemente sensibile da evidenziare anche poche cellule di chitridio, e dunque di evidenziare la patologia anche in stato sub-sintomatico.

Estrazione del DNA

Le strutture cellulari vengono distrutte grazie all'azione meccanica di microsfere, e questa fase consente la fuoriuscita di DNA, proteine e lipidi dalla cellula. Sono stati testati due protocolli di estrazione (miniMAG® e PrepMan®Ultra), i quali differiscono principalmente per il diverso grado di purificazione di acidi nucleici. Entrambi i metodi di estrazione si sono rivelati efficaci, in quanto sono stati ottenuti dati riproducibili nel tempo. Delle due tecniche di estrazione testate è stato utilizzato il protocollo PrepMan®Ultra, in grado

di estrarre un maggior quantitativo di DNA di Bd dal campione infetto e di conseguenza con maggior sensibilità e che prevede l'uso di un unico tampone di estrazione.

Amplificazione del DNA

Il DNA estratto viene successivamente amplificato attraverso il sistema Real-time PCR che amplifica la sequenza target e consente di identificare una specifica sequenza presente in un campione di DNA, utilizzando il kit *Batrachochytrium dendrobatidis* 5,8S ribosomal



RNA (5,8S) Genesis® Standard kit. Durante la reazione di PCR vengono utilizzate delle molecole (sonde marcate con fluorofori), che si legano al DNA a doppio filamento e rendono specifica la reazione ed emettono fluorescenza per misurare i livelli del prodotto di amplificazione. In pratica queste sonde vengono disegnate complementari alla sequenza di DNA di nostro interesse. Tale kit è basato sull'amplificazione dei geni ribosomali presenti in copia multipla nel genoma di Bd.

Specie esaminate	Nr. tot.	Nr. siti
Salamandra pezzata (<i>Salamandra salamandra</i>)	56	9
Tritone punteggiato (<i>Lissotriton vulgaris</i>)	13	1
Tritone alpino (<i>Ichthyosaura alpestris</i>)	58	11
Ululone ventre giallo (<i>Bombina variegata</i>)	88	12
Rospo comune (<i>Bufo bufo</i>)	315	20
Rospo smeraldino (<i>Bufo viridis</i>)	19	5
Rana di Lessona (<i>Pelophylax lessonae</i>)	15	1
Rana ridibonda (<i>Pelophylax ridibundus</i>)	85	12
Rana verde (<i>Pelophylax</i> sp.)	52	5
Rana agile (<i>Rana dalmatina</i>)	60	5
Rana montana (<i>Rana temporaria</i>)	54	20

Risultati

I campionamenti sono stati effettuati in 69 siti localizzati nei comuni di: Aldino, Appiano, Bolzano, Bressanone, Caldaro, Campo Tures, Cortaccia, Cornedo all'Isarco, Fiè allo Sciliar, Gais, Laives, Lana, Malles, Naturno, Nova Ponente, Ora, Racines, Renon, Salorno, S. Pancrazio, S. Genesio, S. Lorenzo di Sebato, S. Cristina, Sarentino, Senale S. Felice, Terzano, Termeno, Tires, Tirolo, Trodena, Ultimo, Vipiteno. Il maggior numero di tamponi prelevati proviene dalla Bassa Atesina, che ospita anche la maggior biodiversità in termini di Anfibi. Degli 815 campioni totali, 10 sono risultati positivi al *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Dei 10 campioni risultati positivi al fungo, solo l'individuo di *Bombina variegata* campionato nella zona adiacente al lago di Caldaro nel 2015 presentava una postura di decubito dorsale anomala con zampe posteriori estese, tipica degli individui affetti da chitridiomicosi (Pessier, 2008; Mutschmann, 2015). Per il resto, il soggetto non presentava altri segni o lesioni evidenti riconducibili alla presenza di Bd. A ulteriore validazione della positività dei campioni al test di isolamento del DNA di chitridio, è stata effettuata un'osservazione microscopica dei tamponi, con i quali sono state raccolte le spore

e le cellule di fungo sugli anfibi. Attraverso l'uso di un microscopio ottico è stato possibile osservare strutture caratteristiche tipiche del chitridio in tutti e dieci i campioni positivi. Confrontando i campioni con i dati disponibili in letteratura (Longcore et al., 1999), è stato possibile identificare zoospore e zoosporangi che differiscono per morfologia e dimensioni. Tali strutture non erano invece visibili negli altri campioni risultati negativi e questo è indice che non ci sono stati falsi negativi nei test genetici. Le indagini microscopiche hanno dunque confermato gli esiti delle analisi molecolari, nonostante l'assenza di tratti conclamati della malattia.

Specie positive per BD	Luogo del campionamento (anno)	Lesioni o altre note
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Bressanone, Pra' di Millan/Millander Au (2014)	-
<i>Lissotriton vulgaris</i>	Bressanone, Pra' di Millan/Millander Au (2014)	-
<i>Lissotriton vulgaris</i>	Bressanone, Pra' di Millan/Millander Au (2014)	-
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Montagna, Castelfeder (2014)	-
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Montagna, Castelfeder (2014)	-
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Lana, Krebsbach (2014)	-
<i>Pelophylax</i> sp.	Lana, Foci del Valsura (2015)	-
<i>Bombina variegata</i>	Gais, Ontaneti dell'Aurino (2015)	-
<i>Bombina variegata</i>	Vadena, vicinanze del Lago di Caldaro (2015)	Postura anomala
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Bolzano, Fossa Perele (2016)	-

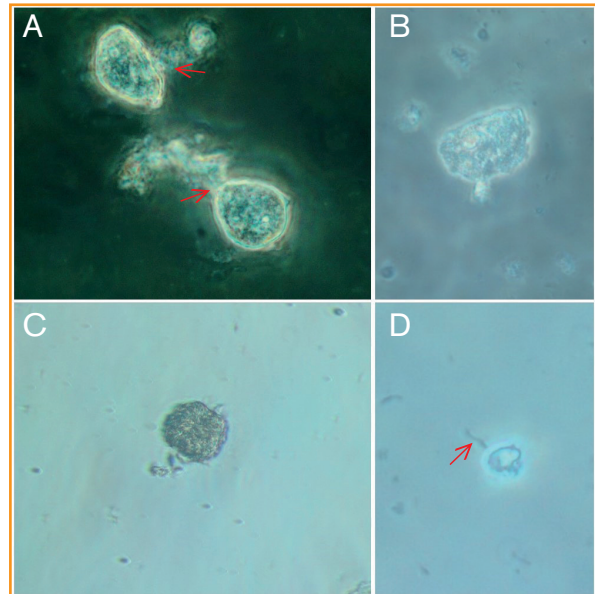
La presenza di 10 individui positivi al Bd su un totale di 815 individui campionati (cioè l'1,2%) è un risultato che indica l'assenza di focolai epidemici in atto, nel territorio altoatesino campionato. Se si confrontano i dati ottenuti con i risultati di altre ricerche nei vari paesi del mondo, si può notare che in aree con epidemia in atto, morie diffuse di anfibi e individui con evidenti segni della patologia, i numeri dei casi positivi sono sensibilmente più elevati, con percentuali che variano tra il 10 e il 90%.

Con l'assenza di focolai, i dati raccolti mostrano una situazione non allarmante, considerando l'assenza di individui con sintomi avanzati della malattia, o mortalità di massa, e che i 10 individui positivi a Bd sono stati campionati insieme ad altri individui risultati negativi alla PCR, in zone geografiche ben distinte. Questa distribuzione eterogenea dei siti positivi evidenzia, tuttavia, come Bd sia presente sia nella parte settentrionale che meridionale

del territorio altoatesino. Ciò, da un punto di vista della prevenzione, rappresenta una situazione di maggiore rischio dato che il fungo non è localizzato in un unico settore ma potenzialmente può diffondersi a partire da diverse aree e difficilmente può essere controllato, se non con un monitoraggio estensivo su tutta la provincia. Ad ogni modo, la tipologia di distribuzione dell'agente patogeno in Alto Adige resta ancora da indagare,

espandendo i campionamenti anche a *Batrachochytrium salamandrivorans*, nei siti non ancora monitorati per Bd, su matrici non ancora studiate come l'acqua, e comprendendo sempre anche individui apparentemente sani. Infatti nel presente studio e in altri lavori (Sztatecsny e Glaser, 2011), è stato dimostrato che la chitridiomicosi può essere presente in forma latente anche senza manifestare segni evidenti di malattia.

Visione al microscopio dei preparati positivi al Bd. Legenda: A) Zoosporangi (entrambi con dimensioni comprese tra 11-12 µm) con probabile fuoriuscita di zoospore (freccia rossa). B) Zoosporangio (dimensioni 13,60 µm x 19,45 µm). C) Zoosporangio (dimensioni 11,80 µm x 9,74 µm). D) Zoospora (lunghezza: 3,56 µm) con flagello (freccia rossa).



Tentativi terapeutici per combattere *B. dendrobatidis* e *B. salamandri-vorans*

Se da un lato la virulenza di Bd si sta imponendo sempre più prepotentemente, dall'altro, si assiste ad un rapido adattamento immunogenetico degli individui, a prova del fatto che gli anfibii, spinti dalla pressione selettiva esercitata dal fungo, hanno il potenziale evolutivo di adattarsi alla chitridiomicosi (Bataille et al., 2015; Savage e Zamudio, 2016). Per studiare tale fungo apparentemente invisibile, ma in grado di muoversi su grandi distanze e di sterminare intere comunità di anfibii, nel mondo sono in corso ricerche con lo scopo di contenerne la diffusione e di studiare nuove tecniche per guarire gli individui malati. Nell'isola di Maiorca alcuni

ricercatori sono stati in grado di eradicare l'infezione da Bd che colpiva le popolazioni del rospo ostetrico endemico *Alytes muletensis*, utilizzando un trattamento basato sull'uso combinato di un antimicotico, applicato sui girini, con una soluzione sterilizzante di laboratorio, in grado di svolgere una disinfezione ambientale (Bosch et al., 2015). Recentemente alcuni studi hanno dimostrato l'efficacia nei confronti del chitridio dell'antimicotico itraconazolo (Hudson et al. 2016), della nikkomicina Z (inibitore della sintesi della chitina) (Holden et al., 2014) e del cloramfenicolo, il quale è però problematico per le specie terrestri (Bishop et al., 2009; Brannelly et al., 2012). L'uso di altri agenti antimicotici, come cloruro di benalconio e fluconazolo, è invece sconsigliato (Brannelly et al., 2012). In un recente lavoro condotto da Pascale Van Rooij et al., 2017, è stata valutata l'efficacia dei disinfettanti

chimici nell'uccidere Bsal. In tutte le condizioni testate, Biocidal®, Chloramine-T®, Dettol medical®, Disolol®, etanolo, F10®, Hibiscrub®, permanganato di potassio, Safe4®, ipoclorito di sodio e Virkon S® erano efficaci nell'uccidere Bsal. Concentrazioni di sodio cloruro al 5% o inferiore, acido peracetico allo 0,01% e solfato di rame allo 0,001-1% non avevano effetti contro Bsal. Nessuna delle condizioni testate per il perossido di idrogeno ha ridotto la vitalità di Bsal, mentre ha ucciso *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). Sulla base dei risultati in vitro, raccomandiamo Virkon S® all'1%, ipoclorito di sodio al 4% e etanolo al 70% per disinfettare le apparecchiature in campo, laboratorio o in cattività, con un tempo di contatto minimo di 5 minuti per Virkon S® all'1% e 1 minuto per questi ultimi disinfettanti. Queste condizioni non solo mirano in modo efficiente a contenere Bsal, ma

anche Bd e *Ranavirus*. (Van Rooij et al., 2017). Infine diversi studi hanno testato anche l'efficacia terapeutica dei trattamenti termici su anfibi affetti da chitridiomicosi (metamorfosati e girini) stabulati in ambiente controllato, con risultati anche incoraggianti. Tuttavia, questo tipo di trattamenti va ulteriormente indagato (Voyles et al., 2017).

Come possiamo prevenire la diffusione del chitridio? Avvertenze per escursionisti, pescatori, tecnici, erpetologi

Oltre all'uso di sostanze chimiche e antimicotiche (non sempre rilevatesi efficaci nella eradicazione della malattia), è importante attuare norme di prevenzione, utili a contenere

la possibile espansione della stessa. Un gruppo di lavoro, cui ha partecipato il Servizio veterinario aziendale dell'Azienda Sanitaria dell'Alto Adige ha redatto delle linee guida rivolte non solo ad erpetologi, ma anche a tecnici che campionano i corsi d'acqua per la valutazione della qualità biologica degli stessi e agli operatori che sovrintendono attività ispettive sui biotopi o le campagne di monitoraggio o censimento della flora e fauna degli ecosistemi alpini.

Questi soggetti potrebbero involontariamente veicolare il patogeno da un sito all'altro, dato che ne visitano numerosi in poco tempo, ma anche i cittadini e i turisti che visitano l'Alto Adige, possono inavvertitamente causare una diffusione del patogeno. Alla luce dei risultati di questo lavoro, emerge l'esigenza di dover riadattare anche alcune pratiche di campionamento e di salvaguardia degli anfibi, come la prassi di salvataggio dall'investimento con l'uso di secchi di raccolta per gli



individui, perché prevedono uno stretto contatto tra loro, trasmettendo la malattia da un individuo all'altro. In vari paesi sono state messe a punto delle indicazioni contro la propagazione della chitridiomicosi, che devono essere considerate da tutte le persone che lavorano nell'acqua e con l'acqua (ad es. erpetologi di campo, limnologi, ittologi, pescatori, escursionisti interessati alla natura, pedagogisti ambientali, ecc.). Ecco le principali misure da osservare:

- gli anfibii ritrovati morti devono essere conservati in alcool al 70% o in un congelatore e poi consegnati all'associazione Herpeton (ref. Ivan Plasinger) che provvederà ad archiviare i dati relativi ai soggetti e a consegnare i reperti presso un centro specializzato per le analisi dei reperti. Per quanto riguarda gli anfibii vivi con segni riconducibili alla presenza di Bd, i soggetti devono essere fotografati ed eventualmente raccolti



utilizzando guanti in vinile, sacchetti di plastica o messi momentaneamente in contenitori monouso provvedendo tempestivamente a contattare il referente di Herpeton. Si ricorda che la cattura e manipolazione degli anfibii è normata dalla legge provinciale vigente (Legge provinciale 12 maggio 2010, n. 6) e per le specie in allegato della Direttiva Habitat anche dal DPR 12 marzo 2003, n.120.

- evitare assolutamente il rilascio in ambiente di specie alloctone, potenzialmente

portatrici di Bd. In ambito terraristico, buona norma sarebbe di acquistare anfibii solo da fornitori autorizzati certificati come “chytrid free”. In cattività tutti gli anfibii appena acquistati dovrebbero restare in quarantena dalle sei alle otto settimane, durante le quali sarebbe opportuno testare ripetutamente la presenza di Bd rivolgendosi ad un laboratorio specializzato (p.e. il laboratorio APPA di Laives). Rilevare la presenza di lesioni o segni clinici della malattia ed effettuare un esame degli individui rinvenuti morti (Mutschmann 2015);

- evitare qualsiasi traslocazione, reinsediamento e ripopolamento di anfibii adulti e larve di anfibii (anche autoctoni);
- decontaminazione dell'equipaggiamento (stivali, retino...) poichè le spore di Bd si possono trovare su qualsiasi superficie umida. Ad oggi il metodo di disinfezione migliore e più facile si è rivelato l'uso di una soluzione di candeggina al 10% (Young et al., 2007), anche se far asciugare e

disseccare l'attrezzatura, rimane un mezzo efficace per decontaminare (Mutschmann, 2015). La disinfezione deve essere particolarmente accurata nel caso in cui si operi in località situate a notevole distanza tra loro e se frequentate da specie differenti (si vedano per esempio le norme consigliate dalla Societas Herpetologica Italica, <http://www-3.unipv.it/webshi/conserv/monitanf.htm#Norme>). Tutto ciò indica che

l'attenzione al problema è molto elevata in tutto il mondo. Anche in Alto Adige grazie al progetto di ricerca su Bd sono stati trovati segnali di presenza del chitridio, pur senza un quadro di emergenza conclamata. È necessario quindi, agire ampliando il monitoraggio e intensificando i campionamenti e le analisi sugli individui in zone fino a oggi inesplorate. È importante estendere le analisi anche ad altre matrici quali l'acqua, in quanto le spore di Bd vengono trasportate sia dalle acque correnti (Chestnut et al., 2014), sia da quelle piovane (Kolby et al., 2015). Lo studio dovrebbe riguardare anche altre patologie che colpiscono gli anfibii, perché come riportato da Warne et al., 2016, l'interazione tra *Batrachochytrium dendrobatidis* e *Ranavirus* potrebbe facilitare la co-infezione e rendere gli individui maggiormente vulnerabili ad infezioni secondarie.



Come possiamo contribuire alla tutela degli anfibi?

Conservando e tutelando gli habitat degli anfibi. Acque e zone umide sono da proteggere e, per quanto possibile, è importante ripristinare gli ambienti umidi alterati.

- ... creando un piccolo laghetto o una pozza in giardino, privo di pesci. Il giardino dovrebbe essere curato in maniera naturale, con piante autoctone e mucchi di compostaggio/legname morto in modo da offrire nascondigli per l'ibernazione.
- ... rinunciando ai pesticidi. Gli anfibi assorbono le tossine anche attraverso la pelle, e i pesticidi ne influenzano direttamente tutte le fasi di sviluppo: dalle uova ai girini, fino all'adulto. I pesticidi disturbano lo sviluppo degli



animali provocando squilibri ormonali ed indebolendo il sistema immunitario.

- ... avendo cura delle recinzioni di protezione per anfibi.

In prossimità delle strade si possono costruire delle recinzioni protettive in modo

da convogliare gli anfibi, che provano ad attraversare, in un secchio interrato (trappola pit-fall), qualora alcuni volontari possano recuperarli per portarli sul lato opposto della strada. In questo modo ogni anno migliaia di animali possono essere salvati dai pericoli della strada.

- ... liberando gli anfibi caduti in buchi e pozzi. Tali accessi devono essere chiusi.
- ... guidando lentamente e prudentemente sui tratti stradali attraversati dagli anfibi.

Per limitare la mortalità di rane e rospi è necessaria una velocità inferiore ai 30 km all'ora!

- Non introdurre animali alloctoni nell'ambiente: predatori contro i quali gli anfibi non hanno difese (tartarughe americane, visoni, pesci rossi, persico sole, e – negli stagni – nemmeno le trote).

Bibliografia

- Australian Government, Department of the Environment and Heritage (2006), Background document for the Threat Abatement Plan. Infection of Amphibians with chytrid fungus resulting in chytridiomycosis, <http://www.environment.gov.au/system/files/resources/8d01e983-3619-4d83-9b5a-6f9fb4d34e3b/files/chytrid-background.pdf> (24.1.2018).
- Bataille, Cashins, Grogan, Skerratt, Hunter, McFadden, Scheele, Brannelly, Macris, Harlow, Bell, Berger, Waldman (2015). Susceptibility of amphibians to chytridiomycosis is associated with MHC class II conformation. *Biological Sciences*, 282(1805).
- Berger, Hyatt, Speare, Longcore (2005). Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Disease of Aquatic Organisms*, 68:51-63.
- Berger, Longcore, Speare, Hyatt, Skerratt (2009). Fungal Diseases in Amphibians. In: "Amphibian Decline: Disease, Parasites, Maladies and Pollution" (Heatwole, Wilkinson, Eds). 2986-3052. Australia, Surrey Beatty & Sons.
- Berger, Speare, Skerratt (2005). Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs *Litoria caerulea* with severe chytridiomycosis. *Disease of Aquatic Organisms*, 68:65-70.
- Bishop, Speare, Poulter, Butler, Speare, Hyatt, Olsen, Haigh (2009). Elimination of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* by Archey's frog *Leiopelma archeyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84:9-15.
- Bosch, Martínez-Solano, García-París (2001). Evidence of Chytrid Fungus Infection Involved in the Decline of the Common Midwife Toad (*Alytes obstetricans*) in Protected Areas of Central Spain. *Biological conservation*, 97:331-337.
- Bosch, Sanchez-Tomé, Fernández-Loras, Oliver, Fisher, Garner (2015). Successful elimination of a lethal wildlife infectious disease in nature. *Biology letters*, 11(11).
- Bovero, Canalis, Crosetto (2013). Gli anfibi e i rettili delle Alpi. BLU edizioni.
- Bovero, Sotgiu, Angelini, Doglio, Gazzaniga, Cunningham, Garner (2008). Detection of Chytridiomycosis Caused by *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Endangered Sardinian Newt (*Euproctus platycephalus*) in Southern Sardinia, Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(3):712-715.
- Brannelly, Richards-Zawacki, Pessier (2012). Clinical trials with itraconazole as a treatment for chytrid fungal infections in amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms*, 101:95-104.
- Chestnut, Anderson, Popa, Blaustein, Voytek, Olson, Kirshtein (2014). Heterogeneous Occupancy and Density Estimates of the Pathogenic Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Waters of North America. *PLoS One*, 9(9):e106790.
- Cunningham, Beckmann, Perkins, Fitzpatrick, Cromie, Redbond, O'Brien, Ghosh, Shelton, Fisher (2015). Emerging disease in UK amphibians. *BMJ Journals*.
- Daszak, Berger, Cunningham, Hyatt, Green, Speare (1999). Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases*, 5(6): 735-748.
- Federici, Clemenzi, Favelli, Tessa, Andreone, Casiraghi, Crottini (2008). Identification of the pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian populations of a plain area in the Northwest of Italy. *Herpetology Notes*, 1: 033-037.
- Ficetola, Valentini, Miaud, Noferini, Mazzotti, Dejean (2011). *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians from the Po River Delta, Northern Italy. *Acta Herpetologica*, 6(2):297-302.

Fisher, Garner (2007). The relationship between the introduction of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews*, 21:2-9.

Fisher, Garner, Walker (2009). Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. *Annual Review of Microbiology*, 63:291-310. The relationship between the introduction of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews*, 21:2-9.

Garner, Perkins, Govindarajulu, Seglie, Walker, Cunningham, Fisher (2006). The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters*, 2:455-59.

Goka, Yokoama, Une, Kuroki, Suzuki, Nakahara, Kobayashi, Inaba, Mizutani, Hyatt (2009). Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*, 18:4757-4774.

Hale, Rosen, Jarchow, Bradley (2005). Effects of the chytrid fungus on the Tarahumara frog (*Rana tarahumarae*) in Arizona and Sonora, Mexico. In: "Connecting Mountain Islands and Desert Seas: Biodiversity and Management of the Madrean Archipelago II" (Gottfried GJG, Brooke S, Eskew L, Edminster CB, Eds.). Pp. 407-411. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fort Collins, CO.

Holden, Fites, Reinert (2014). Nikkomycin Z is an effective inhibitor of the chytrid fungus linked to global amphibian declines. *Fungal biology*, 118(1):48-60.

Hudson, Young, Lopez, Martin, Fenton, McCrea, Griffiths, Adams, Gray, Garcia and Cunningham (2016). In-situ itraconazole treatment improves survival rate during an amphibian chytridiomycosis epidemic. *Biological Conservation*, 195:37-45.

Hyatt, Boyle, Olsen, Boyle, Berger, Obendorf, Dalton, Kriger, Heros, Hines, Phillott, Campbell, Marantelli, Gleason, Coiling (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Disease of Aquatic Organisms*, 73(3):175-192.

IUCN (2015). IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-3. <http://www.iucnredlist.org>. (15.9.2015).

KARCH, Chitridiomicosi. Una temibile malattia che colpisce gli anfibi, <http://www.karch.ch/karch/it/home/amphibien/krankheiten/chytridiomykose.html> (18.1.2018).

Kolby, Smith, Ramirez, Rabemananjara, Pessier, Brunner, Goldberg, Berger, Skerratt (2015). Rapid Response to Evaluate the Presence of Amphibian Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and Ranavirus in Wild Amphibian Populations in Madagascar. *PLoS ONE*, 10(6):e0125330.

Kusrini, Skerratt, Garland, Berger, Endarwin (2008). Chytridiomycosis in frogs of Mount Gede Pangrango, Indonesia. *Disease of Aquatic Organisms*, 82:187-94.

Laking, Ngoc Ngo, Pasmans, Martel, Nguyen (2017). *Batrachochytrium salamandrivorans* is the predominant chytrid fungus in Vietnamese salamanders. *Scientific Reports* 7.

Lips, Diffendorfer, Mendelson, Sears (2008). Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biology*, 6:441-54.

Longcore, Pessier, Nichols (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen et sp nov, a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91(2):219-227.

Martel, Spitzen-van der Sluijs, Blooi, Bert, Ducatelle, Fisher, Woeltjes, Bosman, Chiers, Bossuyt, Pasmans (2013). *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *PNAS* 15325–15329.

Mutschmann (2015). Chytridiomycosis in Amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 24 (3):276-282.

Ohst, Gräser, Plötner (2013). *Batrachochytrium dendrobatidis* in Germany: distribution, prevalences, and prediction of high risk areas. *Disease of Aquatic Organisms*, 107:49-59.

Olson, Aanensen, Ronnenberg, Powell, Walker, Bielby, et al. (2013). Mapping the Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the Amphibian Chytrid Fungus. *PLoS ONE* 8(2): e56802.

Ouellet, Mikaelian, Pauli, Rodrigue, Green (2005). Historical evidence of widespread chytrid infection in North American amphibian populations. *Biological conservation*, 19:1431-40.

Pessier (2008). Amphibian chytridiomycosis. In: "Zoo and Wild Animal Medicine. Current therapy" (Fowler ME, Miller ER, Eds.). 137-143. St. Louis, Saunders Elsevier.

Plasinger, Di Cerbo, Barbacetto (2017). L'atlante degli anfibi e rettili dell'Alto Adige: risultati preliminari. *Atti XI Congresso Nazionale della Societas Herpetologica Italica*, Ianieri Edizioni, pp. 91-98.

Piotrowski, Annis, Longcore (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96:9-15.

Sabino-Pinto, Bletz, Hendrix, Bina Perl, Martel, Pasmans, Lötters, Mutschmann, Schmeller, Schmidt, Veith, Wagner, Vences, Steinfartz (2015). First detection of the emerging fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* in Germany. *Amphibia-Reptilia*, 36: 4, 411 – 416.

Savage, Zamudio (2016). Adaptive tolerance to a pathogenic fungus drives major histocompatibility complex evolution in natural amphibian populations. *Biological Sciences*, 283(1827).

Simoncelli, Fagotti, Dall'Olio, Vagnetti, Pascolini, Di Rosa (2005). Evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection in Water Frogs of the *Rana esculenta* Complex in Central Italy. *EcoHealth*, 2:307.

Skerratt, Berger, Speare, Cashins, McDonald, Phillot, Hines, Kenyon (2007). Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth* 4:125-34.

Societas Herpetologica Italica, Norme di comportamento per limitare la diffusione di patologie tra gli Anfibi, <http://www-3.unipv.it/webshi/conserv/monitanf.htm#Norme> (18.1.2018).

Spitzen-van der Sluijs, Martel, Asselberghs, Bales, Beukema, Bletz, Dalbeck, Goverse, Kerres, Kinet, Kirst, Laudelout, Marin da Fonte, Nöllert, Ohlhoff, Sabino-Pinto, Schmidt, Speybroeck, Spikmans, Steinfartz, Veith, Vences, Wagner, Pasmans, Lötters (2016). Expanding Distribution of Lethal Amphibian Fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. *EID* 22-7.

Stegen, Pasmans, Schmidt, Rouffaer, Van Praet, Schaub, Canessa, Laudelout, Kinet, Adriaensen, Haesebrouck, Bert, Bossuyt, Martel (2017). Drivers of salamander extirpation mediated by *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Nature* 544, 353–356.

Stofler, Poznanski, Plasinger, Barbacetto, Ligazzolo, Imperiale, Di Cerbo, Kranebitter, Glaser, Declara, Lösch, Stenico (2016). *Batrachochytrium dendrobatidis* in popolazioni di anfibi dell'Alto Adige in: Museo scienze naturali dell'Alto Adige, 9° convegno Ricerca zoologica e botanica in Alto Adige, 50-51.

Sztatecsny, Glaser (2011). From the eastern lowlands to the western mountains: First records of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild amphibian populations from Austria. *Herpetological Journal*, 21(1):87-90.

Touratier (1992). Première apparition en France (région Aquitaine) d'une grenouille géante américaine: *Rana catesbeiana* en voie d'acclimatement. Intérêt zoologique et impact éventuel sur l'environnement. *Bulletin mensuel de la Société vétérinaire pratique de France*, 76:219-228.

Van Rooij, Martel, Haesebrouck, Pasmans (2015). Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. *Veterinary research*, 46:137.

Van Rooij, Pasmans, Coen, Martel (2017). Efficacy of chemical disinfectants for the containment of the salamander chytrid fungus *Batrachochytrium salamandrivorans*. *PLOSone* 12(10): e0186269.

Voyles, Young, Berger, Campbell, Voyles, Dinudom, Cook, Webb, Alford, Skerratt (2009). Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*, 326(5952):582-585.

Voyles, Johnson, Rohr, Kelly, Barron, Miller, Minster, Bree Rosenblum (2017). Diversity in growth patterns among strains of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* across extended thermal optima. *Oecologia* 184:363–373.

Waldman, van de Wolfshaar, Klena, Andjic, Bishop, Norman (2001). Chytridiomycosis in New Zealand frogs. *Surveillance*, 28:9-11.

Warne, LaBumbard, LaGrange, Vredenburg, Catenazzi (2016). Co-Infection by Chytrid Fungus and Ranaviruses in Wild and Harvested Frogs in the Tropical Andes. *PLoS ONE*, 11(1):e0145864.

Weldon, du Preez, Hyatt, Muller, Speare (2004). Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases*, 10:2100-2105.

Woodhams, Alford, Briggs, Johnson, Rollins-Smith (2008). Life-history trade-offs influence disease in changing climates: strategies of an amphibian pathogen. *Ecology*, 89:1627-1639.

Yap, Nguyen, Serr, Shepack, Vredenburg (2017). *Batrachochytrium salamandrivorans* and the Risk of a Second Amphibian Pandemic. *EcoHealth* 851-864.

Young, Berger, Speare (2007). Amphibian chytridiomycosis: strategies for captive management and conservation. *International Zoo Yearbook*, 41:1-11.



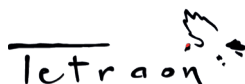
Südtiroler Herpetologen Verein
Associazione Erpetologica Altoatesina
Union di Erpatologs dl Südtirol

INDIRIZZO E CONTATTI:

Piazza Principale n.º 5,
I – 39040 Ora (BZ)
www.herpeton.it

Ivan Plasinger
ivanplasinger@yahoo.it
Cell: 3475431064

IN COLLABORAZIONE CON:



Tetraon

www.ilmondonascosto.com
ilmondonascosto@gmail.com



Reptiland

www.reptiland.it
info@reptiland.it



WWF - Sezione di Bolzano

robmaistri@libero.it
<https://www.fbolzano.wordpress.com/>



Naturtreff Eisvogel

www.eisvogel.it
info@eisvogel.it



Francesco Grazioli

www.microvita.it
francesco.grazioli@microvita.it



Comune di Ora

www.comune.ora.bz.it
info@comune.ora.bz.it

