



LIFE19 NAT/IT/000883



Committente



Con il contributo dello strumento finanziario Life dell'UE

## PROGETTO LIFE19 NAT/IT/000883 LIFE INSUBRICUS

“Urgent actions for long-term conservation of *Pelobates fuscus insubricus* in the distribution area”



### Piano reintroduzione/ripopolazione di *Pelobates fuscus insubricus* e Studio di Fattibilità Action A3.2 Analisi sanitarie

Co-financed by:



Partners:



Deadline 10/2022 - Actual 22/03/2023



---

## Indice

1	SUMMARY .....	3
2	Introduzione .....	4
2.1	Obiettivi dell'azione.....	4
3	Metodologia di lavoro .....	4
3.1	Area di studio.....	4
3.2	Campionamento biologico .....	5
3.3	Diagnostica molecolare .....	5
3.3.1	Estrazione del DNA .....	6
3.3.2	Screening dei campioni tramite saggi qPCR .....	6
4	Risultati e discussione.....	6
5	Bibliografia.....	7
6	REFERENTI.....	8

---

## 1 SUMMARY

The objectives of Action A3.2 included ascertaining, through a non-invasive molecular diagnostic approach, the health status of the *P. fuscus* populations monitored during the course of the project by means of DNA-qPCR target assays, aimed at excluding the presence of the most common infections/diseases of amphibians namely Chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*), Ranavirus and *Saprolegnia parasitica*. Analysis that is indispensable, in addition to providing a comprehensive screening of the health status of the species' populations, especially to avoid any risk of "induced migration" of pathogens during future repopulation and reintroduction actions of the species, as envisaged by the subsequent phases of the project.

Samples taken from all the sites of ascertained presence for the species and the subject of the project's ex-ante monitoring, allowed the collection of more than 500 samples, which subjected to analysis, fortunately allowed us to find negativity to the presence tests of the target pathogens sought in the entire set of samples.

Valuable result that will allow to continue with the best assumptions with the actions of reintroduction of the species in those sti made suitable by the interventions of the project, but that as a precautionary measure, we reserve the right to continue monitoring, thanks to the possibility of being able to continue to carry out random analysis until the end of the project so as to have under control the situation always updated regarding the health aspect.

---

## 2 Introduzione

### 2.1 Obiettivi dell'azione

Gli obiettivi dell'azione A3.2 prevedono l'accertamento, tramite approccio diagnostico molecolare non invasivo, dello stato di salute delle popolazioni di *P. fuscus* monitorate nel corso del progetto tramite saggi target DNA-qPCR, o dei putativi ambienti di introduzione / ripopolamento tramite approcci innovativi basati su Environmental DNA eDNA-qPCR. Tali analisi sono volte ad escludere la presenza delle più comuni infezioni/malattie degli anfibi: Chitridiomicosi (*Batrachochytrium dendrobatidis*), Ranavirus e *Saprolegnia parasitica*.

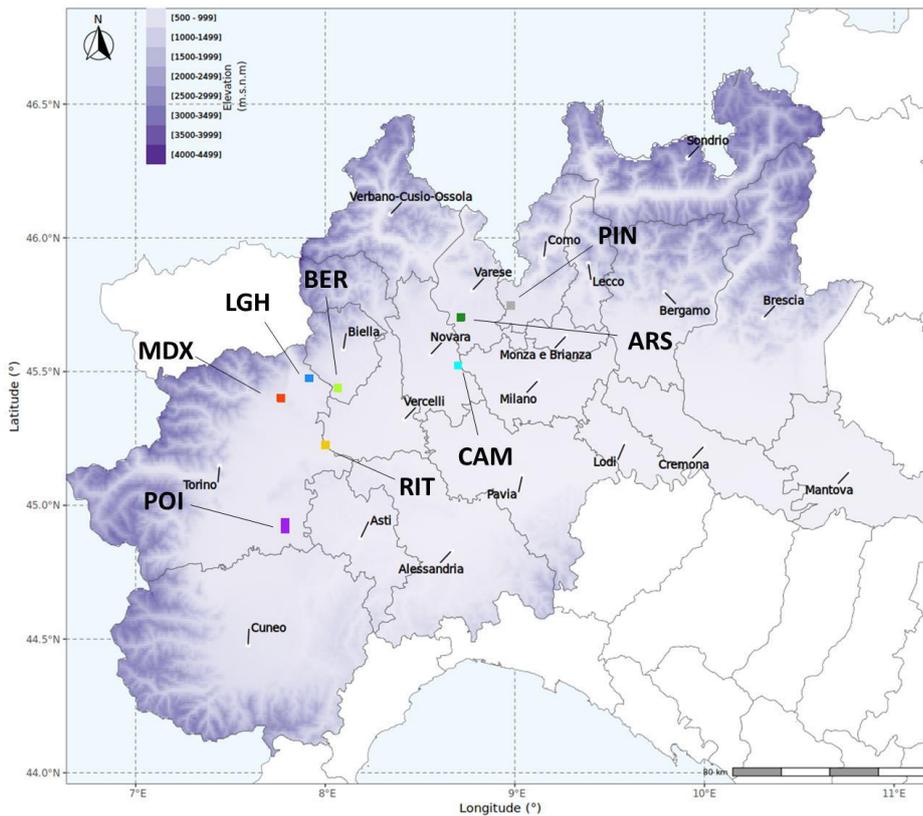
## 3 Metodologia di lavoro

### 3.1 Area di studio

Le indagini atte a valutare tramite approccio genomico lo stato di conservazione attuale di *P. fuscus* hanno interessato quasi tutte le stazioni riproduttive accertate nel corso dell'ultimo decennio circa sul territorio lombardo-piemontese per un totale di 8 macropopolazioni indagate (Fig. 1).

Nello specifico i siti Natura 2000 indagati sono stati i seguenti:

IT2010011 "Paludi di Arsago" (**ARS**) e IT2020007 "Pineta pedemontana di Appiano Gentile" (**PIN**) in Lombardia, IT1150001 "Valle del Ticino" (**CAM**), IT1120013 "Isolotto del Ritano" (**RIT**), IT1110035 "Stagni di Poirino-Favari" (**POI**), IT1130004 "Lago di Bertignano e stagno presso la strada per Roppolo" (**BER**), IT1110021 "Laghi Ivrea" (**LGH**), IT1110047 "Scarmagno - Torre Canavese (morena destra Ivrea)" (**MDX**) in Piemonte.



**Figura 1:** Carta di insieme del territorio interessato dalle attività di monitoraggio genomico ex-ante: si tratta di quasi tutte le stazioni riproduttive attualmente conosciute per il Pelobate fosco insubrico in Piemonte e Lombardia. I colori, rappresentativi di ogni località verranno poi riutilizzati nelle successive rappresentazioni grafiche relative alle analisi bioinformatiche condotte sui marcatori genomici e mitocondriali.

### 3.2 Campionamento biologico

Per poter accertare l'assenza negli individui riproduttori di *P. fuscus* dei patogeni elencati in precedenza, un fitto piano di campionamento è stato operato sulle 8 macropopolazioni monitorate durante il progetto e riportate in figura 1. Tramite tamponi sterili si è proceduto a campionare porzioni di cellule epiteliali (per la detection di *Batrachochytrium dendrobatidis*; seguendo il protocollo AmphibiaWeb "chytrid swabbing protocol" (Briggs NIH Research Group, 2009) o di mucose buccali/cloacali (per la detection di Ranavirus, seguendo il "Sampling protocol for ranaviruses" (San Diego Zoo Institute for Conservation Research, 2016)). Per quanto riguarda la detection di *Saprolegnia parasitica* o di congenerici, sono stati prelevati, laddove presenti, porzioni di ovature con evidenti segni di aggressione micotica, tra cui arresto dello sviluppo embrionale, decolorazione dell'embrione e presenza di muffe. Tali attività sono state condotte negli anni 2021 e 2022 e la frequenza dei campioni raccolti ha previsto la copertura dell'intera finestra riproduttiva nei siti oggetto di monitoraggio. I campioni sono stati raccolti seguendo le accortezze logistiche più idonee per evitare l'inavvertito contagio tra individui (es. uso frequente di guanti monouso, sterilizzazione tramite alcool e flambatura degli strumenti di prelievo e manipolazione dei tamponi). I campioni biologici prelevati sono stati quindi conservati in vials sterili, contenenti etanolo (molecular biology grade) > 90% e conservati a -20°C fino al trasferimento presso il laboratorio della società incaricata delle analisi diagnostiche FEM2-Ambiente srl (Milano).

### 3.3 Diagnostica molecolare

Le analisi di diagnostica molecolare sanitaria sui campioni raccolti sono state affidate alla società esterna FEM2-Ambiente s.r.l. a seguito di determinazione di aggiudicazione definitiva del Responsabile U.O.9 n. 160 del 29/04/2021 e successivo contratto di appalto del servizio di analisi genetiche, DNA-ambientale e analisi sanitarie del progetto LIFE19 NAT/IT/000883 LIFE INSUBRICUS – "URGENT ACTIONS FOR LONG-TERM CONSERVATION OF *PELOBATES FUSCUS INSUBRICUS* IN THE DISTRIBUTION AREA"- AZIONE A.3 SUB.ATTIVITÀ 3.1. ANALISI GENETICHE e 3.2 ANALISI SANITARIE. CIG 8652825912 CUP C16J19000420003.

Il dott. Valerio Mezzasalma ricopre il ruolo di supervisione delle attività di laboratorio, mentre la Dr.ssa Antonia Bruno ricopre il ruolo di responsabile scientifico dell'attività di ricerca incaricato da FEM2 Ambiente nell'ambito del succitato incarico.

### 3.3.1 Estrazione del DNA

I campioni raccolti per le analisi molecolari Allegato 1 sono stati processati al fine di rimuovere ogni traccia del liquido di conservazione, sminuzzati e sottoposti al protocollo di estrazione specifico per swab e altri tessuti utilizzando la resina InstaGene™ Matrix | Bio-Rad seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

### 3.3.2 Screening dei campioni tramite saggi qPCR

Gli estratti di eDNA sono stati sottoposti a saggi di detection target dei patogeni di interesse utilizzando i seguenti protocolli standard (già validati e perfezionati dal team di FEM2-Ambiente, in collaborazione con la Dr.ssa Bruno, nell'ambito di precedenti progettualità).

- Detection di *Batrachochytrium dendrobatidis*: Boyle et al. 2004
- Detection di Ranavirus: Leung et al. 2017
- Detection di *Saprolegnia parasitica* e *Saprolegnia* spp.: Rocchi et al. 2017

Per ciascun patogeno da ricercare (V. allegato 1), la combinazione di primer esterni e probe è stata utilizzata per allestire saggi qPCR con tecnologia TaqMan includendo nella stessa piastra di lavoro, gli estratti di DNA dei campioni da testare, gli estratti di DNA dei patogeni da utilizzare come controlli positivi di reazione e dei controlli negativi per verificare l'assenza di contaminazione durante le fasi di allestimento delle reazioni. Inoltre, Per ciascuna sessione di screening qPCR, è stata anche testata la presenza di DNA di *P.fuscus*, a partire dagli stessi tamponi/ovature, per verificare il successo della fase di estrazione del DNA, seguendo il protocollo sviluppato in Thomsen et al. 2012. Come da protocolli standard (ad es. Langlois et al. 2021; Jamwal et al. 2021), sono state utilizzate più diluizioni seriali per ogni estratto di DNA (da 1:1 fino a 1:10,000) in triplicato. I saggi sono stati condotti su RealTime PCR (AB 7500 - Applied Biosystem, StepOnePlus™-Thermofisher, LightCycler96 - Roche).

Gli output ottenuti sui campioni di controllo positivo hanno permesso di identificare per ogni combinazione di primer e probe selezionata per ciascuna patogeno target alcuni parametri di efficacia del saggio tra cui: efficienza di amplificazione, limite di detection e limite di quantificazione (Bustin et al., 2009; Klymus et al., 2019). I valori di Ct (Cycle threshold) sono stati convertiti in counts (copie di DNA: Bruno et al., 2017). Sulla base di questa messa a punto, quando nei campioni raccolti nell'ambito del progetto LIFE Insubricus il numero di copie inferito tramite qPCR era al di sotto del limite di quantificazione ma al di sopra del limite teorico di tre copie per reazione (Bustin et al., 2009), questo è stato giudicato comunque come detection positiva della specie target.

## 4 Risultati e discussione

Le attività di estrazione del DNA sono andate a buon fine per tutti i campioni considerati come confermato anche dalla detection sempre positiva di *P. fuscus* utilizzata come controllo positivo di reazione secondario.

In Tabella 1 viene riportata una sintesi dei campioni sottoposti ad analisi per ogni popolazione indagata e dei relativi esiti. La lista completa dei campioni e degli esiti diagnostici è riportata in Allegato 1.

MACRO-POPOLAZIONE	POPOLAZIONE	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Ranavirus	<i>Saprolegnia parasitica</i>
		n°positivi / n°campioni testati / n° campioni da testare	n°positivi / n°campioni testati / n° campioni da testare	n°positivi / n°campioni testati / n° campioni da testare

ARS	ARS01	0/29/0	0/27/0	0/1/9
	ARS02	0/43/0	0/4/0	1/1/10
	ARS15	0/29/0	0/29/0	0/0/0
PIN	PIN06	0/12/0	0/12/0	0/0/0
BER	BER33	0/20/0	0/20/0	0/0/0
CAM	CAM01	0/29/0	0/31/0	0/0/1
LGH	LGH18	0/0/0	0/0/0	0/1/0
MDX	MDX	0/17/0	0/17/0	0/0/0
	MDX01	0/7/0	0/6/0	0/0/0
	MDX24	0/0/0	0/0/0	1/1/3
	MDX25	0/6/0	0/6/0	0/0/0
POI	POI01	0/0/0	0/0/0	0/0/0
	POI05	0/28/0	0/17/0	0/1/5
	POI06	0/0/0	0/1/0	0/0/0
RIT	RIT02	0/30/0	0/28/0	1/1/13
TOTALE CAMPIONI TESTATI		250	198	5

**Tabella 1:** Riassunto delle analisi sanitarie ed esiti

Per *Saprolegnia*, le analisi sono al momento in corso.

## 5 Bibliografia

- Boyle, D. G., Boyle, D. B., Olsen, V., Morgan, J. A. T., & Hyatt, A. D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of aquatic organisms*, 60(2), 141-148.
- Briggs NIH Research Group. (2009). Chytrid swab protocol. AmphibiaWeb. [http://amphibiaweb.org/chytrid/swab\\_protocol.html](http://amphibiaweb.org/chytrid/swab_protocol.html) [Accessed May 2016].
- Bruno, A., Sandionigi, A., Galimberti, A., Siani, E., Labra, M., Cocuzza, C., ... & Casiraghi, M. (2017). One step forwards for the routine use of high-throughput DNA sequencing in environmental monitoring. An efficient and standardizable method to maximize the detection of environmental bacteria. *MicrobiologyOpen*, 6(1), e00421.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., ... & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.
- Jamwal, P. S., Bruno, A., Galimberti, A., Magnani, D., Krupa, H., Casiraghi, M., & Loy, A. (2021). First assessment of eDNA-based detection approach to monitor the presence of Eurasian otter in southern Italy. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 32(2).
- Klymus, K. E., Merkes, C. M., Allison, M. J., Goldberg, C. S., Helbing, C. C., Hunter, M. E., ... & Richter, C. A. (2020). Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*, 2(3), 271-282.

- 
- Langlois, V. S., Allison, M. J., Bergman, L. C., To, T. A., & Helbing, C. C. (2021). The need for robust qPCR-based eDNA detection assays in environmental monitoring and species inventories. *Environmental DNA*, 3(3), 519-527.
  - Leung, W. T., Thomas-Walters, L., Garner, T. W., Balloux, F., Durrant, C., & Price, S. J. (2017). A quantitative-PCR based method to estimate ranavirus viral load following normalisation by reference to an ultraconserved vertebrate target. *Journal of Virological Methods*, 249, 147-155.
  - Thomsen, P. F., Kielgast, J. O. S., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., ... & Willerslev, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular ecology*, 21(11), 2565-2573.
  - San Diego Zoo Institute for Conservation Research. 2016. Sampling protocol for ranaviruses. <http://admininstitute.sandiegozoo.org/sites/default/files/Ranavirus%20Guidelines%202016.pdf>. Accessed February 2020.
  - Rocchi, S., Tisserant, M., Valot, B., Laboissière, A., Frossard, V., & Reboux, G. (2017). Quantification of *Saprolegnia parasitica* in river water using real-time quantitative PCR: from massive fish mortality to tap drinking water. *International Journal of Environmental Health Research*, 27(1), 1-10.

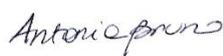
## 6 REFERENTI

Il presente report è stato redatto da:

**Dott. Valerio Mezzasalma** (Responsabile attività analitiche FEM2-Ambiente s.r.l.)



**Dr.ssa Antonia Bruno** (Responsabile scientifico delle analisi microbiologiche su *P. fuscus* – BTBS, Università degli Studi di Milano-Bicocca).



Hanno inoltre contribuito alle fasi analitiche di laboratorio del progetto il Dott. Fausto Ramazzotti e il Dott. Luca Caprotti (BTBS – UNIMIB) e la Dott.ssa Jessica Frigerio e il Dott. Tommaso Gorini (FEM2-Ambiente srl).