

## Studio preliminare sull'insorgenza di cisti in popolazioni di salamandra pezzata (*Salamandra salamandra*) del comasco: primi risultati istologici e estensione del fenomeno

Raoul MANENTI<sup>1\*</sup>, Gentile Francesco FICETOLA<sup>1,2</sup>, Andrea MELOTTO<sup>1</sup>, Benedetta BARZAGHI<sup>1</sup>, Silvia MERCURIO<sup>1</sup>, Roberta PENNATI<sup>1</sup>, Giorgio SCARÌ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, Via Celoria, 26-20133 Milano, Italia.

<sup>2</sup> Laboratoire d'Ecologie Alpine LECA, Université Grenoble-Alpes. F-38000 Grenoble, Francia.

\*Corresponding author: raoulmanenti@gmail.com

**Riassunto** Negli ultimi anni l'insorgere e il diffondersi tra gli Anfibi di diverse patologie ha determinato la scomparsa di intere popolazioni e addirittura l'estinzione di alcune specie. Nella Riserva Naturale Regionale "Fontana del Guercio" ubicata all'interno dei comuni di Carugo e Inverigo (CO), sono stati individuati, a partire dal 2013, degli individui adulti di *Salamandra salamandra* che presentavano cisti a livello della gola, la cui esistenza non era stata finora descritta per nessun Urodelo europeo. Pertanto lo scopo di questa ricerca è di fornire delle prime indicazioni sul probabile organismo patogeno responsabile dello sviluppo di tali cisti e di raccogliere dati sulla distribuzione delle popolazioni colpite per circoscrivere l'area da indagare. Nel corso dell'autunno del 2014 e dell'autunno del 2015 sono stati effettuati ripetuti conteggi lungo transetti nella riserva per stimare il numero di salamandre con cisti. Tra ottobre 2015 e aprile 2016, sono state svolte ricerche anche in aree limitrofe al fine di circoscrivere l'area di insorgenza della patologia. Inoltre stati prelevati nel corso del 2015 in totale 5 individui per effettuare analisi istologiche e microscopiche. Sia nel 2014 che nel 2015 il tasso di salamandre è risultato attorno al 12 % con un lieve incremento nel 2015. Le ricerche svolte nelle aree limitrofe alla riserva hanno finora dato risultati negativi con la presenza di salamandre colpite da cisti che sono state rinvenute solo nel bacino a della Roggia Borromea. Dalle analisi istologiche è stato possibile osservare una reazione infiammatoria caratterizzata da granulociti situati nello strato più esterno e alcuni protozoi muniti di numerose strutture simili a flagelli situati nella regione interna. Tale disposizione è evidenziabile anche in microscopia elettronica e le osservazioni al SEM consolidano ulteriormente l'ipotesi che la struttura cistica sia il risultato di un fenomeno di incapsulazione.

**Abstract** In the last years the arising and spreading of different pathologies determined the declining of entire populations and the extinction of some species of amphibians. Since the autumn of 2013 we started to find in the Regional Reserve “Fontana del Guercio” situated in the Como district (Northern Italy) some adults of *Salamandra salamandra* with strange cysts at the throat level, which existence is not reported, for at least European salamanders, yet. The aim of this study is to obtain preliminary information on the possible pathogen responsible of cystis development and to delineate the area of onset and outbreak on the fire salamander populations. In the autumns of 2014 and 2015 we performed several surveys along linear transects to estimate the number of affected individuals. Between October 2015 and April 2016 we surveyed the areas surrounding the Reserve and we collected 5 individuals to perform histological analyses. The percentage of affected salamanders was around 12 % both in 2014 and in 2015. The surveys in the surroundings were negative with the pathology that for the moment should be considered contained along the area of the first onset. Histological analyses evidenced the existence of a cysts of mucus characterized by inflammatory reaction with the occurrence of granulocytes surrounding some protozoans provided with structures similar to flagella. This structure of the cysts is also observable through electronic microscopy (SEM) and seems to indicate the existence of an encapsulation phenomenon.

**Keywords** Threat, fire salamander, cyst, disease.

### **Introduzione**

Negli ultimi anni l'insorgere di diverse malattie e il loro diffondersi tra gli Anfibi ha determinato la scomparsa di intere popolazioni e addirittura l'estinzione di alcune specie (Houlalan *et al.*, 2000). Di particolare attualità è, ad esempio, la chitridiomicosi, una patologia legata a funghi molto aggressivi che provoca episodi di mortalità di massa e sta stimolando la realizzazione di diversi studi dal punto di vista sanitario, sia su Anuri che su Urodeli (Martel *et al.* 2013; McMahan *et al.*, 2014); tuttavia le competenze e le conoscenze relative alle patologie degli Anfibi presentano ancora notevoli lacune tali da renderne difficile sia la diagnosi sia il trattamento. La salamandra pezzata (*Salamandra salamandra*) è un Anfibio Urodelo ampiamente diffuso in Europa e in particolare sulle Alpi e lungo tutto l'Appennino. Gli adulti sono generalmente legati a zone boscate umide e fresche, mentre le larve possono essere deposte in svariate tipologie di ambiente umido. Nel corso di alcuni rilievi ecologici effettuati nell'ottobre del 2013 presso la Riserva Naturale Regionale denominata “Fontana del Guercio” tra i comuni di Carugo ed Inverigo (CO) sono stati individuati due individui adulti che presentavano ascessi a livello della gola (Fig. 1). Anche se tra il 2013 e il 2014 il numero di individui contattati è stato simile, con una media di circa 170 salamandre per notte (senza distinzione individuale tra notti) durante il periodo autunnale e primaverile, e non sono stati osservati casi di



**Fig. 1.** Maschio adulto di *Salamandra salamandra* in cui sono ben evidenti due cisti sottocutanee a livello della gola.

individui morti, la descrizione di eventuali patogeni è fondamentale per capire quali misure adottare per evitarne il diffondersi e circoscrivere l'insorgere di tali fattori di rischio. Data la particolarità di questo fenomeno, per il quale non esistono dati disponibili in letteratura, e visto l'aumento di individui affetti verificatosi nel corso di un anno nella popolazione della Fontana del Guercio, si è deciso di indagare approfonditamente sulla sua natura. Pertanto, lo scopo di questo studio è stato quello di fornire delle prime indicazioni morfologiche per descrivere il possibile organismo patogeno responsabile dello sviluppo di tali cisti e valutare la diffusione del fenomeno nell'area circostante a quella del primo rinvenimento.

#### **Materiali e Metodi**

Nel corso dell'autunno del 2014 e dell'autunno del 2015 sono stati effettuati ripetuti conteggi lungo transesti nell'area riserva della Fontana del Guercio per stimare il numero di salamandre con cisti. Tra ottobre 2015 e aprile 2016, sono state svolte ricerche anche

in aree limitrofe al fine di circoscrivere l'area di insorgenza della patologia. I rilievi sono stati svolti in nottate umide o piovose, mediante l'ausilio di torce elettriche.

Gli individui di salamandra pezzata raccolti sono stati fotografati su fogli di carta millimetrata plastificata e pesati mediante dinamometro di precisione. Per ogni individuo rinvenuto è stata registrata la posizione tramite GPS Garmin etrex 30. Le foto sono state utilizzate anche per il riconoscimento individuale delle salamandre.

Inoltre 5 individui sono stati prelevati nel corso del 2015 per effettuare analisi istologiche e microscopiche con il protocollo suggerito da Fischer *et al.* (2006). Gli individui sono stati anestetizzati tramite iniezione sottocutanea in corrispondenza dell'ascenso, di tricaina/carbocaina in concentrazione di 4,0 mg/ml (2.1 ml di anestetico per ogni individuo). Successivamente si è proceduto a rimuovere una piccola porzione del tessuto epidermico che rivestiva le cisti e le cisti stesse. Il tessuto epidermico e le cisti sono state fissate con PAFG a 4°C per 24 ore. Dopo la fissazione i reperti sono stati inclusi in paraffina (Bio Plast Plus–Bio Optica Milano), tagliati in sezioni di 5 µm e colorati con ematossilina ed eosina e in parte inseriti in HMDS per osservazioni al microscopio elettronico a scansione (SEM). Al termine dell'operazione gli animali sono stati riposizionati all'interno di vaschette riempite con dell'acqua ozonizzata alla concentrazione di 0,8 mg/l e liberati nel punto di rinvenimento dopo 48 ore di convalescenza. Le operazioni sono state svolte da G.S. e autorizzate dalla Regione Lombardia in deroga alla legge 10/2008, p. n. T1.2015.0001053 del 09/01/2015.

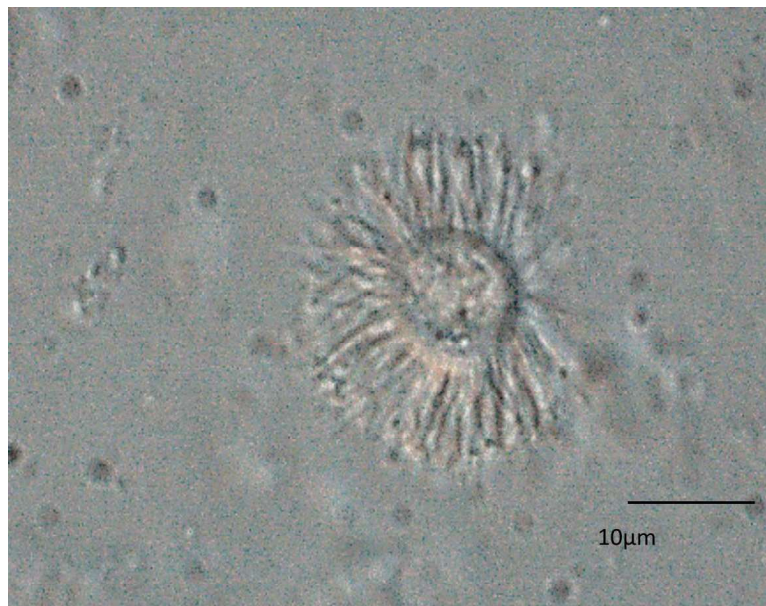
## Risultati

Nel corso dell'autunno del 2014 sono state osservate lungo 3 transetti posti all'interno della Riserva 274 salamandre adulte di cui 34 individui con cisti (12,4 %). Nel corso del 2015 sono state distinte lungo gli stessi transetti 158 salamandre adulte di cui 20 con cisti (12,6%) di cui diverse molto piccole ed in via di formazione.

Le indagini svolte nei dintorni della riserva hanno evidenziato individui con cisti in un'area di circa 0.97 km<sup>2</sup> tutti compresi all'interno del bacino della Roggia Borromea, affluente del Seveso. Mentre ad est di questo tratto non sono stati rinvenute aree idonee ad ospitare salamandre pezzate, nei tratti esplorati a nord e ad ovest sono state osservate solo popolazioni con individui apparentemente sani.

Dallo striscio a fresco si è osservata la presenza di numerosi microorganismi all'interno della massa mucosa che costituisce la ciste ed in particolare di protozoi delle dimensioni di circa 12 µm e dotati di numerose strutture simili a flagelli (Fig. 2). A livello morfologico non abbiamo rinvenuto alcuna rispondenza certa con nessun protozoo descritto o altre patogeni che sono stati indicati essere potenzialmente pericolosi per gli anfibi europei (Duffus & Cunningham, 2010).

La ciste è risultata essere una capsula di muco avente nello strato più esterno ben visibili dei granulociti e dei linfociti, e negli strati più interni, numerosi protozoi. Questa disposizione è stata evidenziata anche in microscopia elettronica a scansione.



**Fig. 2.** Uno dei microorganismi rinvenuti all'interno delle cisti.

### **Discussione**

Le indagini svolte nell'area della Riserva Naturale del Guercio hanno consentito di osservare come il tasso di individui presentanti le cisti sia rimasto tendenzialmente stabile tra il 2014 e il 2015. Nel 2015 sono stati contattati meno individui che nel 2014. Le condizioni climatiche dell'autunno 2015 sono state però avverse e cali simili di osservazioni si sono osservati anche in altre popolazioni distanti dall'area di studio (R.M. oss. pers.). Le foto effettuate nel 2014 e nel 2015 saranno confrontate in futuri studi per verificare la sopravvivenza degli individui in particolare di quelli malati. La diffusione della patologia sembra allo stato attuale essere circoscritta ad un'unica valle. Ulteriori ricerche andranno effettuate per capire se vi sia mortalità legata al possibile patogeno osservato.

La ciste visibile negli individui infetti è probabilmente il risultato di un evento di incapsulazione, questo fenomeno è noto come una risposta immunitaria naturale presente in tutti i vertebrati. È da verificare la provenienza del materiale gelatinoso presente all'interno della ciste poiché potrebbe essere sia una reazione della cute delle salamandre, sia una reazione dei microrganismi allo scopo di proteggersi dai granuli citotossici dei granulociti. Le prime indagini morfologiche non hanno consentito di ottenere una identificazione certa di questi organismi trovati all'interno delle cisti; le uniche somiglianze le si registrano con alcuni mesomicetozoi (Mendoza *et al.*, 2002) parassiti di pesci che però presentano dimensioni differenti e una disposizione dei flagelli un po' diversa (Mendoza *et al.*, 2002) al momento risulta quindi evidente la necessità di ulteriori indagini di tipo genetico che sono attualmente in corso.

**Bibliografia**

- Duffus, A.L.J.; Cunningham, A.A. (2010): Major disease threats to European amphibians. *Herp. J.* **20**: 117-127.
- Fischer, A.H., Jacobson, K., Rose, J., Zeller, R. (2006): Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections Cold Spring Harb. Protoc. 2008, doi:10.1101/pdb.prot4986.
- Houlahan, J.E., Findlay, C.S., Schmidt, B.R., Meyers, A.H., Kunzmin, S.L., (2000): Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* **404**:752-755.
- Martel, A., Spitzen-Van Der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M.C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuit, F., Pasmans, F., (2013): *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *P.N.A.S.* **110**: 15325–15329.
- McMahon, T.A., Sears, B.F., Venesky, M.D., Bessler, S.M., Brown, J.M., Deutsch, K., Halstead, N.T., Lentz, G., Tenouri, N., Young, S., Civitello, D.J., Ortega, N., Fites, J.S., Reinert, L.K., Rollins, L.A., Raffel, T.R., Rohr, J.R. (2014): Amphibians acquire resistance to live and dead fungus overcoming fungal immunosuppression. *Nature* **511**: 224-227.
- Mendoza, L., Taylor, J.W., Ajello, L. (October 2002): "The class mesomycetozoea: a heterogeneous group of microorganisms at the animal-fungal boundary". *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 315–44. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160950. PMID 12142489.