

## LA CHITRIDOMICOSI NEGLI ANFIBI ITALIANI

### Chitridiomicosi e declino degli Anfibi

La chitridiomicosi è considerata, assieme alle infezioni di natura virale (Iridovirus, Chloriridovirus, Ranavirus) uno dei più importanti fattori di natura patologica in grado di spiegare i fenomeni di mortalità in massa di intere popolazioni di Anfibi osservati negli ultimi decenni in varie aree geografiche. Anche il declino di intere specie può essere in diversi casi ricondotto all'incidenza di queste forme patologiche. Numerose sono le ipotesi formulate per spiegare l'apparente aumento di recettività degli Anfibi alle patologie infettive degli ultimi decenni. L'azione combinata di vari fattori (variazioni climatiche, UV-B, pH, inquinamenti, fattori biotici) potrebbe aver influito sulla risposta immunitaria degli Anfibi rendendoli più esposti all'azione degli agenti patogeni. Allo stesso tempo è possibile che tra i microrganismi non patogeni si siano sviluppate forme patologiche, o che queste abbiano aumentato la loro virulenza e la loro diffusione nell'ambiente naturale (Nichols et al., 1998; Pessier et al., 1999; Berger et al., 1996; Speare, 1999; Speare & Smith, 1992; Speare et al., 1991, 1994, 1996; Scocciati, 2001).

La chitridiomicosi è un'infezione sostenuta da miceti appartenenti al phylum Chytridiomycota, ordine Chytridiales. Si tratta di funghi ubiquitari, che sono stati ritrovati in ambienti acquatici e nel suolo umido. In prevalenza sono organismi saprotrofici, che degradano cellulosa, chitina e cheratina.

Le forme parassite infettano protisti, piante, invertebrati e, tra i vertebrati, unicamente gli Anfibi.

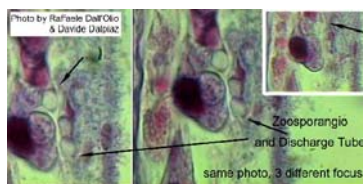
L'infezione da *Batrachochytrium dendrobatidis* avviene a opera di zoospore flagellate, solo attraverso il mezzo acquatico. È stato dimostrato che le zoospore possono sopravvivere a lungo (fino a 3-4 settimane) in acqua di rubinetto o deionizzata, e che in natura possono infettare gli anfibi anche 7 settimane dopo la loro immissione in acqua (JOHNSON & SPEARE, 2003). Non si ritiene che il fungo abbia forme di resistenza all'asciutto.

Gli Anfibi vengono colpiti da metamorfosati a livello del sistema tegumentario: i sintomi più evidenti sono a carico dell'epidermide e risultano costituiti da una muta anomala, accompagnata talora da ulcere, iperemia e piccole emorragie. L'esito letale viene attribuito alla reazione iperplastica dell'epidermide e alle sue conseguenze su respirazione e osmoregolazione cutanea, ma anche all'azione sistemica di tossine prodotte dal fungo.

Le larve degli Anfibi (girini), non possedendo uno strato corneo dell'epidermide, si infettano solo nelle parti boccali cheratinizzate e in modo asintomatico. Le uova non sono soggette all'infezione. Si leggano le notizie diffuse dal DAPTF ([DAPTF@open.ac.uk](mailto:DAPTF@open.ac.uk)) e da Richard Speare nel sito Amphibian Disease : ([www.icu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/](http://www.icu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/))

Fig. 1.

Ecco un'immagine di sezione di epidermide di un *Ulungone* appenninico, dove sono visibili degli zoosporangii vuoti di *Batrachochytrium dendrobatidis* ed il tubo di fuoriuscita delle zoospore.



Circa la metà delle specie colpite si trova in Australia.

In Europa l'infezione è segnalata dal 2000 in Germania, soprattutto in specie esotiche di Dendrobatidi e Iliidi importate dal Sud America, ma anche in popolazioni naturali di *Rana arvalis*. Sempre nel 2000 l'infezione è stata segnalata anche in Spagna, in popolazioni naturali di *Alytes obstetricans* (SPEARE & BERGER, 2000). È indubbio che la diffusione a livello globale dell'infezione, che si espande in media a una velocità di 100 km all'anno, sia principalmente dovuta alle traslocazioni e agli allevamenti di numerose specie di Anfibi operati a fini commerciali.

La prima segnalazione di Chitridiomicosi per l'Italia risale al giugno 2002, in occasione del IV Congresso Nazionale di Erpetologia organizzato dalla SHI a Ercolano (NA) (STAGNI et al., in stampa).

### Un'emergenza globale

Le prime segnalazioni dell'infezione da *Batrachochytrium dendrobatidis* a carico degli Anfibi sono molto recenti, risalendo alla fine degli anni '90. I primi casi documentati si riferiscono a esemplari di *Rana pipiens* raccolti nel 1974 in Nord America e a esemplari di varie specie raccolti a partire dal 1978 in Australia.

Circa un centinaio di specie appartenenti a 14 famiglie di Urodeli e Anuri risultano attualmente colpite da questa infezione in America, Europa, Africa, Australia e Oceania.

### I primi casi osservati in Italia

I primi casi di infezione da *Batrachochytrium dendrobatidis* in anfibi italiani sono stati diagnosticati nell'estate del 2001 su esemplari di *Ulungone* appenninico (*Bombina pachypus*) provenienti da popolazioni del territorio collinare della provincia di Bologna. Le osservazioni dell'infezione sono avvenute nel corso delle attività di conservazione effettuate dal **Centro Anfibi** di Pianoro (Bologna), nato nel 2000 nell'ambito del "Progetto Pellegrino LIFE Natura 1998", attivato dalla Provincia di Bologna e sostenuto dal programma LIFE Natura dell'Unione Europea.



Fig. 2. La prima segnalazione ufficiale in Italia di Chytridiomicosi ha riguardato una popolazione di *Bombina natchvusi* della provincia di Bologna (Foto V.Ferri)

Il **Centro Anfibi** ha avviato nel 2000 un programma di monitoraggio e conservazione delle specie di Anfibi di interesse comunitario maggiormente in declino e minacciate nel territorio appenninico bolognese, prima fra tutte l'*Ulungone* appenninico. Le poche stazioni riproduttive al momento note per la specie in tale territorio sono state assiduamente controllate e da esse sono stati prelevati uova, girini e neometamorfosati allo scopo di dare inizio a un programma di allevamento e riproduzione in ambiente controllato (*captive breeding*).

I neometamorfosati raccolti negli anni 2000 e 2001 in tali stazioni sono stati alloggiati presso il **Centro Anfibi** in piccoli contenitori di materiale plastico acquistati per l'occasione, quindi mai venuti a contatto in precedenza con altri anfibi. Entro una o al massimo due settimane dalla raccolta, tali individui hanno manifestato una sintomatologia caratteristica, contraddistinta da desquamazione dell'epidermide, difficoltà locomotorie, tendenza a portarsi all'asciutto, anoressia, a volte iperemia a livello delle dita. Il decorso è risultato sempre letale nell'arco di pochi giorni dalla comparsa dei primi sintomi. Per contro, si è verificato che diversi neometamorfosati raccolti a più riprese in altre stazioni dell'Appennino tosco-romagnolo (province di Ravenna, Firenze e Forlì-Cesena) negli anni tra il 2000 e il 2002 e allevati allo stesso modo, ma separatamente dai primi, non hanno in nessun caso contratto l'infezione. Nel 2002, inoltre, sono state raccolte alcune decine di uova nelle stazioni bolognesi: da esse sono stati ottenuti dei metamorfosati che sono stati allevati con successo, senza l'insorgenza di casi di infezione per circa un anno, fino al loro rilascio nelle stazioni di provenienza delle uova. L'infezione è dunque stata osservata esclusivamente in individui raccolti dopo la metamorfosi nelle stazioni della collina bolognese.

Tale dato ben si accorda con l'ipotesi della presenza dell'infezione nelle stazioni bolognesi e non in quelle romagnole, avvalorata altresì dai risultati del monitoraggio, che hanno evidenziato un preoccupante declino delle prime (costituite da pochissimi individui adulti e caratterizzate da una totale assenza di giovani e subadulti), contrapposto a un buono stato delle seconde, in cui sono stati censiti alcune decine di adulti e numerosi giovani di tutte le classi di età. La suddetta ipotesi è successivamente stata confermata attraverso test diagnostici condotti su neometamorfosati raccolti, in qualche caso già con evidenti sinomi di infezione o appena morti, nelle stazioni della collina bolognese. Tali test hanno confermato la presenza dell'infezione negli esemplari raccolti in tali stazioni.

In allevamento l'infezione è risultata quasi sempre letale per i neometamorfosati, mentre tra gli individui adulti e subadulti sono stati registrati casi sporadici, di cui solo alcuni con esito letale.

In natura, solo i neometamorfosati appaiono colpiti e decimati dall'infezione, mentre i pochi adulti presenti nelle stazioni infette sono risultati relativamente longevi. Il riconoscimento individuale di adulti e subadulti è stato ottenuto in modo certo mediante schedatura di ciascun esemplare accompagnata dalla fotografia del pattern ventrale.



Fig. 3. La carcassa di un anfibio anuro australiano, *Myxophyes fasciolatus*, morto per una chitridiomicosi cutanea. Si tratta di uno degli individui deceduti durante l'epidemia che ha colpito un gruppo in cattività. Non sono visibili vistose lesioni né segni di particolare emaciatezza.

### Tecniche diagnostiche utilizzate

La diagnosi dei casi di chitridiomicosi osservati nelle stazioni del bolognese e presso il **Centro Anfibi** è stata eseguita seguendo tre tecniche.

#### 1. Caratterizzazione genica

Come primo metodo di analisi si è scelto di utilizzare tecniche normalmente adottate in biologia molecolare, in particolare sfruttando la Reazione a Catena della Polimerasi (PCR) come strumento diagnostico.

Dopo l'estrazione del DNA totale dell'individuo, è possibile rilevare la presenza dell'organismo patogeno mediante l'utilizzo di sequenze oligonucleotidiche (primers) altamente specifiche (il principio è lo stesso adottato nelle analisi degli OGM).

Nel database genetico di riferimento (GenBank <http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/index.html>) è disponibile una sequenza (A.N. [AH009052](#)) relativa ad un tratto del gene 18S ribosomale RNA di *Batrachochytrium dendrobatidis*. L'analisi è stata quindi effettuata su questo tratto di gene e la prima sequenza prodotta è stata inserita nello stesso database (A.N. AY079001).

#### 2. Caratterizzazione istologica

Un altro test per diagnosticare la presenza dell'infezione micotica da *Batrachochytrium dendrobatidis* sfrutta le tecniche di istologia classica, così come descritte da BERGER, SPEARE & KENT (1999). La foto 1 riporta un'immagine di sezione di epidermide, dove sono visibili degli zoosporangii vuoti di *Batrachochytrium dendrobatidis* ed il tubo di fuoriuscita delle zoospore.

#### 3. Caratterizzazione immunocitochimica

Nel corso del 2003 i colleghi ricercatori del **CSIRO** Australian Animal Health Laboratory (<http://www.csiro.au/>) hanno prodotto anticorpi policlonali per test di immunolocalizzazione (la colorazione avviene mediante reazione di immunoperossidasi).

In collaborazione con l'Università di Perugia sono stati analizzati mediante questa tecnica, campioni di animali deceduti nel corso dell'anno 2003.

Particolari colorazioni mettono in evidenza in modo inequivocabile l'avvenuta reazione, che corrisponde alla presenza dell'infezione.

Sempre sfruttando questa metodica, si sta attualmente testando l'efficacia di diverse sostanze con potere antimicotico.

### Trattamenti terapeutici sperimentati

Gli esemplari in allevamento presso il **Centro Anfibi** colpiti dall'infezione sono stati trattati con buoni risultati con un antimicotico reperibile in commercio come curativo per le micosi nei pesci d'acquario (Sera Mycowert) ai dosaggi indicati, e con itraconazolo in sospensione allo 0,01% (preparazione commerciale: Sporanox, Janssen-Cilag spa).

Di questo potente antimicotico ad ampio spettro, la cui efficacia era già stata segnalata da NICHOLS e LAMIRANDE (2001), si stanno attualmente sperimentando gli effetti su gruppi di neometamorfosati di *Bombina pachypus* risultati positivi ai test diagnostici.

Non è al momento ipotizzabile la possibilità di effettuare trattamenti in ambiente naturale.

### Misure profilattiche da adottare

Onde prevenire i rischi di una possibile diffusione sul territorio della chitridiomicosi, è necessaria l'adozione di adeguate misure di profilassi. Tali misure corrispondono a quelle indicate nel **DAPTF** (Declining Amphibian Populations Task Force) Fieldwork Code of Practice:

([http://www.mpm.edu/collect/vertzo/herp/Daptf/fcode\\_e.html](http://www.mpm.edu/collect/vertzo/herp/Daptf/fcode_e.html)).

Nello specifico possono essere ricordate le seguenti norme di comportamento:

Pulizia e disinfezione sistematica delle attrezzature utilizzate sul campo (scarpe, stivali, retini, contenitori). Meglio ancora sarebbe l'utilizzo di materiali diversi per ogni sito visitato, in particolare qualora si tratti di siti molto distanti tra loro, abitati da specie diverse o da popolazioni di specie rare, minacciate o isolate tra loro.

Disinfezione degli strumenti e delle attrezzature di laboratorio che vengono utilizzati o messi a contatti con esemplari di Anfibi.

Per la disinfezione sono indicati l'ipoclorito di sodio (Amuchina al 5%) e l'alcool etilico. È necessario lasciare immersi gli attrezzi da disinfezzare per almeno 30 minuti.

Ridurre al minimo indispensabile il maneggiamento di animali durante le attività di ricerca o conservazione, mantenendo bagnata l'epidermide degli esemplari.

In caso di stabulazione temporanea di esemplari a scopo di studio o per iniziative di conservazione, alloggiare gli stessi in contenitori separati in base alla loro provenienza, evitando di alloggiare molti esemplari in uno stesso contenitore.

Evitare ogni traslocazione di esemplari da una località all'altra.

Lavare accuratamente le mani al termine del lavoro sul campo o utilizzare guanti monouso.

### Lavori citati

- BERGER L., SPEARE R., KENT A., 1999. Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histologic examination. World Wide Web file, <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chihisto.htm>, 20 November 1999.
- Berger L., Spare R. & Humfrey J., 1996 - Mucor amphibiorum in a free-ranging green tree frog, *Litoria caerulea*. Journal of Wildlife Diseases.
- JOHNSON M.L. & SPEARE R., 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: Quarantine and Disease Control Implications. Emerging Infectious Diseases, vol. 9, n. 8.
- NICHOLS D.K. & LAMIRANDE E.W., 2001. Successful Treatment of Chytridiomycosis. Froglog, 46-1.
- SCOCCIANTI C., 2001. Amphibia: aspetti di ecologia della conservazione [Amphibia: aspects of Conservation Ecology]. WWF Italia, Sezione Toscana. Editore Guido Persichino Grafica, Firenze: XIII+430pp., 70 figg.
- Speare R. & Smith J.R., 1992 - An iridovirus isolated from the ornate burrowing frog (*Lymnodynastes ornatus*) in northern Australia. Disease of Aquatic Organism, 14: 51-57.
- Speare R., Berger L., O'Shea P., Ladds P.W. & Thomas A.D., 1996 - The pathology of mucormycosis of free-ranging Cane toads (*Bufo marinus*) in Australia. Journal of Wildlife Diseases.
- Speare R., Thomas A.D., O'Shea P. & Shipton W.A., 1994 - Mucor amphibiorum in the cane toad, *Bufo marinus*, in Australia. Journal of Wildlife Diseases, 30: 399-407.
- Speare R., Freeland W.J. & Bolton S.J., 1991 - A possible iridovirus in erythrocytes of *Bufo marinus* in Costa Rica. Journal of Wildlife Diseases, 27: 457-462.
- SPEARE R., BERGER L., 2000. Global Distribution of Chytridiomycosis in Amphibians. World Wide Web file (11 November 2000). <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/chyglob.htm>
- STAGNI G., DALL'OLIO R., FUSINI U., MAZZOTTI S., SCOCCIANTI C. and SERRA A. Declining populations of Apennine yellow-bellied toad *Bombina pachypus* in northern Apennines, Italy: is *Batrachochytrium dendrobatidis* the main cause? Atti del IV Congresso Italiano di Erpetologia, Ercolano, Napoli (in stampa).

**Guglielmo Stagni**

Centro Anfibi, Piazza Garibaldi 1 - 40063 Pianoro (BO)

**Raffaele Dall'Olio**

Dipartimento di Biologia Evoluzionistica Sperimentale  
Università di Bologna

**Vincenzo Ferri**

Centro Studi Arcadia - "Progetto ROSPI - Toads Project"

30112003

### Le Aree di Rilevanza Erpetologica nazionale

Sono diventati 59 i siti italiani dichiarati quali Aree di Rilevanza Erpetologica nazionale (**ARE**) sulla base delle proposte di soci o referenti locali e le valutazioni della Commissione Conservazione della Societas Herpetologica Italica (CC).

Alla fine del 2003 è stato presentato dalla CC il Documento strategico per migliorare la valenza di questo progetto e dettare le linee guida per l'individuazione delle località e per la concessione di questo riconoscimento. È iniziato l'iter redazionale di un volume sulle "ARE" d'Italia, con l'inquadramento generale degli habitat italiani prioritari per l'erpetofauna, i problemi della loro conservazione e la presentazione dei siti più rappresentativi. L'elenco completo delle ARE è in linea sul sito della SHI: [www.unipv.it/webshi/conserv/](http://www.unipv.it/webshi/conserv/)

(V.Ferri, 09012004)



Le tabelle preparate e posizionate dal Comune di Somaglia (LODI) per delimitare il sito di Monticchie (pSIC) riconosciuto dalla CC SHI quale ARE ITA037 LOM007

### AD UN PASSO DALL'ESTINZIONE

L'Alligatore cinese (*Alligator sinensis*) probabilmente si estinguerà in natura entro i prossimi quindici anni. Un censimento nelle province orientali cinesi di Anhui e Zhejiang ha infatti provato che sopravvivono in una ventina di siti soltanto circa 150 esemplari adulti di questa specie.

L'autorità nazionale Forestale Cinese ha attivato un programma di conservazione in situ e di riproduzione protetta a Changxing County, (Zhejiang), dove sono presenti circa 1500 esemplari in cattività, approvando un progetto di 1,2 milioni di dollari. Contemporaneamente è stata emanata una severa normativa di protezione, ed è stato richiesto un aiuto internazionale per la salvaguardare degli habitat originari e per la sensibilizzazione del pubblico sull'importanza del rarissimo rettile.

(V.Ferri, 09012004)

### Monitoraggio dei risultati degli interventi condotti in Lombardia a favore di *Rana latastei* e *Pelobates fuscus insubricus*.

La Regione Lombardia ha finanziato, per il biennio 2004 e 2005, il monitoraggio dei risultati degli interventi condotti in Lombardia a favore di *Rana latastei* e *Pelobates fuscus insubricus* durante gli anni 1999 - 2002 in sei parchi regionali lombardi (Parco Ticino, Parco Adda Sud, Parco Agricolo Sud Milano, Parco del Serio, Parco Oglio Sud, Parco del Mincio). Si è tratto di interventi di miglioramento ambientale e, se necessario, di reintroduzione o *restocking* da noi realizzati con il coordinamento del Dipartimento di Biologia Animale dell'Università di Pavia e del Parco Adda Sud.

(S. Scali e A. Gentilli, 14012004)



© Commissione Conservazione **SOCIETAS HERPETOLOGICA ITALICA**  
n. 2 - gennaio 2004

per comunicazioni e/o informazioni scrivere a: [vincenf@tin.it](mailto:vincenf@tin.it)