



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



## **Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della Valle del Ticino Piemonte**

*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont

**LIFE00 NAT/IT/007233**



# **MONITORAGGIO SALUTE ANFIBI**

responsabile scientifico  
**Vincenzo Ferri**  
(e-mail: [vincenf@tin.it](mailto:vincenf@tin.it))

**Gennaio 2004**



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



## **INDICE**

<b>Introduzione</b>	<b>3</b>
<b>Descrizione dell’Azione di Progetto</b>	<b>5</b>
<b>Sommario delle attività svolte</b>	<b>6</b>
<b>Materiali e metodi</b>	<b>7</b>
<b>La Chytridiomicosi negli Anfibi italiani</b>	<b>10</b>
<b>Risultati delle analisi microbiologiche</b>	<b>19</b>
<b>Conclusioni</b>	<b>24</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>25</b>



## Introduzione

Da circa 20 anni gli Anfibi sono considerati il gruppo di Vertebrati più minacciato di estinzione (Barinaga, 1990; Beebee, 1973, 1992; Blaustein & Wake, 1990, 1995; Griffiths & Beebee, 1992; Pechmann et al., 1991; Pounds J. & Crump, 1994; Vitt et al., 1990; Wake, 1990) e su di essi si sono riversate le attenzioni del mondo conservazionistico con l'attivazione di programmi coordinati di studio e monitoraggio. Durante il Primo Congresso mondiale di Erpetologia svoltosi nel 1989 a Canterbury, in Gran Bretagna, si cominciarono a diffondere i risultati di ricerche probanti il declino mondiale di rane e rospi. Una diminuzione globale (da qui l'acronimo *G.A.D.* cioè Global Amphibian Decline) che non interessava soltanto i territori più soggetti alle tante attività negative dell'uomo, ma anche quelli più naturali, situati addirittura in aree pochissimo o nulla antropizzate. E' il caso della scomparsa relativamente recente (dal 1989) di *Bufo periglenes* nella foresta di Monteverde in Costa Rica (Crump et al., 1992; Pounds & Crump, 1994); dell'estinzione dal 1979 di *Taudactylus diurnus* e dal 1980 di *Rheobatrachus silus* in Queensland, Australia (Tyler, 1991) o della fortissima contrazione numerica a partire dal 1970 nello Wyoming di *Bufo hemiophrys baxteri* e dal 1980 di *Bufo boreas* sulla Sierra Nevada in California e in altri Stati USA.

A partire dal 1995 il *G.A.D.* diventa argomento di discussione anche al di fuori del mondo scientifico per le notizie di ritrovamenti in diversi Stati USA (Minnesota, Wisconsin, South Dakota, Vermont, California, Texas) e in Canada (Quebec) di anuri con gravi malformazioni. Certo esistono citazioni in letteratura di ritrovamenti di esemplari mostruosi di Anfibi già nel 1600, ma p.e. nel Minnesota, nel 1995, si sono scoperte popolazioni di *Rana pipiens* con quasi il 50% degli individui deformi, per mancanza o sovrannumero di zampe. La segnalazione di malformazioni allo stadio larvale o post-metamorfoico negli Anfibi si è andata drammaticamente intensificando negli ultimi anni e in diverse località del mondo. Pur essendo state accertate cause locali, come le parassitosi (p.e. in raganelle lungo la costa del Pacifico in California a causa di infestazioni di Trematodi - "flatworm" - del genere *Ribeiroia*, Johnson et al., 1999) diverse sostanze chimiche e le radiazioni UV-B (come nelle rane del Minnesota), non sono ancora noti i fattori interagenti alla base di questi fenomeni.

A partire dal primo riconoscimento del *G.A.D.* gli studi parassitologici e i monitoraggi della salute delle popolazioni di Anfibi hanno ricevuto una particolare attenzione. Come è evidenziato in Razzetti & Bonini (2002) questa "attenzione" ha poi significato l'evolversi di una nuova etica della ricerca scientifica per evitare che proprio gli specialisti si trasformassero in diffusori di nefaste epidemie. Negli ultimi anni diversi casi di epidemie virali sono stati riscontrati in popolazioni di Anuri europei; ricordiamo le segnalazioni di Pox-virus per *Rana temporaria* in Gran Bretagna (Cunningham et al., 1993, 1996) e di Herpesvirus in *Rana dalmatina* in Canton Ticino (Bollettino K.A.R.C.H. 1995; K.Grossenbacher *in litteris*, 1994) e nel Comune di Brescia (Bennati et al., 1996).

Più di recente è stato accertato come molte delle diminuzioni di popolazioni di Anfibi nel Centro America e in Australia sono dovute all'imperversare di epidemie fungine



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



epidermiche, Chytridiomicosi e mucormicosi (Nichols et al., 1998; Pessier et al., 1999; Berger et al., 1996; Speare et al., 1994, 1996; Speare, 1999) e di altre virosi, come Iridovirus (*Ranavirus* spp.) e Bohle Virus (Speare & Smith, 1992; Speare et al., 1991).

Diversi microorganismi (come alcune specie di funghi del gruppo delle Saprolegniacee) colpiscono anche le uova inficiando spesso il loro sviluppo e provocando una notevole riduzione delle schiuse.

Nel corso del 2002 la **Chitridiomicosi** è stata segnalata anche in Italia, in popolazioni di Ululone appenninico (*Bombina pachypus*) della provincia di Bologna (Ferri, 2002; Stagni et al., in press; Stagni, Dall'Olio & Ferri, 2004).

Per evitare che questa infezione possa causare epidemie in altre specie italiane è necessaria una vigilanza sanitaria continuativa da attuare con monitoraggi sanitari effettuati in collaborazione con gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, ma soprattutto l'applicazione precisa e continuativa di norme di comportamento da parte di quanti abbiano "contatti" con popolazioni naturali di Anfibi.

In Europa l'infezione è stata segnalata per la prima volta nell'anno 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 –secondo studi recenti- 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.

Sulla base di questi problemi e per verificare se la consistente diminuzione nell'ultimo decennio (dal 1995) delle osservazioni di Pelobati nell'area di Cameri (Novara) fosse causata da agenti patologici epidemici tra cui anche il terribile *Batrachochytrium dendrobatidis*, la prima parte (2002) del monitoraggio Salute delle popolazioni di *Pelobates* e degli altri Anfibi di Cameri (Azione A7a) si è concentrata sulla raccolta di dati epidemiologici e materiale bibliografico per chiarire la situazione italiana rispetto a questa patologia e di campioni istologici adatti per analisi microscopiche specifiche.

In una seconda fase (2003) sono state avviate le indagini epidemiologiche previste nell'Azione A7a, cercando di recuperare campioni analizzabili, provenienti da metodiche di campionamento incruente, in primo luogo di *Pelobates fuscus insubricus* e in seconda istanza di altre specie di Anfibi, in particolare di quelle sintopiche nella fase riproduttiva come *Bufo bufo* e *Rana kl. esculenta*.



## **Descrizione dell'Azione di Progetto**

Azione A.7a. **Monitoraggio salute popolazione larvale naturale di *Pelobates fuscus insubricus*.**

Obiettivi: per contribuire alla conoscenza dello status della popolazione di *P.f.i.* nell'Area oggetto del Progetto è necessario un monitoraggio sanitario a lungo termine della popolazione larvale (più facilmente rilevabile). Queste conoscenze permetteranno con maggiore sicurezza future iniziative di traslocazione verso il centro di allevamento dell'Oasi WWF di Bellinzago Novarese o i programmi di reintroduzione previsti in uno o più siti del territorio del Parco Ticino. Il monitoraggio salute ha anche lo scopo di rilevare tempestivamente azioni nefaste sulle larve causate da sostanze chimiche o da interventi colturali.

Materiali e metodi: I campionamenti saranno incruenti e verranno effettuati direttamente dal Coordinatore di Progetto o da un suo delegato. Le analisi micologiche e batteriologiche saranno effettuate sulle feci, sulle acque di stabulazione temporanea e sulle carcasse degli esemplari rinvenuti schiacciati sulle strade o comunque morti. Le analisi saranno effettuate presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sede di Brescia, attivando una ricerca di tesi in Scienze Biologiche in collaborazione con il Dipartimento di Biologia Animale dell'Università di Milano.

Risultati attesi: Il monitoraggio salute servirà a conoscere i microorganismi ospiti, con o senza implicazioni patologiche, delle larve di *Pelobates*, in contemporanea con la caratterizzazione microbiologica delle acque abitate. Questi dati eviteranno traslocazioni in ambienti a rischio o convivenze deleterie negli stabulari di allevamento semi-naturali o artificiali.

I controlli effettuati durante i campionamenti potranno attivare tempestive azioni di salvataggio nel caso di minacce al normale sviluppo larvale in-situ.



## Sommario delle attività svolte

Tra il 2001 e i primi mesi del 2002 sono state raccolte tutte le informazioni disponibili sulle patologie degli Anfibi europei.

L'A. dal 1994 fa parte del Gruppo di Lavoro "Monitoraggio Salute Anfibi" della Societas Herpetologica Italica e collabora con i ricercatori e i tecnici dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) per la Lombardia ed Emilia Romagna, Sezione di Brescia, per formalizzare opportuni protocolli diagnostici per l'analisi ed il riconoscimento dei microrganismi patogeni di Anfibi e Rettili. Per queste ricerche l'A. è stato nominato nel 2001 responsabile dell'Italian Working Group del D.A.P.T.F.

Nel mese di aprile del 2001 l'A. ha selezionato insieme al Dr. A.Lavazza dell'I.Z.S., alla Prof.essa W.Ponti dell'Istituto di Microbiologia della Facoltà di Veterinaria dell'Univ. di Milano (relatrice) e alla Sig.ra C.Soccini del Centro Studi Arcadia, una studentessa (Marina Cadeo di Brescia) che potesse occuparsi della raccolta ed analisi di campioni vari per ricerche epidemiologiche su piccoli vertebrati acquatici (Cadeo, 2003).

Le metodiche seguite sono quelle stabilite nell'ambito di uno studio epidemiologico precedente completato nel 2000 da Nieddu Daniela (e riguardante completamente *Trachemys scripta elegans*). Il protocollo d'indagine è stato completato nel corso del 2002, affinandolo ancora sui Cheloni (*Trachemys scripta elegans* ed *Emys orbicularis*) e sui primi campioni di Anfibi. La caratterizzazione istologica per diagnosticare la presenza dell'infezione micotica da *Batrachochytrium dendrobatidis* sfrutta le tecniche di istologia classica, così come descritte da BERGER, SPEARE & KENT (1999). Per queste ricerche e più in generale per quelle micologiche è stato interessato direttamente il Dr. L. Alborali, responsabile della Sezione Diagnostica dell'IZS e specialista di patologie dei pesci d'acqua dolce.

Dalla primavera del 2003 sono proseguite le analisi su campioni esclusivamente di Anfibi.

Nel 2001 sono stati esaminati nei laboratori dell'IZS i resti di tre adulti di *P.f.i.*, rinvenuti schiacciati nella primavera del 1999 sulla strada Valle Ticino di Cameri. Questi campioni erano stati raccolti e conservati in freezer dall'A.

Dati il tipo di conservazione, il lungo tempo trascorso dalla raccolta e le condizioni particolarmente critiche di questi campioni (notevole schiacciamento da parte dei veicoli) non è stato possibile utilizzarli per analisi microbiologiche. Gli stessi hanno invece permesso la caratterizzazione istologica per la ricerca di *Batrachochytrium* attraverso l'esame microscopico di piccoli lembi epidermici. L'esito è stato negativo e ciò permette con buona probabilità di escludere tale infezione (fino all'anno 1999) dalla popolazione di *Pelobates fuscus insubricus* di Cameri. (Fig. 2).

Il ritrovamento di 6 girini di *P.f.i.* nel mese di maggio del 2001, nella risaia "Aereonautica", di proprietà del coltivatore Fincato, ha permesso le prime analisi microbiologiche su materiali biologici ottenuti senza danneggiare fisicamente gli esemplari (raccolta delle feci e dell'acqua di stabulazione).



Nel corso del 2002 la disponibilità di adulti e girini è stata purtroppo inferiore alle aspettative e i campioni ricevuti dagli incaricati dei monitoraggi e delle ricerche di campo non sono risultati idonei e confrontabili in quanto gli animali disponibili erano stati tenuti per un certo periodo prima dei prelievi in vaschette di stabulazione riempite con acqua di rubinetto (e non come previsto dall'acqua del sito di cattura).

La difficile situazione climatica 2002 e 2003, che anno reso ancora più eccezionale il ritrovamento di adulti e larve di *Pelobates*, hanno imposto una seria riconsiderazione delle modalità di attuazione del Monitoraggio salute.

Il raro ritrovamento di adulti di *P.f.i.* (soltanto una decina di esemplari nel biennio) e la quasi assenza di loro larve nelle risaie hanno portato alla decisione di effettuare le indagini epidemiologiche su altri Anfibi sintopici. Nel 2003 pertanto le ricerche hanno riguardato adulti di *Bufo bufo* (sulla base di tamponi cloacali) e larve di *Rana kl. esculenta* (sulla base delle feci). I rospi comuni, infatti, si portano all'acqua delle risaie contemporaneamente ai pelobati e depongono le uova più o meno nelle stesse zone; le larve di rana esculenta convivono con quelle di *P.f.i.* ed hanno dimensioni appena inferiori.

## **Materiali e metodi**

### Metodi di campionamento

Gli adulti di Anfibi studiati sono stati catturati direttamente con le mani e subito sottoposti a campionamento con prelievo di materiale fecale utilizzando un sottilissimo bastoncino cotonato, interno alle provette-tampone sterili contenenti appropriati terreni di trasporto, che è stato strofinato intorno all'area cloacale o inserito con estrema cautela nel primissimo tratto cloacale.

La cattura dei girini di Anfibi è avvenuta invece per mezzo di un retino con manico (profondità cm 65, telaio cm 50x60, maglie di 0,5 cm e lunghezza del manico cm 229). Immediatamente dopo la cattura ogni esemplare è stato immerso in una piccola vaschetta della capacità di circa 500 cc, contenente acqua prelevata nello stesso punto della cattura, per una quantità al massimo di circa 200 cc. I girini sono stati lasciati in un punto fresco e ombreggiato per circa 1 ora; a questo punto per ogni esemplare sono stati prelevati con una pipetta i materiali fecali giacenti sul fondo o ancora attaccati alla cloaca e infilati nello stesso tipo di provette-tampone sterili utilizzate per i tamponi cloacali; una parte del liquido di "stabulazione" è stata schizzata in un'altra provetta-tampone.

Tutte le attrezzature usate per ciascun soggetto e ciascun prelievo erano state preventivamente sterilizzate con una immersione totale per più di 30 minuti in alcool al 70%

I campioni sono stati spediti immediatamente al laboratorio o, quando non possibile, sono stati conservati ad una temperatura di 4°C fino alla consegna (Nieddu, 2000).

Dopo il prelievo a scopo sanitario, ogni individuo è stato:

- negli adulti- misurato (peso, lunghezza corpo, lung.h.capo, largh.capo) e sessato;  
nelle larve- riconosciuto il grado di sviluppo secondo Gossner (1960) e misurato (peso, lunghezza corpo e coda).



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



E' stato poi effettuato un Esame Obiettivo Generale ed evidenziati eventuali segni distintivi; a questa indagine, basata unicamente sull'ispezione delle condizioni fisiche, della reattività del soggetto e dei sintomi di affezioni ed infezioni sono seguite le analisi batteriologiche, realizzate dalla sezione diagnostica dell'IZS Sede di Brescia.

Tutte le informazioni riguardanti ogni singolo individuo sono state raccolte in una scheda personale. Al termine del prelievo e delle misurazioni –cercando sempre di stressare il meno possibile l'esemplare- tutti gli animali sono stati rilasciati nel punto di cattura.

Per quanto riguarda i soggetti rinvenuti morti in ambiente naturale per qualsiasi motivo sono stati conservati in vaschette di alluminio ad una temperatura non superiore a 4°C fino alla consegna all'IZS per essere sottoposti, dopo ispezione esterna, ad analisi autoptica. Sulla base dei riscontri anatomico-patologici, il materiale patologico è stato poi oggetto di analisi microbiologiche, virologiche e parassitologiche, secondo le procedure e le tecniche previste nei Reparti di Diagnostica, Batteriologia specializzata, Microbiologia e Microscopia elettronica dell'IZS.

#### Metodi di analisi

#### **Esame batteriologico**

Per la ricerca batteriologica, il campione viene seminato direttamente su Agar-sangue e Gassner. Trattandosi di animali ectotermi, le piastre vengono incubate in condizioni variabili di temperatura e per tempi oscillanti tra le 24 e le 48 ore. Per la ricerca di *Salmonella* spp. invece, vengono utilizzati terreni di pre-arricchimento, quali acqua peptonata e brodo di Preuss/Rappaport, per ottenere lo sviluppo iniziale delle stesse e l'inibizione della crescita di eventuali saprofiti, sempre presenti data la natura dei campioni analizzati.

Successivamente la procedura prevede la semina su terreni differenziali specifici per tali microorganismi (piastre di Gassner). Con una certa frequenza, dopo il periodo d'incubazione, nelle piastre si possono osservare altre colonie diverse per dimensione, forma e colore, generalmente elementi rappresentanti della normale flora microbica del soggetto o contaminanti ambientali.

Pertanto, dopo il primo isolamento, è necessaria l'esecuzione delle sub-colture a partire da quelle colonie ritenute più significative e rappresentative dell'intera piastra.

Ottenuta la coltura pura, su una nuova piastra di Agar-sangue, si osservano le caratteristiche morfo-colturali della stessa. Si procede, poi, a successive prove biochimiche più specifiche, sia in macro che in micrometodo.

L'identificazione degli enterobatteri e non-enterobatteri viene effettuata fino alla definizione della specie, utilizzando sistemi di identificazione da tempo disponibili in commercio (p.e. "API-20E, "API-20NE" e Bio-Mériéux) e terreni selettivi e differenziali.



## **Esame virologico**

Per la diagnostica virologica diretta, sono utilizzati metodi di Microscopia Elettronica a Trasmissione in colorazione negativa, eseguiti direttamente su sospensioni acquose di organi e tessuti, secreti ed escreti. Il campione, dopo omogeneizzazione e/o sospensione in acqua deionizzata ad opportuna diluizione, viene congelato e scongelato ripetutamente al fine di disgregare ulteriormente le cellule, facilitando la liberazione nella sospensione dell'eventuale virus. La sospensione è centrifugata due volte a basso numero di giri (6000 e 10000 per 20 minuti) per allontanare i detriti più grossolani.

Una piccola quantità (80 µl) del secondo surnatante così ottenuto, viene caricato in microprovette portanti specifici *adapters*, nei quali sono alloggiati griglie in rame rivestite di *formvar*, in modo tale che su di esse avvenga il pellettamento durante la fase successiva di ultracentrifugazione alla velocità di 80000 giri/minuto. La griglia estratta viene colorata negativamente con una soluzione al 2% del sale sodico dell'acido fosfotungstico (NaPT) per 1,5 minuti. Tale trattamento permette di osservare al TEM (*Transmission Electron Microscopy*) eventuali particelle virali e di identificarle su base morfologica. L'osservazione avviene utilizzando un TEM Philips CM10 operante a 80kV ad ingrandimenti variabili tra 13000 e 39000x.

Una tecnica di più rapida esecuzione è quella della goccia per flottazione, ma essa viene utilizzata solo come *screening* su campioni di tessuti cutanei (ulcere, croste, ecc.).

Essendo meno sensibile rispetto al metodo basato sull'ultracentrifugazione, infatti, tale tecnica è adatta a svelare infezioni virali caratterizzate da elevato titolo infettante, fatto abbastanza comune in caso di virus localizzate a livello cutaneo. Il materiale sottoposto ad esame viene omogeneizzato in mortaio in presenza di diluente. La griglia viene successivamente posta a flottare direttamente su una goccia di sospensione e dopo 15' di contatto viene opportunamente colorata ed esaminata al TEM con le stesse modalità riportate.

## **Esame parassitologico**

L'esame parassitologico diretto, eseguito sul prelievo di materiale fecale, viene svolto in modo differente in base al parassita da evidenziare:

- Protozoi flagellati e cigliati: 1-2 gtt. di campione + soluzione di Lugol;
- Uova di Nematodi e Cestodi: per flottazione con soluzione satura (1200N) di nitrato di sodio;
- Trematodi: per sedimentazione e centrifugazione.

## **La Chytridiomicosi negli Anfibi italiani**



Un fungo di recente identificazione, del genere *Batrachochytrium* (Longcore *et al.* 1999), Phylum Chytridiomycota, che infetta gli Anfibi è oggi considerato la principale causa di declino e di scomparsa di molte popolazioni di questi Vertebrati in Australia, Oceania, Centro e Sud America, Europa e America settentrionale (Berger *et al.* 1998, Pessier *et al.* 1999, Daszak *et al.* 1999). (Fig. 2).

I Chytridiomycota sono funghi ubiquitari, che sono stati ritrovati in ambienti acquatici e nel suolo umido. In prevalenza sono organismi saprotrofi, che degradano cellulosa, chitina e cheratina. Le forme parassite infettano protisti, piante, invertebrati e, tra i vertebrati, unicamente gli Anfibi.

*B.dendrobatidis* –la specie in questione- ha una bassa specificità e può probabilmente infettare qualsiasi specie di Anfibi, anche quelle più terrestri. Si trasmette attraverso zoospore flagellate che richiedono acqua come mezzo di spostamento. *B. dendrobatidis* ha una fase latente resistente alla disidratazione, ma le zoospore e gli zoosporangi sono uccisi con l'essiccamento. 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).

E' stato provato che *B.dendrobatidis* si sposta naturalmente attraverso gli ambienti in modo indipendente dalle attività umane e che la misura media di questi spostamenti è di circa 100 Km l'anno.

Una volta accertato in un'area *B.dendrobatidis* può essere individuato con facilità in tutta l'area.

*B.dendrobatidis* può crescere e moltiplicarsi senza incidere sulla salute di Anfibi stabulati in laboratorio; ma è un patogeno capace di una elevata morbilità e mortalità sugli Anfibi in cattività e su alcune specie in natura.

Probabilmente *B.dendrobatidis* può moltiplicarsi in natura anche senza la perdita di animali o l'evidenza di un'epidemia su Anfibi.

Le larve di Anfibi sono rapidamente infettate da *B.dendrobatidis*, non possedendo uno strato corneo dell'epidermide, si infettano solo nelle parti boccali cheratinizzate e in modo asintomatico. Sono però noti danni importanti al disco corneo orale (Fellers *et al.*, 2001, vedi parte del lavoro in allegato).

Lo spostamento delle larve in una zona umida porta alla dispersione locale del *B.dendrobatidis*. Le uova non sono soggette all'infezione.

Non è completamente chiarito il perché la Chytridiomicosi porti alla morte un Anfibio infestato.



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
 LIFE00 NAT/IT/007233



**girino di *Rana muscosa***

foto a) Normal mouthparts are black in color, in the closeup you can see tooth rows and very black jaw sheaths.

foto b)

An example of a tadpole that has lost the color rows but still has some black on the jaw sheaths.

Fellers et al. (2001) recently found that conspicuous oral disc abnormalities including depigmented to swollen labial papillae (along the margins of the oral disc) are strongly associated with *Batrachochytridiomycosis* tadpoles b) and c) showed no sign of chytridiomycosis. This suggests that a lack of pigmentation in field and laboratory surveys provide evidence for a seasonal trend in mouthpart pigmentation in *R. muscosa*. Found in populations that have undergone declines, it would still be prudent for herpetologists to continue to monitor the [spread](#) of this disease, as suggested by Fellers et al. (2001) and Vredenburg and Summers (2001), until a

Fellers, Gary M., D. Earl Green, and Joyce E. Longcore. 2001. Oral Chytridiomycosis in Mountain Yellow-Legged Frog.

Vredenburg, V. T., and A. P. Summers. 2001. Field identification of Chytridiomycosis in *Rana muscosa* (Camp 19



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 cutanee, ma anche all'azione sistemica di tossine prodotte dal fungo (Fig. 1).

I segni clinici di Chytridiomicosi negli Anfibi giovani ed adulti includono: manifestazioni neurologiche (posture anomali, zampe posteriori tenute molto incassate sui fianchi, riflessi di attenzione e di fuga inibiti o assenti, comportamenti anormali come lo stazionamento alla luce del sole di specie notoriamente a costumi notturni), segni epidemici (superficie della pelle anormalmente rugosa o con rilevamenti reticolari), morte improvvisa. Nei metamorfosati colpiti si osserva una caratteristica desquamazione dell'epidermide, difficoltà locomotorie, la tendenza a portarsi all'asciutto, anoressia, a volte iperemia a livello delle dita. Il decorso è sempre letale nell'arco di pochi giorni dalla comparsa dei primi sintomi.

Non è noto se qualche Anfibio sia capace di superare e guarire dall'infezione con *B.dendrobatidis*.

E indubbio che alcuni fattori ambientali sembrano determinare la severità dell'infezione e tra esse le basse temperature, alle quali la Chytridiomicosi sembra colpire con forte virulenza.

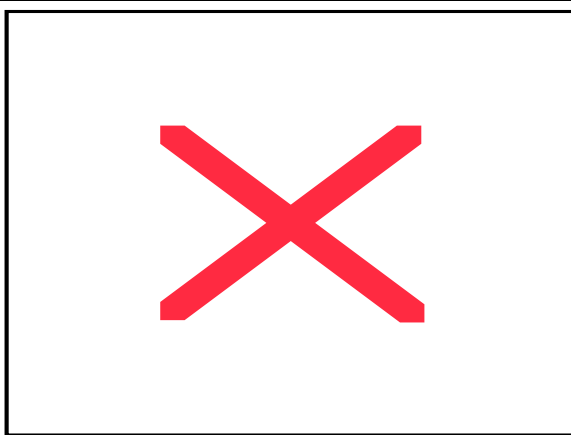


Fig. 1. La carcassa di un anfibio anuro australiano, *Myxophyes fasciolatus*, morto per una chitridiomicosi cutanea. Si tratta di uno degli individui deceduti durante l'epidemia che ha colpito un gruppo in cattività. Non sono visibili vistose lesioni né segni di particolare emaciatezza. Questa foto e la seguente sono riprese dal lavoro di P. Daszak e colleghi (1999).

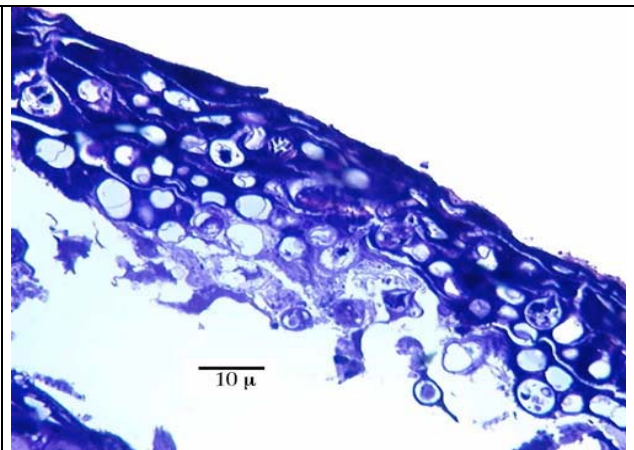


Fig. 2. Pelle delle dita di un Anfibio infetto con chitridiomicosi. Numerosi vacuoli sono visibili tra le cellule cheratinizzate dell'epidermide. Alcuni di questi contengono sottili pareti (septa) – una caratteristica frequente nello sviluppo degli sporangi di *Batrachochytrium*. Altre cellule contengono sporangi ben sviluppati a forma di fiasco.



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



Le infezioni di Chytridiomicosi segnalate riguardano popolazioni di Anfibi di sei continenti : Africa, Sud America, Centro e Nord America, Australia, Oceania e Europa. La prima segnalazione ha riguardato nel 1974 *Rana pipiens* del Nord America. Attualmente è stata diagnosticata l'infezione di *Batrachochytrium dendrobatidis*. in due Ordini di Anfibi (Anuri e Caudati), di 15 Famiglie e di 94 specie. Il maggior numero di specie colpite è in Australia (46).

Per quanto riguarda l'Europa le segnalazioni riguardanti popolazioni di specie selvatiche sono molto limitate (*Alytes obstetricans* in Spagna, *Rana arvalis* in Germania e *Bombina pachypus* in Italia) mentre sono diverse quelle riguardanti Anfibi importati per la terraristica (a dimostrazione del rapporto esistente tra traffico di Anfibi e diffusione globale della Chytridiomicosi).

**Tab. 1. SEGNALAZIONI UFFICIALI PER L'EUROPA DI CHITRIDOMICOSI**

<b>ITALIA</b>	Le segnalazioni riguardano alcune piccole popolazioni di Ululone appenninico ( <i>Bombina pachypus</i> ) della provincia di Bologna (Emilia Romagna, Italia settentrionale). La notizia è stata data ufficialmente nel mese di giugno 2002 al IV° Congresso della <i>Societas Herpetologica Italica</i> , a Ercolano (Stagni et al., in press).		
<b>ANURA</b>			
<b>Bombinatoridae</b>			
<i>Bombina pachypus</i>	dintorni di Bologna	2001	Stagni et al., in press
<b>GERMANIA</b>	Tutte le segnalazioni per la Germania hanno riguardato esemplari di Anfibi importati dal Costa Rica, dal Surinam, dal Perù o dagli Stati Uniti. Uniche popolazioni selvatiche colpite: <i>Rana arvalis</i> presso Berlino nel 1999 (Mutschmann, 2000)		
<b>ANURA</b>			
<b>Dendrobatidae</b>			
<i>Dendrobates galactonotus</i>	Captive bred in Germany	2000	Mutschmann, 2000
<i>Dendrobates auratus</i>	Berlin (captive bred)	November 1999	Mutschmann, 2000
<i>Dendrobates granulatus</i>	Imported from Costa Rica, Panama via Canada	2000	Mutschmann, 2000
<i>Dendrobates lugubris</i>	Captive bred in Germany	2000	Mutschmann, 2000
<i>Dendrobates pumilo</i>	Berlin (imported from Costa Rica)	November 1999	Mutschmann, 2000
<i>Dendrobates terribilis</i>	Origin not reported	2000	Mutschmann, 2000
<i>Dendrobates tinctorius</i>	Imported from Surinam via Canada	2000	Mutschmann, 2000
<i>Phyllobates bicolor</i>	Berlin (captive bred)	November 1999	Mutschmann, 2000
<i>Phyllobates lugubris</i>	Berlin (captive bred)	November 1999	Mutschmann, 2000
<i>Phyllobates vittatus</i>	Imported from French Guayana	2000	Mutschmann, 2000
<b>Hylidae</b>			
<i>Agalychnis callydrias</i>	Captive bred in Germany	2000	Mutschmann, 2000
<i>Hyla punctata</i>	Imported from Peru	2000	Mutschmann, 2000
<i>Litoria caerulea</i>	Pet trade in Germany	2000	Mutschmann, 2000
<i>Phyllomedusa bicolor</i>	Pet trade in Germany	2000	Mutschmann, 2000
<b>Ranidae</b>			
<i>Rana arvalis</i>	Wild frogs near Berlin	1999	Mutschmann, 2000
<b>CAUDATA</b>			
<b>Amphiumidae</b>			
<i>Amphiuma tridactylum</i>	Pet trade (imported from USA)	2000	Mutschmann, 2000
<b>Proteidae</b>			
<i>Necturus maculosus</i>	Pet trade (imported from USA)	1999	Mutschmann, 2000
<b>Sirenidae</b>			
<i>Siren lacertina</i>	Pet trade (imported from Georgia, USA)	1999	Mutschmann, 2000
<b>Salamandridae</b>			
<i>Salamandra salamandra</i>	Captive bred (European Community)	2000	Mutschmann, 2000



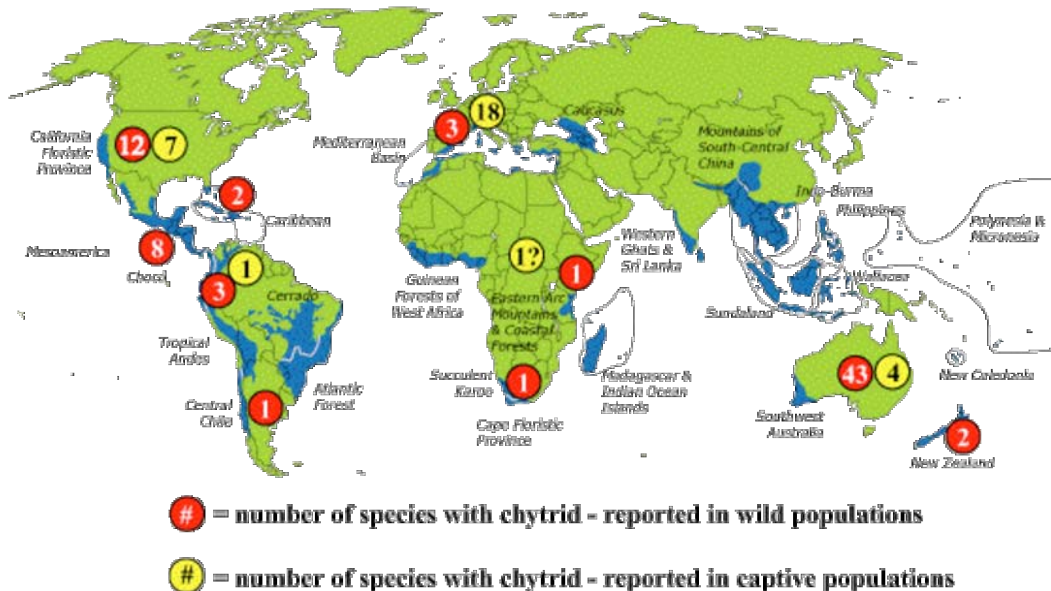
**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



**Tab. 2. SEGNALAZIONI UFFICIALI PER L'EUROPA DI CHITRIDOMICOSI**

<b>SPAGNA</b>	Le segnalazioni riguardano popolazioni selvatiche di <i>Alytes obstetricans</i> dei dintorni di Madrid		
<b>ANURA</b>			
<b>Discoglossidae</b>			
<i>Alytes obstetricans</i>	Peñalara Natural Park, near Madrid	1997-1999	<a href="#">Bosch, Martínez-Solano &amp; García-París (2000)</a>
<b>Bibliografia citata</b>			
Bosch, Jaime, Martínez-Solano, Iñigo and García-París, Mario. <a href="#">Chytridiomycosis in Spain: First European report of declines of wild amphibians associated with chytridiomycosis</a> . Report confirmed by Lee Berger.			
Daszak P., Berger L., Cunningham A.A., Hyatt A.D., Green D.E. & Speare, R. (1999). Emerging infectious diseases and amphibian population declines. <i>Emerg. Infect. Dis.</i> 5: 735-748 <a href="http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no6/daszak.htm">http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no6/daszak.htm</a>			
Mutschmann, Frank. (2000). Record from <a href="#">Dr Mutschmann</a> , Berlin. Report confirmed by Lee Berger.			
STAGNI G., DALL'OLIO R., FUSINI U., MAZZOTTI S., SCOCCIANI C. and SERRA A. Declining populations of Apennine yellow-bellied toad <i>Bombina pachypus</i> in northern Apennines, Italy: is <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> the main cause ? . Atti del IV Congresso Italiano di Erpetologia, Ercolano, Napoli (in stampa).			

## Global Distribution of Chytrid fungus



Background biodiversity hotspots map from Myers et. al., 2000. Nature 403:853-858 c/o Conservation International.  
 Copyright: J.-M. Hero, August, 2002. For information on sources contact: [m.hero@mailbox.gu.edu.au](mailto:m.hero@mailbox.gu.edu.au)



### Come riconoscere l'infestazione

Per quanto riguarda l'individuazione del *Batrachochytrium* attraverso una caratterizzazione istologica, come effettuato nel presente studio, riportiamo parte del lavoro di L. Berger, R. Speare e A. Kent: "*Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histologic examination. World Wide Web file, [www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chhisto.htm](http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chhisto.htm), 20 November 1999*".

---

*A newly identified chytrid fungus in the genus *Batrachochytrium* (Longcore et al. 1999) that infects amphibians and can cause death has been found in Australia, South America, Central America, Europa, Oceania and the North America (Berger et al. 1998, Pessier et al. 1999, Daszak et al. 1999). It has also been found in a small proportion of apparently healthy frogs and tadpoles (Berger et al. 1999).*

*The chytrid can be diagnosed by routine histology of skin specimens preserved in formalin or ethanol. Examination of unstained skin scrapings is a quick method, but requires greater expertise in identifying organisms. Chytrid culture from fresh specimens requires specialised methods (Longcore et al. 1999) and is difficult; so most diagnoses are made using histology.*

*Diagnosis using histology requires skills in microscopy, a knowledge of the morphology of the chytrid, a knowledge of normal histology of the skin, and an ability to differentiate the chytrid from other structures in the skin. The histology of the normal amphibian skin has been described by Patt and Patt (1970) and Green (1999). Pessier et al. (1999) describe the histological appearance of the amphibian chytrid, but this paper provides more detailed criteria so investigators unfamiliar with histopathology can make a diagnosis of chytrid infection.*

.....

*This technique may be used for surveying toe clips from wild and captive amphibians, surveying archived specimens, to test animals before translocation, and to determine the cause of mortality in the wild and in captivity so that appropriate management can be implemented.*

.....

*Healthy tadpoles can carry chytrids for months. Tadpole skin does not become infected as it is not keratinised, but chytrids may infect the keratinised mouthparts. Healthy infected tadpoles may be highly prevalent in a population and so sampling tadpoles is a sensitive way of assessing a location.*

---

Oltre alla caratterizzazione istologica (fig. 3) la diagnosi dei casi di chitridiomicosi osservati nelle stazioni del bolognese e presso il Centro Anfibi di Pianoro (BO) è avvenuta con l'uso di altre due tecniche:

### La caratterizzazione genica

Si tratta di tecniche normalmente adottate in biologia molecolare, in particolare sfruttando la Reazione a Catena della Polimerasi (PCR) come strumento diagnostico.

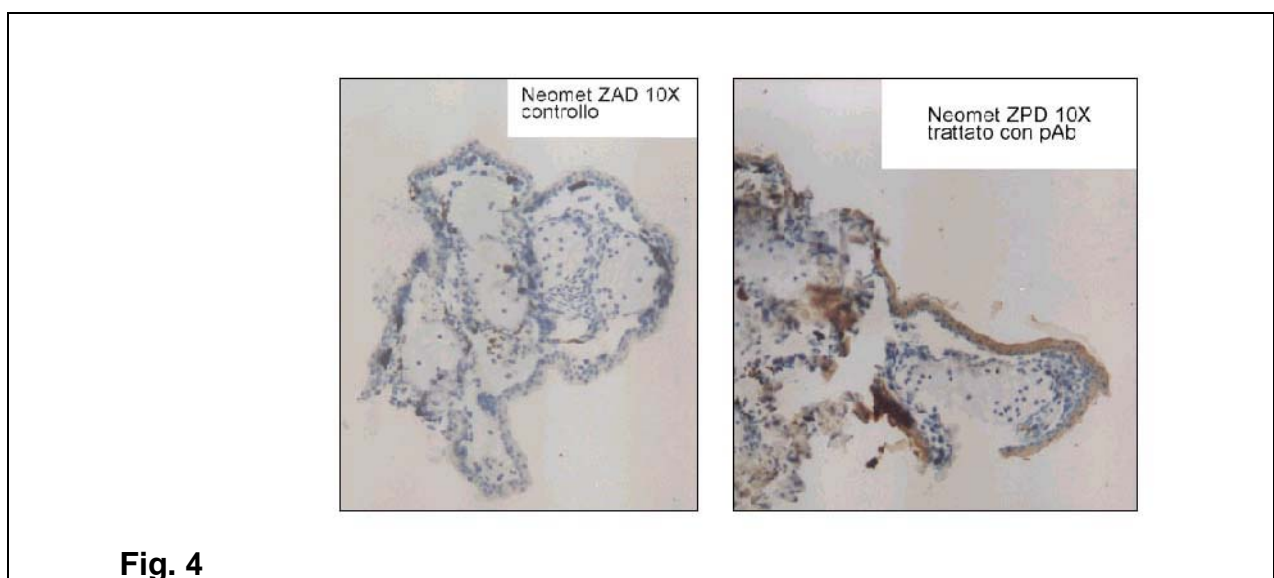
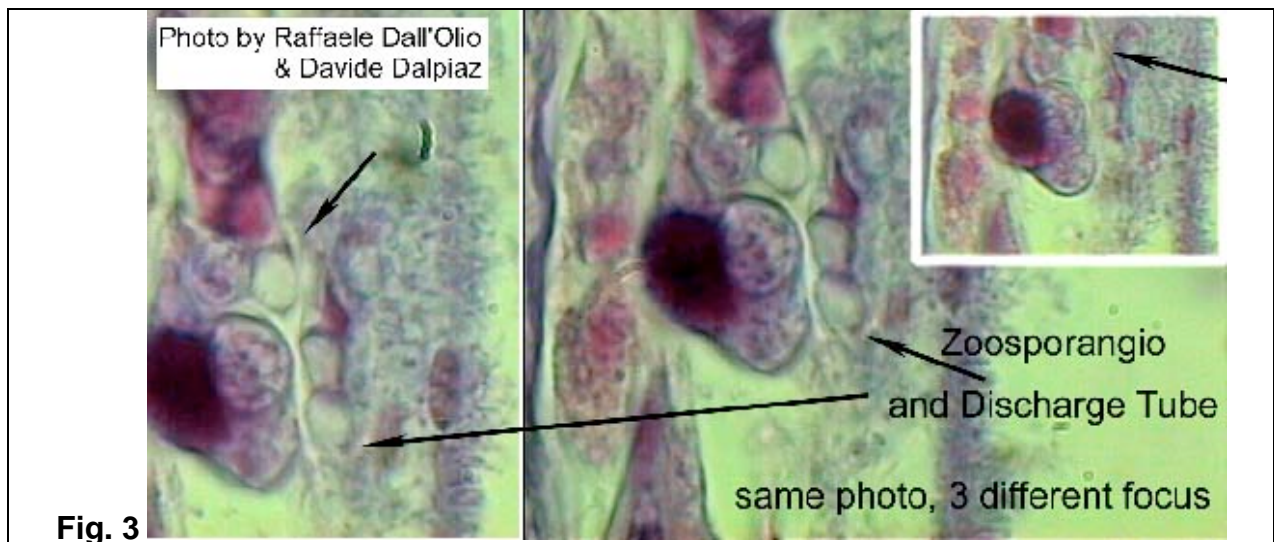
Dopo l'estrazione del DNA totale dell'individuo, è possibile rilevare la presenza dell'organismo patogeno mediante l'utilizzo di sequenze oligonucleotidiche (primers) altamente specifiche. Nel database genetico di riferimento (GenBank <http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/index.html>) è disponibile una sequenza (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).



### La caratterizzazione immunocistochimica

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 *Bombina pachypus* 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.





## **Cosa fare**

Per evitare il diffondersi della Micosi cutanea degli Anfibi e di altre epidemie sono state diffuse opportune linee guida come quella diffusa attraverso la rivista elettronica BufoNEWS (2002/1) ai volontari del Progetto ROSPI.

---

**Le squadre di volontari “salvarospi” dovrebbero poter disporre di un magazzino vicino al sito di salvataggio dove conservare tutte le attrezzature individuali. I volontari occasionali dovranno comunque rispettare le norme qui indicate.**

**In corso di salvataggi di Anfibi (come quelli nell’ambito del Progetto ROSPI) evitare, se possibile, di accumulare nello stesso recipiente un numero eccessivo di animali perché anche animali apparentemente sani possono essere portatori di malattie o parassitosi.**

**Evitare di maneggiare gli Anfibi con le mani completamente asciutte per non rimuovere il muco che ne ricopre l’epidermide. Trattenerli il meno possibile e in corso di misurazioni per fini biometrici, immergerne il corpo di tanto in tanto in un pò d’acqua pulita.**

**Disinfettare le attrezzature da campo (secchi, retini, sacchetti, strumenti di misura, stivali in gomma, impermeabili) prima di riutilizzarle. Sarebbe bene poter disporre di set di strumenti e materiali diversi per ogni sito studiato (specialmente in corso di monitoraggi a lungo termine) da pulire dopo ogni utilizzo.**

**La disinfezione deve essere particolarmente accurata nel caso si operi in località situate a notevole distanza tra loro e se frequentate da specie differenti. Ancora di più se lo studio riguarda specie rare, minacciate e località molto isolate.**

**Per disinfettare le attrezzature è possibile utilizzare una soluzione di Amuchina al 5% (reperibile a basso prezzo in farmacia) o, più semplicemente, candeggina o alcool denaturato (soluzione di etanolo al 70%). E’ necessario però immergere gli attrezzi ed i materiali completamente e lasciarli nel liquido disinfettante almeno 30 minuti. Dopo la disinfezione risciacquare bene per eliminare i residui del disinfettante. È anche importante lavarsi accuratamente le mani prima di spostarsi da un sito all’altro.**

**Fermo restando che il prelievo di animali selvatici è sempre un’azione eticamente discutibile, evitare di porre negli stessi contenitori Anfibi provenienti da diverse località; cercare di evitare anche i contatti indiretti (attraverso strumenti, materiali e alimenti).**

---

## **Trattamenti terapeutici sperimentati**

Gli esemplari di Ululone appenninico in allevamento presso il Centro Anfibi di Pianoro (BO) e 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.



### **Chytridiomicosi e *Pelobates fuscus insubricus***

Nonostante la negatività delle indagini istologiche fino ad ora condotte su esemplari della popolazione di *Pelobates fuscus insubricus* di Cameri (NO) si cercherà di approfondire le conoscenze su questo potenziale infestante effettuando (a partire dal 2003) ricerche microscopiche approfondite su qualsiasi esemplare di *P.f.i.* piemontese che sia stato collezionato e conservato in passato nelle collezioni erpetologiche dei musei italiani. I Chytridi sono prevalenti sulla superficie ventrale degli anuri e sui piedi, specialmente sulle palmature. Essi possono essere rilevati in esemplari fissati in formalina al 10% o in alcool al 70%. Si tratta di campioni di pelle fissata preparati su vetrini istologici trattati con emotosilina ed eosina per essere esaminati per la ricerca dei funghi (come suggerito in web da R. Speare all'indirizzo: [www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chhisto.htm](http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chhisto.htm) ).

Va ricordato che se il Chytridium è un parassita primario, Speare e Berger ipotizzano che esso ha raggiunto la popolazione di Anfibi colpita ad un certo periodo e probabilmente molto prima del suo declino. L'ipotesi alternativa è che il fungo era sempre stato presente nella popolazione colpita e altri fattori gli hanno permesso di manifestarsi come agente patogeno.

Identificando quando la patogenità si è manifestata per la prima volta in una popolazione e le relazioni con la morte degli anuri, si spera di riuscire a:

1. ottenere dati per supportare una o l'altra ipotesi
2. determinare l'area e le popolazioni di anuri dove il fungo attualmente è presente
3. determinare la prevalenza del Chytride degli Anfibi in anuri "normali".



## Risultati delle analisi microbiologiche

Come detto in apertura i campionamenti per il Monitoraggio Salute hanno seguito il protocollo operativo disposto presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) per la Lombardia ed Emilia Romagna, Sezione di Brescia, in accordo con il Centro Studi Arcadia:

- tecniche di prelievo idonee e incruente, effettuate con la minima manipolazione e costrizione degli esemplari di Anfibi e Rettili studiati, se possibile in condizioni di asepsi, in modo da evitare possibili contaminazioni;
- utilizzo di tamponi sterili contenenti i terreni di trasporto più adatti ai diversi materiali da esaminare;
- invio immediato dei campioni diagnostici in laboratorio, ma se questo non risultava possibile la conservazione degli stessi a +4°C fino al momento della spedizione, che comunque è avvenuta nel più breve tempo possibile.

Il riepilogo dei risultati degli esami batteriologici effettuati sui tamponi cloacali di larve e adulti di *Pelobates fuscus insubricus* (N=8), *Bufo bufo* (N=17), *Hyla intermedia* (N=8) e *Rana kl. esculenta* (N=16), apparentemente sani, è riportato nelle Tabelle 3-15.

Nel periodo di Monitoraggio Salute 2001-2003, la percentuale di campioni con tipizzazioni positive (N=28) rispetto al totale degli esaminati (N= 49) è abbastanza elevata (57,14%). In alcuni casi sono stati isolati microrganismi interessanti per il loro ruolo di patogeni potenziali per gli Anfibi, come nel caso di *Aeromonas hydrophila*, possibile causa di una patologia ad importante morbilità e mortalità, la "red-legged disease", descritta anche in popolazioni italiane di Anfibi.

Per quanto riguarda le altre specie microbiche evidenziate, essendo comunemente presenti nell'apparato gastroenterico di questi Vertebrati come commensali, restano dei dubbi sul loro reale coinvolgimento quali agenti di infezione. Nella Tabella 4 sono riportati in dettaglio le specie tipizzate e la frequenza di isolamento delle stesse.

Sono invece riportati in Tab. 15, per confronto, i risultati delle analisi microbiologiche effettuate contestualmente sulle acque dei siti riproduttivi nell'area di Cameri.

Tab. 3. Monitoraggio Salute "Pelobates": dati relativi ai campioni esaminati (2001-2003)

materiale esaminato	numero campioni totale	campioni negativi	campioni positivi di interesse
Tamponi cloacali 2001-2003	49	21	28 (57,14%)



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



Tab. 4. Risultati delle tipizzazioni delle specie microbiche di interesse riguardanti gli Anfibi del territorio di Cameri (Novara).

Bacterial strain isolated	2001-2003		
	Total # of samples tested	Number of isolations	% out of total # of samples
<i>Aeromonas</i> spp.	49	4	8,16
<i>Escherichia coli</i>	49	19	38,78
<i>Staphylococcus</i> spp.	49	2	4,08
<i>Streptococcus</i> spp.	49	1	2,04
<i>Enterobacter agglomerans</i>	49	4	8,16
<i>Shigella</i> spp.	49	6	12,25
Flora microbica varia	49	5	10,20
<b>Totale tipizzazioni</b>		<b>41</b>	

Tabella 5. Risultati delle tipizzazioni delle specie microbiche di interesse riguardante *Pelobates fuscus insubricus* (N=6 larve 11.05.2001 N=2 adulti 03.2003).

N=8 tipizzazioni N=8	<i>Pelobates fuscus insubricus</i>	
	n° isolamenti	% sul totale
<i>Enterobacter agglomerans</i>	4	50,0
Flora microbica varia	4	50,0
nessuna tipizzazione	2	

Tabella 6. Risultati delle tipizzazioni delle specie microbiche di interesse riguardante *Bufo bufo* (N= 8 adulti 06.05.2003 N= 9 adulti 12.05.2003 ).

N= 17 tipizzazioni N=14	<i>Bufo bufo</i>	
	n° isolamenti	% sul totale
<i>Aeromonas</i> spp.	1	5,80
<i>Escherichia coli</i>	6	35,29
<i>Shigella</i> spp.	6	35,29
Flora microbica varia	1	5,80
nessuna tipizzazione	9	

Tabella 7. Risultati delle tipizzazioni delle specie microbiche di interesse riguardante *Hyla intermedia* (N=4 larve 30.06.2003 N=4 larve 01.07.2003 ).

N=8 tipizzazioni N=2	<i>Hyla intermedia</i>	
	n° isolamenti	% sul totale
<i>Aeromonas</i> spp.	1	12,50
<i>Escherichia coli</i>	1	12,50
nessuna tipizzazione	7	



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



Tabella 8. Risultati delle tipizzazioni delle specie microbiche di interesse riguardante *Rana kl. esculenta* (N=16 larve 07/09/14/16.07.2003).

N=16 tipizzazioni N=17	<i>Rana kl. esculenta</i>	
	n° isolamenti	% sul totale
<i>Aeromonas spp.</i>	2	12,50
<i>Escherichia coli</i>	12	75,00
<i>Staphylococcus ssp.</i>	2	12,50
<i>Streptococcus ssp.</i>	1	6,25
nessuna tipizzazione	3	

I microorganismi più frequentemente isolati sono risultati *Aeromonas spp.*, un batterio che, secondo quanto riportato in letteratura (vedi allegato 1) può essere responsabile di elevata morbilità e mortalità in popolazioni di Anfibi naturali (cosa dimostrata anche in popolazioni italiane di *Rana temporaria*), e in cattività, ed *Escherichia coli*.

Allegato 1: SCHEDA *Aeromonas sobria* ed *Aeromonas hydrophila* (Enterobacteriaceae)

Microorganismi Gram-negativi di forma bastoncellare, sia motili sia non-motili, anaerobi o aerobi facoltativi, ossidasi positivi, con metabolismo del glucosio sia respiratorio che fermentativo. Presentano caratteristiche comuni con *Pseudomonas* e con gli enterobatteri (Poli,1988). Questi batteri vengono isolati frequentemente nelle acque di superficie e nelle acque di rete, con un certo andamento stagionale. Sembra, infatti, che in acque clorate, la crescita di *Aeromonas* dipenda dalla temperatura e dalla concentrazione del cloro. È presente anche in assenza di *Escherichia coli* ed è difficile definire una relazione tra le sue densità e quelle degli indici di contaminazione fecale, in modo particolare in acque poco inquinate ed in acque potabili (trattate e non). Tradizionalmente si distingue tra *Aeromonas salmonicida*, specie psicrofila, ed *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* ed *Aeromonas caviae*, specie mesofile motili. In attesa, però, di una precisa e definitiva determinazione, si tende a riunire sotto il nome di "gruppo degli *A. hydrophila*" tutte le specie di *Aeromonas*. In questo genere sono presenti specie patogene per Anfibi (la "red-legged disease") e Pesci (*A. salmonicida* provoca una foruncolosi nella famiglia dei *Salmonidae*) (Poli,1988). *Aeromonas*, inoltre, sembra essere diretto responsabile dell'USD (*Ulcerative Shell Disease*) nelle testuggini, nelle quali provoca anche setticemia. Si localizza a livello delle gonadi e apparato respiratorio (Fudge, 2000). L'azione di questo batterio, in associazione con *Pseudomonas*, sembra interessare soprattutto soggetti stressati dal punto di vista termico; in questi casi, la patologia che si sviluppa è una dermatite necrotica (Pagliarini,1999). Alcuni genotipi sono ritenuti responsabili di certe patologie (infezioni cutanee e sistemiche) nell'uomo, tanto che l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha incluso questi batteri tra i potenziali agenti di gastroenteriti (Semproni & Bonadonna,2000).

Lara Rachowicz, Department of Integrative Biology, University of California, Berkeley, [larar@socrates.berkeley.edu](mailto:larar@socrates.berkeley.edu), August 20, 2002:

The bacterial pathogen characteristic of red-legged disease, *Aeromonas hydrophila*, was isolated in *Rana muscosa* in Kings Canyon National Park, California, and believed to be responsible for a massive die-off in 1979 (Bradford 1991), as well as implicated in die-offs of boreal toads (*Bufo boreas boreas*) (Carey 1993).

Bradford, D. F. 1991. Mass mortality and extinction in a high elevation population of *Rana muscosa*. *Journal of Herpetology* 25:369-377.

Carey, C. 1993. Hypothesis concerning the causes of the disappearance of boreal toads from the mountains of Colorado. *Conservation Biology* 7:355-362.



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



Tabella 9

<b>Analisi microbiologica delle acque di stabulazione - Risaia 1 Nembrini - 30.06.2003</b>				
UFC/ML	girino <i>Hyla</i>	girino <i>Hyla</i>	girino <i>Hyla</i>	girino <i>Hyla</i>
Carica batterica psicrofila totale	150	110	50	500
Coliformi totali	assenti	40	assenti	assenti
Stafilococchi	assenti	assenti	assenti	assenti
Streptococchi	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Miceti	assenti	assenti	assenti	assenti
<i>Aeromonas</i>	n.r.	10	n.r.	n.r.

Tabella 10

<b>Analisi microbiologica delle acque di stabulazione - Risaia 2 Aeronautica - 01.07.2003</b>				
UFC/ML	girino <i>Hyla</i>	girino <i>Hyla</i>	girino <i>Hyla</i>	girino <i>Hyla</i>
Carica batterica psicrofila totale	700	350	400	230
Coliformi totali	assenti	assenti	assenti	assenti
Stafilococchi	assenti	assenti	assenti	assenti
Streptococchi	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Miceti	assenti	assenti	assenti	assenti
<i>Aeromonas</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

Tabella 11

<b>Analisi microbiologica delle acque di stabulazione - Laghetto Parco - 07.07.2003</b>				
UFC/ML	girino Rana verde	girino Rana verde	girino Rana verde	girino Rana verde
Carica batterica psicrofila totale	900	0,011	900	900
Coliformi totali	assenti	50	assenti	300
Stafilococchi	assenti	assenti	assenti	assenti
Streptococchi	assenti	assenti	assenti	assenti
Miceti	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Aeromonas</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



Tabella 12

UFC/ML	<b>Analisi microbiologica delle acque di stabulazione - Risaia 2 Aeronautica - 09.07.2003</b>			
	girino Rana verde	girino Rana verde	girino Rana verde	girino Rana verde
Carica batterica psicrofila totale	1800	3.000	3.000	1.100
Coliformi totali	20	assenti	assenti	60
Stafilococchi	assenti	20	assenti	assenti
Streptococchi	200	assenti	assenti	assenti
Miceti	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Aeromonas</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

Tabella 13

UFC/ML	<b>Analisi microbiologica delle acque di stabulazione - Stagno c/o canc. B.V. - 14.07.2003</b>			
	girino Rana verde	girino Rana verde	girino Rana verde	girino Rana verde
Carica batterica psicrofila totale	400	200	7.400	200
Coliformi totali	20	30	230	10
Stafilococchi	assenti	assenti	assenti	assenti
Streptococchi	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Miceti	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Aeromonas</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

Tabella 14

UFC/ML	<b>Analisi microbiologica delle acque di stabulazione - Risaia 1 Nembrini - 16.07.2003</b>			
	girino Rana verde	girino Rana verde	girino Rana verde	girino Rana verde
Carica batterica psicrofila totale	800	4.000	8.900	3.000
Coliformi totali	150	400	140	80
Stafilococchi	assenti	10	assenti	assenti
Streptococchi	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Miceti	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Aeromonas</i>	300	n.r.	n.r.	230



Tabella 15

	<b>Analisi microbiologica delle acque nei siti riproduttivi</b>			
	<b>H2O laghetto</b>	<b>H2O risaia 2</b>	<b>H2O stagno</b>	<b>H2O risaia 1</b>
<b>UFC/ML</b>	<b>07.07.2003</b>	<b>09.07.2003</b>	<b>14.07.2003</b>	<b>16.07.2003</b>
Carica batterica psicrofila totale	0,0029	0,0044	91.000	180.000
Coliformi totali	0,0004	3.400	16.000	7.000
Stafilococchi	assenti	10	assenti	assenti
Streptococchi	assenti	n.r.	n.r.	n.r.
Miceti	n.r.	assenti	n.r.	n.r.
<i>Aeromonas</i>	n.r.	n.r.	7.000	9.000

## Conclusioni

Dal punto di vista sanitario l'analisi dei risultati fa ragionevolmente pensare che i microorganismi potenzialmente patogeni isolati dai vari campioni siano più probabilmente riscontri di commensali occasionali legati all'ambiente in cui gli animali vivono (come provano le analisi microbiologiche delle acque in Tab. 15), mentre il resto delle tipizzazioni ha riguardato una flora batterica normalmente presente negli organismi studiati.

Visti i limitati dati a disposizione, non è possibile un confronto epidemiologico tra la popolazione di *Pelobates* e quelle sintopiche di *Bufo*, *Hyla* e *Rana*. Non sembrano peraltro emergere, significative differenze, rispetto al tipo e al numero di microorganismi isolati, tra le tre specie *Bufo bufo*, *Hyla intermedia* e *Rana kl. esculenta*.

La difficoltà oggettiva nei campionamenti di *Pelobates* negli anni 2002-2003, dovuta a cause indipendenti dalla volontà dell'A. e dei tecnici incaricati, non ha permesso di soddisfare appieno le necessità del Monitoraggio Salute, così come indicato negli obiettivi dell'Azione A7a in Progetto.

Sulla base dei dati raccolti e dei risultati ottenuti, infatti, non è disponibile un quadro epidemiologico esaustivo della popolazione di *Pelobates fuscus insubricus* di Cameri né è possibile per ora escludere completamente, tra le cause che hanno portato al calo degli effettivi, l'azione di microorganismi patogeni.

Per questo è stato confermato dall'Ente di gestione del Parco del Ticino Piemonte il proseguimento a lungo termine di questo Monitoraggio Salute.

Gennaio 2004

Vincenzo Ferri

\*\*\*\*\*



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



## **Bibliografia citata**

- Andren C. & Nilson G., 1997 - A Conservation Plan for Swedish Amphibians. Abstracts from Third World Congress in Herpetology, 3-10 August 1997, Prague, Czech Republic.
- Andreone F., Fortina R. & Chiminello A., 1993 - Natural history, Ecology and conservation of the Italian Spadefoot Toad, *Pelobates fuscus insubricus*. Scientific Report, 2, Soc. Zool. "La TORBIERA", PP. 95.
- Andreone F. & Sindaco R., 1998 - Erpetologia del Piemonte e della Valle d'Aosta. Atlante degli Anfibi e dei Rettili. Monografie XXVI. Mus. Reg. Sci.Nat.Torino, pp. 283.
- Barinaga M., 1990 - Where have all the froggies gone ?. *Science*, 247: 1033-1034.
- Beebee T. J. C., 1992 - Amphibian decline? *Nature*, 355: 120.
- Beebee T. J. C., 1996 - Ecology and Conservation of Amphibians. Conservation biology series. *Chapman & Hall* ed.
- Beebee T. J. C., 1997b - Amphibian breeding and climate. *Nature* 374: 219-220.
- Bennati R., Bonetti M., Lavazza A. & Gelmetti D., 1996 - Epidemia da herpesvirus in popolazioni di *Rana dalmatina* nel Comune di Brescia. Studi Trentini di Scienze Naturali - Acta Biologica, 71(1994): 241-243.
- 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/chhisto.htm> , 20 November 1999.
- Berger L., Spare R. & Humhrey J., 1996 - *Mucor amphibiorum* in a free-ranging green tree frog, *Litoria caerulea*. *Journal of Wildlife Diseases*.
- Blaustein A.R. & Wake D.B., 1990 - Declining Amphibians populations: a global phenomenon ?. *Trends Ecol. Evol.*, 5 (7): 203-204.
- Blaustein A.R. & Wake D.B., 1995 - I mutamenti ambientali e la scomparsa degli anfibi. *Le Scienze* (ediz. italiana di Scientific American), 322: 22-28.
- Blaustein A.R., Hoffman P.D., Hokit D.G., Kiesecker J.M., Walls S.C. & Hays J.B., 1994 - UV repair and resistance to solar UV-B in Amphibian eggs: a link to population declines? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:1791-1795.
- Briggs L. & Andersen A., 1995 - Effects of Agriculture on Pond Ecology and conservation of the Fire bellied toad (*Bombina orientalis*) in Denmark. Poster SHE Congress in Bonn 1995.
- Bruno S., 1970a - I Pelobatidi. *Boll. WWF*, Roma, 3 (8): 15-16.
- Bruno S., 1970b - Pro-memoria sul *Pelobates fuscus insubricus* in Italia. (inedito).
- Bruno S., 1973 - Problemi di conservazione nel campo dell'erpetologia. *Atti III Simp.Naz.Cons.Natura*, Bari, 2: 117-226.
- CADEO M., 2003 - Identificazione di microrganismi batterici in popolazioni di Tartarughe di specie *Trachemys scripta elegans* e *Emys orbicularis* in ambienti naturali e artificiali. Tesi Di Laurea, Univ. Degli Studi Di Milano, Facoltà Di Medicina Veterinaria.
- Carey C., 1997 - Is UVB responsible for Amphibian Declines ?. Abstracts from Third World Congress in Herpetology, 3-10 August 1997, Prague, Czech Republic.
- Corn P.S. & Vertucci F.A., 1992 - Descriptive risk assessment of the effects of acidic deposition on Rocky Mountain amphibians. *J.Herp.*, 26(4): 361-369.
- Conway G.R. & Pretty J.N., 1991 - Unwelcome harvest. *Agriculture and Pollution*. Earthscan Publ., London, pp. 637.
- Cunningham A.A., Langton T.E.S., Bennett P.M., Drury S.E.N., Gough R.E. & Kirkwood J.K. , 1993 - Unusual mortality associated to pox-virus-like particles in frogs (*Rana temporaria*). - *The Veterinary Record*, 7:141-142.
- Cunningham A.A., Langton T.E.S., Bennett P.M., Lewin J.F., Drury S.E.N., Gough R.E. & Macgregor S.K., 1996 - Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 351:1539-1557.
- Crump M.L., Hensley F.R. & Clark K., 1992 - Apparent decline of the Golden toad: underground or extinct ?. *Copeia* (2): 413-420.
- De Wijer P., Watt J. & Oldham R.S., 1997 - Amphibian Decline and aquatic pollution: effects of Nitrogenous fertilizer. Abstracts from Third World Congress in Herpetology, 3-10 August 1997, Prague, Czech Republic.
- Di Cerbo A.R. & Ferri V., 1995 - Situation and conservation problems of *Bombina v. variegata* in Lombardy, North Italy. in "Verbreitung, Biologie und Schutz der Gelbbauchunke", Jena, 10-12 Nov. 1995.



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



- Doria G. & Salvadio S., (Eds.) 1994 - Atlante degli anfibi e rettili della Liguria. Regione Liguria, Cataloghi dei Beni Naturali, 2, Genova; pp. 151+38 tavv. f.t.
- Ferri V., 1993a - Il Progetto ROSPI Lombardia. Quad. Civ. Staz. Idrobiol., 19 (1992): 13-15.
- Ferri V., 1993b - La gestione delle popolazioni inurbate di rospo smeraldino (*Bufo viridis* Laurenti, 1768): l'esempio di Milano. Quad. Civ. Staz. Idrobiol., 19 :125-130.
- Ferri V., 1988a - Anfibi e Rettili del territorio di Montagnana (Bassa Pianura Veneta, Provincia di Padova). Atti Soc.ital.Sci.nat., Milano, 129 (2-3): 211-224.
- Ferri V., 1988b - Colorazione Anfibi:diverso è bello ma pericoloso. OASIS, Musumeci Ed.,AO, n.3/1988: 72-77.
- Ferri V. & Centelleghes F., 1996 - Situazione e problemi di conservazione degli Anfibi in Valtellina. Studi Trentini di Scienze Naturali. Acta Biologica. Trento, 71 (1994): 25-33.
- Ferri V., 1998a. - Il Centro Studi Erpetologici "Emys" della S.I.S.N. : dieci anni di attività di conservazione della piccola fauna urbana. Atti Primo Conv. Nazionale sulla Fauna Urbana, Roma: 131-134.
- Ferri V. (Eds.) 1998b - Il Progetto ROSPI Lombardia. Iniziative di censimento, studio e salvaguardia degli Anfibi in Lombardia. Consuntivo dei primi sei anni. 1990-1996.Com.Montana Alto Sebino & Regione Lombardia, Gianico (BS), pp. 231.
- Fog K. & Arntzen J.W., 1997 - Declining amphibians: examples from long-term studies in Europe. In Rocek Z. & Hart S. (Eds.), Herpetology '97, Abstracts from Third World Congress in Herpetology, 3-10 August 1997, Prague, Czech Republic.
- Freda J. & Dunson W.A., 1986 - Effects of Low pH and other chemical variables on the local distribution of Amphibians. Copeia (2): 454-466.
- Griffiths R.A., 1993 - The effect of pH on feeding behaviour in newt larvae (*Triturus*: Amphibia). J.Zool.Lond., 231: 285-290.
- Griffiths R.A. & Beebee T., 1992 - Decline and fall of the amphibians. New Scientist, 1827: 25-29.
- Griffiths R.A., De Wijer P. & Brady L., 1993 - The effect of pH on embryonic and larval development in smooth and palmate newts, *Triturus vulgaris* and *T.helveticus*. J.Zool.Lond., 230:401-409.
- Grossenbacher K., 1997 - Long-term population monitoring of *Rana temporaria* near Berne, Switzerland. In Rocek Z. & Hart S. (Eds.), Herpetology '97, Abstracts from Third World Congress in Herpetology, 3-10 August 1997, Prague, Czech Republic.
- Halliday T., 1999 - Amphibian Breeding and Climate Change. FROGLOG, 32 April 1999.
- Hayes B.T. & Noriega N., 1997 - Endocrine Disruptors: a role in Amphibian declines ?. Abstracts from Third World Congress in Herpetology, 3-10 August 1997, Prague, Czech Republic.
- Hazelwood E., 1970 - Frog pond contaminated. British Journal of Herpetology, 4:177-185.
- HOLT J.G., KIERG N.R., JACOBSON E.R., 1984 - *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. IX Ed., Williams & Wilkins Eds.
- JOHNSON M.L. & SPEARE R., 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: Quarantine and Disease Control Implications. Emerging Infectious Diseases, vol. 9, n. 8.
- Langton T. E. S. (Ed.), 1989 - Amphibians on roads. ACO Polymer Prod. Ltd, Shefford.
- Mann R. & Alexander E., 1997 - The Toxicity of some common pesticide surfactants to the tadpoles of Australian frogs. Abstracts from Third World Congress in Herpetology, 3-10 August 1997, Prague, Czech Republic.
- Mazzotti S., 1993 - Competizione fra fauna ittica e batracofauna in laghi dell'Appennino settentrionale. Quad. Civ. Staz. Idrobiol., 20 (1992): 67-74.
- Minnesota Pollution Control Agency, 1999 - Parasites and malformed frogs. Legislative Update 1999, May 5.
- NICHOLS D.K. & LAMIRANDE E.W., 2001. Successful Treatment of Chytridiomycosis. Froglog, 46-1.
- Nichols D.K., Pessier A.P. & Longcore J.E., 1998 - Cutaneous chytridiomycosis in Amphibians: an emerging disease ?. Abstract, Proc. Amer.Ass.Zoo Veterinarians & Amer.Ass.Wildlife Veterinarians: 269-271.
- NIEDDU D., 2000 - *Evidenziazione di microrganismi patogeni in testuggini acquatiche appartenenti alla specie Trachemys scripta elegans*. Tesi di specializzazione in Sanità Animale, Allevamento e Produzioni Zootecniche. Scuola di specializzazione, Università degli Studi di Milano, AA 1999/2000.
- Ovaska K., Davis T.M. & Flamarique I.N., 1997 - Hatching success and larval survival of the frogs *Hyla regilla* and *Rana aurora* under ambient and artificially enhanced solar ultraviolet radiation. Can. J. Zool., 75: 1081-1088.
- Pessier A.P., Nichols D.K., Longcore J.E. & Fuller M.S., 1999 - Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). J.Veterinary Diagnostic Investigation 11: 194-199.



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



- Pechmann J.H.K., Scott D. E., Semlitsch R. D., Caldwell J. P., Vitt L. J., Gibson J.W., 1991 - Declining Amphibian populations: the problem of separating human impacts from natural fluctuations. *Science*, 253: 892-895.
- Pickford D.B. & Morris I.D., 1999 - Effects of endocrine-disrupting contaminants on Amphibian oogenesis: methoxychlor inhibits progesterone-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes in vitro. *Environmental Health Perspectives* 107(4): 285-292.
- Pounds J.A. & Crump M.L., 1994 - Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology*, 8: 72-85.
- QUINN P.J., CARTER M.E., MARKEY B. & CARTER G.R., 1994 - *Enterobacteriaceae*. In: *Clinical Veterinary Microbiology*, Cap. 18: 216.
- Reading C.J., 1998 - The effect of winter temperatures on the timing of breeding activity in the common toad *Bufo bufo*. *Oecologia*, 117: 469-475.
- Reaser J., 1998 - US Government takes big leap. *Froglog* Number 30, December, 1998
- REICHENBACH-KLINKE H. & ELKAN E., 1990 - *The principal diseases of lower vertebrates*. Book III. *Diseases of Reptiles*. T.F.H. Publications, Inc., pp. 583.
- Salio C. & Giacoma C., 1998 - Interventi per la conservazione della batracofauna in Piemonte. In: "Progetto rospi Lombardia".- Iniziative integrate di censimento, studio e salvaguardia degli Anfibi in Lombardia: consuntivo dei primi sei anni, 1990-1996. Ferri V. (red.): 55-85.
- Salvidio S. & Andreone F., (1996) *in press* - Le ricerche pluriennali sugli Anfibi in Italia. Atti I Convegno Nazionale S.H.I. (Torino, 2-6 Ottobre 1996)- Boll. Mus. reg. Sci. nat., Torino.
- Speare R., 1999 - Amphibian Disease Website:  
<http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/ampdis.htm>.
- 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. & Sipton 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. & FERRI V., 2004 - La Chytridiomycosi negli Anfibi italiani. *Conservation NEWS* n. 2/2004. Commissione Conservazione S.H.I.
- 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).
- Stebbins R.C. & Cohen N.W., 1997 - *A Natural History of Amphibians*. ISBN 0-691-03281-5, pp. 316.
- Stumpel A.H.P., 1992 - Successful reproduction of introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in northwestern Europe: a potential threat to indigenous amphibians. *Conserv.Biol*, 60:61-62.
- Tyler M.J., 1991 - Declining Amphibian populations, a global phenomenon ?. An Australian perspective. *Alytes*, 9: 43-50.
- Vitt L.J., Caldwell H.M.W. & Smith D.C., 1990 - Amphibians as harbingers of decay. *Bioscience*, 40: 418.
- Wake D., 1991 - Declining Amphibian populations. *Science*, 253:860.
- Watson W., 1999 - Amphibians and *Crassula helmsii*. *Froglog* Number 31, February, 1999
- Wissinger & Whiteman, 1992 - Fluctuation in a Rocky Mountain population of salamanders: anthropogenic acidification or natural variation ?. - *J.Herp.*, 26(4): 377-391.

### **Bibliografia di riferimento "Epidemiologia Anfibi"**

- Alford RA, Dixon PM & Pechmann JHK. 2001. Global amphibian population declines. *Nature*. 414:449-500.
- Anderson P, Morales F, Sherman BH, Daszak P, Cunningham AA & E P. 2002, in review. New and emerging infectious diseases of plants. *Science*.
- Annis SL, Dastoor F, Fifield B, & Longcore JE. In prep. Analysis of the population genetics of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a pathogen of amphibians using Amplified Fragment Length Polymorphisms.



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



- Annis SL, Dastoor F, Ziel H, Daszak P, & Longcore JE. 2003, submitted. A DNA-based assay to identify *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases*.
- Berger et al. 1998 Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences; USA* 95:9031-9036.
- Berger L, Hyatt AD, Olsen V, Hengstberger S, Boyle D, Marantelli G, Humphries K & Longcore KE. 2002. Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms*. 48:213-220.
- Berger L, Hyatt AD, Speare R, Hengstberger SG, Longcore JE. 2003, submitted. Morphology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. *Diseases of Aquatic Organisms*.
- Berger L, Speare L, Hines HB, Marantelli G, Hyatt AD, Olsen V, McDonald KR, Clarke J, Gillespie G, Mahony M, Sheppard N, Williams C, & Tyler M. 2003, submitted. Mortality in amphibians due to chytridiomycosis increases in winter and with lower experimental temperatures. *Emerging Infectious Diseases*.
- Blaustein AR, Garcia T, Romansic J, & Longcore JE. In prep. Interacting effects of ultraviolet radiation and disease on survivorship of three amphibian species.
- Romansic J, Han B, Fasey E, Longcore JE, & Blaustein A. In prep. Effects of pesticide and chytrid fungus on toad larvae.
- Blaustein AR, Hatch AC, Belden LK & Kiesecker JM. 2002, in press. Multiple causes for declining amphibian populations. In *Experimental Approaches to Conservation Biology*. M Gordon and S Bartol, editors. University of California Press.
- Boyle DG, Boyle DB, Hyatt AD, Olsen V, & Morgan J. In prep. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay.
- Boyle DG, Hyatt AD, Daszak P, Berger L, Longcore JE, Porter D, Hengstberger SG & Olsen V. 2003, in press. Cryo-archiving of *Batrachochytrium dendrobatidis* and other Chytridiomycetes. *Diseases of Aquatic Organisms*.
- Bradley GA, Rosen PC, Sredl MJ, Jones TR & Longcore JE. 2002, in press. Chytridiomycosis in three species of native Arizona frogs (*Rana yavapaiensis*, *Rana chiricauhuensis* and *Hyla arenicolor*). *Journal of Wildlife Diseases*.
- Brunner JL & Sesterhenn T. 2001. Disinfection of *Ambystoma tigrinum* virus (ATV). *Froglog*. 48:2.
- Brunner JL, Schock DM, Davidson EW, & Collins JP. 2003, in press. Intraspecific reservoirs: Complex life history and the persistence of a lethal ranavirus. *Ecology*.
- Bryan L, Silphadaung U, Noga E, Wade D, Rollins-Smith LA, & Chinchar VG. In prep. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides.
- Carey C, Bradford DF, Brunner JL, Collins JP, Davidson EW, Longcore JE, Ouellet M, Pessier AP & Schock DM. 2003, in press. Biotic factors in the decline of amphibian populations. In *Multiple stressors and declining amphibian populations: evaluating cause and effect*. G Linder, DW Sparling, and SK Krest, editors. Society of Environmental Chemistry and Toxicology, Pensacola, Florida, USA.
- Carey C, Cohen N, & Rollins-Smith LA. 1999. Amphibian declines: An immunological perspective. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 459-472.
- Carey C, Heyer WR, Wilkinson J, Alford RA, Arntzen JW, Halliday T, Hungerford L, Lips KR, Middleton EM, Orchard SA & Rand AS. 2001. Amphibian declines and environmental change: Use of remote-sensing data to identify environmental correlates. *Conservation Biology*. 15:903-913.
- Carey C, Pessier AP & Peace AD. 2003. Pathogens and infectious disease. Pages 125-136 In *Amphibian Conservation*. RD Semlitch, editor. Smithsonian, Washington, D.C.
- Chinchar VG, Bryan L, Wang J, Long S, & Chinchar GD. 2003. Induction of apoptosis in frog virus 3-infected cells. *Virology* 306:303-312.
- Chinchar VG, Essbauer S, He JG, Hyatt A, Miyazaki T, Seligy V, & Williams T. 2003, submitted. Family *Iridoviridae*. In *Virus Taxonomy: 8<sup>th</sup> Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Van Regenmortel et al., editors.
- Chinchar VG, Wang J, Murti G, Carey C & Rollins-Smith L. 2001. Inactivation of frog virus 3 and channel catfish virus by esculentin-2P and ranatuerin-2P, two antimicrobial peptides isolated from frog skin. *Virology*. 288:351-357.
- Chinchar VG. 2002. Ranaviruses. In *The Springer Index of Viruses*. Tidona CA & Darai G, editors. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Chinchar VG. 2002. Ranaviruses (Family *Iridoviridae*): emerging cold-blooded killers. *Archives of Virology*. 147: 447-470.



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



- Collins JP & Storer A. 2003. *Amphibian declines: Sorting the hypotheses*. *Diversity and Distributions* 9: 89-98.
- Collins JP, Brunner JL, Miera V, Parris MJ, Schock DM & Storer A. 2002, in prep. Ecology of diseases: Unraveling the spread of diseases globally and the differential susceptibility of species. Pages 137-151 *In* Amphibian conservation. Semlitsch R, editor. Smithsonian Press, Washington, D.C.
- Collins JP, Cohen N, Davidson EW, Longcore JE & Storer A. 2003. Global amphibian declines: an interdisciplinary research challenge for the 21st century. *In* Status and conservation of U.S. amphibians. Volume 1: *Conservation essays*. Lannoo MJ, editor. University of California Press, Berkeley, California. pp. 43-52.
- Cunningham AA, Daszak P & Hyatt AD. 2001. Amphibia. *In* Quarantine and Health Screening Protocols for Wildlife prior to Translocation and Release into the Wild. Woodford MH, editor. Office International des Epizooties (OIE), Paris, France & IUCN Species Survival Commission's Veterinary Specialist Group, Gland, Switzerland. pp. 74-79.
- Cunningham AA, Daszak P & Rodriguez JP. 2003, in press. Pathogen Pollution: defining a parasitological threat to biodiversity conservation. *Journal of Parasitology*.
- Cunningham AA, Green DE, Daszak P, & Hyatt AD. In prep. Infectious diseases. Chapter for book to be published by the Declining Amphibian Populations Taskforce of the International Union for the Conservation of Nature (IUCN/DAPTF).
- Daszak P & Cunningham AA. 1999. Extinction by infection. *Trends in Ecology and Evolution*. 14:279.
- Daszak P & Cunningham AA. 2000. More on the ecological impact of fungal infections on wildlife populations. *Parasitology Today*. 16:404-405.
- Daszak P & Cunningham AA. 2002. Emerging infectious diseases: A key role for Conservation Medicine. *In* Conservation Medicine: Ecological health in practice. Aguirre AA, Ostfeld R.S, House CA, Tabor GM & Pearl MC, editors. Oxford University Press, New York. pp. 432
- Daszak P & Cunningham AA. 2003, in press. Anthropogenic change, biodiversity loss and a new agenda for emerging diseases. *Journal of Parasitology*.
- Daszak P & Mills JN. 2002, in press. Parasites and Disease. *In* The Cambridge Encyclopedia of Biodiversity and Conservation. Cambridge University Press.
- Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE & Speare R. 1999. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases*. 5:735-748.
- Daszak P, Cunningham AA & Hyatt AD. 2000. Conservation Conundrum - response. *Science*. 288:2318.
- Daszak P, Cunningham AA & Hyatt AD. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science*. 287:443-449.
- Daszak P, Cunningham AA & Hyatt AD. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica*. 78:103-116.
- Daszak P, Cunningham AA & Hyatt AD. 2001. Viral emergence in the human-wildlife continuum. *In* Emergence and Control of Zoonotic Ortho- and Paramyxovirus Diseases. B Dodet, editor. John Libbey Eurotext, Paris.
- Daszak P, Cunningham AA & Hyatt AD. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*. 9: 141-150
- Daszak P, Faggioni C, Scott D, Porter D & Gibbons JW. In prep. Chytridiomycosis in amphibians from a long-term stable population.
- Daszak P, Porter B, Annis S, Morgan J, Berger L, Longcore JS, & Porter D. In prep. DNA sequence phylogeny and AFLP analysis suggest anthropogenic introduction is involved in spread of emerging pathogen of amphibians.
- Daszak P, Strieby A., Brown CC, Cunningham AA, Longcore JS, & Porter D. In prep. Are introduced species involved in the spread of an chytridiomycosis - an emerging fungal disease of amphibians?
- Daszak P., Cunningham AA, & Hyatt AD. 2001. Draft guidelines for international translocation of amphibians with respect to infectious diseases. Attachment 6. Pages 171-183 *in* Developing management strategies to control amphibian diseases: decreasing the risks due to communicable diseases. R. Speare, and Steering Committee of Getting the Jump on Amphibian Disease, editors. School of Public Health and Tropical Medicine, James Cook University, Townsville.
- Davidson EW, Jancovich JK, Borland S, Newbery M, & Gresens J. 2003. Dermal lesions, hemorrhage, and limb swelling in laboratory axolotls. *Lab Animal* 32(3):23-25.
- Davidson EW, Parris M, Collins JP, Longcore JE, Pessier A, & Brunner J. 2003, in press. Pathogenicity and transmission of Chytridiomycosis in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia*.



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



- Docherty DE, Meteyer CU, Brannian R, Wang J, Mao J, Case S & Chinchar VG. 2003, in press. Diagnostic and molecular evaluation of three iridovirus-associated salamander mortality events. *Journal of Wildlife Diseases*.
- Dybdahl M & Storfer A. 2003, in revision. Infectivity and virulence in parasite local adaptation: Red Queen versus Suicide King. *Trends in Ecology and Evolution*.
- Fellers GM, Green DE & Longcore JE. 2001. Oral chytridiomycosis in the mountain yellow-legged frog. *Copeia*. 4:945-953.
- Gadagkar SR, Rosenberg MS & Kumar S. 2003, submitted. Effect of concatenation of gene sequences on phylogenetic accuracy.
- Gadagkar SR, Tamura K & Kumar S. 2002, in prep.. Quantifying the substitution process heterogeneity between lineages.
- Gantress J, Maniero GD, Cohen N, & Robert J. 2003, in press. Development and characterization of a model system to study amphibian immune responses to iridoviruses. *Virology*.
- Hanselmann R, Rodriguez A, Lampo M, Daszak P, Fajardo-Ramos L, Aguirre AA, & Rodriguez JP. In prep. Presence of an emerging pathogen of amphibians in recently-introduced *Rana catesbeiana* in Venezuela.
- Hauselberger K & Alford RA. 2003, submitted. Effects of season and weather on chorus formation and continuation in the Australian microhylid frogs *Austrochaperina robusta* and *Cophixalus ornatus*. *Herpetologica*.
- Horton T, Stewart R, Cohen N, Rau L, Ritchie P, Watson M, Robert J, & Horton J. 2003, in press. Ontogeny of *Xenopus* NK cells in the absence of MHC class I antigens. *Developmental and Comparative Immunology*.
- Hyatt AD, Gould AR, Zupanovic Z, Cunningham AA, Hengstberger S, Whittington RJ, Kattenbelt J & Coupar BEH. 2000. Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Archives of Virology*. 145:301-331.
- Hyatt AD, Olsen V, & Boyle D. In prep. Overview and recommendations of sampling protocols and diagnostic assays for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*.
- Hyatt AD, White J, Boyle D, Olsen V, & Hengstberger S. In prep. Generation of MAbs for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* by histochemistry, ELISA and immunoelectron microscopy.
- James TY, Porter D, Leander CA, Vilgalys R & Longcore JE. 2000. Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. *Canadian Journal of Botany*. 78:336-350.
- Jancovich J, Mao J, Chinchar VG, Wyatt C, Case ST, Kumar S, Valente G, Subramanian S, Davidson EW, Collins JP, & Jacobs BL. 2003, submitted. Genomic sequence of a ranavirus (family *Iridoviridae*) associated with salamander mortalities in North America. *Virology*.
- Jancovich JK, Davidson EW, Seilor A, & Jacobs BL. 2001. Transmission of the *Ambystoma tigrinum* virus to alternative hosts. *Diseases of Aquatic Organisms* 46:159-163.
- Jancovich JK, Storfer A, Davidson EW, Parameswaran N, Mao N, Chinchar VG, Collins JP & Jacobs BL. In prep. Phylogeography of ranavirus strains associated with salamander die-offs in North America.
- Johnson ML & Speare R. 2003, in press. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water has quarantine and control implications. *Emerging Infectious Diseases*.
- Kattenbelt JA, Hyatt AD & Gould AR. 2000. Recovery of ranavirus dsDNA from formalin-fixed archival material. *Diseases of Aquatic Organisms*. 39:151-154.
- Kellner J & Alford RA. 2003. The ontogeny of fluctuating asymmetry. *American Naturalist* 161:931-947
- Langkilde TL & Alford RA. 2002, in review. The tail wags the frog: attached transponders affect movement behavior in *Litoria lesueuri*. *Journal of Herpetology*.
- Lips KR & Donnelly MA. 2002. What the tropics can tell us about declining amphibian populations: current patterns and future prospects. In *North American Amphibians: Status and Conservation*. MJ Lannoo, editor. University of California Press. 388-406.
- Lips KR, Green DE, & Papendick R. 2003. Chytridiomycosis in wild frogs from southern Costa Rica. *Journal of Herpetology* 37(1):215-218.
- Lips KR, Mendelson III JR, Munoz Alonso A, & Canseco Marquez L. 2003, submitted. Direct evidence of declines in amphibian populations in montane southern Mexico. *Biological Conservation*.
- Lips KR, Reaser JK, Young BE & Ibañez R. 2001. El Monitoreo de Anfibios en America Latina: Un manual para coordinar esfuerzos. In *SSAR Herpetological Circular*. 116pp.
- Lips KR, Reeve J & Witters L. 2003, in press. Ecological factors predicting amphibian population declines in Central America. *Conservation Biology* 17(4).



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



- Lips KR. 2003. Eyewitnesses to History? Book review of Amphibians of Honduras. *Diversity and Distribution* 9(2):165-166.
- Longcore JE, Pessier AP & Nichols DK. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*. 91:219-227.
- Mazzoni R, Cunningham AA, Daszak P, Apolo A, Perdomo E, & Speranza G. 2003, in press. An Emerging Pathogen of Wild Amphibians and the International Trade in Frogs (*Rana catesbeiana*). *Emerging Infectious Diseases*.
- Mazzoni R., Cunningham AA, Daszak P, Apolo A, Perdomo E & Speranza G. 2003, in press. Chytridiomycosis in a farm-reared bullfrogs in Uruguay. *Emerging Infectious Diseases*.
- Mech SG, Storfer A, Ernst J, Reudink M, & Maloney S. 2003. Polymorphic microsatellite primers for tiger salamanders, *Ambystoma tigrinum*. *Molecular Ecology Notes* 3:79-81.
- Molyneux DH, Chivian E, Morse SS, Bos R & e al. 2003, in press. Report from working group V: Ecosystem disruption, biodiversity, and human infectious diseases. *In Biodiversity: Its Importance to Human Health*. Eea Chivian, editor. World Health Organization and the United Nations Environment Programme.
- Morehouse E, James TY, Ganley ARD, Vilgalys R, Berger L & Longcore JE. 2003. Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Molecular Ecology* 12:395-403.
- Nichols DC, Lamirande EW, Pessier AP & Longcore JE. 2001. Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in dendrobatid frogs. *Journal of Wildlife Diseases*. 37:1-11.
- Nordhaus W, Peteet D, Allen C, Ausubel J, Cook E, Daszak P & e al. 2001. Report on a workshop on the impacts of abrupt climate change on economic and ecological systems. National Academy of Sciences, Washington, D.C.
- Olsen V, Boyle D, Hengstberger S, & Hyatt AD. In prep. An ELISA for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*.
- Olsen V, Boyle D, Mendez DA, & Hyatt AD. In prep. A modified protocol for the co-localisation of keratin and *Batrachochytrium dendrobatidis* within infected amphibian skin.
- Parris MP, Storfer A, Collins JP, & Davidson EW. 2003, submitted. Pathogen effects on life history in tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*) larvae. *Oecologia*.
- Pascolini R, Daszak P, Cunningham AA, Fagotti A, Di Rosa I, Tei S, Vagnetti D & Bucci S. 2003, in press. Parasitism by *Dermocystidium ranae* in a population of *Rana esculenta complex* in Central Italy and designation of *Amphibiocystidium* n. gen.. *Diseases of Aquatic Organisms*.
- Piotrowski JS, Annis SL & Longcore JE. 2001. Physiology, zoospore behavior, and enzyme production of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogenic to amphibians. *Phytopathology*. 91:S121.
- Piotrowski JS, Annis SL, & Longcore JE. 2003, in press. Biology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*.
- Powell P. 2003. Frog dip detects killer fungus. Infection-detecting bath could aid conservation. 7 February 2003 *Nature* (overview of sampling).
- Rau L, Cohen N & Robert J. 2001. MHC restricted CD8 T-cells: A phylogenetic perspective. *Transplantation*. 72:1830-1835.
- Richards SJ, Alford RA, & Bradfield KS. 2003, in press. The great frog decline in Australasia: causes, developments, and conservation. *In Evolution and Biogeography of Australasian Vertebrates*. Merrick JR, Archer M, Hickie G, & Lee M, editors. Australian Scientific Publishers, Sydney.
- Robert J, Gantress J, Cohen N, & Maniero GD. 2002. The frog *Xenopus* as an experimental model for studying the evolution of hsp-immune system interactions. *In Methods: A Companion to Methods in Enzymology (HSP-Immune System Interactions)*. Srivastava P, editor. Academic Press
- Robert J, Gantress J, Rau L, Bell A & Cohen N. 2002. Minor histocompatibility antigen-specific MHC-restricted CD8 T-cell responses elicited by heat shock proteins. *Journal of Immunology* 168:1697-1703.
- Robert J, Gantress J, Bell A, Maniero G, Chinchar VG & Cohen N. 2002, in prep. *Xenopus*, a model to study immune response to iridovirus. .
- Robert J, Rau L, Horton J, Horton T, Gantress J, Bell A & Cohen N. 2001. Identification and characterization of *Xenopus* CD8 T cells expressing an NK-associated molecule. *European Journal of Immunology* 32:1574-83.
- Robertson JR, Lips KR, & Heist E. 2003, submitted. Fine scale gene flow and multi-year comparison of individual dispersal among subpopulations of *Centrolenella prosoblepon*, a Neotropical stream frog. *Copeia*.
- Rojas S & Davidson EW. 2003, submitted. Influence of temperature on ranavirus infection in salamanders, *Ambystoma tigrinum*. *Diseases of Aquatic Organisms*.



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



- Rollins-Smith L, Carey C, Reinert LK, Miera V, Davidson EW, Tyler MJ, & Bowie J. 2003, in press. Antimicrobial peptide defenses of Australian frogs against the chytrid fungus associated with global amphibian declines. *Proceedings of the International Congress of Developmental and Comparative Immunology*.
- Rollins-Smith LA & Hodnett DS. 2000. An investigation of the UV sensitivity of two fungal pathogens associated with global amphibian declines. *Developmental and Comparative Immunology*. 24:S46.
- Rollins-Smith LA and N Cohen. 2003. Hormones and the immune system of amphibians. Pages 2377-2391 *In* Amphibian Biology Vol. 6: Endocrinology. H Heatwole, editor. Surrey Beatty and Sons. Chipping Norton, Australia.
- Rollins-Smith LA, Carey C, Conlon JM, Reinert LK, Doersam JK, Bergman T, Silberring J, Lankinen H, & Wade D. 2003. Activities of temporin family peptides against the chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) associated with global amphibian declines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:1157-1160.
- Rollins-Smith LA, Doersam JK, Longcore JE, Taylor SK, Shamblin JC, Carey C & Zasloff MA. 2002. Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. *Developmental and Comparative Immunology*. 26:63-72.
- Rollins-Smith LA, Reinert LK, Miera V, & Conlon JM. 2002. Antimicrobial peptide defenses of the Tarahumara frog, *Rana tarahumarae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 297:361-367.
- Rollins-Smith LA, Carey C, Longcore J, Doersam JK, Boutte A, Bruzgal JE & Conlon JM. 2002. Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines. *Developmental and Comparative Immunology* 26:471-479.
- Rollins-Smith LA. 2001. Neuroendocrine-immune system interactions in amphibians: Implications for understanding global amphibian declines. *Immunological Research* 23(2&3):273-280.
- Rollins-Smith LA. 2001. Neuroendocrine-immune system interactions in amphibians: Implications for understanding global amphibian declines. *Immunologic Research*. 23:273-280.
- Rosenberg MS & Kumar S. 2001. Incomplete Taxon Sampling is not a Problem for Phylogenetic Inference. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 98:10751-10756.
- Rosenberg MS & Kumar S. 2003. Heterogeneity of nucleotide frequencies among evolutionary lineages and phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution* 20:610-621.
- Ryan MJ & Lips KR. 2003, in press. *Sibon argus* diet. *Herpetological Review*.
- Savage JM, Hollingsworth BD, Lips KR, & Jaslow AP. 2003, submitted. A new species of rainfrog (Genus *Eleutherodactylus*) from the Serrania de Tabasara, west-central Panama, and reanalysis of the *fitzingeri* species group. *Herpetologica*.
- Schock DM, Bollinger TK & Collins JP. 2002, in prep.. Migratory birds as vectors of a pathogenic amphibian virus.
- Schock DM, Bollinger TK, Chinchar VG, Mao J & Brigham RM. 2002, in prep.. Epidemiology of Regina ranavirus in tiger salamander (*Ambystoma tigrinum diabolii*) populations in Saskatchewan, Canada .
- Schock DM, Bollinger TK, Mao J, Chinchar VG & Collins JP. 2002, in prep.. Experimental challenge of walleye, northern pike, and rainbow trout with the tiger salamander pathogen Regina ranavirus (Iridoviridae) .
- Storfer A, Collins JP, Mech SG, , Reudink MW, Ziemba RE, & Warren J. 2003, submitted. Introgression by non-native species in the endangered tiger salamander, *Ambystoma tigrinum stebbinsi*. *Copeia*.
- Storfer A, Mech SG, , Reudink MW, & Lew K. In prep. Genetic population structure and heterozygote deficiency based on microsatellites in the endangered Sonora tiger salamander.
- Storfer A, Jancovich JK, Mech SG, Collins JP, Reudink MW, Parris MJ, Brunner JL, Jacobs BL, Davidson EW, & Schock DM. In prep. Pathogen pollution, emerging diseases and amphibian declines.
- Storfer A. 2000. Amphibian declines: Unraveling the mystery. *Amphibian and Reptile Conservation*. 2:33.
- Storfer A. 2003. Amphibian declines: Future directions. *Diversity and Distributions* 9(2): 151-163.
- Storfer A. 2003. Editor: Special Issue: Amphibian Declines. *Diversity and Distributions* 9(2).
- Van Eills T, Stanton J, Strieby A, Daszak P, Hyatt AD & Brown CC. 2003, in press. The use of immunohistochemistry to diagnose chytridiomycosis in dyeing poison dart frogs (*Dendrobates tinctorius*). *Journal of Wildlife Diseases*.
- Wade D, Flock J-I, Edlund C, Lofving-Arvholm I, Sallberg M, Bergman T, Silveira A, Unson C, Rollins-Smith L, Silberring J, Richardson M, Kuusela P, & Lankinen H. 2002. Antibiotic properties of novel synthetic Temporin A analogs and a Cecropin A-Temporin A hybrid peptide. *Protein and Peptide Letters* 9:533-543.



**Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della  
Valle del Ticino Piemonte**  
*Pelobates* project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont  
LIFE00 NAT/IT/007233



- Wade D, Silveira A, Rollins-Smith L, Bergman T, Silberring J & Lankinen H. 2002. Hematological and antifungal properties of temporin A and a cecropin A-temporin A hybrid. *Acta Biochimica Polonica* 48:1185-9
- Williams T, Chinchar G, Darai G, Hyatt A, Kalmakoff J, & Seligy V. 1999. Family *Iridoviridae*. Pages 167-182 in *Virus Taxonomy*, 7<sup>th</sup> Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Van Regenmortel et al., editors. Academic Press, New York.
- Woodhams D & Alford RA. 2003, in press. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of Aquatic Organisms*
- Working Group V: Ecosystem Disruption, Biodiversity, and Human Infectious Diseases. In *Biodiversity: Its Importance to Human Health*. Chivian E, editor. 2003 Interim report published by Harvard Medical School under the auspices of The World Health Organization & The United Nations Environment Programme.
- Young BE, Lips KR, Reaser JK, Ibanez R, Salas AW, Cedeno JR, Coloma LA, Ron S, La Marca R, Meyer JR, Munoz A, Bolanos F, ChavesG & Romo D. 2001. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology* 15:1213-1223.
- Zhang QY, Xiao F, Li ZQ, Gui JF, Mao J & Chinchar VG. 2001. Characterization of an iridovirus from the cultured pig frog *Rana grylio* with lethal syndrome. *Diseases of Aquatic Organisms* 48:27-36.