PARCO NAZIONALE CINQUE TERRE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita

DISTAV

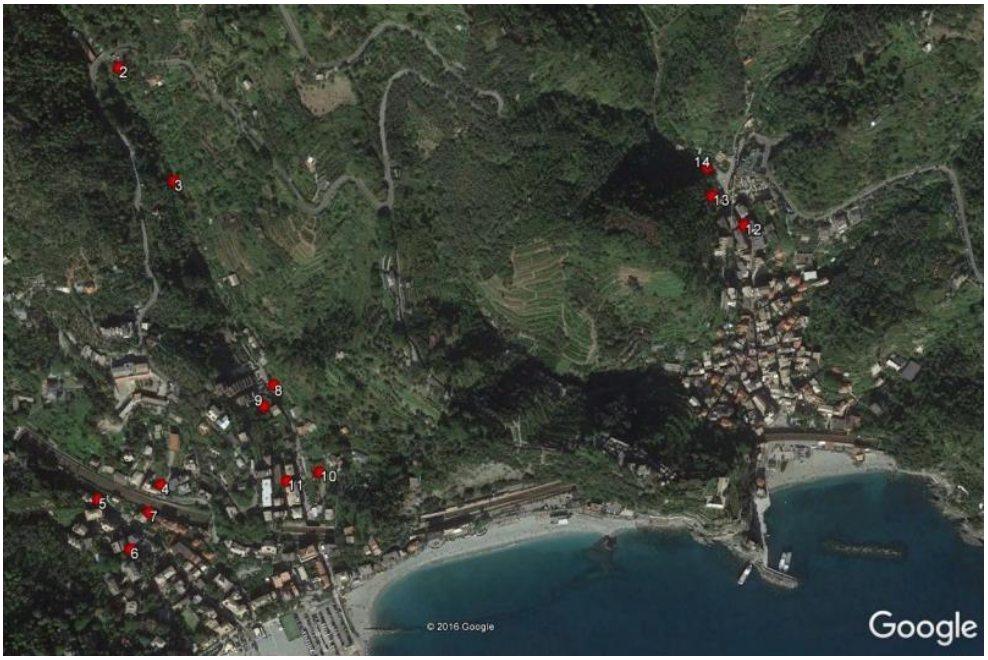
AZIONE DI SISTEMA

Monitoraggio delle specie di ambiente umido acquatico

Parco Nazionale delle Cinque Terre (capofila)

Parco Nazionale dell'Appennino Lucano Val d'Agri – Lagonegrese, Parco Nazionale della Majella e Parco Nazionale del Pollino.

Relazione novembre 2017



INDICE

	pag
1. SINTESI AZIONE DI SISTEMA ANNO 2017	**3**
2. INTRODUZIONE	**4**
3. RISULTATI SULLO STATO SANITARIO DELLE POPOLAZIONI DI ANFIBI	**6**
4. RIUNIONE DI COORDINAMENTO 10 OTTOBRE 2017	**10**
5. PROPOSTE PER PROSECUZIONE DELL'AZIONE DI SISTEMA 2018	**12**
6. BIBLIOGRAFIA	**13**
7. ALLEGATI	**15**
Riassunto presentazione risultati chitridiomicosi Poster presentato al XIX Congresso della Società Europea Erpetologica	

1. SINTESI AZIONE DI SISTEMA ANNO 2017

In questa relazione vengono riassunte le attività svolte dai Parchi associati nell'ambito dell'azione di sistema a partire dall'ultima sintesi redatta in data maggio 2017 (Parco Nazionale delle Cinque Terre, 2016).

Si tratta quindi di riportare i risultati ottenuti dai Parchi partecipanti nei mesi primaverili ed estivi del 2017. Purtroppo la scarsa piovosità registrata in tutto il 2017 ha influenzato negativamente la riproduzione delle popolazioni di anfibi in tutte le regioni d'Italia, rendendo difficili i confronti con gli anni precedenti. Nonostante queste difficoltà, come previsto del piano di attività concordato nella riunione di coordinamento tenutasi a Manarola il 20 e 21 marzo 2017, sono proseguite le attività di raccolta di campioni di muco e le loro analisi molecolari per determinare lo stato di salute delle popolazioni di anfibi e sono stati realizzati i primi rilievi vegetazionali nei principali siti riproduttivi degli anfibi all'interno della aree protette. Tali rilievi sono stati eseguiti secondo le linee guida del manuale degli Habitat Natura 2000 recentemente pubblicato da ISPRA (Angelini et al., 2016). Alcuni parchi hanno anche messo le basi per iniziare attività concrete di conservazione e di ripristino delle zone umide utilizzate dagli anfibi come siti riproduttivi, con corsi di formazione specifici ed ausilio di volontari.

Infine, il 10 ottobre 2017, si è tenuta a Roma presso la sede di Federparchi una ulteriore riunione di coordinamento per condividere i risultati raggiunti, condividere le diverse esperienze e per programmare le azioni comuni e il nuovo calendario di attività per il 2018.

2. INTRODUZIONE

Nella **figura 1** sono mostrati i parchi Nazionali partecipanti alle attività del 2017 sviluppate nell'ambito dell'Azione di Sistema "**Monitoraggio delle specie di ambiente umido acquatico**". Questa azione, iniziata nel 2014 con un diverso gruppo di Parchi partecipanti, ha come finalità quella di aggiornare i dati sulla presenza e distribuzione delle principali specie animali e vegetali legate agli ambienti umidi ed in particolare a quelle presenti negli allegati della Direttiva Habitat 92/43/CEE.

Tutti i partecipanti hanno preso come gruppo di riferimento gli anfibi, gruppo animale legato agli ambienti umidi e di rilevante interesse conservazionistico. Anche gli habitat umidi naturali o artificiali in cui gli anfibi si riproducono sono stati analizzati, con rilevi specifici della vegetazione e con specifiche norme di tutela da proporre per l'inserimento nel Piano del Parco.

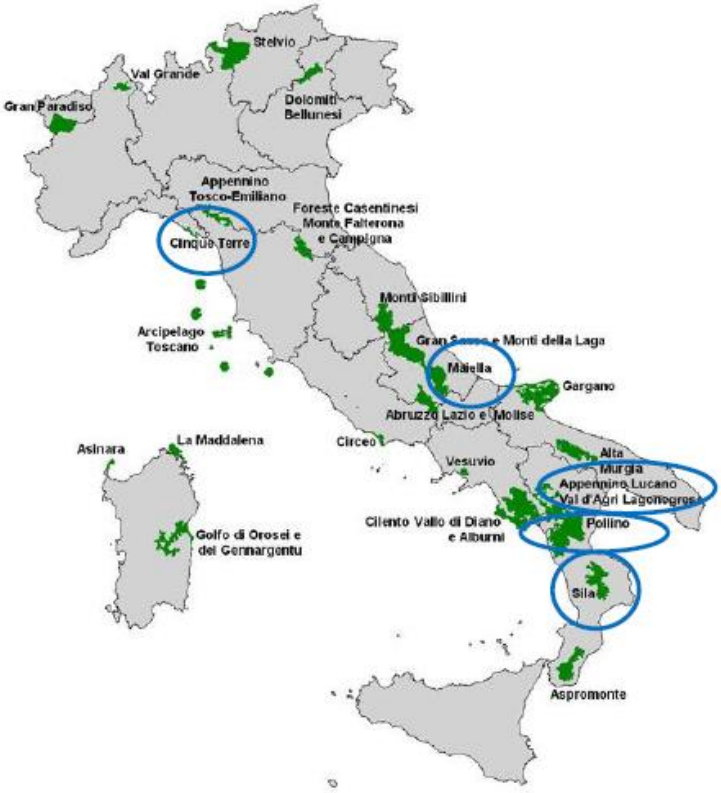


Figura 1. Parchi Nazionali partecipanti all'azione di sistema 2017-2018 "**Monitoraggio delle specie di ambiente umido acquatico**"

Ad oggi la principale attività comune a quattro dei Parchi Nazionali partecipanti è stata la valutazione, tramite analisi molecolari, della presenza e prevalenza di una patologia specifica degli anfibi: la batraco-micosi. Tale patologia è dovuta al fungo parassita della cute degli anfibi *Batrachochytrium dendrobatis* (Skerrat et al., 2007; Berger et al., 2016).

I risultati ottenuti sulla diffusione di questa patologia, sono i primi a livello nazionale per quanto riguarda le popolazioni di anfibi presenti in Parchi nazionali italiani e completano le poche informazioni note sugli anfibi del nostro paese (Simoncelli et al., 2005; Bielby et al., 2009; Canestrelli et al., 2013; Tessa et al., 2013; Zampiglia et al., 2015). I risultati di questa ricerca sono stati recentemente presentati al XIX Congresso della Società erpetologica Europea (SEH), tenutosi a Salisburgo in Austria e saranno riportati in esteso nella Sezione 3, della presente relazione. Copia del riassunto della presentazione è invece riportata in allegato, insieme al poster originale.

3. RISULTATI SULLO STATO SANITARIO DELLE POPOLAZIONI DI ANFIBI

Vengono presentati in questa sezione i risultati delle analisi molecolari riguardanti la presenza del fungo patogeno *Batrachochytrium dendrobatidis* in popolazioni di anfibi presenti nei Parchi nazionali italiani. Le analisi sono state effettuate nei laboratori del DISTAV dell'Università di Genova, dal 205 al 2017, tramite PCR quantitativa, una tecnica molecolare che permette di quantificare a livello individuale la quantità di DNA fungino (Boyle et al., 2004; Canessa et al., 2017). Nei risultati delle analisi sono riportati anche i dati relativi al Parco Nazionale del Crceo che ha attivamente collaborato all'Azione di Sistema fino al 2016, ma che attualmente non partecipa più alle attività tuttora in corso.

I risultati sintetici della analisi sulle popolazioni di anfibi campionate all'interno delle aree protette italiane sono mostrati in **Tabella 1**. La metodologia di analisi, che si basa sulla real-time PCR di DNA ottenuto da tamponi cutanei di anfibi, è stata validata (Canessa et al., 2017) ed è già stata descritta nelle precedenti relazioni (Salvidio et al., 2016). In totale sono stati analizzati 496 tamponi provenienti dal Parco Nazionale delle Cinque Terre, il Parco Nazionale del Circeo e il Parco Nazionale del Pollino.

Tabella 1. Risultati delle analisi molecolari sulle popolazioni di anfibi.
* = popolazioni campionate in aree limitrofe al Parco.

Specie	**Parco Nazionale Cinque Terre**	**Parco Nazionale Circeo**	**Parco Nazionale Pollino**
Salamandrina terdigitata	-	-	6/6
			100% (61-100)
Salamandra salamandra	-	-	4/1
			25% (3-72)
Lissotriton italicus			14/3
			21% (6-47)
Lissotriton vulgaris	-	**46/5**	-
		11% (5-23)	
*Triturus carnifex**	3/0	-	-
	0% (0-54)		
*Bombina pachypus**	50/0	-	-
	0% (0-5)		
Bufo bufo	21/0	**30/0**	-
	0% (0-11)	**0% (0-8)**	
Bufo balearicus	-	**46/0**	-
		0% (0-5)	
Rana dalmatina	-	**35/0**	
		0% (0-7)	
Rana italica	-	-	23/5
			22% (9-41)
Pelophylax esculentus	43/3	**65/4**	-
	7% (2-17)	**6% (2-14)**	
Icthyosaura alpestris	110/4	-	-
	4% (1-8)		
Totale	***227/7***	***222/10***	***47/15***
	3% (1-6)	**5% (2-8)**	***32% (20-46)***

I risultati indicano tassi di infestazione a livello di popolazione bassi nel caso del Parco delle Cinque Terre (3&) e del Parco del Circeo (5%), ma piuttosto elavati nelle popolazioni del Parco del Pollino (32%) come evidenziato dalla **Figura 2**. Tali differenze possono essere dovute alle diverse numerosità di campioni analizzate nelle tre aree (solo 47 individui nel Pollino) e andrebbero verificate con ulteriori analisi.

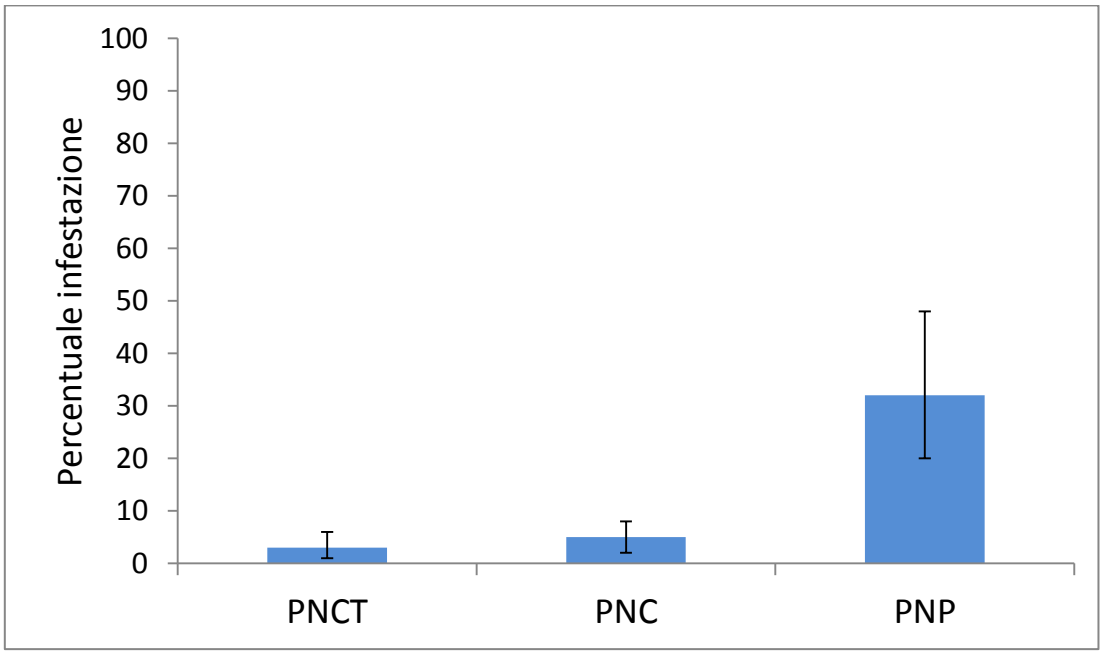


Figura 2. Tassi di infestazione da *Batrachochytryum dendrobatidis* rilevati nelle popolazioni di anfibi di tre Parchi Nazionali italiani.

Nella **Tabella 2** sono riportati in dettaglio i risultati sui tassi di infestazione a livello individuale per le diverse specie di anfibi analizzate nei singoli Parchi Nazionali. La quantificazione del tasso di infestazione individuale è importante, in quanto è noto che gli effetti negativi della batracomicosi sono dose-dipendenti. Infatti, lo stato di salute individuale degli anfibi dipende dal carico fungino; se è maggiore il tasso di infestazione individuale maggiore maggiori saranno gli effetti negativi è più alto il tasso di mortalità (Clare et al., 2016).

Tabella 2. Tasso individuale di infestazione per specie, nei tre parchi nazionali italiani.GE = quantità di DNA equivalente a un genoma del fungo *B. dendrobatidis*.

Species	**Parco Nazionale Cinque Terre**	**Parco Nazionale Circeo**	**Parco Nazionale Pollino**
Salamandrina terdigitata	-	-	6
GE			4–20
Salamandra salamandra	-	-	1
GE			6
Lissotriton vulgaris	-	5	-
GE		3–30	
Lissotriton italicus	-	-	3
GE			3–6
Rana italica	-	-	5
GE			3–11
Pelophylax sinkl. esculentus	3	4	-
GE	2–8	1–21	
Icthyosaura alpestris	4	-	-
GE	2–4		

Il tasso di infestazione individuale risulta in genere basso, essendo inferiore ai 30 GE. Pertanto, i risultati attuali non sembrano mostrare eventi patologici allarmanti che potrebbero causare casi di mortalità di massa, come ad esempio riportato in Sardegna (Bielby et al., 2009).

Pertanto, sulla base di queste prime analisi i risultati ottenuti sono in linea con i precedenti dati disponibili sulle popolazioni di anfibi italiani. I pochi studi disponibili riportano tassi di infestazione inferiori al 10%. Ad esempio, Zampiglia et al. (2015) riportano i seguenti dati: tasso di infestazione medio in *Salamandra salamandra* 12%, in *Ichtyosaura alpestris* 6% e in *Rana italica* 19%. Solo il tasso di infestazione generale rilevato in *Bombina variegata* in varie parti d'Italia centrale e meridionale risulta maggiore di quello rilevato negli anfibi analizzati nel presente studio (Canestrelli et al., 2013). L'unico studio che riporta tassi di infestazioni elevati per altro correlati ad eventi di mortalità massiva è quello di Bielby et al. (2008) su *Discoglossus sardus* in Sardegna.

4. RIUNIONE DI COORDINAMENTO: 10 OTTOBRE 2017

Il giorno 10 ottobre alle 14.00 si svolta una riunione di coordinamento dell'Azione di Sistema "**Monitoraggio delle specie di ambiente umido acquatico**" con il seguente ordine del giorno:

- Presentazione di una sintesi dei lavori ad oggi in corso di realizzazione
- Presentazione di una sceda descrittiva di ciò che si intende programmare per la prosecuzione delle attività prpgettuali
- Definizione di un documento programmatico e di indirizzo per la programmazione progettuale delle Direttive future
- Definizione di un calendario di incontri tecnico-tematici da realizzarsi in ciascun Parco partner

Alla discussione, avviata durante l'incontro di coordinamento, erano presenti quattro dei cinque Parchi nazionali partecipanti all'azione di sistema, oltre al rappresentante del DISTAV dell'Università di Genova che funge da coordinamento scientifico (**Tabella 3**).

Tabella 3. Elenco dei partecipanti alla Riunione del 10 ottobre 2017.

Ente	**Ruolo**
Parco Nazionale delle Cinque Terre	Capofila
Parco Nazionale del Pollino	Partecipante
Parco Nazionale della Majella	Partecipante
Parco nazionale della Sila	Partecipante
DISTAV – Università di Genova	Coordinamento scientifico

Il rappresentate del Parco nazionale della Majella ho consegnato 154 tamponi prelevati su anfibi che si andranno ad aggiungere agli oltre 400 già analizzati in precedenza.

Sono stati anche presentati i rilevanti risultati scientifici relativi allo stato sanitario delle popolazioni di anfibi, presentato al XIX Congresso della Società Europea Erpetologica e che sono allagati alla presente relazione.

Infine, dopo aver discusso le singole attività svolte nel corso del 2017 sono state discusse e condivise le proposte relative alle attività da proseguire o eventualmente da iniziare durante il proseguo dell'azione prevista per il 2018.

In particolare si è discusso delle seguenti attività avviate o ancora in corso che saranno proseguite da tutti i Parchi partecipanti anche nel corso dell'annualità 2018:

1. Censimento e cartografia dei siti riproduttivi delle specie di Anfibi tutelate in base alla Direttiva Habitat (All. 2, 4 e 5) nel territorio delle Aree Protette
2. Stima quantitativa di alcune popolazioni delle specie di maggior interesse conservazionistico in ciascuna area protetta
3. Caratterizzazione dei principali habitat vegetazionali in Direttiva Habitat (All. 1) tramite applicazione dei criteri e metodiche del manuale ISPRA (2016).
4. Prelievo di tamponi cutanei di anfibi al fine di valutare lo stato di salute (chitridiomicosi) nei diversi Parchi Nazionali (analisi a cura del DISTAV)
5. Realizzazione di corsi di formazione per il personale in servizio nelle Aree Protette.
6. Realizzazione/completamento di siti riproduttivi artificiali per gli anfibi locali.

5. PROPOSTE PER PROSECUZIONE DELL'AZIONE DI SISTEMA 2018

Per quanto riguarda le proposte per sviluppare nuove attività relative alla conservazione di specie e habitat umidi, i partecipanti hanno concordato che saranno sviluppate le azioni comuni, qui sotto elencate:

- Predisposizione di **linee guida per la tutela degli anfibi** e dei loro habitat riproduttivi da inserire nel Piano del Parco
- Realizzazione e diffusione di materiale informativi/didattico sul **divieto di introdurre specie alloctone nelle acque dolci** (crostacei, pesci, anfibi e testuggini) in ambiente naturale
- Partecipazione al prossimo Convegno Nazionale della Società Erpetologica Italiana (settembre 2018) con **proposta di organizzare una sessione tematica sulla conservazione degli anfibi nei Parchi Nazionali**.
- Organizzazione di incontri tecnici tra i partner al fine di assicurare un coordinamento (il primo previsto in linea di massima per marzo 2018, presso il Nazionale del Pollino).

6. BIBLIOGRAFIA

Berger L., Roberts A.A. Voyles, A.J., Longcore, J.E., Murray K.A., Skerratt L.F. (2016). History and recent progress on chytridiomycosis in amphibians. Fungal Ecology, 19: 89-99.

Bielby J., Bovero S. Sotgiu G., Tessa G., Favelli M., Angelini C., Doglio S.,Clare F.C., Gazzaniga E., Lapietra F., Garner T.W.J. (2009). Fatal chytridiomycosis in the Tyrrhenian painted frog. Ecohealth, 6: 25-32.

Canestrelli D., Zampiglia M., Nascetti G. (2013). Widespread occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in contemporary and historical samples of the endangered Bombina pachypus along the Italian peninsula. PLoS ONE 8: e63349

Canessa S., Maggesi M., Salvidio S., Grasselli E. (2017). Validation and cost-effectiveness of an alternative method to quantify *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in amphibian samples using real-time PCR. Rendiconti Lincei. DOI 10.1007/s12210-017-0640-0.

Clare F. Daniel O., Garner T., Fisher M. (2016). Assessing the ability of swab data to determine the true burden of infection for the amphibian pathogen Batrachochytrium dendrobatidis. EcoHealth, 13: 360-367.

Salvidio S., Crovetto F., Maggesi M., Grasselli E. (2016). Monitoraggio degli anfibi del Parco Nazionale delle Cinque Terre. Monitoraggio dei siti e stato sanitario delle popolazioni. Relazione al Parco Nazionale delle Cinque Terre, 41 pp.

Parco Naizonale delle Cinque Terre (2017). Azione di sistema – Monitoraggio delle specie di ambiente umido acquatico. Relazione maggio 2017. Pag. 58.

Simoncelli F., Fagotti A., Dall'Olio R., Vagnetti D., Pascolini R., Di Rosa I. (2005). Evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in water frogs of the *Rana esculenta* complex in Central Italy. Ecohealth 2:307–312.

Skerratt L.F., Berger L., Speare R., Cashins S., McDonald K., Phillott A., Hines H., Kenyon N. (2007). The spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. EcoHealth 4, 125e134.

Tessa G., Angelini C., Bielby J., Bovero S. , Giacoma C. Sotgiu G. Garner T.W.J. (2013). The pandemic pathogen of amphibians, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Phylum Chytridiomycota), in Italy. Italian Journal of Zoology, 80: 1-11.

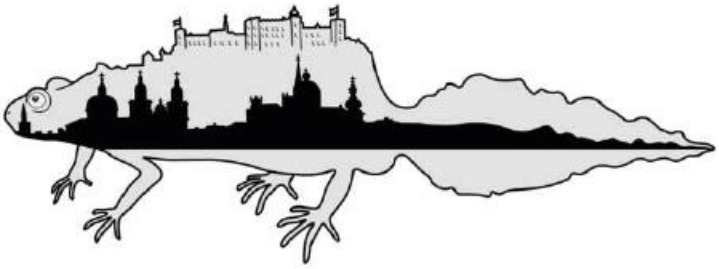
Zampiglia M., Canestrelli D., Chiocchio A., Nascetti G. (2015). Geographic distribution of the chytrid pathogen Batrachochytrium dendrobatidis among mountain amphibians along the Italian peninsula. Diseases of Aquatic Organisms, 107: 61-68.

7. **ALLEGATI**

Riassunto presentazione risultati chitridiomicosi

SEH 2017

19th European Congress of Herpetology



PROGRAMME & ABSTRACTS

UNIVERSITÄT SALZBURG

ÖGH Österreichische Gesellschaft für Herpetologie

MUSEUM FÜR NATUR & TECHNIK

HAUS DER NATUR SALZBURG

University of Salzburg
18th - 23rd September 2017

1

First data on *Batrachochytrium dendrobatidis* infecting amphibian populations in National protected areas in Italy

ELENA GRASSELLI[1*], FEDERICO CROVETTO[1], ESTER DEL BOVE[2], MARCO MAGGESI[1], GIORGIA BIANCHI[1], MATTEO PERRONE4, ANTONIO ROMANO[5], SERVIZIO CONSERVAZIONE DEL NATURA DEL PARCO NAZIONALE DEL POLLINO[3] & SEBASTIANO SALVIDIO[1]

[1] DISTAV, University of Genova, Italy; [2] Parco Nazionale del Circeo, Italy; [3] Parco Nazionale del Pollino, Italy; [4] Parco Nazionale delle Cinque Terre, Italy, [5] IBAF-CNR, Italy

E-mail: elena.grasselli@gmail.com

There are relatively few data on the prevalence of the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) in amphibian populations from Italy, where it has been detected in different species, comprising Sardinia (Bielby et al. 2013; Tessa et al. 2013). To assess the diffusion of *Bd* infection in amphibian populations of three Italian National parcs, a molecular screening, part of the Italian Ministry of Environment project "Monitoraggio delle specie di ambiente umido acquatico", began in 2015.

Overall, 496 swabs from eleven species were analysed by RT-PCR, using a protocol based on Sybr Green chemistry and validated against the standard Taqman PCR assay of Boyle et al. (2004).

The preliminary results show that *Bd* infection, detected in 6 species, is present in all the three sampled areas with different prevalence. In particular, in the Cinque Terre National Park (NW Italy) the overall infestation rate was 3% (7 infested amphibians out of 227) and in the Circeo National Park (central Italy) 5% (10 infested out of 222). A higher infestation rate (32%, 15 infested out of 47) was observed in the Pollino National Park (S Italy). However, there were no evidences of unusual mortalities in any study area and the individual prevalence was low, ranging from 1 to 30 Bd genome equivalents per individual swab. This project aims to include more national protected areas, while enlarging the sample size of unstudied and under-represented species.

References

Bielby, J., Bovero, S., Angelini, C., Favelli, M., Gazzaniga, E.,Perkings, M., Sotgiu, G., Tessa, G. & T.W.J. Garner (2013): Geographic and taxonomic variation in *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and transmission within a highly endemic amphibian community. Diversity and Distributions 19: 1153-1163.

Boyle, D.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T. & A.D. , Hyatt (2004): Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. Diseases of Aquatic Organisms 60: 141-148

Tessa, G., Angelini, C., Bielby, J., Bovero, S., Giacoma, C., Sotgiu, G., & T.W.J. Garner (2013): The pandemic pathogen of amphibians, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Phylum Chytridiomycota), in Italy. Italian Journal of Zoology 80: 1-11.

Poster presentato al XIX Congresso della Società Europea Erpetologica

First data on *Batrachochytrium dendrobatidis* infecting amphibian populations in National protected areas, in Italy

Elena Grasselli[1*], Federico Crovetto[1], Ester Del Bove[2], Marco Maggesi[1], Giorgia Bianchi[1], Matteo Perrone[4], Antonio Romano[5], Servizio Conservazione del Natura del Parco Nazionale del Pollino[3], Sebastiano Salvidio[1]

[1] DISTAV, University of Genova, Italy; [2] Parco Nazionale del Circeo, Italy; [3] Parco Nazionale del Pollino, Italy; [4] Parco Nazionale delle Cinque Terre, Italy, [5] IBAF-CNR, Italy. * Corresponding author: elena.grasselli@gmail.com

INTRODUCTION

In Italy, the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) has been detected in different amphibian species and different areas comprising the Island of Sardinia (Bielby et al. 2013; Canestrelli et al., 2013; Tessa et al. 2013; Zampiglia et al, 2013). However, there are relatively few data on the individual prevalence of Bd, this being a relevant information to evaluate the healthy or pathogenic status of individuals (e.g. Clare et al., 2016; Kolenda et al., 2017). Therefore, to assess the diffusion of Bd infection in amphibian populations and of the individual intensity of infection, a molecular screening, part of the Italian Ministry of Environment project "Monitoraggio delle specie di ambiente umido acquatico", began in 2015, in three Italian National Parks.

STUDY AREAS

The three Natianal Parks are located in North-Western (Parco Nazionale delle Cinque Terre), Central (Parco Nazionale del Circeo) and Southern (Parco Nazionale del Pollino) Italy (**Figure 1**). All three areas are part of the Apennine Mountain chain and are comprised in the Mediterranean biogeographic region.

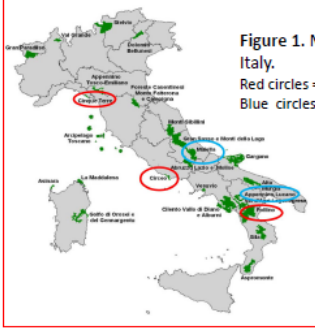


Figure 1. Map showing national parks in Italy.
Red circles = areas sampled in 2015-16;
Blue circles area to be sampled in 2017-18.

MATERIALS AND METHODS

Swabs were obtained from living animals immediately after capture: Sterile swabs were rotated 30 times over the venter, hind legs, feet and pelvic region of each animal. Ventral pictures of each animal were also taken to avoid swabbing recaptured animals.

Swabs were analysed by RT-PCR, using a protocol based on Sybr Green chemistry and validated against the standard Taqman PCR assay of Boyle et al. (2004) by Canessa et al. (2017). This method is cost-effective in comparison to the standard Taqman PCR assay, being about 60% cheaper, allowing the monitoring of more populations and individuals.

Species	Parco Nazionale Cinque Terre	Parco Nazionale Circeo	Parco Nazionale Pollino
Salamandrina terdigitata	-	-	6/6 100% (61-100)
Salamandra salamandra	-	-	4/1 25% (3-72)
Lissotriton italicus			14/3 21% (6-47)
Lissotriton vulgaris	-	46/5 11% (5-23)	-
*Triturus carnifex**	3/0 0% (0-54)	-	-
*Bombina pachypus**	50/0 0% (0-5)	-	-
Bufo bufo	21/0 0% (0-11)	30/0 0% (0-8)	-
Bufo balearicus	-	46/0 0% (0-5)	-
Rana dalmatina	-	35/0 0% (0-7)	
Rana italica	-	-	23/5 22% (9-41)
Pelophylax sinkl. esculentus	43/3 7% (2-17)	65/4 6% (2-14)	-
Icthyosaura alpestris	110/4 4% (1-8)	-	-
Total	***227/7*** ***3% (1-6)***	***222/10*** ***5% (2-8)***	***47/15*** ***32% (20-46)***

Table 1.
Bd screening (no. swabs/positives) in Italian National Parks with percentage of infestation (95% CL). *samples from Park boundaries.

Species		Parco Nazionale Cinque Terre	Parco Nazionale Circeo	Parco Nazionale Pollino
Salamandrina terdigitata		-	-	6
	GE			4–20
Salamandra salamandra		-	-	1
				6
Lissotriton vulgaris		-	5	-
	GE		3–30	
Lissotriton italicus		-	-	3
				3–6
Rana italica		-	-	5
	GE			3–11
Pelophylax sinkl. esculentus		3	4	-
		2–8	1–21	
Icthyosaura alpestris		4	-	-
	GE	2–4		

Table 2.
Individual load of Bd infection (no. of individuals infected, upper line) expressed in Bd genome equivalents (GE, lower line).

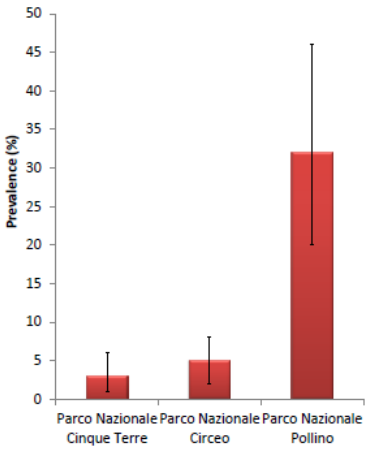


Figure 2.
Batrachochytium dendrobatidis prevalence in amphibian populations from three Italian National Parks. Errors bars are 95% CL.

RESULTS AND DISCUSSION

Overall, 496 swabs belonging to 12 species were analyzed and Bd infection was observed in 8 species, and in all areas (Table 1; Fig. 2). In any case, the individual infection load was low, ranging from 1 to 30 GE (Table 2), and there were no evidences of unusual mass mortalities, as previously reported in Sardinia (Bielby et al. 2009). Amphibians in the most Southern area (Parco Nazionale del Pollino) displayed the highest infestation rate at the population level (32%; Fig. 2), although the total sample size was small, being 47 swabs belonging to only three species. Further sampling is in progress, aiming to add more species and more protected areas are now participating to this national screening project (Fig. 1, blue circles).

REFERENCES

- Bielby J., Bovero S. Sotgiu G., Tessa G., Favell M., Angelini C., Doglio S.,Clare F.C., Gazzaniga E., Lapietra F., Garner T.W.J. (2009). Fatal chytridiomycosis in the Tyrrhenian painted frog. Ecohealth 6: 25-32.

- Boyle, D.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T., Hyatt, A.D. (2004): Dis. Aquat. Org., 60: 141-148.

- Canestrelli D., Zampiglia M., Nascetti G. (2013). Widespread occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in contemporary and historical samples of the endangered *Bombina pachypus* along the Italian peninsula. PLoS ONE 8: e63349.

- Canessa S., Maggesi M., Salvidio S., Grasselli (2017). Validation and cost-effectiveness of an alternative method to quantify *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in amphibian samples using Real-Time PCR. Rend. Fis. Acc. Lincei (DOI: 10.1007/s12210-017-0640-0)

- Clare F. Daniel O., Garner T., Fisher M. (2016). Assessing the ability of swab data to determine the true burden of infection for the amphibian pathogen Batrachochytrium dendrobatidis. EcoHealth, 13: 360-367.

- Kolenda K. Najbar A., Ogielska M., Bališ V. (2017). *Batrachochytrium dendrobatidis* is present in Poland and associated with reduced fitness in wild populations of *Pelophylax lessonae*. Dis. Aquat. Org., 124: 241-245.

- Tessa G., Angelini C., Bielby J., Bovero S. , Giacoma C. Sotgiu G. Garner T.W.J. (2013). The pandemic pathogen of amphibians, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Phylum Chytridiomycota), in Italy. Ital. J. Zool., 80: 1-11.

- Zampiglia M., Canestrelli D., Chiocchio A., Nascetti G. (2015). Geographic distribution of the chytrid pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* among mountain amphibians along the Italian peninsula. Dis. Aquat. Org., 107: 61-68.