



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente

Direttore: Prof. Silvio Seno

Corso di Laurea Magistrale in Conservazione della biodiversità, didattica e
comunicazione scientifica

**Screening sulla diffusione di *Ophidiomices ophidiicola* in
Italia**

Relatore:

Prof. Roberto Sacchi

Correlatori:

Federico Storniolo

Matteo Riccardo Di Nicola

Tesi di Laurea Magistrale

in Conservazione della biodiversità, didattica e comunicazione scientifica

di GIACOMO VANZO

matr. 520335

Anno Accademico 2023/24

INDICE

INTRODUZIONE	1
1. L'IMPORTANZA DELLO STUDIO DELLA SALUTE ANIMALE	1
2. LE PATOLOGIE DELL'ERPETOFAUNA SELVATICA	4
2.1. LE PATOLOGIE FUNGINE DEGLI SQAMATA	6
3. <i>OPHIDIOMYCES OPHIDIICOLA</i>	9
3.1 BIOLOGIA DI <i>OPHIDIOMYCES OPHIDIICOLA</i>	12
3.2 PATOGENESI	17
3.3. ALTERAZIONI FISIOLOGICHE E COMPORTAMENTALI	21
3.3. DISTRIBUZIONE E EFFETTI DELL'OFIDIOMICOSI SULLE POPOLAZIONI NATURALI	24
3.4. DIAGNOSI DEL PATOGENO	26
3.5. CRITERI DIAGNOSTICI	29
3.6. TECNICHE ALTERNATIVE DI <i>DETECTION</i>	30
SCOPI DEL LAVORO	32
MATERIALI E METODI	34
1. PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO	34
2. <i>DETECTION</i> MOLECOLARE	38
3. ANALISI ISTOPATOLOGICA	40
4. ANALISI STATISTICHE	40
RISULTATI	42
1. RACCOLTA DEI CAMPIONI	42
2. <i>DETECTION</i> MOLECOLARE	44
2.1 DETERMINAZIONE DEI CLADI	51
3. <i>DETECTION</i> ISTOLOGICA	52
4. ANALISI STATISTICHE	53
DISCUSSIONE	55
RINGRAZIAMENTI	64
BIBLIOGRAFIA	65

INTRODUZIONE

1. L'importanza dello studio della salute animale

Lo stato di salute degli animali ha sempre interessato l'uomo sin dai tempi antichi perché è strettamente correlata a vari aspetti della società come l'allevamento del bestiame per la sicurezza alimentare, la salute pubblica e quella degli animali da compagnia (Swabe, 1998; Wells, 2009; Dietz & York, 2015). Nell'ambito della salute animale, di particolare interesse vi è quella degli animali da reddito. Infatti, essi sono estremamente studiati perché suscitano l'interesse delle industrie alimentari che ne promuovono la ricerca al fine di migliorare il profitto economico attraverso un aumento della produttività sostenuto da una miglior condizione fisica degli animali (Sandeberg et al., 2023). Un'altra categoria di animali per i quali le indagini sanitarie sono di grande rilevanza è rappresentata da quelli destinati alla compagnia (*pet*): essi godono di uno status privilegiato e una conoscenza decisamente più approfondita grazie all'interesse sociale ed emotivo che rappresentano per l'uomo, sin dai tempi antichi (MacKinnon, 2010). Fra questi, i più studiati sono senz'altro i cani (*Canis lupus familiaris*) e i gatti (*Felis silvestris catus*), seppur sia in ampia espansione anche la ricerca incentrata su uccelli, rettili, anfibi e micromammiferi da compagnia (es. Engebretson, 2006; Hausmann et al., 2013; Rowland, 2020; Naguib, 2022). In questo scenario, quindi, appare evidente che l'interesse e la conoscenza dello stato di salute delle popolazioni selvatiche non direttamente collegate alle attività umane siano secondari.

Negli ultimi anni, tuttavia, la ricerca riguardo la salute della fauna selvatica è incrementata significativamente, anche in conseguenza delle possibili implicazioni delle patologie animali, come nel caso dei possibili rischi zoonotici palesati in occasione della pandemia da Covid19 (Parry, 2020; Tiwari et al., 2020; Garoma & Diba, 2022; Haagmans &

Koopmans, 2022). Per “zoonosi” si intende una qualsiasi malattia infettiva che può essere trasmessa dagli animali all'uomo. Gli agenti infettivi che causano le zoonosi possono essere trasmessi sia direttamente che indirettamente, quindi attraverso il contatto, il passaggio di liquidi biologici infetti, tramite organismi vettori o alimenti infetti (Canavesi, 2007). Le zoonosi comportano il contagio da parte di un nuovo agente eziologico i cui effetti sull'ospite umano possono coprire un ampio spettro clinico, dall'assenza di sintomi evidenti all'insorgenza di sintomatologie sub-cliniche o cliniche, che possono comportare anche conseguenze letali per l'ospite. Inoltre, le zoonosi possono avere elevata capacità proliferativa, con il conseguente sviluppo di epidemie o pandemie, come è accaduto ad esempio nei casi dell'influenza pandemica H1N1, del COVID-19, dell'Ebola e dell'AIDS (Marx et al., 2001; Sharp et al., 2001; Marí Saéz et al., 2015; Sooksawasdi Na Ayudhya & Kuiken, 2021). Per questi motivi, studiare la salute delle popolazioni animali è fondamentale e ciò è particolarmente valido per le specie che vivono a stretto contatto con l'uomo e che possono funzionare come amplificatori di agenti patogeni, con conseguente rischio per la salute umana (Morand et al., 2014).

L'approccio sanitario che più comunemente si ha nei confronti degli animali è l'eradicazione dei potenziali agenti eziologici, compresi i parassiti, per ridurre la morbilità e la mortalità che questi possono avere nei confronti degli ospiti (Blasco & Molina-Flores, 2011; Ewen et al., 2012; Murray et al., 2022). Tuttavia, questo approccio non è necessariamente quello migliore. Gli effetti negativi che i parassiti inducono nei loro ospiti, infatti, tendono a mettere in ombra il valore ecologico e i ruoli che essi hanno all'interno delle comunità. La rilevanza ecologica dei parassiti è oggetto di studio approfondito nell'ambito della biologia della conservazione da relativamente pochi anni (Jørgensen, 2015), ad esempio nell'ambito del controllo del numero di ospiti (O'Brien, 2000), dell'effetto sul loro comportamento, dell'impatto sulla composizione delle comunità e delle reti trofiche (Gómez & Nichols, 2013; Godkin & Smith, 2017) e del loro ruolo come “motori dell'evoluzione” (Thompson & Cunningham, 2002; Harvell, 2004). In un contesto di crescita del numero di malattie emergenti,

il ruolo della fauna selvatica nell'insorgenza di malattie umane e degli animali domestici è stato ampiamente riconosciuto come un fattore che non è più possibile ignorare (Ryser-Degiorgis, 2013). Pertanto, il monitoraggio sanitario della fauna selvatica è diventata una componente integrante nell'identificazione e nella gestione di potenziali minacce per la salute umana e animale (Daszak et al., 2001; Jones et al., 2008; Belant & Deese, 2010; Artois et al., 2012), per la sicurezza alimentare (Chmielewski & Swayne, 2011) e per la conservazione (Guberti et al., 2014). La gran parte delle indagini sanitarie finalizzate alla conservazione si sono focalizzate praticamente solo su mammiferi e uccelli, in quanto costituiscono la maggioranza delle specie animali di interesse economico o ricreativo, nonché rappresentano i gruppi maggiormente coinvolti nei processi zoonotici che interessano l'uomo (Contreras et al., 2016; Han et al., 2016). Recentemente, è cresciuto anche l'interesse nei confronti degli anfibi, in quanto questa classe di Vertebrati è quella maggiormente a rischio di estinzione e perché tra i principali motivi che ne causano il declino vi sono le malattie infettive (Fisher & Garner, 2020). In questo contesto, i rettili sono stati quasi completamente trascurati (Todd et al., 2010), anche se con 12.162 specie ad oggi descritte, sono il secondo gruppo più ricco di specie tra i vertebrati, dopo i pesci ossei (www.reptile-database.org, Luglio 2024), costituendo un'importante parte della biodiversità globale. Proprio per questa ragione, negli ultimi anni i biologi conservazionisti hanno cominciato a dedicare una maggiore considerazione delle cause, dei trend e delle previsioni del loro declino a livello globale. Infatti, è possibile che i rettili anche se scarsamente studiati siano ugualmente o più minacciati degli anfibi e che siano spesso vulnerabili agli stessi tipi di minaccia (Gibbons et al., 2000). Tra le minacce principali che colpiscono questa classe di Vertebrati, è possibile evidenziare i cambiamenti climatici, la perdita di habitat, l'introduzione di specie aliene, il sovrasfruttamento a scopo alimentare e/o economico, l'inquinamento ambientale, la carenza di studi a lungo termine e su ampia scala geografica e, infine, la diffusione di patologie (Gibbons et al., 2000). È perciò evidente che lo studio dei

patogeni e il monitoraggio a lungo termine della diffusione delle malattie e dei processi di infezione che avvengono nelle popolazioni di rettili sia essenziale per la loro conservazione.

2. Le patologie dell'Erpetofauna selvatica

Ad oggi, seppur le conoscenze in ambito sanitario dei rettili selvatici siano ancora molto scarse rispetto ai vertebrati di più ampio interesse, sono state individuate diverse malattie infettive emergenti (*Emerging Infective Diseases*, EID) che colpiscono questi animali su scala globale. Le EID sono causate da agenti patogeni che hanno subito recenti cambiamenti in termini di diffusione geografica, aumento dell'incidenza e ampliamento della gamma di ospiti, o da agenti patogeni di nuova scoperta (McArthur, 2019). L'erpetofauna (rettili ed anfibi) è ultimamente oggetto di studi estensivi a causa dell'emergere di malattie batteriche, virali, fungine e parassitarie che non solo sono sempre più osservate in cattività, ma che sono anche responsabili del declino delle popolazioni selvatiche (Gibbons & Steffes, 2013; La'Toya & Wellehan, 2013; Cunningham et al., 2015; Lorch et al., 2016; Spitzen-van der Sluijs et al., 2016; Xie et al., 2016; Adamovicz et al., 2020; La'Toya & Klaphake, 2020; Ladner et al., 2022; Schilliger et al., 2023). In particolare, per quanto riguarda la classe Amphibia, in cui le cui conoscenze sanitarie sono più approfondite a livello globale, queste malattie sono dovute principalmente a infezioni da funghi chitridi, come *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) e *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*), i quali si sono diffusi a livello globale attraverso il commercio di anfibi destinati all'alimentazione e alla compagnia e che hanno causato il declino e la scomparsa di numerose specie (Fisher & Garner, 2020).

Per quanto riguarda la classe Reptilia, in cui le conoscenze sanitarie sono molto limitate, le principali EID sono dovute a infezione da *Arenavirus*, *Nidovirus*, *Paramyxovirus*, Coccidiosi intranucleare delle Testuggini (TINC), Ofidiomicosi, Paranannizziocicosi, Nannizziomicosi e *Emydomyces testavorans* (Gibbons & Steffes, 2013; La'Toya & Wellehan, 2013; Baker et al.,

2019; Woodburn et al., 2019; Adamovicz et al., 2020; Haynes & Allender, 2021; Marschang et al., 2021; Parrish et al., 2021; Di Nicola et al., 2022a). Alcuni agenti infettivi causa di EID come la Criptosporidiosi, i *Rhabdovirus*, gli *Adenovirus*, gli *Iridoviridae* come il *Ranavirus* e le infezioni da *Herpesvirus* sono invece diffusi sia in anfibi che nei rettili (Robert, 2010; Ariel, 2011; P. M. Gibbons & Steffes, 2013; La'Toya & Wellehan, 2013, 2020; Brunner et al., 2015; Ip et al., 2016; Harrach et al., 2019; Adamovicz et al., 2020; La'Toya & Klaphake, 2020; Origgi et al., 2021; Harding et al., 2022; Schilliger et al., 2023). Focalizzandosi in particolare sui responsabili delle malattie fungine dei rettili, la maggior parte di essi sono stati originariamente raggruppati in un complesso fungino chiamato "*Chrysosporium anamorph of Nannizziopsis vriesii (CANV)*". In seguito a studi successivi che hanno identificato nel dettaglio molti degli agenti patogeni che costituivano questo gruppo, la denominazione *CANV* è stata abbandonata per una nuova classificazione che include diversi generi appartenenti all'ordine *Onygenales*.

I funghi onigeni sono ascomiceti saprotrofi e/o patogeni, anche dell'uomo. Questi funghi sono caratterizzati dal consumare e scomporre la cheratina, ovverosia il componente principale dello strato esterno della pelle e si trovano principalmente su animali, escrementi e aree frequentate da animali. Molti di questi funghi sono dimorfici e possono passare dalla forma di muffa a quella di lievito a seconda dell'ambiente (Van Dyke et al., 2019; Kandemir et al., 2022; Laux et al., 2023). Tra i funghi onigeni, quelli che colpiscono i rettili appartengono ai generi *Ophidiomyces*, *Parananizziopsis*, *Emydomyces* e *Nannizziopsis* (Di Nicola et al., 2022a) e sono motivo di preoccupazione per l'erpetofauna di tutto il mondo (Allain et al., 2019; Paré & Conley, 2020; Peterson et al., 2020). Questi funghi hanno varie caratteristiche morfologiche e istologiche simili, ma sono stati solo recentemente scoperti o suddivisi in diverse specie tramite analisi molecolari (Sigler et al., 2013; Stchigel et al., 2013; Woodburn et al., 2019). *Nannizziopsis* e *Parananizziopsis* sono generi che colpiscono diversi ordini di rettili, mentre *Emydomyces testavorans* colpisce solo i cheloni e *Ophidiomyces ophidiicola (Oo)* colpisce specificatamente i serpenti (Di Nicola et al., 2022a). Tra questi patogeni, *Oo* è attualmente il

più studiato e molto probabilmente ha il maggiore impatto sulle popolazioni di rettili in natura. In particolare, le infezioni da *Nannizziopsis* sp. e *Paranannizziopsis* sp. nei rettili erano precedentemente note come "yellow fungal disease" (YFD), ora sostituite da "nannizziomicosi" per l'infezione da *Nannizziopsis* sp. e da "paranannizziomicosi" per l'infezione da *Paranannizziopsis* spp. (Paré et al., 2020). Allo stesso modo, l'infezione da *Ophidiomyces ophidiicola* (*Oo*) nei serpenti precedentemente nota come "snake fungal disease" (SFD), è ora indicata come "ofidiomicosi" (Paré et al., 2020). In questo caso, la SFD è ancora oggi utilizzata per descrivere un'ampia serie di segni clinici, mentre il termine "ofidiomicosi" viene limitato solo all'infezione confermata da *Oo* (Schilliger et al., 2023).

2.1. Le patologie fungine degli Squamata

Gli Squamata (Oppel, 1811) sono il più grande ordine di rettili attualmente esistente e comprende i sauri, i serpenti e gli anfisbeni. Con oltre 11.000 specie descritte (www.reptile-database.org, Luglio 2024), gli Squamata sono il secondo ordine più grande dei vertebrati, costituendo quindi un gruppo estremamente diversificato. I rettili appartenenti a questo ordine vengono infettati da diversi funghi dell'Ordine Onygenales ed in particolare da *Nannizziopsis* sp., *Paranannizziopsis* sp. e *Ophidiomyces ophidiicola* (Di Nicola et al., 2022a). La nannizziomicosi è stata descritta per la prima volta nel 1991 nei gechi diurni (*Phelsuma* sp.) e successivamente nel 1997 in tre diverse specie di camaleonti in cattività (*Calumma parsonii*, *Chamaeleo lateralis* e *C. jacksoni*), con *CANV* attribuito come agente eziologico (Paré et al., 1997). La malattia è stata successivamente denominata *YFD* in seguito alla segnalazione di dermatomicosi granulomatosa profonda e pigmentazione giallastra dell'epidermide in tre draghi barbuti (*Pogona vitticeps*) in cattività (Bowman et al., 2007). Da allora questa infezione è stata segnalata in diverse specie di lucertole e coccodrilli ed è ora riconosciuta come una malattia emergente sia negli animali selvatici che in quelli in cattività (Mitchell & Walden, 2013). Infatti, casi di infezione da *Nannizziopsis* spp. nei rettili in cattività sono stati segnalati in Africa, Asia, Europa, Nord America, Australia e Nuova Zelanda (Sigler et al., 2013; Stchigel

et al., 2013; Paré & Sigler, 2016; Peterson et al., 2020). Tra gli agenti eziologici che causano questa infezione, *Nannizziopsis guarroi* è la specie di *Nannizziopsis* più frequentemente segnalata nei draghi barbuti (*Pogona vitticeps*, ovvero sia il sauro in cattività con più elevata prevalenza di nannizziomicosi), seguita da *N. chlamydospora*, *N. draconii* e *N. barbatae* (Johnson et al., 2011; Sigler et al., 2013; Gentry et al., 2021). Altre due specie di *Nannizziopsis* rilevanti sono *N. dermatidis*, che in gechi e camaleonti causa infezioni cutanee e sistemiche che coinvolgono polmoni e reni (Sigler et al., 2013) e *N. crocodili*, isolato per la prima volta negli anni '90 in allevamenti di coccodrilli d'acqua salata (*Crocodylus porosus*) e di coccodrilli di Johnston (*C. johnstoni*) e che provoca elevate mortalità infantili, lesioni e ulcerazioni superficiali a pigmentazione nera ed edema localizzato (Hill et al., 2019a, 2019b). Di grande preoccupazione è stata la prima segnalazione di *N. barbatae* in individui selvatici rinvenuti morti nel 2020 appartenenti a quattro specie di lucertole australiane (Peterson et al., 2020).

La nannizziomicosi si manifesta con l'iniziale proliferazione delle ife nello strato corneo epidermico esterno, con successiva invasione degli strati epidermici più profondi e poi del derma. Di solito si osserva uno spettro di lesioni riconducibili all'infezione, che vanno dalla necrosi liquefattiva dell'epidermide all'infiammazione granulomatosa nel derma (Paré et al., 2006). Nei draghi barbuti, i segni clinici includono dermatite crostosa del capo, della superficie ventrale degli arti e della regione pericloacale (Hellebuyck et al., 2012; Gentry et al., 2021). Le croste si presentano con un aspetto da giallo a marrone (Fig. 1). I segni clinici non patognomonicamente includono la ritenzione della muta, la letargia e l'anoressia. L'infezione culmina in un'infiammazione granulomatosa e in una diffusione viscerale, determinando una prognosi infausta (Wellehan, 2019).



Figura 1. Nannizziomicosi in una iguana verde (*Iguana iguana*) che si presenta con estese lesioni cutanee nel fianco. *Credits:* Schilliger et al., 2023.

Il genere *Paranannizziopsis*, invece, comprende quattro specie, tre delle quali sono state descritte esclusivamente nei serpenti dai tentacoli (*Erpeton tentaculatum*) in cattività. Le varie specie di *Paranannizziopsis* si differenziano per la tipologia di conidio prodotta a livello lesionale e per la produzione di artroconidi o meno in coltura (Bertelsen et al., 2005; Sigler et al., 2013). In particolare, *Paranannizziopsis crustacea*, *Paranannizziopsis californiensis* e *Paranannizziopsis longispora* causano forme aggressive di dermatomicosi che si manifestano in lesioni necrotiche estese e con conseguenza anche letali (Fig. 2; Bertelsen et al., 2005; Sigler et al., 2013; Stchigel et al., 2013). *Paranannizziopsis australasiensis*, invece, è stata identificata in diversi taxa di Squamati in Australia e Nuova Zelanda (Stchigel et al., 2013). Questo fungo è stato isolato da due acrocordidi (*Acrochordus* sp.) ospitati in cattività in un istituto zoologico a Victoria (Sigler et al., 2013) che mostravano lesioni cutanee biancastre sparse, circolari o puntiformi (Paré, 2007). La stessa specie di fungo è stata confermata dall'istopatologia, dalla coltura in vitro e dal sequenziamento dell'ITS (Internal Transcribed Spacer) come causa di dermatite da nodulare a ulcerosa in *Sphenodon punctatus* e *Pogona vitticeps* tenuti in cattività

all' Auckland Zoo in Nuova Zelanda (Sigler et al., 2013; Masters et al., 2016) con conseguenze letali nel caso di *P. vitticeps* a causa di diffusione delle ife fungine a livello epatico e subcliniche nel caso di *S. punctatus* (Stchigel et al., 2013).



Figura 2. Scolorimento multifocale della pelle con gonfiore e ispessimento dell'epidermide in *Erpeton tentaculatum*, causato dall'infezione da *Paranannizziopsis crustacea*. Credits: Stchigel et al., 2013.

3. *Ophidiomyces ophiodiicola*

Ophidiomyces ophiodiicola (precedentemente *Chrysosporium ophiodiicola*) è attualmente collocato nell'ordine *Onygenales* (Ascomycota) all'interno della famiglia *Onygenaceae* (Sigler et al., 2013). Questo fungo è strettamente correlato ad altre specie di *Onygenaceae* all'interno del complesso CANV (Sigler et al., 2013). Attualmente, il genere *Ophidiomyces* include una sola specie, *O. ophiodiicola*, ed è in natura è noto per infettare solo i serpenti, portando all'ofidiomicosi (nota anche come sindrome *SFD* -Snake Fungal Disease),

patologia potenzialmente mortale (Allender et al., 2011; Sigler et al., 2013; Sleeman, 2013). Come gli altri funghi onigenalei appartenenti all'ex complesso *CANV*, la tassonomia di *Oo* è cambiata molte volte dalla sua scoperta (Paré & Sigler, 2016) e solo recentemente si è iniziato a fare chiarezza riguardo vari aspetti della sua biologia e filogenesi. A livello storico, l'origine dell'*Oo* rimane poco definita poiché c'è un numero limitato di studi che indagano la sua diffusione in ambiente naturale e perché sono stati evidenziati casi sparsi e/o rilevamenti in quasi tutte le ecozone del mondo. Inoltre, capire l'origine di questo fungo è complesso perché esso ha una distribuzione cosmopolita (ad eccezione dell'Antartide e dell'Artide) ed è verosimilmente presente da un tempo indefinitamente lungo al di fuori del suo areale nativo. Infatti, ad oggi la sua filogenesi è stata solo in parte chiarita, dimostrando che il fungo è stato introdotto in Nord America in più occasioni dal XVIII secolo (Ladner et al., 2022).

Una recente review ha fornito un punto della situazione dell'ofidiomicosi su scala globale, passando in rassegna i casi di rilevamento e infezione di *Oo* pubblicati in letteratura fino a giugno 2021 (Di Nicola et al., 2022a). In particolare, la prima segnalazione di *Oo* è associata ad un esemplare di *Cemophora coccinea* raccolto in Florida nel 1945, seguito da *Crotalus horridus* del Wisconsin nel 1958 e da un *Pantherophis spiloides* del Tennessee nel 1973, nei quali il patogeno è stato identificato retrospettivamente tramite analisi molecolari e istopatologiche (Lorch et al., 2021). Successivamente, il fungo è stato identificato in esemplari in cattività di *Python regius*, *Pantherophis guttatus* (Lynne et al., 2020a), *Boiga irregularis* (Nichols et al., 1999; Sigler et al., 2013) e *Thamnophis* (Vissiennon et al., 1999; Sigler et al., 2013). Più recentemente, due diverse colture di *CANV* sono state isolate da serpenti australiani con lesioni cutanee, ovvero un *Acrochordus* sp. in Queensland nel 2003 (Sigler et al., 2013) e un *Hoplocephalus bungaroides* a Victoria nel 2010 (McLelland et al., 2010; Sigler et al., 2013). Un caso di significativa rilevanza è rappresentato dalla rilevazione di ofidiomicosi su un individuo di *Pantherophis obsoletus* catturato in Georgia (USA) nella prima metà degli anni 2000 e mantenuto in cattività per 4 anni. Questo individuo mostrava granulomi facciali

multifocali contenenti ife fungine e artroconidi (Rajeev et al., 2009; Lorch et al., 2016), i quali sono stati isolati e caratterizzati morfologicamente, a livello colturale e molecolare, portando alla classificazione del fungo come *Chrysosporium ophioidicola* (Guarro, D. A. Sutton, Wickes, and Rajeev, sp. nov. (Rajeev et al., 2009). Inoltre, questo patogeno è stato associato a due eventi di elevata mortalità in crotali Nordamericani (*Sistrurus catenatus* e *Crotalus horridus*) in conseguenza dell'insorgenza di diffuse lesioni cutanee (Clark et al., 2011; Allender et al., 2011). Dopo questo evento, una novità nomenclaturale è stata pubblicata da Sigler (2013), in cui *Chrysosporium ophioidicola* è stato riassegnato al nuovo genere *Ophiomyces* [*Ophiomyces ophioidicola* (Guarro, Deanna A. Sutton, Wickes & Rajeev) Sigler, Hambleton & Paré, comb.nov.; Basionimo: *Chrysosporium ophioidicola*], collocato filogeneticamente all'interno della famiglia delle Onygenaceae.

In seguito, *Oo* è stato interessato dal sequenziamento dell'intero genoma a partire da un suo isolato (Ohkura et al., 2017) ed è stata indagata la relazione filogenetica tra gli isolati di *Oo*. Le sequenze derivate dai geni ITS, ACT e TEF del fungo sono state allineate, concatenate e sottoposte alla stima di massima verosimiglianza e all'analisi bayesiana (Franklinos et al., 2017; Sun et al., 2022), producendo un albero filogenetico che supporta l'esistenza di tre cladi:

- Clade I (“clade europeo”), derivato dagli isolati del Regno Unito e della Repubblica Ceca (Franklinos et al., 2017);
- Clade II (“clade Nordamericano”), costituito da isolati provenienti dagli Stati Uniti (Franklinos et al., 2017) e due isolati da un individuo di *Naja atra* originario di Taiwan (Sun et al., 2022);
- Clade III, derivante da due isolati di un *Dinodon rufozonatum* selvatico a Taiwan (Sun et al., 2022) e da un isolato del 1985 dalle lesioni cutanee di un *Python regius* tenuto in cattività nel Regno Unito (Franklinos et al., 2017; Sun et al., 2022).

Tuttavia, la denominazione dei primi due cladi quali “europeo” e “Nordamericano” è ancora dibattuta. Infatti, una recente caratterizzazione di alcuni isolati ha evidenziato che tutti i ceppi

di serpenti selvatici degli Stati Uniti appartengono al Clade II, il quale sembra tuttavia provenire dal più antico Clade I europeo (Ladner et al., 2022). Inoltre, i ceppi *Oo* provenienti da Taiwan, così come da serpenti in cattività provenienti da Australia, Europa e Nord America, sono stati raggruppati all'interno dell'outgroup Clade III o all'interno di diversi lignaggi di Clade II trovati anche nei serpenti selvatici degli Stati Uniti orientali. Questo aspetto è degno di futura attenzione e tra le possibili spiegazioni attuali vi è una contaminazione dovuta al commercio di animali domestici (Ladner et al., 2022). In seguito a questi studi, recentemente, *Oo* è stata rilevata anche in altre specie e paesi, come in individui in cattività di *Acrochordus granulatus* importati dall'Indonesia in uno zoo russo (Ovchinnikov et al., 2021), in *Python bivittatus* ad Hong Kong, Cina (Grioni et al., 2021), in diversi colubridi in cattività in Giappone (Takami et al., 2021) e in diversi serpenti europei allo stato brado (ad es. *Coronella austriaca*, *Hierophis viridiflavus*, *Natrix maura*, *N. natrix*, *N. tessellata*, *Zamenis longissimus* e *Vipera nikolskii*) (Blanvillain et al., 2022; Marini et al., 2023a). Nel complesso, la presenza di *Oo* è stata rilevata principalmente in Nord America, mentre nelle altre parti del globo i dati sono ancora scarsi, in particolar modo in Centro/Sud America e in Africa (Marini et al., 2023a).

3.1 Biologia di *Ophidiomyces ophidiicola*

Il ciclo vitale di *Oo* è attualmente in gran parte sconosciuto. Alcune capacità di *Oo*, come la possibilità di essere coltivato in vitro su terreni di coltura contenenti diversi organismi in decomposizione precedentemente sterilizzati in autoclave (*Pleoticus muelleri*, *Locusta migratoria*, *Carassius* sp. e *Lentinula edodes*) hanno portato a suggerire che esso si tratti di un fungo saprobio (Allender et al., 2015). *Ophidiomyces ophidiicola* è un organismo euriecio, in grado di crescere in vitro in un'ampia gamma di pH, temperature e umidità, che utilizza varie fonti energetiche complesse di carbonio e azoto e che è tollerante alla maggior parte dei composti solforati naturali (Allender et al., 2015). Per questi motivi, *Oo* potrebbe essere in

grado di utilizzare il terreno come reservoir ed a tal proposito in alcuni studi è stata verificata la sua presenza nel substrato in prossimità dei rifugi utilizzati dai potenziali ospiti, dimostrando che questa specie è in grado di crescere sul suolo naturale, seppur solo in condizioni di sterilità (Walker et al., 2019). La crescita di *Oo* sembra, infatti, essere inibita da alcuni metaboliti secondari prodotti da altri taxa fungini e viene generalmente soppressa da parte delle intere comunità microbiche presenti nel suolo attraverso principalmente il sequestro delle risorse disponibili e l'esclusione competitiva (Schlatter et al., 2017; Campbell et al., 2021). Nonostante ciò, nei lavori di Campbell et al. (2021) e Burger et al. (2023) è emerso che la prevalenza del rilevamento di *Oo* era significativamente più alta nei suoli degli *ibernacula* - ovverosia i luoghi di giacenza invernale dei serpenti - rispetto ai suoli superficiali, riconoscendone quindi il potenziale ruolo come serbatoio ambientale, permettendo quindi la trasmissione agli individui nei periodi di latenza. A supporto di questa tesi, è emerso da studi recenti come serpenti negativi per *Oo* prima della brumazione sono emersi dalla latenza invernale con la malattia (Long et al., 2019). Tuttavia, nonostante la concentrazione di *Oo* nel suolo degli *ibernacula* sia maggiore rispetto al resto del substrato, è plausibile che la trasmissione del fungo durante l'ibernazione sia mediata più dal contatto diretto tra gli animali che dalla contaminazione attraverso tane condivise, poiché la capacità di crescita dei patogeni nel suolo è solitamente ridotta a causa della soppressione da parte della comunità microbica presente, ridimensionando il ruolo di questa matrice come serbatoio ambientale (Campbell et al., 2021).

Negli ascomiceti, le strutture riproduttive sono costituite da spore sottoforma di conidi asessuati (anamorfi) (Rajeev et al., 2009; Sigler et al., 2013), i quali possono essere suddivisi in coltura in aleurioconidi e artroconidi (Rajeev et al., 2009; Sigler, 2013; Sigler et al., 2013). Queste due tipologie di conidi si differenziano perché i primi crescono su corti peduncoli ai lati delle ife da cui si staccano per deiscenza resilolitica (Fig. 3a), mentre i secondi si generano dalla frammentazione di ife fertili preesistenti (deiscenza schizolitica, Fig. 3b) (Di Nicola et al., 2022a). Gli aleuroconidi sono di forma cilindrica o clavata, lunghi 2,5-8,3 μm e larghi 1,5-2,9

μm (Fig. 3a; Sigler et al. 2013; Ohkura et al. 2016), mentre gli artroconidi hanno una forma cilindrica più lunga con estremità da leggermente ottuse a tronche, che vanno da 3 a 12,5 μm di lunghezza e 1,5-3,5 μm di larghezza (Fig. 3b; Sigler et al. 2013).

Nelle colture di *Oo* in vitro le ife vegetative sono settate e ramificate, hanno una parete sottile e sono strette. A volte hanno un micelio a forma di racchetta e sono larghe tra 1,5 e 2,5 μm (Rajeev et al. 2009; Sigler, 2013; Sigler et al. 2013) e talvolta presentano delle ramificazioni ondulate visibili lateralmente rispetto alle ife principali (Fig. 1b; Sigler et al. 2013; Ohkura et al. 2016). Questo aspetto è peculiare per la maggior parte degli ex membri del complesso *CANV* (Paré e Sigler 2016). Le ife principali fertili e i rami ifali ondulati laterali possono differenziarsi in catene di artroconidi adiacenti (Sigler et al. 2013; Ohkura et al. 2016).

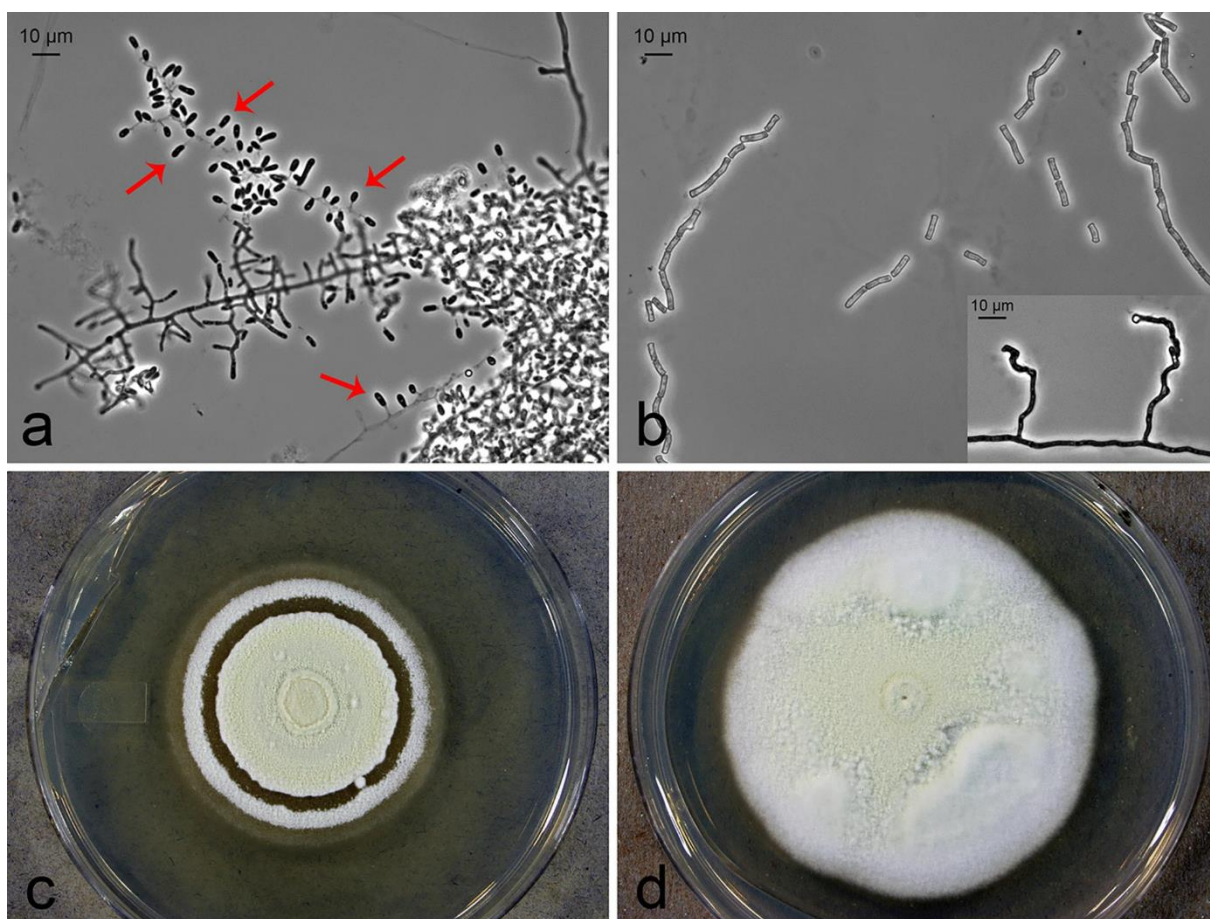


Figura 3. Caratteristiche microscopiche (a e b) e macroscopiche (c e d) delle colture di *Ophidiomyces ophidiicola* (*Oo*). (a) Morfologia microscopica degli aleurioconidi di *Oo* (freccie) che crescono su brevi peduncoli ai lati delle ife da cui si staccheranno per deiscenza resilolitica. (b) Artroconidi cilindrici creati per deiscenza schizolitica (frammentazione) di ife fertili. (b) Dettaglio di ife ondulate che crescono lateralmente alle ife principali. (c) e (d)

Colonie di *Oo* su PDA incubate a 30 °C e mostrate dopo 21 giorni (**c** zonato, colonia polverosa; **d** colonia piatta, densa, vellutata). *Credits*: Di Nicola et al., 2022a.

Le colture in vitro hanno mostrato che l'incubazione del fungo su PDA (*potato destrose agar*) a 25-30 °C in un intervallo compreso tra 14 e 21 giorni porta a ottenere colonie con un diametro variabile tra 31 e 60 mm (Rajeev et al. 2009; Sigler et al. 2013; Ohkura et al. 2016; Sun et al. 2022). Interessante per le sue implicazioni ecologiche è che la crescita di *Oo* tende ad essere inibita a 35 °C (Sigler et al. 2013; Sun et al. 2022), mentre inizia a essere inibita a temperature inferiori a 15 °C (colonia di 5 mm di diametro dopo 14 giorni di incubazione a 15°C; Rajeev et al., 2009), seppur il fungo sia in grado di sopravvivere al congelamento (Paré e Sigler 2016). Le colonie possono avere un aspetto con una colorazione dal biancastro al giallo chiaro (Fig. 1c, d; Rajeev et al. 2009; Sigler et al. 2013) e se incubate a 25°C possono mostrarsi piatte, dense e polverose o vellutate (Fig. 1d; Rajeev et al. 2009; Sun et al. 2021), mentre se incubate a 30°C appaiono zonate (Fig. 1c; Sigler et al. 2013).

Ad oggi, come riportato da Di Nicola et al., 2022a, nelle sezioni istologiche effettuate da materiale proveniente da serpenti infetti, solo la forma ifale di *Oo* e quella artroconidica sono state riconosciute. Inoltre, a livello istologico, il fungo in forma ifale si presenta solitamente intralesionale e presenta delle pareti cellulari parallele, setti trasversali e frequenti ramificazioni ad angolo acuto, oltre che un diametro massimo di 5µm, (Fig. 4a, c, d; Baker et al. 2019). La forma artroconidica del fungo, invece, si presenta nelle sezioni istologiche con una dimensione di circa 2 × 4 µm e con una morfologia cilindrica. Quest'ultima forma si trova anch'essa a livello intralesionale e si presenta associata alle ife fertili e/o in cluster compatti (Fig. 4b; Baker et al., 2019). Questi ultimi aggregati/cluster sono chiamati ciuffi artroconidiali e si trovano talvolta all'interfaccia aria-tessuto sulla superficie della lesione o all'interno di granulomi (Paré e Sigler, 2016). Questi ultimi sono molto importanti nella *detection* istologica del fungo, in quanto gli artroconidi sono prodotti anche in vivo nella superficie cutanea degli ospiti e la

presenza di ciuffi artroconidiali in questa posizione è considerata da Paré e Sigler (2016) come "praticamente patognomonica per l'infezione da uno di questi funghi" (ovvero degli ascomiceti membri dell'ex complesso *CANV*) (Di Nicola et al., 2022a). Queste artrospore che formano aggregati si trovano più comunemente nelle interfacce aria-tessuto sulla pelle o all'interno degli organi interni, come i bronchi (Fig. 4a; Dolinski et al., 2014; Last et al., 2016; Baker et al., 2019; Haynes et al., 2021). Questa caratteristica è coerente con la natura intrinseca dei propaguli infettivi degli artroconidi dermatofiti e con la loro propensione a disperdersi nell'ambiente (Patel et al., 2017).

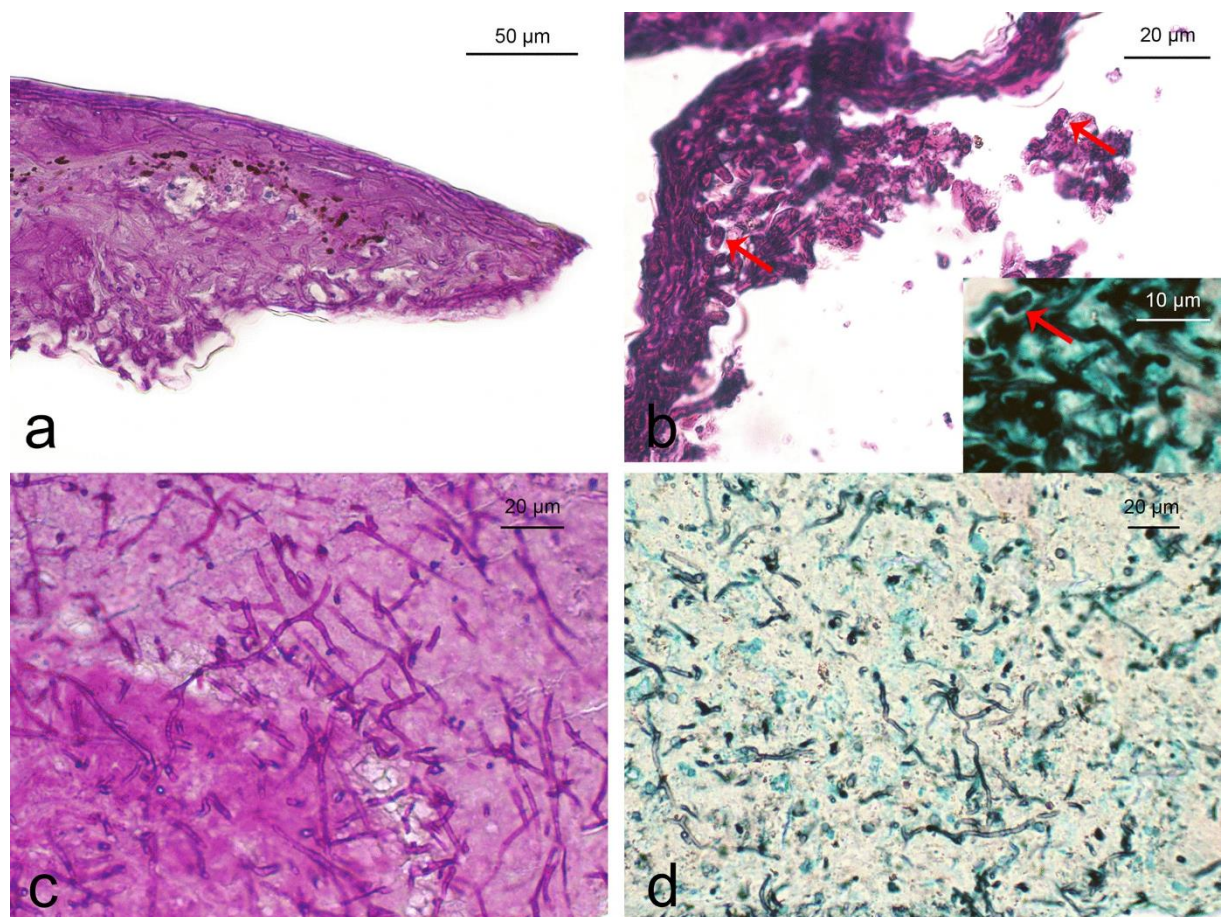


Figura 4. Caratteristiche istologiche di *Ophidiomyces ophidiicola* (*Oo*) nei tessuti cutanei. (a) Sezione istologica che mostra le ife di *Oo*. È possibile notare un aggregato ifale nella regione ventrale della squama che probabilmente si svilupperà in ciuffi artroconidiali e artroconidi. (b) Artroconidi (freccie) situati all'interfaccia aria-tessuto. (c) *Oo* ife ialine che mostrano pareti parallele, setti trasversali e ramificazioni ad angolo acuto. (d) Iife intralesionali di *Oo*. Credits: Di Nicola et al., 2022a.

3.2 Patogenesi

Secondo le informazioni attualmente presenti in letteratura, non è ancora totalmente chiaro come i serpenti selvatici contraggano il fungo patogeno. L'opzione più probabile è che l'infezione naturale da *Oo* in serpenti sani avvenga attraverso il contatto con portatori sintomatici/asintomatici o substrati contaminati (Di Nicola et al., 2022a). Un aspetto importante del contagio e della conseguente insorgenza delle malattie è la specificità d'ospite dei patogeni (Wells & Clark, 2019), che in *Oo* è necessario indagare più approfonditamente, in quanto attraverso esperimenti di inoculazione incrociata è emerso che questo fungo è in grado di contagiare le lucertole oltre ai serpenti (Savannah et al., 2023). Il rischio di contagio da parte di *Oo* è comunque fortemente influenzato dallo stato di salute dell'ospite. A tal proposito, è possibile affermare che la presenza di ferite, abrasioni o ulcerazioni e quindi di interruzioni nella continuità epidermica aumentino il rischio di invasione fungina e delle successive lesioni macroscopiche (Lorch et al., 2015). I risultati di diverse infezioni sperimentali hanno confermato che *Oo* è in grado di contagiare attraverso la sua forma mitosporidica (il conidio), indipendentemente dalla via cutanea/paracutanea scelta (Allender et al., 2015; Lorch et al., 2015; McKenzie et al., 2020b). In questi esperimenti, l'inoculazione dei propaguli è avvenuta tramite diversi metodi come l'applicazione topica su fosse naso-labiali (Allender et al., 2015), bendaggio topico su diverse parti del tegumento, con o senza abrasione cutanea (Lorch et al., 2015) e iniezione sottocutanea (McKenzie et al., 2020a). La dermatomicosi determinata dall'invasione di *Oo* può riguardare singole squame o arrivare ad interessare ampie parti del corpo in posizione dorsale, ventrale o cefalica (Di Nicola et al., 2022a) e nelle diverse infezioni sperimentali si sono manifestati effetti di varia entità, con un tasso di sopravvivenza dei serpenti che è variato tra 0 e 87% principalmente a causa dei diversi disegni sperimentali (ad esempio, via di inoculazione e quantità di conidi inoculati) (Di Nicola et al., 2022a). Ad esempio, mentre nello studio di Lorch et al., (2015) la malattia non è progredita verso stadi pericolosi per la vita e non ha portato a morti "naturali", in quello di McKenzie et al., (2020b) i serpenti infetti sono

stati brumati ed hanno avuto un tasso di mortalità più elevato. Questi dati suggeriscono che la brumazione e le temperature più basse possono avere un impatto negativo sulla sopravvivenza nei serpenti con infezioni fungine.

Durante gli esperimenti con infezione indotta in condizioni controllate, sono stati ottenuti dati anche riguardo le lesioni cutanee che conseguono l'invasione da *Oo*. Queste includono gonfiore regionale, edema squamale, scolorimento o ingiallimento, allargamento e coalescenza della lesione, nonché formazione di vescicole e croste sierocellulari (Lorch et al. 2015; McKenzie et al. 2020b). Le croste possono staccarsi rivelando erosioni e ulcere (Lorch et al., 2016; Meier et al., 2018) o possono trasformarsi progressivamente in granulomi dermici che successivamente vengono erosi o ulcerati (Baker et al., 2019). Altri segni cutanei che sono stati apprezzati in animali naturalmente infetti includono discedisi, increspature, desquamazione e squame necrotiche/brunastre (Franklinos et al., 2017; Haynes et al., 2021; Di Nicola et al., 2022a; Sun et al., 2022; Marini et al., 2023a) (Fig. 5). Queste lesioni indotte da ofidiomicosi interessano principalmente la parte ventrale dell'animale, probabilmente perché è quella più esposta alle spore fungine, e si presentano soprattutto in serpenti adulti e nei maschi, probabilmente per il maggiore spostamento che essi conducono durante il periodo riproduttivo (Burger et al., 2023; Allain et al., 2024).

L'ofidiomicosi può portare anche ad altri effetti, come l'aumento della frequenza di ecdisi (Tetzlaff et al., 2015; Meier et al., 2018; Allain et al., 2024), sebbene questo non fosse stato dimostrato significativamente nei serpenti esposti tramite inoculazione sottocutanea in condizioni controllate (McKenzie et al., 2020b). Questo fenomeno può essere spiegato come un tentativo dell'ofide di eliminare l'infezione superficiale in corso (Lorch et al., 2015) che risulta inefficace quando il fungo ha già raggiunto lo strato α dell'epidermide, costituendo già un'infezione più profonda (Di Nicola et al., 2022a).

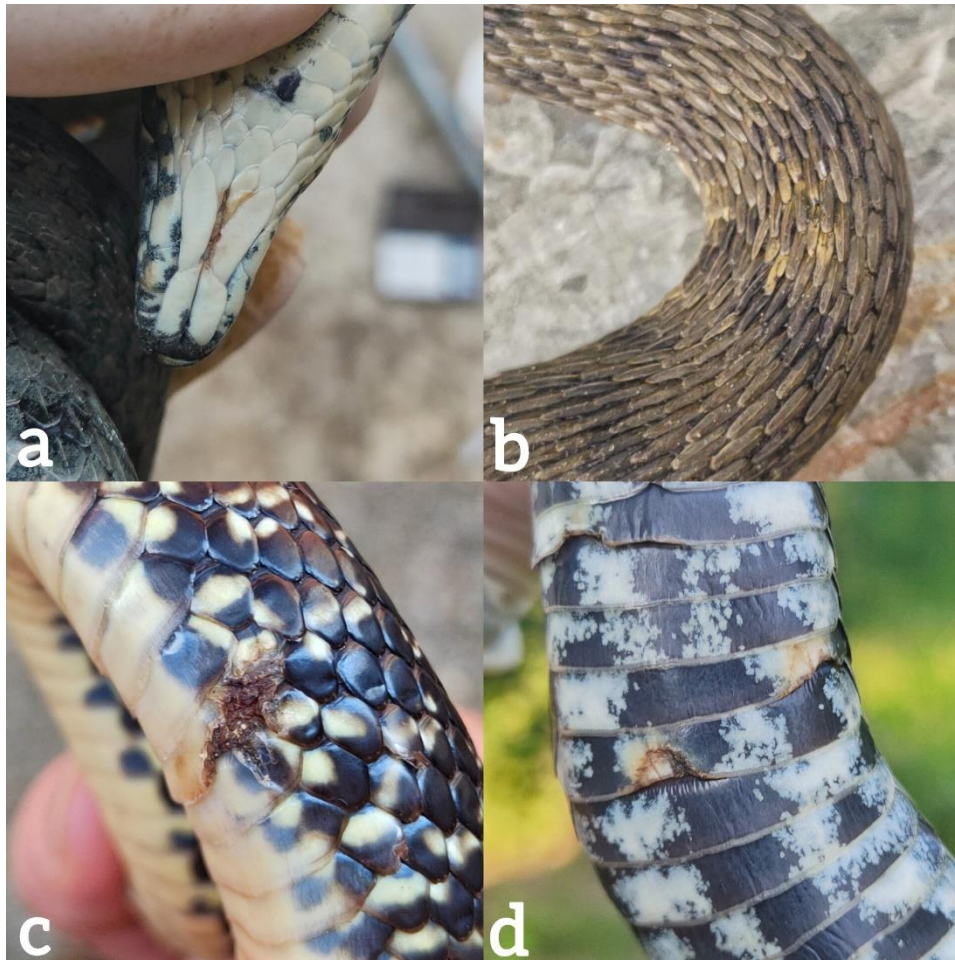


Figura 5. Fotografie di lesioni in individui che in questo studio sono emersi positivi a *Oo*, sia al rilevamento molecolare che a quello istologico. **(a)** Lesione tra le squame cefaliche ventrali in *N. tessellata*; **(b)** Ingiallimento e degradazione delle squame in *N. tessellata*; **(c)** Lesione crostosa in *H. viridiflavus*; **(d)** Lesioni ventrali in di *N. tessellata*.

L'infezione fungina, tuttavia, può interessare anche parti più viscerali degli animali e non solo quelle più esterne (McKenzie et al., 2020a). Quando l'invasione fungina si limita allo strato epidermico, le ife fungine e i conidi formano sovente densi aggregati all'interno della cheratina e della crosta sierocellulare, sottostanti a uno strato di eterofili e macrofagi epitelioidi. Quando, invece, le ife raggiungono i tessuti più profondi, il fungo può causare granulomi dermici o ipodermici multifocali che contengono un'area centrale di necrosi e che sono spesso visibili esternamente come noduli (Allender et al., 2011; Ohkura et al., 2017). Queste aree necrotiche sono circondate da un anello di macrofagi epitelioidi integrato con un numero di eterofili che aumenta verso la periferia (McKenzie et al., 2020a). Questo pattern suggerisce una possibile diffusione ematogena all'interno del derma (McKenzie et al., 2020b). Alcuni

granulomi fungini sottocutanei possono raggiungere la cavità celomatica, il cuscinetto adiposo celomatico e i reni, diffondendosi attraverso i tessuti connettivi e i muscoli scheletrici epassiali (Robertson et al., 2016; Steeil et al., 2018; Anderson et al., 2021). I granulomi non tegumentari che si generano in seguito a infezioni naturali o sperimentali possono interessare diverse strutture (in questo caso si parla di ofidiomicosi disseminata), tra cui bronchi, polmoni, trachea, esofago, stomaco, mesentere, gengiva, ghiandole salivari, occhi, grasso celomatico, ovaie, reni, fegato e milza (Vissiennon et al., 1999; Allender et al., 2011; Dolinski et al., 2014; Robertson et al., 2016; Steeil et al., 2018; McKenzie et al., 2020b). La capacità di *Oo* di causare infezioni sistemiche è supportata dalla presenza di elementi fungini coerenti con questo patogeno nel fegato (Vissiennon et al., 1999; McKenzie et al., 2020b), nei vasi sierosi adiacenti al tratto gastroenterico (McLelland et al., 2010) e nei polmoni (Vissiennon et al., 1999; Dolinski et al., 2014; Robertson et al., 2016). Inoltre, in alcuni rari casi, l'infezione sistemica da *Oo* è stata associata al rilevamento di setticemia micotica ed emboli fungini, oltre che all'invasione fungina dei vasi epatici con conseguente trombosi (Vissiennon et al., 1999; McLelland et al., 2010; Robertson et al., 2016).

Ad oggi l'associazione tra infezione cutanea e viscerale rimane poco chiara (Di Nicola et al., 2022a). Infatti, nonostante i dati suggeriscano una diffusione ematogena, la patogenesi e la conseguente risposta immunitaria adattativa derivanti l'invasione sistemica di *Oo* dell'ospite rimangono non caratterizzate (Di Nicola et al., 2022). *Ophidiomyces ophidiicola* penetra più comunemente di quanto si possa pensare a livelli più viscerali di quello epidermico, tanto che le lesioni subcliniche possono essere abbondanti quasi quanto quelle macroscopiche, portando come conseguenza a un problema di rilevamento di falsi negativi quando l'*Oo* è presente solo a livello subepidermico o viscerale (Pohly, 2020; Di Nicola et al., 2022). L'infezione da *Oo*, inoltre, può essere associata ad altre condizioni patologiche. Stando alle conoscenze attuali, la comorbilità più diffusa associata all'ofidiomicosi è una notevole diminuzione del tessuto adiposo viscerale, suggerendo che la mortalità dovuta a questa infezione fungina potrebbe

essere causata da un bilancio energetico secondario negativo e continuo (Di Nicola et al., 2022a; Pohly, 2020), come comunemente accade nelle malattie croniche che stimolano il catabolismo tramite citochine pro-infiammatorie (Wang & Ye, 2015). Una elevata mortalità conseguente a ofidiomicosi è stata rilevata anche nel periodo postnatale in diverse specie di serpenti selvatici Nordamericani, in cui il patogeno è verosimilmente stato trasmesso verticalmente e nei quali la morte è avvenuta probabilmente a causa del rapido sviluppo del fungo (Britton et al., 2019; Stengle et al., 2019). I segni clinici che sono stati rinvenuti fino ad ora nei serpenti neonati possono essere sottili o assenti, a differenza dei genitori (Britton et al., 2019).

3.3. Alterazioni fisiologiche e comportamentali

L'ofidiomicosi non comporta solamente conseguenze a livello anatomico, ma determina anche cambiamenti nel comportamento degli ofidi in ambiente naturale. I serpenti sono animali con comportamenti criptici e schivi e le varie attività che compiono, come la termoregolazione, il foraggiamento e l'evitamento dei potenziali predatori, dipendono da vari aspetti legati alla loro condizione fisiologica e possono essere alterate dalla presenza di malattie, come l'ofidiomicosi (Di Nicola et al., 2022a). Le variazioni etologiche possono essere legate alla compromissione a causa della micosi di alcune funzionalità importanti in un individuo, come la capacità visiva, traducendosi in variazioni delle tempistiche impiegate in ciascuna attività (Di Nicola et al., 2022a). Ad esempio, in condizioni di positività al patogeno si è registrato un aumento del tempo di esposizione ad un incontro visivo nei natricini (McKenzie et al., 2021) ed una sua diminuzione nei viperini (Tetzlaff et al., 2017). Le alterazioni comportamentali possono determinare una serie conseguenze a catena nei rettili, i quali sono animali ectotermi che regolano la propria temperatura -e di conseguenza le proprie attività fisiologiche- attraverso il comportamento. Ad esempio, la normale regolazione della temperatura può essere volontariamente alterata dai rettili in condizioni patologiche. Di fronte a un pirogeno o patogeno

pirogenico, infatti, i serpenti mostrano una risposta febbrile comportamentale aumentando la loro attività di termoregolazione per portare la propria temperatura corporea a condizioni più elevate (Burns et al., 1996; Zimmerman et al., 2010). Questo fenomeno è stato osservato aneddoticamente durante il tardo autunno e i mesi invernali (Clark et al., 2011; McBride et al., 2015; Tetzlaff et al., 2017) in animali selvatici con ofidiomicosi presente o sospetta (Di Nicola et al., 2022a). Questo comportamento perpetrato durante le stagioni più fredde permette di incrementare la risposta immunitaria e una migliore risposta cellulo-mediata, nonché un possibile rallentamento della crescita fungina, sottoponendo *Oo* a temperature più elevate, quindi sfavorevoli (Di Nicola et al., 2022a). L'aumento dell'esposizione per la termoregolazione indotta dall'infezione da *Oo* può essere anche legato all'aumento del metabolismo necessario per promuovere il processo di ecdisi necessario per eliminare l'infezione fungina (Allain et al., 2024). La maggiore esposizione, indotta dalla febbre comportamentale e dalla necessità di un maggiore fabbisogno energetico, comporta una maggiore esposizione al rischio di predazione e può determinare quindi delle possibili conseguenze negative all'interno delle popolazioni infette portando quindi ad una riduzione della fitness a livello di popolazione (Todd et al., 2016; Di Nicola et al., 2022a; Allain et al., 2024).

Oltre alle alterazioni comportamentali, l'ofidiomicosi può indurre anche cambiamenti nella fisiologia degli individui infetti, come effetti sub-letali sulla riproduzione. Infatti, la condizione patologica indotta dal micete può provocare la soppressione del normale funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, determinando una compromissione nella fitness degli individui infetti (Lind et al., 2019). Gli ormoni prodotti da questo asse promuovono la spermatogenesi in estate e la vitellogenesi in primavera (Di Nicola et al., 2022a) e l'ofidiomicosi compromette la normale produzione di testosterone ed estradiolo nei serpenti infetti, con quindi potenziali conseguenze per la gametogenesi (Lind et al., 2019). Ad oggi, tuttavia, non è stato ancora trovato alcun legame diretto tra l'infezione da *Oo* e la diminuzione

della fitness (Di Nicola et al., 2022a). Oltre alla capacità riproduttiva, l'ofidiomicosi può causare altre variazioni della normale fisiologia. In particolare, gli individui infetti da *Oo* hanno un aumento del tasso metabolico a riposo, probabilmente associato all'aumento di una risposta immunitaria e del tasso di ecdisi (Agugliaro et al., 2020; Allain et al., 2024), presentando una diminuzione del tessuto adiposo viscerale (Pohly, 2020) e quindi un Body Condition Index (BCI, ovvero una misura dello stato energetico medio, calcolata prendendo il residuo di una regressione lineare della massa sulla SVL, entrambe trasformate logaritmicamente) significativamente ridotta (Lind et al., 2017; 2018; McCoy et al., 2017). L'ofidiomicosi, inoltre, determina un livello di stress maggiore e un conseguente aumento della concentrazione di glucocorticoidi circolanti (Lind et al., 2017), con una conseguente diminuzione delle riserve di grasso (Pohly, 2020) e quindi della BCI. Il peggioramento della condizione corporea può portare anche a esiti infausti ed è alimentato da un circuito a feedback positivo (Lind et al., 2017) determinato dall'aumento del fabbisogno energetico a causa della necessità di temperature corporee maggiori (Agugliaro et al., 2020) e del tasso di ecdisi più elevato, nonché da una compromessa capacità di predare e quindi di soddisfare i requisiti di assunzione di energia (Lorch et al., 2015). Tuttavia, le relazioni tra BCI e ofidiomicosi devono ancora essere approfondite e devono essere prese in considerazione altre importanti variabili che possono determinare una variazione alla risposta al patogeno, come la specie, i diversi tipi di ambiente e di clima, oltre che le dinamiche stagionali (Di Nicola et al., 2022a).

L'ofidiomicosi è una malattia legata fortemente alla stagionalità (Dillon et al., 2022), probabilmente perché si sviluppa durante la brumazione dei serpenti nel periodo invernale (Lind et al., 2017; McKenzie et al., 2019), i quali essendo animali ectotermi subiscono variazioni fisiologiche importanti in base alla stagione e alle condizioni ambientali. In particolare, l'immunocompetenza di un rettile necessaria per contrastare un'infezione dipende fortemente dalla termoregolazione della temperatura corporea (Todd et al., 2016) e può presentare una sottoregolazione durante i cambi stagionali a causa delle variazioni termiche, soprattutto

quando le riserve energetiche sono limitate (McCoy et al., 2017; Di Nicola et al., 2022a). A tal proposito, Dillon et al. (2022) hanno dimostrato che la prevalenza e le lesioni associate all'ofidiomicosi presentavano un picco dopo l'uscita dal periodo di brumazione e un minimo durante il periodo estivo. Anche McCoy et al. (2017) hanno scoperto che la gravità dell'ofidiomicosi negli individui non in letargo di *Sistrurus miliarius*, un crotalo Nordamericano, raggiunge il suo massimo quando la temperatura atmosferica è più bassa. Oltre a una minor capacità immunitaria durante i periodi di brumazione, la maggior prevalenza e gravità dell'ofidiomicosi durante i periodi freddi possono essere legate a una ridotta frequenza di ecdisi durante la brumazione, con una possibile invasione dei tessuti più profondi da parte del patogeno (Dillon et al., 2022). Nella stessa specie nello stesso luogo, Lind et al. (2017) ha dimostrato che il corticosterone plasmatico (una molecola la cui concentrazione aumenta in concomitanza a condizioni stressanti (Beuving & Vonder, 1978)) era più alto quando i serpenti presentavano infezioni più gravi e durante i periodi invernali e autunnali, prima dell'esacerbazione dei segni clinici. Plausibilmente, questo fenomeno si manifesta perchè una maggiore risposta agli stress, dovuta a fattori stagionali come le basse temperature e la minore acquisizione di risorse, agisce in sinergia con una crescente necessità di allocare risorse (ad esempio, riproduzione, crescita e funzione immunitaria) nello stabilimento di un circolo vizioso che guida un modello stagionale di malattia (Lind et al., 2017). Stagione dopo stagione, questo ciclo di feedback positivo può aumentare la suscettibilità dell'ospite e aggravare l'ofidiomicosi, portando al deterioramento delle condizioni osservate nella popolazione durante l'inverno (Lind et al., 2017).

3.3. Distribuzione ed effetti dell'ofidiomicosi sulle popolazioni naturali

L'ofidiomicosi è riconosciuta come una minaccia per le popolazioni di serpenti e le conoscenze che la riguardano, soprattutto in un contesto naturale, sono ancora estremamente ridotte

(McKenzie et al., 2021). Infatti, quantificare in che modo le malattie della fauna selvatica, come l'ofidiomicosi, potrebbero influenzare la crescita di una popolazione è complicato e richiede una comprensione meccanicistica di come le malattie influenzano la forma fisica degli individui che vivono in libertà (Dillon et al., 2024). La maggior parte degli studi sull'ofidiomicosi sono stati condotti negli Stati Uniti, dove diverse popolazioni selvatiche di serpenti hanno mostrato effetti discordanti in seguito a epidemie da *Oo*: popolazioni di *Crotalus horridus*, *Sistrurus catenatus* e *Nerodia sipedon* (crotali e natricini americani) con ofidiomicosi presente o sospetta hanno subito un grave declino, con picchi di mortalità che hanno raggiunto oltre il 90% degli individui infetti (Clark et al., 2011; Lorch et al., 2016; Allender et al., 2018), mentre delle popolazioni di colubridi Nordamericani *Pantherophis vulpinus*, di *Regina septemvittata*, di *Nerodia sipedon* e di *Pituophis melanoleucus* con ofidiomicosi presente o sospetta hanno mostrato una buona tolleranza alla malattia, sia in termini letali che sub-letali (McKenzie et al., 2021; Burger et al., 2023; Dillon et al., 2024). Studi recenti hanno, infatti, rivelato che l'ofidiomicosi può avere effetti diversi sulle popolazioni a seconda della specie, del clade a cui appartiene il fungo e di altri fattori ambientali, suggerendo la necessità di ulteriori studi a carattere epidemiologico per capire meglio questi aspetti (Blanvillain et al., 2024; Dillon et al., 2024). Al di fuori del continente nordamericano, il numero di studi pubblicati è basso. In Europa, ad esempio, le conoscenze riguardo gli impatti dell'ofidiomicosi sono per lo più sconosciute a causa della scarsa sorveglianza sanitaria e della mancanza di dati di monitoraggio a lungo termine (Böhm et al., 2013; Franklinos et al., 2017).

Attualmente, i rilevamenti di *Oo* sono stati segnalati nella maggior parte dei paesi europei e in 9 delle 57 specie di serpenti presenti (ovvero *Coronella austriaca*, *Hierophis viridiflavus*, *Natrix helvetica*, *N. maura*, *N. natrix*, *N. tessellata*, *Zamenis longissimus*, *Vipera berus* e *V. nikolskii*) (Franklinos et al., 2017; Meier et al., 2018; Blanvillain et al., 2022, 2024; Schüler et al., 2022, 2024; Marini et al., 2023, 2024; Přibyl et al., 2023; Martinez-Silvestre et al., 2024; Stark et al., 2024).

Nonostante l'Italia sia uno dei paesi con maggiore diversità dal punto di vista erpetologico in Europa (Nania et al., 2022), ospitando circa 59 specie di rettili (Sindaco & Razzetti, 2021) tra cui 22 specie di serpenti (39% delle 57 specie ofidi europee, inclusi i taxa alloctoni) (Di Nicola et al., 2022b), gli studi sulla diffusione di questo patogeno sono estremamente limitati, con i primi lavori pubblicati dopo il 2022 che descrivono la presenza di *Oo* in due individui selvatici di *Natrix helvetica* prelevati sul territorio nazionale (in località non specificate) e in quattro *Natrix tessellata* sul Lago di Garda (Marini, et al., 2023a; Origgi et al., 2022). Altri studi di screening in Italia per *Oo* erano stati condotti precedentemente solo in due casi ed in entrambi i casi *Oo* non era stato rilevato (Marini et al., 2022; Marini et al., 2023b), seppur fosse plausibilmente presente in modo più corposo sul territorio italiano dato che segni clinici compatibili con l'ofidiomicosi erano stati segnalati in passato al confine svizzero con l'Italia (Meier et al., 2018) e dato che serpenti con disecdisi, rigonfiamenti e lesioni crostose erano stati individuati sin dal 2015 tramite la citizen science e osservazioni personali di Marini e colleghi (Marini et al., 2023a).

3.4. Diagnosi del patogeno

I metodi di biologia molecolare, come la PCR convenzionale o quantitativa, sono il metodo più veloce e affidabile per valutare la presenza di DNA fungino (Di Nicola et al., 2022a). A tal proposito, sono stati ideati diversi set di primer per rilevare a livello molecolare con queste due tecniche: (1) primer mirati alla regione spaziatrice trascritta interna 2 (ITS2) e alla regione spaziatrice intergenica (IGS) all'interno del gene dell'RNA ribosomiale (rRNA) di *Oo* (Bohuski et al., 2015); (2) primer mirati alla regione 1 dello spaziatore trascritto interno (ITS1) all'interno del gene dell'rRNA fungino (Allender et al., 2015); (3) primer mirati alla subunità mitocondriale NADH deidrogenasi 1 (*nad1*) di *Oo* (Lorch et al., 2021).

Il DNA fungino utilizzato per il rilevamento molecolare tramite qPCR/PCR, può essere estratto da varie tipologie di campioni. Tra queste, i tamponi asciutti rappresentano il metodo più utilizzato (Di Nicola et al., 2022a), sebbene siano stati utilizzati anche tamponi umidi (McKenzie et al., 2019). Siccome la qPCR è una tecnica che rileva una percentuale molto elevata di falsi negativi su singoli tamponi (>70%; Hileman et al., 2018), vengono comunemente impiegate più repliche (normalmente tre) per ogni animale campionato (Di Nicola et al., 2022a). I diversi campioni vengono raccolti sfregando gli *swab* sulla cute dell'intero corpo dell'ofide, sia ventralmente che dorsalmente, insistendo maggiormente sulle zone dove sono presenti lesioni riconducibili a segni clinici da ofidiomicosi, in modo tale da raccogliere il maggior quantitativo possibile di ife (Baker et al., 2019). Quest'ultimo accorgimento è importante perché i tamponi di ofidi con segni clinici cutanei hanno maggiori probabilità di risultare positivi rispetto a quelli di individui macroscopicamente asintomatici (Hileman et al., 2018; Long et al., 2019). Infatti, gli animali asintomatici possono avere un'infezione subepidermica o viscerale da *Oo* che non viene rilevata da analisi sulla superficie esterna del corpo (Pohly, 2020). Le altre tipologie di campione che possono essere prelevate sono biopsie tissutali ed esuvie ed entrambe, insieme ai tamponi cutanei, si sono dimostrati uno strumento affidabile per il rilevamento di funghi con metodi molecolari (Baker et al., 2019; Dibadj et al., 2021).

Tra le analisi diagnostiche importanti che riguardano questo fungo onigenale, si distingue l'isolamento in coltura, utile per l'identificazione tramite caratteri morfologici e le analisi filogenetiche. A tal proposito, si utilizza una coltura fungina creata mediante inoculazione di campioni di tessuto (Glorioso et al., 2016) su terreni di coltura arricchiti con antibiotici (Baker et al., 2019). I tamponi cutanei/lesionali raccolti tramite sfregamento sull'animale infetto, risultano spesso inutili per questo compito diagnostico (Davy et al., 2021), perché non sempre sono positivi per *Oo*, nonostante questo possa essere presente sull'individuo tamponato (Hileman et al., 2018). Fino ad ora, i terreni e i parametri più adatti per ottenere la

coltura fungina sono: il DTM (Dermatophyte Test Medium), a 30 °C per 20 giorni (Lorch et al., 2015); l'SDA (Sabouraud Dextrose Agar), a 22-25 °C per 10-20 giorni (Dolinski et al., 2014; Allender et al., 2015; Bohuski et al., 2015; Last et al., 2016; Rzadkowska et al., 2016); il PDA (Potato Dextrose Agar), a 30-35 °C per 21 giorni (Sigler et al., 2013) e l'ICG (inhibitory mould agar with chloramphenicol and gentamicin), a 25 °C, seguito da sub-coltura su PDA per la caratterizzazione morfologica (Sun et al., 2022). La coltura fungina, tuttavia, presenta alcuni svantaggi, come la difficoltà intrinseca legata all'identificazione morfologica degli isolati, le lunghe tempistiche legate alla lenta crescita di *Oo* e la difficoltà di isolare il fungo da piccoli campioni a causa della contemporanea crescita di altri funghi commensali (Pohly, 2020; Di Nicola et al., 2022a). La coltura fungina rimane comunque fondamentale per l'estrazione del DNA genomico fungino al fine dell'identificazione, come il sequenziamento del DNA del 18S rRNA ITS (Dolinski et al., 2014) e per l'analisi filogenetica molecolare (Franklinos et al., 2017; Sun et al., 2022).

Un'ultima tecnica fondamentale nelle analisi che riguardano *Oo* ed in particolare nella conferma della presenza della condizione patologica è l'istopatologia (Di Nicola et al., 2022a). Per le analisi istopatologiche vengono utilizzati tessuti cutanei provenienti da necropsie o biopsie, i quali subiscono i processi di fissazione, inclusione, sezionamento, deceratura e colorazione con ematossilina eosina (HE) (Di Nicola et al., 2022a). Questo colorante è utile per analizzare le lesioni microscopiche e le loro caratteristiche, ma è limitato nell'evidenziare ife fungine e artroconidi (Di Nicola et al., 2022a). Allo scopo di evidenziare queste ultime strutture vengono utilizzate altre colorazioni istochimiche, come le colorazioni d'argento di Gomori (Grisnik et al., 2018; McKenzie et al., 2020a; McKenzie et al., 2020b), di Grocott-Gomori (McBride et al., 2015; Ohkura et al., 2017), di Grocott (Allender et al., 2011; Lorch et al., 2021), il Jones Methenamine Silver Method (Sun et al., 2022) e l'acido periodico-Schiff (Di Nicola et al., 2022a).

3.5. Criteri diagnostici

Non in tutti gli studi si effettuano le indagini in modo completo, cosicché possano permettere la *detection* del fungo e l'attribuzione della condizione fisica dell'ospite alla patogenesi determinata da *Oo*. È quindi necessario attribuire dei canoni per la diagnosi dell'ofidiomicosi. In Di Nicola et al., (2022a), sono riportati diversi criteri, tra cui quelli identificati da Baker et al., 2019:

- ***Ophidiomyces* presente**, quando il rilevamento molecolare/culturale risulta positivo e non è accompagnato da un'alterazione macroscopica o istologica dei tessuti coerente con l'infezione da *Oo*;
- **possibile ofidiomicosi**, quando (i) le analisi istologiche dimostrano la presenza di ife fungine coerenti con l'infezione da *Oo*, senza artroconidi, o quando (ii) sono presenti lesioni macroscopiche ma la PCR/cultura per l'identificazione non è stata eseguita, è risultata equivoca o negativa, o se l'istopatologia non ha mostrato elementi fungini nelle lesioni;
- **ofidiomicosi apparente**, quando (i) sono presenti segni clinici macroscopici (cutanei) e la rilevazione molecolare/culturale è emersa positiva, ma l'istopatologia non è stata eseguita o quando (ii) le analisi istopatologiche sono coerenti con l'infezione da *Oo* (solo ife senza artroconidi) e vi è un rilevamento molecolare/culturale positivo;
- **ofidiomicosi confermata**, solamente quando l'istopatologia evidenzia ife e artroconidi fungini ialini intralesionali e la PCR o la coltura rilevano la positività alla presenza di *Oo* (non viene data rilevanza alla presenza di segni macroscopici coerenti con la patologia).

Siccome questa classificazione è quella più prudente, in cui è necessaria la presenza degli artroconidi intralesionali per confermare la presenza dell'ofidiomicosi, in Di Nicola et al., (2022a) viene sottolineata l'importanza di usare un approccio coerente e standardizzato a questa classificazione al fine di armonizzare tutte le indagini future.

3.6. *Tecniche alternative di detection*

I segni clinici sembrano essere un forte predittore della presenza di *Oo* durante l'indagine sul campo, infatti, i tamponi applicati sulle ferite di *Pituophis melanoleucus melanoleucus* in New Jersey hanno presentato una maggior positività al fungo (Burger et al., 2023). Questi segni, tuttavia, sembrano essere influenzati dal tipo di habitat in cui vive il serpente e potrebbero determinare un gap di campionamento. Infatti, in popolazioni canadesi di *Pantherophis vulpinus* è emerso che i serpenti che vivono in habitat palustri hanno una più alta probabilità di manifestare la malattia attraverso lesioni cutanee (Dillon et al., 2022), mentre serpenti che vivono in habitat maggiormente aridi, come la *Vipera berus*, potrebbero essere meno soggette a questa tipologia di problema (Allain et al., 2024).

Una tecnica che si è dimostrata efficace sul campo è la fluorescenza ultravioletta, la quale si è rivelata utile in diversi casi concernenti le malattie fungine emergenti. Infatti, le infezioni fungine dermatofitiche diventano fluorescenti sotto la luce ultravioletta (UV) a onde lunghe (Turner et al., 2014), permettendo l'utilizzo di questa tecnica per diagnosticare le infezioni fungine cheratinacee, come la tigna negli animali domestici (Koenig & Schneckenburger, 1994), la tinea capitis nell'uomo (Margarot & Deveze, 1925), la sindrome del naso bianco dei pipistrelli (Turner et al., 2014) e l'ofidiomicosi (Vivirito et al., 2021). Questa tecnica permette di evidenziare le lesioni cutanee presenti sulla superficie del corpo dei serpenti, tramite l'esposizione alla luce UV (365 nm), seppur sembri funzionare solo su individui con ofidiomicosi apparente (Vivirito et al., 2021). La fluorescenza ultravioletta offre il vantaggio di essere veloce, affidabile, economica e utile nella fase preliminare del processo di screening, in particolare per identificare individui e aree cutanee per ulteriori test diagnostici (Vivirito et al., 2021). È infatti necessario approfondire tramite test diagnostici maggiormente rigorosi come la qPCR e l'istopatologia, in modo tale da avere una convalida più accurata.

La possibilità di rilevare il fungo nell'ambiente può essere utile in un'analisi preliminare. A tal proposito, può essere utilizzato il DNA ambientale (eDNA), uno strumento

efficace per rilevare la presenza di specie elusive (es. (Jamwal et al., 2021) e che risulta essere un metodo altamente sensibile e conveniente (Ficetola et al., 2008). L'eDNA si è, infatti, dimostrato utile nel monitoraggio dei patogeni fungini nei sistemi di acqua dolce con l'utilizzo diretto di campioni d'acqua (Strand et al., 2014), rivelandosi a volte più efficace addirittura dei metodi di rilevamento convenzionali (Wittwer et al., 2018). L'utilizzo dell'eDNA sul caso dell'ofidiomicosi è avvenuto per la prima volta nello studio di (Baker et al., 2020), dove è stato usato questo metodo per identificare la presenza simultanea di *S. catenatus* e *Oo* nei siti di giacenza invernale, attraverso l'utilizzo di campioni d'acqua provenienti da questi luoghi. Tuttavia, l'utilizzo di questa tecnica sembra non essere molto efficace negli studi su *Oo*, in quanto non sempre riesce a rilevare la sua presenza (Allender et al., 2016). Per questo motivo, l'eDNA sembra non offrire maggiori vantaggi rispetto ad altri metodi di campionamento, seppur sia necessario indagare più approfonditamente la questione (Baker et al., 2020).

SCOPI DEL LAVORO

Ophidiomyces ophidiicola è un fungo ampiamente diffuso in Europa dove è presente sin dalla metà del secolo scorso e un crescente numero di studi ne continuano ad ampliare la distribuzione nei diversi paesi europei (Origgi et al., 2022). Studi retrospettivi hanno infatti identificato la presenza del fungo in esemplari museali di diverse specie di natricini raccolti in Svizzera e Italia, nei quali sono stati rilevati sia il Clade europeo che americano (Origgi et al., 2022). La prima e unica *detection* di *Oo* su serpenti selvatici in vita sul territorio nazionale risale allo studio pilota sulle *N. tessellata* del lago di Garda (Marini et al., 2023a), mentre è ancora sconosciuta la situazione nel resto del territorio nazionale, anche se verosimilmente nelle aree geografiche limitrofe alle feste di Cocullo e Pretoro il fungo potrebbe essere assente, data la negatività di tutti i serpenti raccolti per queste ricorrenze (Marini et al., 2022; Marini et al., 2023b). Siccome vi sono differenze nella suscettibilità delle specie, anche se congeneri, al clade a cui appartiene il patogeno (ad esempio, *Z. longissimus* ha una maggiore probabilità di essere infettato dal Clade II, *N. helvetica* dal Clade I e verosimilmente *N. tessellata* e *N.atrix* dal Clade II) e siccome alcune specie rispondono in modo più grave alla presenza della malattia, nonché sembra ci siano delle differenze nella gravità della malattia a seconda del clade del ceppo che la genera (Blanvillain et al., 2024), è essenziale determinare come il fungo si distribuisce sul territorio nazionale, con quali cladi e quali specie di ofide colpisce, causando o meno l'ofidiomicosi. In questo modo, si può effettuare un primo passo verso l'attuazione di politiche di prevenzione specifiche sulla diffusione del patogeno, prestando particolare attenzione alle diverse suscettibilità delle specie di serpenti ai cladi del fungo.

Con questo lavoro di tesi mi sono proposto di effettuare, attraverso un massiccio campionamento, una prima indagine sulla distribuzione di *Oo* nel territorio nazionale e di analizzare alcuni aspetti che possono influenzare la presenza del patogeno. In particolare, ho indagato quali siano i cladi di *Oo* presenti in Italia e come si distribuiscono nel territorio, quali

siano le specie che presentano il fungo e quali di queste presentino ofidiomicosi, nonché se vi siano influenze delle caratteristiche degli individui (sesso e morfologia), delle variabili climatiche e del periodo dell'anno sulla prevalenza del fungo e sulla sua *detectability*.

MATERIALI E METODI

1. Protocollo di campionamento

Durante il periodo compreso tra marzo 2023 e settembre 2024 è stata effettuata una ricerca opportunistica di tutte le specie di serpenti presenti sull'intero territorio italiano. All'interno della totalità dei campioni, sono stati inclusi taxa minacciati o con un areale di distribuzione limitato (come *Vipera ursinii*, *Vipera berus walser* e *Natrix helvetica cetti*), nonché le popolazioni di serpenti provenienti da località in cui *Oo* è notoriamente presente grazie a studi precedenti o in cui la sua presenza è sospetta grazie alla *citizen science*, come ad esempio i grandi laghi del Nord Italia (Marini et al., 2023a). Sono stati inclusi, inoltre, taxa e popolazioni apparentemente esenti dalla presenza di questo patogeno. La raccolta dei serpenti è avvenuta attraverso metodi non standardizzati (VES, *Visual Encounter Survey*), ovvero una ricerca opportunistica negli habitat e microhabitat maggiormente idonei per ciascuna specie, con l'intento di contattare i serpenti durante i periodi in cui essi si espongono maggiormente, come ad esempio durante le attività di termoregolazione. La VES, essendo un sistema di raccolta non standardizzato, determina una grande variabilità di successo tra un operatore e l'altro, a causa principalmente delle differenze di esperienza dell'operatore stesso (Lardner et al., 2019). La raccolta e il maneggiamento di serpenti velenosi in grado di portare a conseguenze cliniche nell'uomo è avvenuta attraverso dispositivi di sicurezza appositi (guanti), che garantiscono una manipolazione sicura sia per l'animale sia per l'operatore. Sono stati, inoltre, raccolti tutti gli esemplari trovati deceduti sulle strade (*roadkills*) o in altri contesti, quando questi non fossero eccessivamente deteriorati da processi meccanici e/o biologici e quindi fossero idonei per la raccolta dei dati e dei campioni biologici. Oltre ai *roadkills*, sono state raccolte le exuvie trovate in ambiente naturale, qualora queste fossero abbastanza recenti da non costituire un campione

deteriorato. Infine, la restante parte dei campioni è stata raccolta nella collezione del Museo Civico di Storia Naturale di Milano (MSNMi), selezionando tutti quegli esemplari che presentavano segni clinici sospetti e potenzialmente riconducibili alla malattia.

Durante la VES, sono state registrate le tracce attraverso l'applicazione OruxMaps (<https://Oruxmaps.Com/Cs/En/>) e le coordinate GPS per georeferenziare ogni individuo o esemplare raccolto. Per ogni animale, il protocollo che è stato eseguito ha previsto diversi passaggi. In primis, è avvenuta l'identificazione delle specie secondo le chiavi dicotomiche fornite in letteratura (Di Nicola et al., 2022b). Dopodiché, è avvenuta la determinazione del sesso tramite ispezione visiva, il quale è stato poi registrato come “F” (femmina), “M” (maschio), mentre quando il soggetto era troppo giovane per una determinazione sicura, esso è stato indicato come “J” (giovane). I due sessi sono stati identificati principalmente sulla base della lunghezza della coda, la quale è tendenzialmente più lunga nei maschi e più corta nelle femmine, e dalla presenza di un rigonfiamento in zona cloacale riconducibile alla presenza degli emipeni, oltre che da altre caratteristiche specie-specifiche, come differenze cromatiche e folidotiche (Di Nicola et al., 2019). Quindi, per ogni serpente è stato assegnato un codice alfanumerico univoco (codificato: iniziale del nome, due iniziali del cognome, numero sequenziale a tre cifre, anno di cattura, ad esempio GVA001/23) ed è stato registrato il giorno e l'ora di cattura, oltre che le coordinate GPS, al fine di georeferenziare i campioni (nel sistema EPSG:4326, con sistema gradi decimali), con successiva estrazione della quota dal sistema Shuttle Radar Topography Mission (SRTM). In seguito, è avvenuta l'ispezione visiva di ogni animale alla ricerca di eventuali segni clinici, i quali sono stati documentati attraverso fotografie sia delle lesioni che degli animali per intero. È avvenuta poi l'applicazione in triplice copia per ogni individuo/esemplare di *swab* sterili (Fig. 6), tramite sfregamento per un periodo di almeno 40 secondi sulla cute dell'intero corpo, sia dorsalmente che ventralmente, insistendo in corrispondenza delle eventuali lesioni sospette. Applicando più *swab* sullo stesso animale, si aumenta infatti la sensibilità del test, riducendo la possibilità di falsi negativi. Tra questi, un

unico tampone positivo è sufficiente per indicare la positività del serpente a *Oo*. I campioni così raccolti sono stati posti in provette da 1.5ml e, quando possibile, sono stati conservati a secco a basse temperature attraverso borse gelo provviste di ghiaccio, altrimenti in soluzioni di alcol assoluto. Dopodiché, è stata effettuata la misurazione delle variabili biometriche tramite utilizzo di metro per SVL e TL (*Snout-Vent Length* e *Tail Length* rispettivamente; precisione di 1mm) e di calibro per le misure del capo (*Head Length* - HL, *Head Width* - HW e *Head Height* - HH; precisione di 0.01mm); infine tramite utilizzo di due pesole con capacità differenti (impiegate in base alle dimensioni dell'individuo) è stata misurata la massa corporea dell'individuo (precisione di 5g per la pesola da 1000g e 1g per pesola da 50g) (Fig. 6).



Figura 6. A sinistra, applicazione di un tampone sulla cute di un individuo di *Vipera ammodytes* catturato in Friuli-Venezia Giulia. A destra, misurazione di SVL e TL del medesimo individuo.

Al fine di confermare la presenza di *Oo* e dello stato infiammatorio che ne consegue, oltre alla rilevazione molecolare del fungo è necessario procedere con un esame istologico ed è quindi fondamentale raccogliere del materiale cutaneo. A tal proposito, per ridurre al minimo l'invasività della procedura, tali frammenti di tessuto sono stati esclusivamente prelevati da

individui che all'ispezione visiva iniziale avevano mostrato segni clinici sospetti e con lesioni prominenti che permettevano agilmente il prelievo di piccoli frammenti superficiali di cute, evitando di compromettere i tessuti sottocutanei. In questo modo, il campionamento dei tessuti è stato evitato su animali con un tegumento intatto, riducendo il rischio di infezioni successive. Il taglio delle squame potenzialmente ofidiomicotiche è stato condotto con forbici chirurgiche sterili. Tutti i campioni di tessuto sono stati poi fissati in una soluzione di formalina neutra tamponata al 10% e conservati a temperatura ambiente. Il codice alfanumerico univoco di ciascun serpente è stato quindi applicato a tutto il materiale derivante dal processamento, ovvero sia a tutte le provette e fotografie. Infine, sono state registrate eventuali note come la presenza di disecdisi, di lesioni singole o multiple e la loro posizione, oltre che altre informazioni eventualmente utili. A questo punto, è avvenuta la liberazione dei vari individui catturati in prossimità del sito di ritrovamento, le provette contenenti i tamponi sono state poste a -20°C, in attesa di essere elaborate tramite il protocollo PCR e tutta la strumentazione che è entrata in contatto con il potenziale portatore è stata disinfettata con una soluzione di candeggina. Il materiale raccolto durante lo sforzo di campionamento finalizzato a questo elaborato è stato implementato a quello raccolto da Matteo Di Nicola a partire da febbraio 2021. La classificazione dei casi ottenuti da tutto il materiale raccolto è avvenuta come indicato in Tabella 1, sulla base dei risultati ottenuti dell'ispezione visiva, della *detection* molecolare e delle analisi istopatologiche.

Tabella 1. Classificazione dei casi utilizzata in questo studio, basata su Di Nicola et al. (2022).

Classificazione dei casi	Presenza di segni clinici evidenti	Detection molecolare	Presenza di ife	Presenza di artroconidi
<i>Oo</i> presente	No o N/A	Sì	No o N/A	No o N/A
Ofidiomicosi apparente	Sì	Sì	No o N/A	No o N/A
Ofidiomicosi	Sì o N/A	Sì	Sì	No
Ofidiomicosi & <i>Oo</i> - <i>shedder</i>	Sì o N/A	Sì	Sì	Sì

2. Detection molecolare

I campioni analizzati in questo elaborato sono quelli raccolti fino alla stagione di campo del 2023, in quanto le analisi di *detection* molecolare e di istopatologia dei campioni dell'anno corrente devono ancora essere condotte. Le analisi molecolari sono avvenute nel Dipartimento di Patobiologia, Farmacologia e Medicina zoologica dell'Università di Ghent, in Belgio.

Dai tamponi raccolti mediante lo sfregamento sul tegumento esterno dei serpenti, il DNA è stato estratto mediante il PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent Protocol (Applied Biosystems; vedi Hyatt et al., 2007; Franklinos et al., 2017) e un passaggio successivo che ha utilizzato la liticasi (vedi Allender et al., 2015; Dibadj et al., 2021). Il protocollo, in particolare, ha previsto che 50 µl di una soluzione di 6 U/µl di liticasi (cat. n. L4025-25KU; Sigma-Aldrich) venissero aggiunti ai tamponi e incubati per 1 ora a 37 °C. Dopo questo periodo, nelle provette con i tamponi sono stati aggiunti 50 µl di soluzione PrepMan™ Ultra, sono stati fissati con delle punte di pipette e sono stati centrifugati a 8000 rpm per 1 minuto. Dopo la centrifuga, le punte con i tamponi sono state rimosse e i campioni sono stati incubati a 100 °C per 10 minuti, per poi essere nuovamente centrifugati a 13000 rpm per 3 minuti. A questo punto, il surnatante contenente il DNA presente in ogni provetta viene trasferito in una nuova provetta e diluito 10 volte (10 µl di DNA con 90 µl di acqua per HPLC) per ridurre la potenziale inibizione.

Per quanto riguarda il DNA delle exuvie e dei tessuti, esso è stato estratto con DNeasy® Sangue e kit tessuto (Qiagen, Inc.) con un ulteriore passo di liticasi. Per prima cosa, le mute sono state polverizzate finemente mediante l'impiego di sfere d'acciaio (diametro 20 mm) agitate a 30 Hz per due minuti. Per l'estrazione del DNA, 50 mg di polvere o di tessuto sono stati pesati e raccolti in provette da 1,5 mL. I campioni sono stati quindi incubati con liticasi (1 ora a 37 °C con 300 U di liticasi) e proteinasi K (durante la notte a 56 °C), seguendo le istruzioni del produttore per isolare e purificare il DNA.

La *detection* molecolare di *Oo* è stata effettuata mediante PCR quantitativa (qPCR) utilizzando primer designati per la regione intergenica distanziatrice (IGS) (estremità 3' e 5')

del complesso di geni dell'RNA ribosomale (ovvero il primer forward *Oo-rt-IGS-F* e il primer reverse *Oo-rt-IGS-R*), con una sonda specifica (*Oo-rt-IGS-P*; vedi Bohuski et al., 2015). Questo saggio qPCR è stato condotto utilizzando i sistemi CFX Opus 96 Real-Time PCR (Bio-Rad, Stati Uniti). Ogni soluzione totale da 25 μL comprendeva: 12,5 μL di supermix 2X IQ (Bio-Rad, Stati Uniti), 6,25 μL di acqua per HPLC, 0,5 μL di ciascun primer (concentrazione finale a 0,4 μM), 0,25 μL di sonda (concentrazione finale a 0,2 μM) e 5 μL di DNA estratto. Alla soluzione, è stato sottoposto un ciclo iniziale a 95 °C per 3 minuti, seguito da 43 cicli di 95 °C per 3 secondi e 60 °C per 1 minuto. La qPCR è stata eseguita in doppio quando erano disponibili almeno due tamponi. Per una minoranza di campioni per i quali era disponibile un solo tampone non sono stati eseguiti duplicati. I campioni sono stati ritenuti positivi solo se almeno una replica ha dato un segnale positivo superiore alla soglia qPCR di 10 copie del gene. Quattro campioni hanno dato un segnale al di sotto di questa soglia in una replica e non hanno dato alcun segnale nelle altre repliche, motivo per cui sono stati quindi considerati negativi.

Per identificare a quale clade di *Oo* appartenessero i campioni, abbiamo amplificato tutti i campioni positivi alla qPCR per due loci brevi (*Actina* e *ITS*) che sono noti per distinguere tra Clade I e Clade II (Origgi et al. 2022). I parametri della PCR per entrambi i marcatori sono stati impostati in base a Origgi et al. (2022), e, dopo il controllo visivo dell'amplificazione su gel di agarosio, i prodotti PCR riusciti sono stati sequenziati in entrambe le direzioni con metodo Sanger (Eurofins Genomics, Edelsberg, Germania). Le tracce di sequenziamento risultanti sono state ispezionate visivamente e modificate tramite il software Geneious Prime v2024.0.2 (Kearse et al., 2012), per poi essere combinate con dati rappresentativi di 17 ceppi di *Oo* da GenBank e allineati utilizzando il software MAFFT (Katoh e Standley, 2013). Sia l'*ITS* che il locus di *Actin* hanno due SNPs determinative che corrispondono al Clade I e al Clade II e sono stati quindi usati per identificare il clade di tutti i campioni sequenziati.

3. Analisi istopatologica

Nei casi in cui la presenza di *Oo* è stata confermata attraverso le tecniche molecolari (ad eccezione di un campione prelevato da un serpente con PCR negativa che mostrava chiari segni clinici) e nei casi in cui i tessuti delle presunte lesioni infette sono stati campionati, è stata condotta l'analisi istopatologica dei tessuti. Questa analisi è necessaria per caratterizzare le infezioni e gli elementi fungini. Come indicato nella sezione dei materiali e metodi, i campioni di tessuto prelevati sono stati fissati in formalina neutra tamponata al 10%, per poi essere trasformati in blocchi di paraffina e tagliati longitudinalmente in sezioni sottili di 5 μm . Le sezioni così ottenute sono state successivamente colorate tramite l'acido periodico di Schiff (PAS) al fine di accentuare le componenti fungine, le quali sono state in seguito esaminate con microscopia ottica. I campioni analizzati per questo elaborato corrispondono ai tessuti raccolti nella stagione di campo del 2023 e negli anni precedenti, in quanto le analisi di *detection* molecolare e di istopatologia dei campioni dell'anno corrente devono ancora essere condotte.

4. Analisi statistiche

Al fine di garantire un'analisi statistica robusta, precedentemente alle analisi i dati sono stati filtrati per evitare confronti tra *taxa* rappresentati in numero comparabile in termini di osservazioni. A tal fine, in primo luogo sono stati raggruppati i *taxa* che appartenevano alla stessa specie, dopodiché sono stati eliminate dalle analisi tutte le specie non sufficientemente rappresentate per poter fornire un supporto statistico sensato e robusto. Successivamente, sono stati indagati i pattern di suscettibilità e di insorgenza all'infezione da *Oo* mediante un modello lineare generalizzato (GLM) in cui la *detection* molecolare di *Oo* è stata implementata come

una variabile di risposta binomiale, mentre la presenza di evidenti segni clinici esterni e l'età degli individui sono stati utilizzati come effetti fissi. Inoltre, la specie di appartenenza, al fine di testare se potessero esserci differenze specie-specifiche nella probabilità di risultare positivi ad *Oo*, è stata implementata nel modello come effetto fisso. Tuttavia, data la natura opportunistica del campionamento messo in atto, è emerso che le occorrenze delle specie e dei positivi non risultano spazialmente indipendenti (si veda il caso di *N. tessellata* campionata principalmente in prossimità dei grandi laghi lombardi), per cui risulta complesso separare l'effetto della specie rispetto a quello della località in relazione alla suscettibilità ad *Oo*. Per tener conto di questa autocorrelazione spaziale sarebbe necessario impiegare approcci statistici avanzati, che ricadrebbero al di fuori di questo progetto di tesi; di conseguenza, per tener parzialmente conto dell'effetto della località/specie, abbiamo utilizzato un secondo GLM, in cui la presenza di segni clinici esterni e l'età dell'individuo sono stati impiegati come effetti fissi, e la specie è stata utilizzata come effetto random sull'intercetta (GLMM). Questa analisi è stata effettuata tramite la funzione *glmer* del pacchetto R "lme4" (Bates et al., 2015). I dati analizzati per questo elaborato risalgono ai serpenti raccolti nella stagione di campo del 2023 e negli anni precedenti, in quanto le analisi di *detection* molecolare e di istopatologia dei nuovi campioni devono ancora essere condotte. Le analisi sono state eseguite in R 4.2.2 (R Core Team, 2022) e i risultati sono stati visualizzati grazie ai grafici ottenuti mediante il pacchetto R "visreg" (Breheny e Burchett, 2017).

RISULTATI

1. Raccolta dei campioni

Durante il periodo di studio, è stato campionato un totale di 654 serpenti, appartenenti a 16 delle 21 specie presenti in Italia (Tab. 2); di questi, 423 sono stati campionati entro Settembre 2023 e sono stati oggetto di analisi molecolari, istologiche e statistiche mentre i restati 231 sono stati campionati da Settembre 2023 a Settembre 2024 per cui le relative analisi sono ancora in corso. Tra la totalità dei campioni, 297 sono stati raccolti dagli sforzi del gruppo di operatori dell'Università di Pavia e 146 dalle mie attività di campo finalizzate a questo elaborato, mentre i restanti campioni sono stati raccolti in varie campagne condotte sul territorio italiano da Matteo R. Di Nicola e da altri collaboratori (Tab. 2). In particolare, tra questi ultimi campioni, alcuni sono stati ottenuti sfruttando ricorrenze locali come le feste di Cocullo e di Pretoro, come già successo in altri lavori passati (vedi Marini et al., 2022; Marini et al., 2023b), dove centinaia di serpenti vengono catturati in natura da dei "cacciatori di serpi", chiamati "serpari" (autorizzati da una specifica esenzione ministeriale), al fine di esporli durante la giornata delle feste. In queste occasioni, per evitare la contaminazione incrociata, i serpenti sono stati mantenuti separatamente fino alla procedura di screening. Oltre a queste ricorrenze, sono stati raccolti campioni da 17 esemplari di *Natrix helvetica* e *Natrix tessellata* risalenti al periodo compreso tra il 1926 e il 1993. Questi esemplari storici sono stati presi dalle collezioni di alcol del Museo di Storia Naturale di Milano per un'indagine retrospettiva e sono stati selezionati attraverso una prima ispezione visiva, dove i serpenti che mostravano segni clinici riconducibili alla presenza di *Oo* sono stati campionati con la rimozione di frammenti di tessuto tegumentale.

Tabella 2. Numero e specie di serpenti raccolti durante le attività di campo. A destra, è indicato il numero e le specie di serpenti che ho raccolto per questo elaborato.

Famiglia	Specie	Totale	GV
Erycidae	<i>Eryx jaculus</i>	1	/
Colubridae	<i>Coronella austriaca</i>	29	14
	<i>Coronella girondica</i>	9	/
	<i>Elaphe quatuorlineata</i>	23	/
	<i>Hierophis viridiflavus</i>	170	31
	<i>Macroprotodon cf. cucullatus</i>	18	/
	<i>Malpolon insignitus</i>	6	/
	<i>Malpolon monspessulanus</i>	11	/
	<i>Zamenis longissimus</i>	26	4
Natricidae	<i>Natrix helvetica</i>	81	25
	<i>Natrix maura</i>	17	3
	<i>Natrix tessellata</i>	136	29
Viperidae	<i>Vipera aspis</i>	55	27
	<i>Vipera ammodytes</i>	7	2
	<i>Vipera berus</i>	26	11
	<i>Vipera ursinii</i>	19	/
Totale		634	146

Lo sforzo di campionamento che ho effettuato per la raccolta dei 146 campioni è stato di 403.9 km in 5 regioni italiane, ovvero Piemonte, Lombardia, Liguria, Trentino Alto-Adige e Friuli-Venezia Giulia, traducibile in uno sforzo sottoforma di Indice chilometrico di abbondanza (IKA) pari a 0.245 (Rosetta et al., 2010).

I campioni analizzati nella *detection* molecolare e nelle analisi istopatologiche condotte in questo studio erano quelli raccolti negli anni precedenti al 2024 e provenivano da 423 serpenti, raccolti in 17 regioni italiane (Fig. 9; Fig. 10). Tra questi campioni, 304 derivano da serpenti raccolti in ambiente naturale, 45 da exuvie, 57 da serpenti che sono stati trovati deceduti 17 dal MSNMi. Tra i serpenti corrispondenti a quest'ultimo sottogruppo di campioni, per 370 è stata registrata la presenza (n = 77) o l'assenza (n = 293) di segni clinici riconducibili a ofidiomicosi, come gonfiore, edema squamale, scolorimento o ingiallimento, vescicole e croste sierocellulari, discedisi, desquamazione e squame necrotiche/brunastre (Fig. 5), soprattutto nella parte ventrale del corpo.

Tra questi 423 serpenti, il materiale per la *detection* molecolare (tamponi o tessuto cutaneo) è stato raccolto in tutti gli animali, mentre il tessuto conservato in formalina per la valutazione istologica è stato raccolto da soli 28 individui.

2. *Detection molecolare*

Su 423 campioni analizzati, è stata rilevata positività a *Oo* nelle indagini molecolari tramite qPCR in 32 serpenti (7,6%) (Fig. 7), appartenenti a cinque diversi taxa (*Natrix helvetica*, n = 4; *N. tessellata*, n = 23; *Hierophis viridiflavus*, n = 3; *Coronella austriaca*, n=1; *Vipera aspis*, n = 1; Tab. 3), in cinque delle 17 regioni studiate (Fig. 9; Fig. 10). Tra i campioni che sono risultati positivi, sei derivano da esemplari museali: quattro *N. helvetica* (due lombarde, datate 1964 e 1985 e due toscane, datate 1985) e due *N. tessellata* (lombarde, datate 1974 e 1985).

Tabella 3. Numero di serpenti campionati e percentuale di *Oo*-positivi per ciascun *taxon* inclusi nelle analisi. Sono inclusi i dati provenienti da studi preliminari precedenti (Marini et al., 2023a, b)

Taxon	N° di serpenti	% <i>Oo</i> -positivi
<i>Coronella austriaca</i>	21	4.8 %
<i>Coronella girondica</i>	9	0 %
<i>Elaphe quatuorlineata</i>	23	0 %
<i>Eryx jaculus</i>	1	0 %
<i>Hierophis viridiflavus</i>	103	2.9%
<i>Macroprotodon cf. cucullatus</i>	18	0 %
<i>Malpolon insignitus</i>	6	0 %
<i>Malpolon monspessulanus</i>	11	0 %
<i>Natrix helvetica</i>	61	2.5 %
<i>Natrix maura</i>	14	0 %
<i>Natrix natrix vulgaris</i>	1	0 %
<i>Natrix tessellata</i>	93	29%
<i>Vipera ammodytes</i>	5	0 %
<i>Vipera aspis</i>	40	2.5%
<i>Vipera berus</i>	18	0 %
<i>Vipera ursinii</i>	19	0 %
<i>Zamenis longissimus</i>	19	0 %
Total	462	7.8%



Figura 7. Mappa dell'Italia con i punti dei campioni raccolti dai 423 serpenti inclusi in questa *survey*. Le località con i serpenti che sono emersi *Oo*-negativi sono evidenziate in giallo, quelle con serpenti *Oo*-positivi in rosso. *Map credit:* Google Earth [Data SIO, NOAA, U.S. Navy, NGA, GEBCO Image Landsat/Copernicus], *modified*.

Implementando i campioni di questo studio con quelli raccolti da alcuni studi pilota precedenti condotti in Italia (Marini et al., 2023a, b), il numero totale di campioni raccolti è attualmente di 462, con 36 test positivi per *Oo* (questi lavori includono quattro individui di *N. tessellata* *Oo*-positivi). Al fine di fornire una panoramica completa sulle conoscenze di *Oo* in Italia, in futuro i risultati presentati comprenderanno anche questi dati. Tra i serpenti trovati in natura, quelli che sono stati raccolti in Abruzzo alle feste dei “serpari” di Cocullo e Pretoro (N = 38) sono risultati tutti negativi a *Oo*. Tra i cinque taxa che includevano campioni *Oo*-positivi, *N. tessellata* ha il più alto tasso di positività (29%, 26 su 93 campioni), seguito da *N. helvetica*

(8,2%, 4 su 49 campioni), *H. viridiflavus* (2,9%, 3 su 103 campioni), *C. austriaca* (4,8%, 1 su 21) e *V. aspis* (2,5%, 1 su 40 campioni) (Tab. 3; Fig. 8).

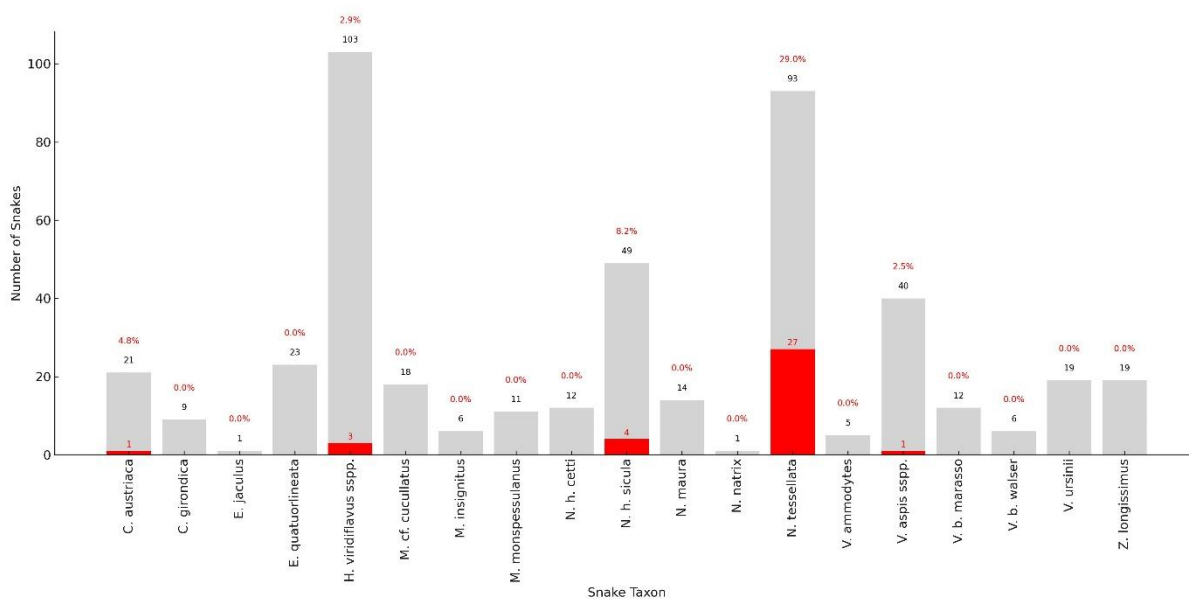


Figura 8. Numero di serpenti campionati (grigio) e *Oo*-positivi (rosso) per ciascun taxon di serpenti. I dati provenienti da precedenti studi sono stati inclusi.

Tra le cinque regioni in cui sono emersi serpenti *Oo*-positivi, quella con il più alto tasso di positività è la Toscana (66,7%, 2 su 3 campioni), seguita dal Veneto (33,3%, 5 su 15 campioni), dal Trentino-Alto Adige (29,3%, 12 su 41 campioni), dalla Lombardia (10,7%, 11 su 103 campioni) e dal Piemonte (7,7%, 6 su 78 campioni) (Fig. 9; Fig. 10). Questi risultati, tuttavia, dipendono fortemente dalla disomogeneità del campionamento, con la Toscana che ha tutti i campioni derivanti dalle collezioni museali del MSNMi, i quali sono stati selezionati per lo screening in base alla presenza di segni clinici evidenti.

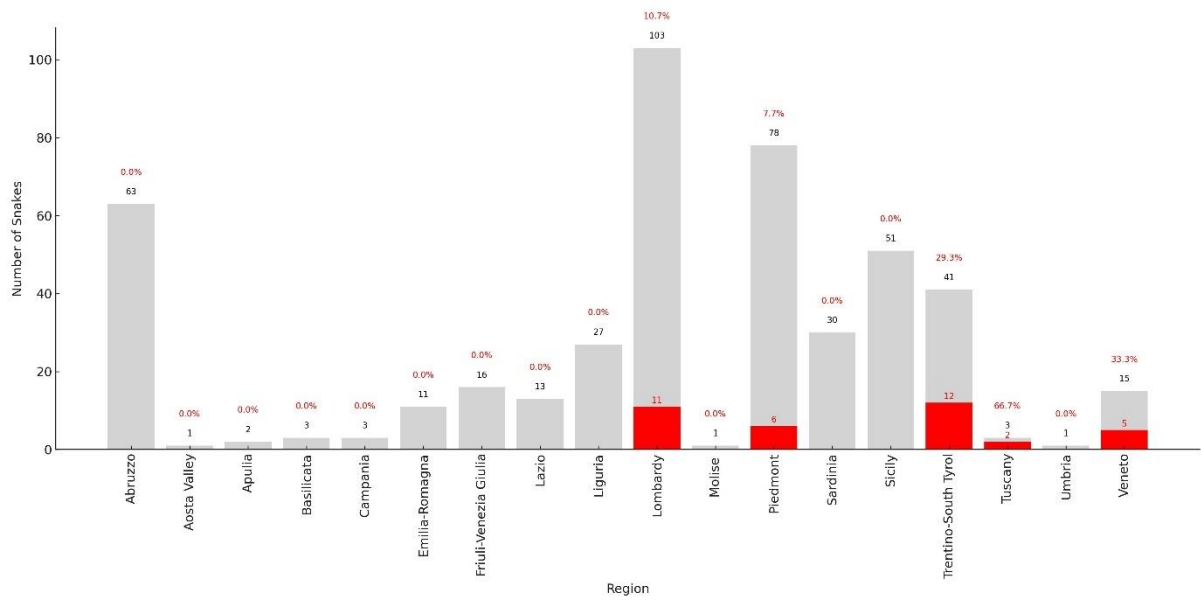


Figura 9. Numero di serpenti campionati (grigio) e *Oo*-positivi (rosso) per ciascuna regione. I dati provenienti da precedenti studi sono stati inclusi.

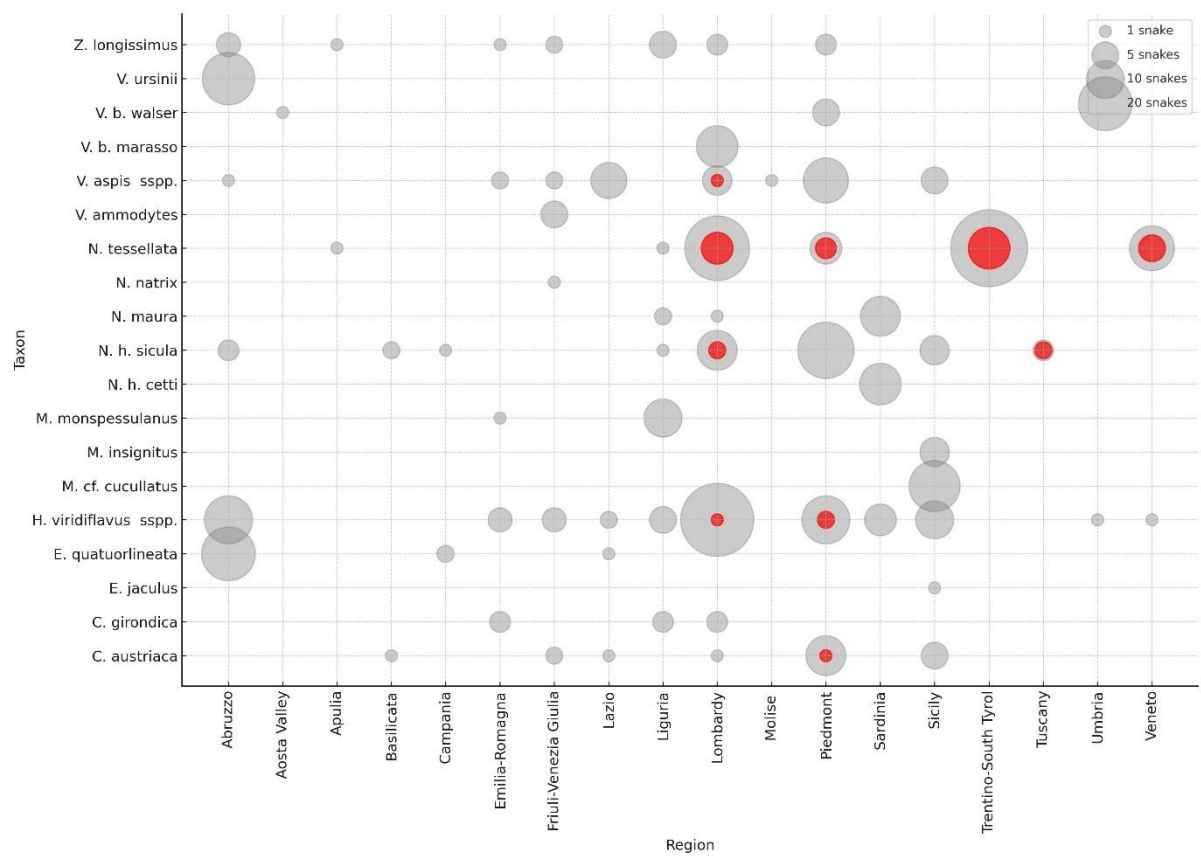


Figura 10. Numero di serpenti campionati (grigio) e serpenti *Oo*-positivi (rosso) per specie e regione. Sono inclusi anche dati di studi nazionali precedenti (Marini et al., 2023a, b).

I risultati ottenuti in questo studio mostrano che il periodo dell'anno con il maggior numero di serpenti *Oo*-positivi è stato la prima metà di marzo (N=9), seguito dalla seconda metà di maggio (N=5) e dalla prima metà di agosto (N=5) (Fig. 11; Fig. 12a). Analogamente, il periodo dell'anno con il più alto tasso di positività per *Oo* è stato la prima metà di marzo (81,8%), seguito dalla seconda metà di marzo (11,1%) e dalla seconda metà di maggio (10,2%) e agosto (10%) (Fig. 11; Fig. 12b).

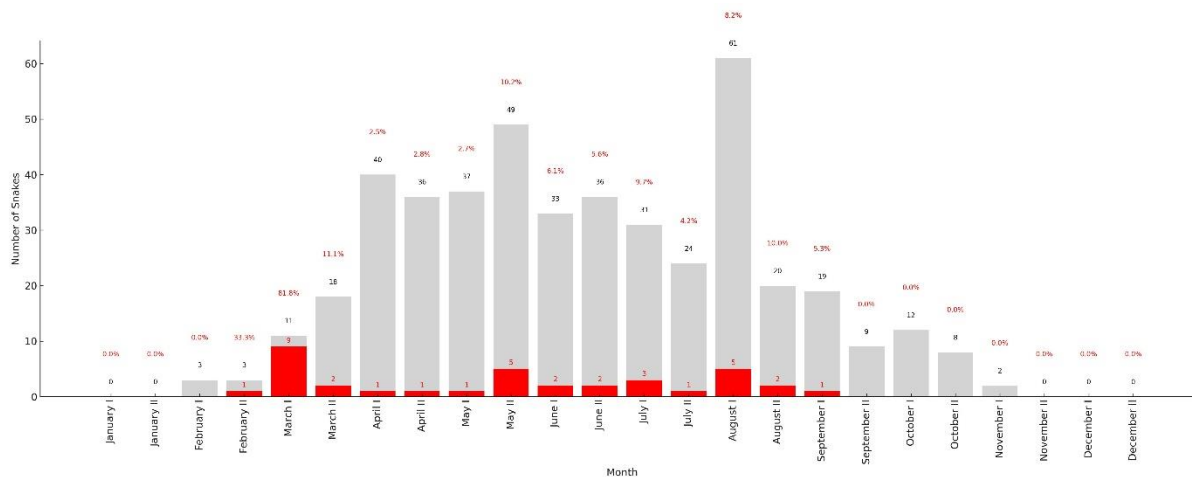


Figura 11. Numero di serpenti campionati (grigio) e *Oo*-positivi (rosso) nei diversi periodi dell'anno. Sulle ascisse è riportata la prima (I) e la seconda (II) metà di ciascun mese. I dati provenienti da precedenti studi sono inclusi.

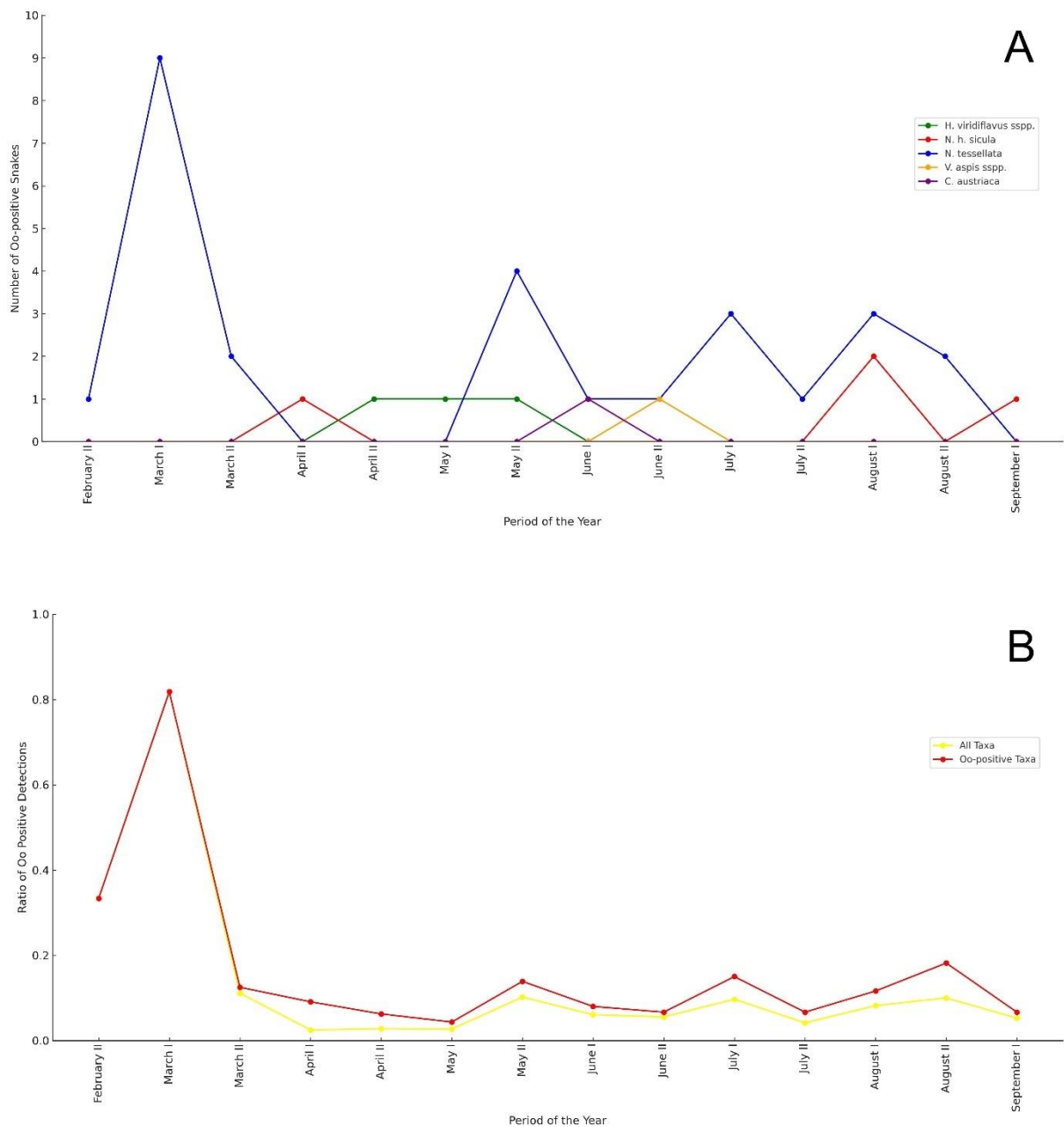


Figure 12. (a) Numero di serpenti *Oo*-positivi, divisi per taxon e periodo dell'anno. **(b)** Prevalenza di serpenti *Oo*-positivi nei periodi dell'anno, considerando tutti i taxa campionati (giallo) e i cinque taxa positivi (rosso). In entrambi i grafici, sulle ascisse è riportata la prima (I) e la seconda (II) metà di ogni mese. Sono inclusi i dati dei precedenti studi nazionali di Marini et al. (2023a, b).

Su 370 serpenti in cui è stata tenuta traccia della cosa, è stata registrata la presenza (N= 77) o l'assenza (N= 293) di segni clinici evidenti. Tra i serpenti con segni macroscopici, il 27,3% ha dato esito positivo per la rilevazione di *Oo*, mentre solo il 4,8% di quelli senza segni macroscopici è risultato positivo (Fig. 13a).

La classe di età è stata determinata per 461 serpenti, comprendenti 54 giovani, 31 subadulti e 376 adulti. Gli esemplari giovani (14,8%) e i subadulti (16,1%) hanno presentato una percentuale più elevata di casi positivi di *Oo* rispetto agli adulti (6,1%) (Fig. 13b).

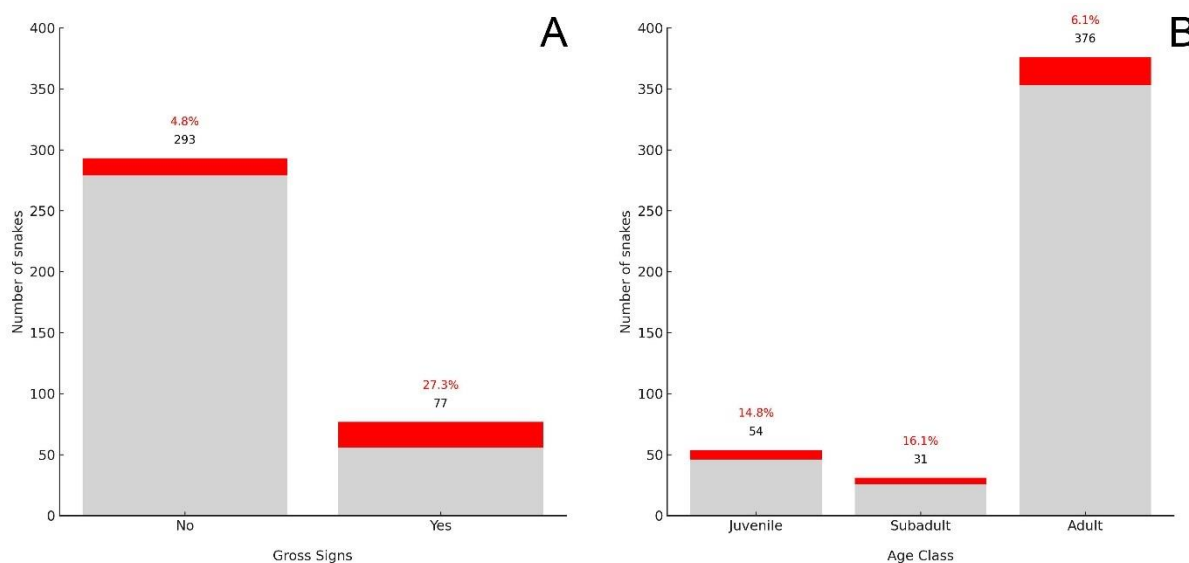


Figura 13. Distribuzione della rilevazione di *Oo* tra: (a) Presenza di segni clinici evidenti (N = 370); (b) classi d'età (N = 461). Il colore rosso indica gli *Oo*-positivi, il grigio gli *Oo*-negativi. Sono inclusi anche i dati dei precedenti studi di Marini et al. (2023a, b).

Tra i 32 serpenti che sono emersi *Oo*-positivi in questo studio, la caratterizzazione del clade è disponibile per 18. Il Clade I (“europeo”) è stato rilevato esclusivamente nei campioni raccolti dai serpenti appartenenti alle collezioni museali, ovvero nelle due *N. helvetica* e due *N. tessellata* originarie della Lombardia che erano emerse *Oo*-positive alla *detection* molecolare. In studi recenti questo clade era stato trovato anche in una *N. tessellata* del Trentino-Alto Adige (Marini et al., 2023a). Il Clade II (“Nordamericano”) è stato rilevato nei restanti 1 campioni, risalenti a 13 esemplari provenienti da cinque differenti taxa (*H. viridiflavus*, *N. helvetica*, *N. tessellata*, *C. austriaca* e *V. aspis*). Tra questi, solo uno è un esemplare museale (*N. helvetica*, datato 1985). Questi campioni provengono dalla Lombardia, dal Piemonte, dalla

Toscana e dal Veneto. (Fig. 14). Il Clade III non è stato rilevato in nessuno dei campioni analizzati in questo studio.

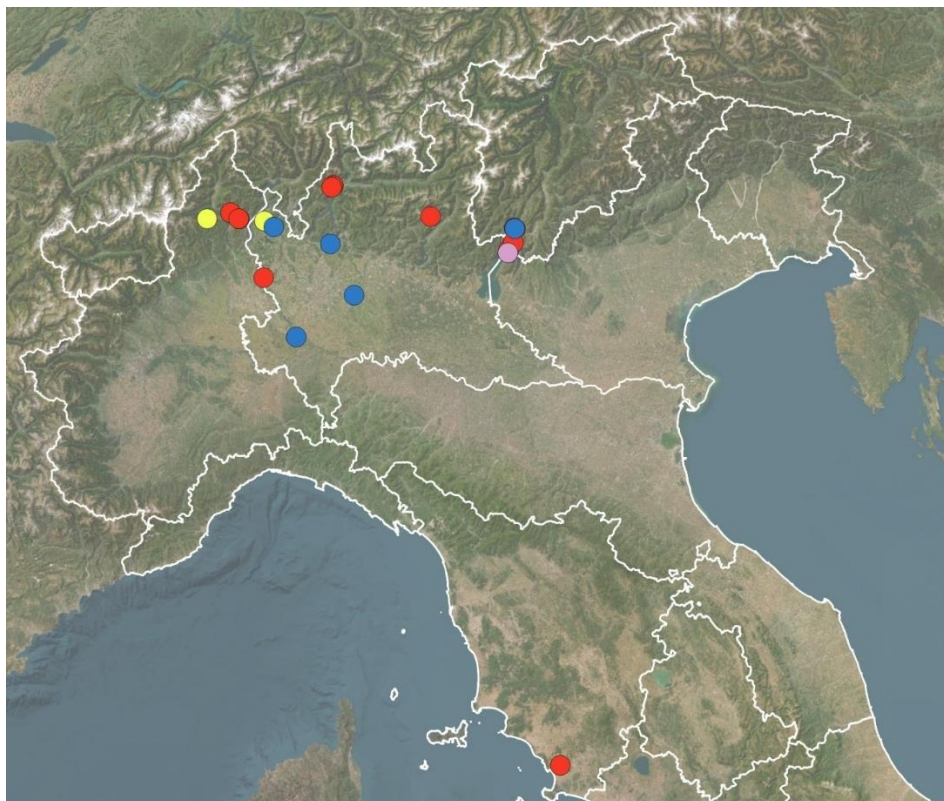


Figura 14. Distribuzione dei cladi di *Oo* in Italia. In azzurro, sono indicati serpenti infettati dal Clade I di *Oo*; in rosso i serpenti infettati dal clade II, in rosa i serpenti infettati da entrambi i cladi in giallo i serpenti dei quali non è stato possibile risalire al clade di *Oo*.

2.1 Determinazione dei cladi

Per l'identificazione dei cladi, l'amplificazione e il sequenziamento sono stati efficaci per entrambi i loci in 13 su 22 campioni positivi a qPCR. Per altri nove campioni è stato sequenziato un singolo locus, mentre per dieci campioni positivi alla qPCR non è stato possibile generare le sequenze Sanger. Il successo dell'amplificazione è stato generalmente correlato con valori più alti di qPCR. Nei casi in cui entrambi i loci sono stati sequenziati con successo per lo stesso campione, essi corrispondevano sempre alla stessa identificazione del clade. I risultati di queste

analisi hanno mostrato che un totale di quattro campioni erano appartenenti Clade I, ovvero il primo clade identificato nel Regno Unito e nella Repubblica Ceca (Franklinos et al. 2017). I restanti 14 campioni corrispondevano al Clade II, identificato inizialmente in Nord America (Ladner et al. 2022), ma anche in tutta l'Europa (Blainvillain et al., 2024, Origgi et al. 2022).

3. *Detection istologica*

L'analisi istopatologica è stata condotta su una totalità di nove serpenti, otto dei quali erano risultati *Oo*-positivi attraverso la *detection* molecolare. Tutti i campioni analizzati provenivano da serpenti che mostravano segni di infiammazione, dai quali è stato prelevato un campione di tessuto tegumentale. Sono stati evidenziati elementi fungini in cinque su nove campioni, quattro dei quali appartenevano a serpenti qPCR positivi (due *Natrix tessellata* del Veneto che presentavano ife; due *Hierophis viridiflavus* del Piemonte, con ife e artroconidi (Fig. 15). Il campione risultato positivo alle analisi istopatologiche e che apparteneva a un serpente emerso negativo dalla rilevazione molecolare, corrisponde a una *N. tessellata* del Veneto. Tutti e nove i tessuti analizzati hanno presentato delle caratteristiche patologiche, come vari gradi di necrosi e infiammazione, con o senza la presenza di propaguli fungini (Fig. 15). In alcuni di questi casi erano presenti dei piccoli frammenti di epidermide che presentavano necrosi su tutto lo spessore, con ife fungine e artroconidi compatibili all'ofidiomicosi. Talvolta, nelle zone limitrofe a queste aree necrotiche, è stato possibile osservare regioni di epidermide intatta con spongiosi lievi ed eterofili trasmigratori. Inoltre, in alcuni campioni sono state osservate croste sierocellulari contenenti colonie di batteri basofili.

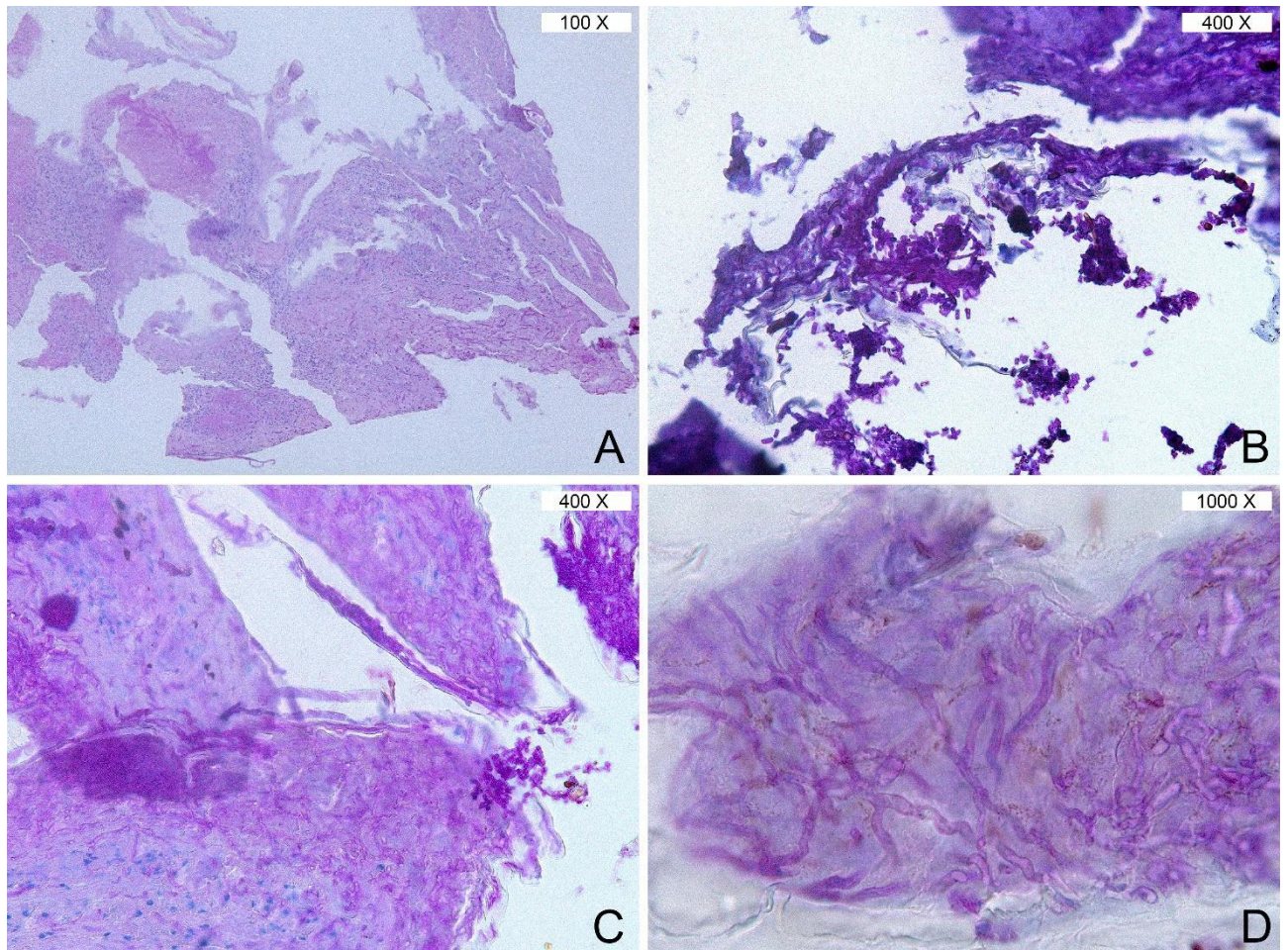


Figura 15. Immagine di preparati istologici ottenuti da serpenti emersi *Oo*-positivi dalle analisi con qPCR. (a) *Natrix tessellata*; Ingrandimento 100X della crosta necrotica sierocellulare in cui sono presenti dozzine di ife fungine all'interno di frammenti di tessuto epiteliale necrotizzato e degli elementi infiammatori. (b) *Hierophis viridiflavus*; Epidermide necrotica con ife fungine PAS- positive e ciuffo artroconidale all'interfaccia aria-lesione. (c) *Hierophis viridiflavus*; Epidermide con spongiosi lievi, eterofili trasmigratori e necrosi multifocali con presenza di diverse ife e conidi. (d) *Hierophis viridiflavus*; Ife fungine (parallele, raramente ondulate, occasionali septazioni trasversali, ramificazioni non dicotomiche e ad angolo acuto) all'interno dei detriti necrotici epidermici.

4. Analisi statistiche

Il filtraggio effettuato sulle specie non rappresentate ha ridotto il campione originale a 244 serpenti, 66 dei quali appartenenti al genere *Hierophis*, 146 al genere *Natrix* (91 di *N. tessellata* e 55 di *N. helvetica*) e 32 al genere *Vipera* (tutti appartenenti a *V. aspis*). Dal primo modello lineare generalizzato che è stato generato, è emersa una bassa probabilità di base che un serpente fosse positivo a *Oo* ($\beta_0 = -4.36$, $p < 0.001$) ed è stato evidenziato un effetto statisticamente significativo e positivo della presenza di segni clinici esterni ($\beta_{\text{signs}} = 1.927$, $p < 0.001$; Fig. 16), infatti gli individui con evidenti segni clinici hanno una maggiore probabilità di risultare *Oo*

positivi. Inoltre, è emerso un effetto statisticamente significativo della specie, in quanto *N. tessellata* mostra una probabilità significativamente maggiore rispetto alle altre specie di risultare positiva ad *Oo* ($\beta_{\text{tess}} = 2.517$, $p = 0.0012$).

Il secondo GLM, analogamente, ha mostrato una bassa probabilità di baseline di risultare positivi ad *Oo* ($\beta_0 = -3.256$, $p < 0.001$) e un effetto statisticamente significativo della presenza di segni clinici ($\beta_{\text{signs}} = 1.995$, $p < 0.001$). Inoltre, è stato riscontrato un effetto random della specie sull'intercetta, che indica una differente probabilità di baseline delle specie di risultare positive ad *Oo*, che spiega il 10.1% della varianza complessiva.

In entrambi i modelli non è stato riscontrato alcun effetto della classe di età.

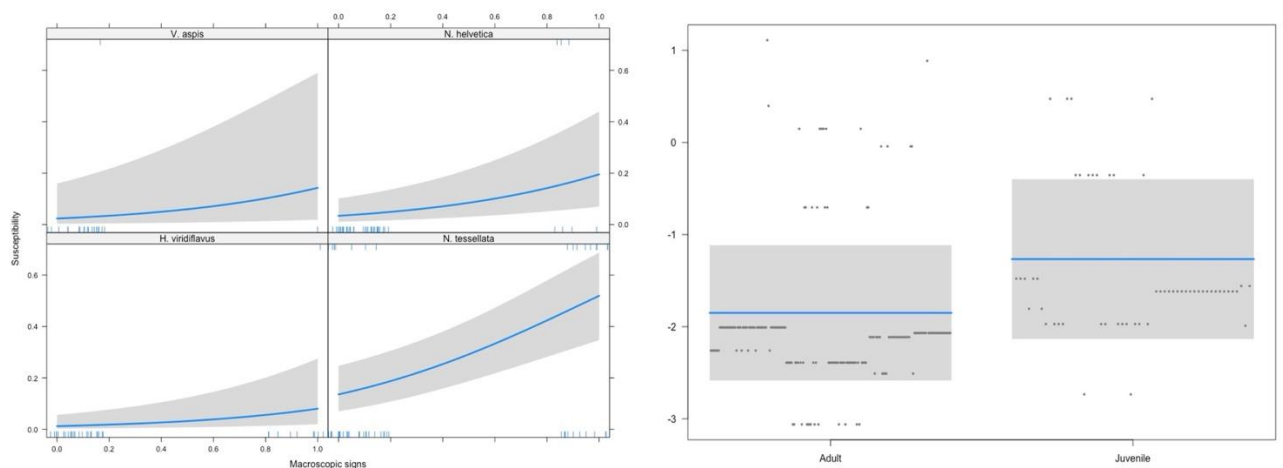


Figura 16. Effetti della presenza di segni clinici evidenti (pannello sinistro) e dell'età (pannello destro) sulla probabilità dei serpenti analizzati di dare un risultato *Oo*-positivo. È emersa una maggiore probabilità di risultare positivi ad *Oo* in presenza di segni clinici esterni, mentre nessuna differenza fra classi di età è stata riscontrata. Inoltre, sono state riscontrate differenze fra specie nella probabilità di risultare positivi, in particolare *N. tessellata* mostra una probabilità significativamente maggiore rispetto alle altre specie.

DISCUSSIONE

In questo monitoraggio sulla prevalenza di *Oo* in Italia ho assemblato un campione di 654 serpenti appartenenti a 17 delle 22 specie presenti sul territorio nazionale. Tra questi, solo i serpenti raccolti fino a fine 2023 (N= 423) sono stati analizzati per questo elaborato, in quanto i campioni raccolti nell'anno corrente devono ancora essere analizzati. Tra queste 17 specie, cinque sono risultate positive: *Natrix tessellata*, *N. helvetica*, *Hierophis viridiflavus*, *Coronella austriaca* e *Vipera aspis*. Due delle tre specie appartenenti al genere *Natrix* che sono state campionate erano già state indicate come sensibili al parassita in altri lavori condotti nel contesto europeo (Schüler et al., 2022, 2024; Marini et al., 2023a; Stark et al., 2024). Le specie del genere *Natrix*, infatti, vivono in un contesto umido simile a quello di altri serpenti Nordamericani in cui è stata rilevata la positività ad *Oo* e dell'ofidiomicosi, come ad esempio i generi affini *Nerodia* e *Thamnophis* (Natricini diffusi nell'America Centro-Settentrionale) (Dolinski et al., 2014; Pohly, 2020; Vivirito et al., 2021). Come è consueto per i funghi, numerose evidenze suggeriscono che *Ophidiomyces ophidiicola* sembri prediligere i contesti umidi rispetto a quelli xerici, come ad esempio il suo frequente rilevamento su specie che vivono in prossimità di ambienti acquatici (ad esempio, Dolinski et al., 2014; Pohly, 2020; Vivirito et al., 2021; Joudrier et al., 2024a); di fatti, è noto sperimentalmente che il tasso di crescita in vitro su substrati che inducono stress per la carenza di acqua fosse ridotto (Allender et al., 2015). I risultati ottenuti nel contesto di questo lavoro di tesi sono di fatto coerenti con le conoscenze attuali reperibili in letteratura scientifica. Le due specie appartenenti al genere *Natrix* risultate positive all'ofidiomicosi (*N. tessellata* e *N. helvetica*), infatti, sono legate in modo importante al contesto acquatico durante il loro ciclo vitale. In particolare, *Natrix tessellata* è un serpente estremamente specializzato a condurre una vita acquatica, con modificazioni a livello morfologico che consentono un nuoto più idrodinamico e un maggior successo nella caccia dell'ittiofauna (Brecko et al., 2011; Andjelković et al., 2016) ed è la specie che numericamente e percentualmente ha mostrato più positivi in questo studio. In particolare,

27 individui su 93 di *N. tessellata* sono risultati positivi sia alla *detection* molecolare che a quella istologica. *Natrix helvetica*, invece, è una specie meno strettamente legata agli ambienti acquatici, soprattutto in forma adulta (Corti et al., 2010; Di Nicola et al., 2019) ed infatti in questo studio ha mostrato una bassa percentuale di positività, con gli unici quattro (2.5%) serpenti positivi che sono stati campionati dalla collezione in alcol del Museo di Storia Naturale di Milano. L'altra specie congenere che è stata campionata, ovvero *Natrix maura*, fino ad ora non è mai stata rilevata positiva negli studi condotti, probabilmente perché è una specie su cui sono state fatte poche indagini. In questo studio, la negatività riscontrata in tutti gli individui della natrice viperina può essere dovuta a un difetto di campionamento (N=14) o effettivamente a una condizione ottimale di salute delle popolazioni di questa specie sul territorio nazionale. Essendo, tuttavia, il genere *Natrix* apparentemente molto suscettibile alle infezioni da *Oo* (Blanvillain et al., 2024), dovrebbero essere condotte analisi più approfondite.

Un altro taxon in cui ci si aspettava di rinvenire individui positivi a *Oo* e all'ofidiomicosi è il genere *Vipera*. Come i natricini, anche i Viperidae presentano squame carenate su cui il fungo potrebbe verosimilmente avere una maggiore facilità di crescita a causa della maggior superficie esterna disponibile all'insediamento di *Oo*, dovuta alle pliche che caratterizzano questo tipo di squama. Inoltre, gli studi Nordamericani hanno mostrato molteplici casi di positività a *Oo* e all'ofidiomicosi in diverse specie appartenenti a questa famiglia, come ad esempio *Crotalus horridus* e *Crotalus adamanteus* (Hill et al., 2018; Steeil et al., 2018). Anche in Europa, ed in particolare in studi su esemplari risalenti alla Gran Bretagna, erano emersi diversi esemplari di *Vipera berus* positivi a *Oo* (Franklinos et al., 2017; Allain et al., 2024). Questa specie è stata campionata anche in questo studio (N=18), ma nessun individuo è emerso positivo al fungo. In Italia, infatti, *Vipera berus* vive sulle Alpi ad alte quote, in due principali popolazioni disgiunte, ovvero *Vipera berus marasso*, in Lombardia, Trentino Alto-Adige, Veneto e Friuli-Venezia Giulia e *Vipera berus walser*, in Piemonte (Di Nicola et al., 2019). Le particolari condizioni ambientali che sono presenti negli ambienti alpini di alta quota sembrano,

infatti, essere sfavorevoli anche ad altri patogeni fungini che attaccano l'erpeto fauna, come ad esempio *bsal* (Böning et al., 2024). Tuttavia, nel presente studio è emerso *Oo*-positivo un individuo di *Coronella austriaca* che ho trovato a una quota superiore ai 1300m slm. La località in cui è stato trovato questo colubride positivo è una meta nota in tutto il mondo per chi conduce viaggi naturalistici finalizzati alla osservazione dei rettili. Infatti, l'habitat in cui è diffusa la popolazione di *C. austriaca* che comprende l'individuo positivo vive in simpatria con altre specie di serpenti ed in particolare con *N. helvetica*, *V. aspis* e *V. berus walser*. Dalla scoperta risalente al 2016 in cui è stata descritta la "vipera dei Walser" (Ghielmi et al., 2016), molti erpetologi ed appassionati si sono cimentati nella ricerca di questo serpente velenoso diffuso in un piccolo areale del Piemonte settentrionale, determinando un potenziale rischio di diffusione di eventuali patogeni, come ad esempio *Oo*. La presenza di *Oo* in serpenti che vivono in stretto contatto con *V. berus walser*, un endemismo di cui ancora scarseggiano notevolmente le informazioni necessarie alla sua conservazione, determina un potenziale rischio della sopravvivenza di questa sottospecie.

In questo studio è inoltre emerso positivo alla *detection* molecolare di *Oo* il terzo individuo di *Vipera aspis* al mondo dopo i casi emersi in un lavoro molto recente condotto in Svizzera (Joudrier et al., 2024b). Rispetto a *Vipera berus*, in Italia questa specie vive in un più ampio range di altitudini, anche in pianura (Di Nicola et al., 2019), e potrebbe quindi essere maggiormente soggetta al patogeno. Tuttavia, in questo studio gli individui di *Vipera aspis* di bassa quota campionati sono pochi e sarebbe necessario approfondire questo aspetto in futuro con ulteriori studi. Un'altra specie del genere *Vipera* che raggiunge le basse quote è la vipera dal corno, *Vipera ammodytes*, per la quale, tuttavia, tutti i campioni raccolti hanno dato esito negativo alle analisi molecolari. La negatività rilevata sugli individui appartenenti a questa specie può essere legata alla xerofilia e alle caratteristiche climatiche dell'habitat in cui vive sul territorio italiano, il quale consiste tipicamente in grandi e scoscese pietraie di origine calcarea o dolomitica, muretti a secco e boscaglie aperte e sassose (Di Nicola et al., 2019). Queste

caratteristiche potrebbero essere ostili alla crescita del fungo. La negatività di tutti gli individui campionati di questa specie, che come *Vipera aspis* è presente a basse quote, può essere legata anche a un difetto di campionamento (N=40). Fino ad ora, nessuno studio ha riportato casi di positività in vipere dal corno.

Oltre alle specie che vivono in modo semi-acquatico o che hanno le squame carenate, in diversi studi condotti in passato sono emersi positivi anche altri serpenti che non condividono queste caratteristiche, come ad esempio *Pantherophis obsoletus*, *Coluber constrictor* e *Carphophis amoenus* (tre colubridi Nordamericani, tra cui l'ultimo che è un piccolo serpente fossorio) (Patterson et al., 2021), *Python bivittatus* (un pitonide diffuso nel Sudest asiatico) (Grioni et al., 2021) e in numerosi altri colubridi. Alcuni di questi casi, tuttavia, erano di individui tenuti in cattività che non descrivono al meglio le caratteristiche ecologiche del fungo in ambiente naturale (ad esempio, Nichols et al., 1999; Picquet et al., 2018; Patterson et al., 2021; Takami et al., 2021; Příbyl et al., 2023). Al contrario, sul continente europeo sono stati recentemente analizzati serpenti selvatici, con alcuni individui di *Hierophis viridiflavus*, *Zamenis longissimus* e *Coronella austriaca* che sono emersi positivi alla *detection* molecolare (Příbyl et al., 2023; Joudrier et al., 2024a; Marini et al., 2024; Martinez-Silvestre et al., 2024). Nel presente studio, queste ed altre specie di colubridi sono state campionate ed è emersa positività sia alla *detection* molecolare sia a quella istologica di tre individui (2.9%) di *Hierophis viridiflavus* e di un individuo (4.8%) di *Coronella austriaca*. Due dei tre individui di *H. viridiflavus* che sono emersi positivi sono stati raccolti in un contesto di simpatria con la popolazione di *N. tessellata* del fiume Toce (Verbania, Piemonte) che in questo studio è emersa positiva alla *detection* molecolare ed istologica. *Hierophis viridiflavus* è una specie che comprende serpenti che vivono in un'ampia gamma di ambienti, sia naturali che urbani, sia in pianura che oltre i 1000 metri di quota (Di Nicola et al., 2019). Questi serpenti sono, infatti, estremamente opportunistici e sono in grado di compiere ampi spostamenti anche nell'arco di una singola giornata (Corti et al., 2010; Di Nicola et al., 2019), determinando verosimilmente

una maggior probabilità di entrare in contatto con *Oo*. Un altro aspetto che potrebbe determinare un rischio di contagio è costituito dal fatto che sono noti casi in cui *H. viridiflavus*, *Z. longissimus* e *Natrix* sp. condividono rifugi temporanei e “nidi” comuni, ovvero siti dove diverse femmine depongono contestualmente le loro uova, talora in compagnia anche di femmine delle altre specie (Corti et al., 2010). Inoltre, la dieta di questi serpenti comprende un’ampia varietà di prede, tra cui altri serpenti (Mondino et al., 2022), determinando verosimilmente una maggior probabilità di entrare in contatto con individui infetti e quindi di contrarre il patogeno. L’ofidiofagia è stata osservata in altre specie in cui è stata rilevata la positività nella *detection* molecolare a *Oo* in questo studio e/o in altri condotti in Europa, come ad esempio in *C. austriaca* e *Z. longissimus* (Di Nicola et al., 2020; Major et al., 2023; Přibyl et al., 2023), determinando quindi questo comportamento alimentare come un potenziale fattore di rischio.

Per quanto riguarda il saettone, *Z. longissimus*, non sono stati osservati campioni positivi all’interno di questo studio. Questo risultato potrebbe essere in parte spiegato da un difetto di campionamento (N=19) rendendo necessarie ulteriori indagini future.

Tutti i campioni delle altre specie indagate sono risultati negativi alle indagini molecolari e non sono presenti studi in Europa o nel resto del mondo che riportano queste specie essere sensibili a *Oo* in altri contesti rispetto a quelli indagati in questo studio. I casi di positività, in particolare, sono stati rivelati tutti nell’Italia centro-settentrionale (Fig. 7), sollevando l’ipotesi che nel Sud del Paese non vi siano le condizioni climatiche ed ecologiche ideali per la prosperità del fungo. È necessario, tuttavia, condurre ulteriori ricerche in queste regioni italiane per confermare o meno questa ipotesi.

Le analisi istopatologiche hanno rivelato la presenza di propaguli fungini in quattro campioni di tessuto, tra cui due dei quali appartenevano a individui di *N. tessellata* catturati in Veneto e due dei quali appartenevano a individui piemontesi di *H. viridiflavus*. Un risultato rilevante è l’identificazione di artroconidi e ife nei campioni di quest’ultima specie, in quanto

non erano mai state trovate spore di *Oo* nei tessuti di questa specie. La presenza di artroconidi nei tessuti implica la capacità del fungo patogeno di utilizzare i biacchi come mezzo per propagarsi ad altri ofidi conspecifici o di altre specie, determinandone quindi un potenziale ruolo come “untori” (Patel et al., 2017).

A livello statistico, sono emersi degli effetti significativi della specie di appartenenza e della presenza di evidenti segni clinici esterni sulla probabilità dei serpenti di risultare positivi a *Oo*. In particolare, in questo studio è emerso che la presenza di vistosi segni clinici a livello del tessuto tegumentale (come ad esempio disecdisi, lesioni crostose, ulcerazioni e scolorimento/ingiallimento delle squame (Di Nicola et al., 2022a) è un buon predittore della positività a *Oo*. La presenza di lesioni più o meno gravi, tuttavia, dipende fortemente dalla specie e dall’habitat: i serpenti che vivono in ambienti palustri sembrano essere maggiormente predisposti a sviluppare lesioni rispetto a quelli che vivono in altri contesti (Dillon et al., 2022). I GLM prodotti nelle analisi statistiche hanno mostrato, inoltre, un evidente effetto significativo della specie, con alcune entità tassonomiche che sono più probabilmente *Oo*-positive rispetto ad altre, a parità di segni clinici. In particolare, è emerso che le *N. tessellata* sono molto più frequentemente positive alla presenza del fungo rispetto alle altre specie, coerentemente con le conoscenze attualmente presenti in letteratura, in cui i serpenti legati agli ambienti acquatici sembrano essere più soggetti all’ofidiomicosi (Stark et al., 2024). Tuttavia, siccome non tutte le specie suscettibili al patogeno sono state campionate con un numero di individui sufficiente a condurre un’analisi statistica robusta (come nel caso di *C. austriaca* N = 21; 1 positivo), i GLM che hanno rilevato questi risultati sono stati costruiti comprendendo i dati delle sole quattro specie sufficientemente rappresentate, ovvero *H. viridiflavus*, *N. tessellata*, *N. helvetica*, *V. aspis*. In futuri studi sarebbe opportuno includere un set di dati più grande e un numero maggiore di specie nel modello. I risultati delle analisi statistiche del presente studio hanno mostrato anche una tendenza non statisticamente significativa dei serpenti giovani a risultare più probabilmente positivi al fungo. Questo risultato è in discordanza con altri studi condotti in

precedenza, dove era stata calcolata una maggior probabilità di infezione nei serpenti adulti (Allender et al., 2020; Haynes et al., 2020). I serpenti giovani, verosimilmente, potrebbero essere predisposti alla malattia in quanto il bilancio energetico è maggiormente spostato sulla crescita e potrebbe essere volto in minor modo alla funzione immunitaria. Infatti, è stato visto che nei giovani di Piovanello maggior (*Calidris canutus*), un uccello limicolo con distribuzione cosmopolita, il livello di anticorpi era significativamente più basso rispetto agli adulti (Buehler et al., 2009), esattamente come è stato evidenziato in *Tropidonophis mairii*, un colubride diffuso in Australia e nel Sud-Est asiatico, dove i neonati hanno un rapporto di linfociti/eritrociti inferiore rispetto agli adulti (Brown & Shine, 2016). D'altro canto, i serpenti adulti hanno avuto più tempo e più occasioni per entrare in contatto con il fungo, quindi è possibile che vi siano differenti pattern di probabilità nel rilevamento di *Oo* in giovani e adulti a seconda del contesto. La presenza di ofidiomicosi nei serpenti di età più giovane, che non si sono ancora riprodotti, può avere potenzialmente un effetto sulla persistenza e sul potenziale evolutivo delle popolazioni di serpenti, seppur questa spiegazione rimane totalmente speculativa a causa della mancanza di lavori a lungo termine a carattere epidemiologico su singole popolazioni in territorio europeo. La gravità delle conseguenze delle epidemie da ofidiomicosi nelle popolazioni di serpenti potrebbe essere tuttavia ridimensionata dalla presenza di questo fungo in esemplari museali diffusi sul territorio europeo a metà del secolo scorso (Origgi et al., 2022). La presenza di questo fungo in popolazioni "antiche" solleva, infatti, la possibilità che *Oo* possa essere un patogeno endemico delle popolazioni di serpenti del territorio europeo, che non sia stato introdotto dal pet trade dal territorio americano e che il suo impatto nelle popolazioni naturali non sia estremamente grave, come lo è invece per altre patologie dell'erpetofauna come, ad esempio, la bsal o il Ranavirus (Brunner et al., 2015; Spitzen-van der Sluijs et al., 2016; Xie et al., 2016). Il commercio di serpenti domestici, piuttosto, potrebbe comportare la contaminazione di cladi di *Oo* ritenuti alloctoni in base alle conoscenze attuali (vedi pag. 12)(Ladner et al., 2022). Tuttavia, i risultati ottenuti nella determinazione dei cladi in questo

studio complica la questione, in quanto i cladi normalmente indicati come “Nordamericano” ed “europeo” potrebbero essere erroneamente associati a una localizzazione geografica che in realtà potrebbe non rispecchiare la loro reale distribuzione a livello mondiale, ridimensionando notevolmente il rischio di contaminazione genetica dovuto al *pet trade*. Infatti, dei 22 serpenti in cui in questo studio è stata possibile la determinazione del clade, il Clade I (“europeo”) è stato rilevato quasi esclusivamente in campioni museali ed in particolare in due *N. helvetica* (datati 1964 e 1985) e in due *N. tessellata* (1974 e 1985), tutti originari della Lombardia. Questo clade è stato rilevato anche in un lavoro recente su una *N. tessellata* del Trentino Alto-Adige (Marini et al., 2023a). Al contrario, sui restanti 14 serpenti è stato identificato il Clade II (“Nordamericano”). Tra questi, i campioni risalgono a quattro differenti taxa campionati durante le attività di campo (*H. viridiflavus*, *C. austriaca*, *N. tessellata* e *V. aspis*) e ad un taxon di un esemplare museale (*N. helvetica*, datato 1985). Questi campioni provengono dalla Lombardia, dal Piemonte, dalla Toscana e dal Veneto (Fig. 14). Una importante novità introdotta in questo studio è il rilevamento di entrambi i cladi di *Oo* su uno stesso individuo di *N. tessellata* campionato in Veneto. Coerentemente, il Clade I e il Clade II sono stati riscontrati in località limitrofe a quella in cui è stato trovato questo individuo. È plausibile che pattern simili siano presenti in altre località in cui è emersa *Oo*-positività e che essi non siano stati trovati in questo studio a causa di un difetto di campionamento. Complessivamente, quindi, non è stato trovato un pattern uniforme e chiaro di distribuzione dei diversi *clades* (es. Clade I a Sud e Clade II a Nord). Questi risultati complicano notevolmente l’interpretazione della distribuzione dei cladi sul territorio europeo, suggerendo un approccio conservativo nell’attribuzione geografica ai diversi cladi. Alla luce del complesso dei risultati ottenuti in questo studio, si ritiene necessario indagare ulteriormente in modo maggiormente dettagliato e approfondito la diffusione di *Oo* sul territorio italiano, sia in quelle regioni dove è emersa positività, sia in quelle che sono emerse come apparentemente esenti dalla presenza del fungo. È inoltre necessario compiere degli studi a carattere epidemiologico sulle popolazioni di

serpenti affette da ofidiomicosi, per determinare se questa ha degli effetti differenti a seconda della località, del clade del fungo e della specie di serpente colpita e per determinare quanto sia effettivamente una patologia pericolosa per la persistenza delle popolazioni colpite. Al fine di chiarire il ruolo del pet trade nella circolazione del patogeno e dei suoi diversi cladi, può essere utile analizzare in quale misura questo può avere effettivamente un ruolo importante nell'epidemiologia di *Oo*. Si suggerisce, inoltre, una maggiore attenzione nella pulizia della strumentazione utilizzata per tutti gli operatori che devono entrare in contatto diretto con i serpenti, per evitare di veicolare il patogeno al di fuori dell'areale di distribuzione attualmente conosciuto. Siccome, inoltre, i serpenti sono animali con una ridotta mobilità (ad esempio, *H. viridiflavus*, una delle specie a più ampia mobilità, compie spostamenti giornalieri che non superano alcune centinaia di metri; Corti et al., 2010), è possibile che all'interno dell'areale di distribuzione di *Oo* vi siano delle popolazioni isolate che non siano entrate in contatto con il patogeno, ponendo una maggiore attenzione sulla necessità di evitare la veicolazione del patogeno durante le attività di rilevamento delle specie.

RINGRAZIAMENTI

BIBLIOGRAFIA

- Adamovicz, L., Allender, M. C., & Gibbons, P. M. (2020). Emerging infectious diseases of chelonians: An update. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, **23**(2), 263–283.
- Af Sandeberg, A., Båge, R., Nyman, A.-K., Agenäs, S., & Hansson, H. (2023). Review: Linking animal health measures in dairy cows to farm-level economic outcomes: a systematic literature mapping. *Animal*, **17**(10), 100971.
- Agugliaro, J., Lind, C. M., Lorch, J. M., & Farrell, T. M. (2020). An emerging fungal pathogen is associated with increased resting metabolic rate and total evaporative water loss rate in a winter-active snake. *Functional Ecology*, **34**(2), 486–496.
- Allain, S. J. R., Duffus, A. L. J., & Allain, S. (2019). Emerging infectious disease threats to European herpetofauna. *Herpetological Journal*, **29**, 189–206.
- Allain, S. J. R., Leech, D. I., Hopkins, K., Seilern-Moy, K., Rodriguez-Ramos Fernandez, J., Griffiths, R. A., & Lawson, B. (2024). Characterisation, prevalence and severity of skin lesions caused by ophidiomycosis in a population of wild snakes. *Scientific Reports*, **14**(1), 5162.
- Allender, M. C., Baker, S., Britton, M., & Kent, A. D. (2018). Snake fungal disease alters skin bacterial and fungal diversity in an endangered rattlesnake. *Scientific Reports*, **8**(1), 12147.
- Allender, M. C., Baker, S., Wylie, D., Loper, D., Dreslik, M. J., Phillips, C. A., Maddox, C., & Driskell, E. A. (2015). Development of Snake Fungal Disease after Experimental Challenge with *Ophidiomyces ophiodiicola* in Cottonmouths (*Agkistrodon piscivorous*). *PLOS ONE*, **10**(10), e0140193-.
- Allender, M. C., Bunick, D., Dzhaman, E., Burrus, L., & Maddox, C. (2015). Development and use of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Ophidiomyces ophiodiicola* in snakes. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **27**(2), 217–220.

- Allender, M. C., Dreslik, M. J., Wylie, S. J., Phillips, C. A., Wylie, D., Delaney, M. A., & Kinsel, M. (2011). An unusual mortality event associated with *Chrysosporium* in the Eastern Massasauga (*Sistrurus catenatus catenatus*). *Emerging Infectious Diseases*, **17**, 2383–2384.
- Allender, M., Dreslik, M., Wylie, S. J., Phillips, C. A., Wylie, D., Maddox, C., Delaney, M., & Kinsel, M. (2011). *Chrysosporium* sp. Infection in Eastern Massasauga Rattlesnakes. *Emerging Infectious Disease Journal*, **17**(12), 2383.
- Allender, M. C., Phillips, C. A., Baker, S. J., Wylie, D. B., Narotsky, A., & Dreslik, M. J. (2016). Hematology in an eastern massasauga (*Sistrurus catenatus*) population and the emergence of *Ophidiomyces* in Illinois, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, **52**(2), 258–269.
- Allender, M. C., Raudabaugh, D. B., Gleason, F. H., & Miller, A. N. (2015). The natural history, ecology, and epidemiology of *Ophidiomyces ophiodiicola* and its potential impact on free-ranging snake populations. *Fungal Ecology*, **17**, 187–196.
- Allender, M. C., Ravesi, M. J., Haynes, E., Ospina, E., Petersen, C., Phillips, C. A., & Lovich, R. (2020). Ophidiomycosis, an emerging fungal disease of snakes: Targeted surveillance on military lands and detection in the Western US and Puerto Rico. *PLOS ONE*, **15**(10), e0240415-.
- Anderson, K. B., Steeil, J. C., Neiffer, D. L., Evans, M., Peters, A., Allender, M. C., & Cartoceti, A. N. (2021). Retrospective review of ophidiomycosis (*Ophidiomyces ophiodiicola*) at the Smithsonian’s National Zoological Park (1983–2017). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **52**(3), 997–1002.
- Andjelković, M., Tomović, L., & Ivanović, A. (2016). Variation in skull size and shape of two snake species (*Natrix natrix* and *Natrix tessellata*). *Zoomorphology*, **135**, 243–253.
- Ariel, E. (2011). Viruses in reptiles. *Veterinary Research*, **42**(1), 100.
- Artois, M., Ben Jebara, K., Warns-Petit, E., & Leighton, F. A. (2012). National wildlife health surveillance systems. *Animal Health and Biodiversity—Preparing for the Future (Compend OIE Global Conf Wildl)*, 133–142.

- Baker, S. J., Haynes, E., Gramhofer, M., Stanford, K., Bailey, S., Christman, M., Conley, K., Frasca, S., Ossiboff, R. J., & Lobato, D. (2019). Case definition and diagnostic testing for snake fungal disease. *Herpetological Review*, **50**(2), 279–285.
- Baker, S. J., Kessler, E., Darville-Bowleg, L., & Merchant, M. (2019). Different mechanisms of serum complement activation in the plasma of common (*Chelydra serpentina*) and alligator (*Macrochelys temminckii*) snapping turtles. *PLoS One*, **14**(6), e0217626.
- Baker, S. J., Niemiller, M. L., Stites, A. J., Ash, K. T., Davis, M. A., Dreslik, M. J., & Phillips, C. A. (2020). Evaluation of environmental DNA to detect *Sistrurus catenatus* and *Ophidiomyces ophiodiicola* in crayfish burrows. *Conservation Genetics Resources*, **12**, 13–15.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, **67**(1), 1-48.
- Belant, J. L., & Deese, A. R. (2010). Importance of wildlife disease surveillance. *Human-Wildlife Interactions*, **4**(2), 165–169.
- Bertelsen, M. F., Crawshaw, G. J., Sigler, L., & Smith, D. A. (2005). Fatal cutaneous mycosis in tentacled snakes (*Erpeton tentaculatum*) caused by the Chrysosporium anamorph of *Nannizziopsis vriesii*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **36**(1), 82–87.
- Beuving, G., & Vonder, G. M. A. (1978). Effect of stressing factors on corticosterone levels in the plasma of laying hens. *General and Comparative Endocrinology*, **35**(2), 153–159.
- Blanvillain, G., Lorch, J. M., Joudrier, N., Bury, S., Cuenot, T., Franzen, M., Martínez-Freiría, F., Guiller, G., Halpern, B., & Kolanek, A. (2022). Hotspots for snake fungal disease across Europe are maintained by host and pathogen identity. *BioRxiv*, **10**(2022.11), 10–515990.
- Blanvillain, G., Lorch, J. M., Joudrier, N., Bury, S., Cuenot, T., Franzen, M., Martínez-Freiría, F., Guiller, G., Halpern, B., & Kolanek, A. (2024). Contribution of host species and pathogen clade to snake fungal disease hotspots in Europe. *Communications Biology*, **7**(1), 440.
- Blasco, J. M., & Molina-Flores, B. (2011). Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, **27**(1), 95–104.

- Böhm, M., Collen, B., Baillie, J. E. M., Bowles, P., Chanson, J., Cox, N., Hammerson, G., Hoffmann, M., Livingstone, S. R., Ram, M., Rhodin, A. G. J., Stuart, S. N., van Dijk, P. P., Young, B. E., Afuang, L. E., Aghasyan, A., García, A., Aguilar, C., Ajtic, R., ... Zug, G. (2013). The conservation status of the world's reptiles. *Biological Conservation*, **157**, 372–385.
- Bohuski, E., Lorch, J. M., Griffin, K. M., & Blehert, D. S. (2015). TaqMan real-time polymerase chain reaction for detection of *Ophidiomyces ophidiicola*, the fungus associated with snake fungal disease. *BMC Veterinary Research*, **11**(1), 95.
- Böning, P., Lötters, S., Barzaghi, B., Bock, M., Bok, B., Bonato, L., Ficetola, G. F., Glaser, F., Griese, J., Grabher, M., Leroux, C., Munimanda, G., Manenti, R., Ludwig, G., Preininger, D., Rödel, M.-O., Seibold, S., Smith, S., Tiemann, L., Plewnia, A. (2024). Alpine salamanders at risk? The current status of an emerging fungal pathogen. *PLOS ONE*, **19**(5), e0298591-.
- Bowman, M. R., Paré, J. A., Sigler, L., Naeser, J. P., Sladky, K. K., Hanley, C. S., Helmer, P., Phillips, L. A., Brower, A., & Porter, R. (2007). Deep fungal dermatitis in three inland bearded dragons (*Pogona vitticeps*) caused by the Chrysosporium anamorph of *Nannizziopsis vriesii*. *Medical Mycology*, **45**(4), 371–376.
- Brecko, J., Vervust, B., Herrel, A., & Van Damme, R. (2011). Head morphology and diet in the dice snake (*Natrix tessellata*). *Mertensiella*, **18**(September), 20–29.
- Breheny P and Burchett W (2017). Visualization of Regression Models Using visreg. *The R Journal*, **9**, 56-71.
- Britton, M., Allender, M. C., Hsiao, S.-H., & Baker, S. J. (2019). Postnatal mortality in neonate rattlesnake associated with *Ophidiomyces ophidiicola*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **50**(3), 672–677.
- Brown, G. P., & Shine, R. (2016). Maternal body size influences offspring immune configuration in an oviparous snake. *Royal Society Open Science*, **3**(3), 160041.

- Brunner, J. L., Storfer, A., Gray, M. J., & Hoverman, J. T. (2015). Ranavirus ecology and evolution: from epidemiology to extinction. *Ranaviruses: Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates*, 71–104.
- Buehler, D. M., Irene Tieleman, B., & Piersma, T. (2009). Age and environment affect constitutive immune function in Red Knots (*Calidris canutus*). *Journal of Ornithology*, **150**(4), 815–825.
- Burger, J., Gochfeld, M., Zappalorti, R., Bunnell, J., Jeitner, C., Schneider, D., Ng, K., DeVito, E., & Lorch, J. M. (2023). Prevalence of *Ophidiomyces ophidiicola* and epizootiology of snake fungal disease in free-ranging Northern Pine Snakes (*Pituophis melanoleucus melanoleucus*) in New Jersey. *Environmental Monitoring and Assessment*, **195**(6), 662.
- Burns, G., Ramos, A., & Muchlinski, A. (1996). Fever response in North American snakes. *Journal of Herpetology*, 133–139.
- Campbell, L. J., Burger, J., Zappalorti, R. T., Bunnell, J. F., Winzeler, M. E., Taylor, D. R., & Lorch, J. M. (2021). Soil reservoir dynamics of *Ophidiomyces ophidiicola*, the causative agent of snake fungal disease. *Journal of Fungi*, **7**(6), 461.
- Canavesi, F. (2007). Zoonosi e sanità pubblica: un approccio interdisciplinare per un problema emergente. Springer Science & Business Media.
- Chmielewski, R., & Swayne, D. E. (2011). Avian influenza: public health and food safety concerns. *Annual Review of Food Science and Technology*, **2**(1), 37–57.
- Clark, R. W., Marchand, M. N., Clifford, B. J., Stechert, R., & Stephens, S. (2011). Decline of an isolated timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) population: Interactions between climate change, disease, and loss of genetic diversity. *Biological Conservation*, **144**(2), 886–891.
- Contreras, A., Gómez-Martín, A., Paterna, A., Tatay-Dualde, J., Prats-Van Der Ham, M., Corrales, J. C., De La Fe, C., & Sánchez, A. (2016). Epidemiological role of birds in the transmission and maintenance of zoonoses. *Rev. Sci. Tech*, **35**(3), 845–862.
- Corti, C., Capula, M., Luiselli, L., Razzetti, E., & Sindaco, R. (2010). Fauna d'Italia, Reptilia. *Edizioni Calderini de Il Sole*, 24.

- Cunningham, A. A., Beckmann, K., Perkins, M., Fitzpatrick, L., Cromie, R., Redbond, J., O'Brien, M. F., Ghosh, P., Shelton, J., & Fisher, M. C. (2015). Emerging disease in UK amphibians. *The Veterinary Record*, **176**(18), 468.
- Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2001). Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica*, **78**(2), 103–116.
- Davy, C. M., Shirose, L., Campbell, D., Dillon, R., McKenzie, C., Nemeth, N., Braithwaite, T., Cai, H., Degazio, T., Dobbie, T., Egan, S., Fotherby, H., Litzgus, J. D., Manorome, P., Marks, S., Paterson, J. E., Sigler, L., Slavic, D., Slavik, E., Urquhart, J., Jardine, C. (2021). Revisiting Ophidiomycosis (Snake Fungal Disease) After a Decade of Targeted Research. *Frontiers in Veterinary Science*, **8**.
- Di Nicola, M. R., Caviglioli, L., Luiselli, L., & Andreone, F. (2019). *Anfibi e Rettili d'Italia*.
- Di Nicola, M. R., Coppari, L., Notomista, T., & Marini, D. (2022). *Ophidiomyces ophidiicola* detection and infection: a global review on a potential threat to the world's snake populations. *European Journal of Wildlife Research*, **68**(5), 64.
- Di Nicola, M. R., Faraone, F. P., & Zabbia, T. (2022). An updated dichotomous key to the snakes of Europe. *Basic and Applied Herpetology*, **36**, 47–64.
- Di Nicola, M. R., Zecchin, L., D'Amico, M., & Faraone, F. P. (2020). Ophiophagy in *Coronella austriaca*: first case of predation on *Hierophis viridiflavus* and first direct observations of predation on *Vipera aspis*. *Herpetology Notes*, **13**, 1107–1110.
- Dibadj, B., Haynes, E., Vivirito, K., Wright, A., Stanford, K., & Allender, M. C. (2021). Investigating agreement between snake sheds and skin swabs in detection of *Ophidiomyces ophidiicola*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, **31**(2), 119–123.
- Dietz, T., & York, R. (2015). Animals, capital and sustainability. *Human Ecology Review*, **22**(1), 35–53.
- Dillon, R. M., Paterson, J. E., Manorome, P., Ritchie, K., Shirose, L., Slavik, E., & Davy, C. M. (2022). Seasonal and interspecific variation in the prevalence of *Ophidiomyces ophidiicola*

- and ophidiomycosis in a community of free-ranging snakes. *Journal of Wildlife Diseases*, **58**(4), 791–802.
- Dillon, R. M., Paterson, J. E., Manorome, P., Ritchie, K., Shirose, L., Slavik, E., & Davy, C. M. (2024). Effects of ophidiomycosis on movement, survival, and reproduction of eastern foxsnakes (*Pantherophis vulpinus*). *Scientific Reports*, **14**(1), 4948.
- Dolinski, A. C., Allender, M. C., Hsiao, V., & Maddox, C. W. (2014). Systemic *Ophidiomyces ophiodiicola* infection in a free-ranging plains garter snake (*Thamnophis radix*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, **24**(1–2), 7–10.
- Engebretson, M. (2006). The welfare and suitability of parrots as companion animals: a review. *Animal Welfare*, **15**(3), 263–276.
- Ewen, J. G., Acevedo-Whitehouse, K., Alley, M. R., Carraro, C., Sainsbury, A. W., Swinnerton, K., & Woodroffe, R. (2012). Empirical consideration of parasites and health in reintroduction. *Reintroduction Biology: Integrating Science and Management*, 290–335.
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, **4**(4), 423–425.
- Fisher, M. C., & Garner, T. W. J. (2020). Chytrid fungi and global amphibian declines. *Nature Reviews Microbiology*, **18**(6), 332–343.
- Franklinos, L. H. V., Lorch, J. M., Bohuski, E., Rodriguez-Ramos Fernandez, J., Wright, O. N., Fitzpatrick, L., Petrovan, S., Durrant, C., Linton, C., Baláž, V., Cunningham, A. A., & Lawson, B. (2017). Emerging fungal pathogen *Ophidiomyces ophiodiicola* in wild European snakes. *Scientific Reports*, **7**(1), 3844.
- Garoma, A., & Diba, S. (2022). Role of Pet Animals (Dogs, Cats) For Emerging and Re-Emerging Zoonoses Disease: Review. *Journal of Medicine and Healthcare. SRC/JMHC-218*.
- Gentry, S. L., Lorch, J. M., Lankton, J. S., & Pringle, A. (2021). Koch's postulates: Confirming *Nannizziopsis guarroi* as the cause of yellow fungal disease in *Pogona vitticeps*. *Mycologia*, **113**(6), 1253–1263.

- Ghielmi, S., Menegon, M., Marsden, S. J., Laddaga, L., & Ursenbacher, S. (2016). A new vertebrate for Europe: the discovery of a range-restricted relict viper in the western Italian Alps. In *Journal of Zoological Systematics and evolutionary research*, **54**(3), 161–173.
- Gibbons, J. W., Scott, D. E., Ryan, T. J., Buhlmann, K. A., Tuberville, T. D., Metts, B. S., Greene, J. L., Mills, T., Leiden, Y., & Poppy, S. (2000). The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians: Reptile species are declining on a global scale. Six significant threats to reptile populations are habitat loss and degradation, introduced invasive species, environmental pollution, disease, unsustainable use, and global climate change. *BioScience*, **50**(8), 653–666.
- Gibbons, P. M., & Steffes, Z. J. (2013). Emerging infectious diseases of chelonians. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, **16**(2), 303–317.
- Glorioso, B. M., Waddle, J. H., Green, D. E., & Lorch, J. M. (2016). First Documented Case of Snake Fungal Disease in a Free-Ranging Wild Snake in Louisiana. *Southeastern Naturalist*, **15**(1).
- Godkin, A., & Smith, K. A. (2017). Chronic infections with viruses or parasites: breaking bad to make good. *Immunology*, **150**(4), 389–396.
- Gómez, A., & Nichols, E. (2013). Neglected wildlife: parasitic biodiversity as a conservation target. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, **2**, 222–227.
- Griani, A., To, K. W., Crow, P., Rose-Jeffreys, L., Ching, K. K., Chu, L. O., Hill, F. I., Chan, H. K., & Cheung, K. S. (2021). Detection of *Ophidiomyces ophidiicola* in a wild Burmese python (*Python bivittatus*) in Hong Kong SAR, China. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, **31**(4), 283–291.
- Grisnik, M., Leys, J. E., Bryan, D., Hardman, R. H., Miller, D. L., Cobb, V. A., Ogle, C., Simpson, C., Campbell, J. R., & Applegate, R. D. (2018). Host and geographic range of snake fungal disease in Tennessee, USA. *Herpetological Review*.
- Guberti, V., Stancampiano, L., & Ferrari, N. (2014). Surveillance, monitoring and survey of wildlife diseases: a public health and conservation approach. *Hystrix*, **25**(1), 3–8.

- Haagmans, B. L., & Koopmans, M. P. G. (2022). Spreading of SARS-CoV-2 from hamsters to humans. *The Lancet*, **399**(10329), 1027–1028.
- Han, B. A., Kramer, A. M., & Drake, J. M. (2016). Global patterns of zoonotic disease in mammals. *Trends in Parasitology*, **32**(7), 565–577.
- Harding, E. F., Russo, A. G., Yan, G. J. H., Mercer, L. K., & White, P. A. (2022). Revealing the uncharacterised diversity of amphibian and reptile viruses. *ISME Communications*, **2**(1), 95.
- Harrach, B., Tarján, Z. L., & Benkő, M. (2019). Adenoviruses across the animal kingdom: a walk in the zoo. *FEBS Letters*, **593**(24), 3660–3673.
- Harvell, D. (2004). Ecology and Evolution of Host-Pathogen Interactions in Nature. *The American Naturalist*, **164**(S5), S1–S5.
- Hausmann, J. C., Hollingsworth, S. R., Hawkins, M. G., Kass, P. H., & Maggs, D. J. (2013). Distribution and outcome of ocular lesions in snakes examined at a veterinary teaching hospital: 67 cases (1985–2010). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **243**(2), 252–260.
- Haynes, E., & Allender, M. (2021). History, epidemiology, and pathogenesis of ophidiomycosis: A review. *Herpetol. Rev.*, **52**, 521–536.
- Haynes, E., Chandler, H. C., Stegenga, B. S., Adamovicz, L., Ospina, E., Zerpa-Catanho, D., Stevenson, D. J., & Allender, M. C. (2020). Ophidiomycosis surveillance of snakes in Georgia, USA reveals new host species and taxonomic associations with disease. *Scientific Reports*, **10**(1), 10870.
- Haynes, E., Pohly, A., Clifford, D. L., Patterson, L. C., Manning, S., Wack, R. F., & Allender, M. C. (2021). First report of ophidiomycosis in a free-ranging California kingsnake (*Lampropeltis californiae*) in California, USA. *The Journal of Wildlife Diseases*, **57**(1), 246–249.
- Hellebuyck, T., Pasmans, F., Haesebrouck, F., & Martel, A. (2012). Dermatological diseases in lizards. *The Veterinary Journal*, **193**(1), 38–45.

- Hileman, E. T., Allender, M. C., Bradke, D. R., Faust, L. J., Moore, J. A., Ravesi, M. J., & Tetzlaff, S. J. (2018). Estimation of *Ophidiomyces* prevalence to evaluate snake fungal disease risk. *The Journal of Wildlife Management*, **82**(1), 173–181.
- Hill, A. J., Leys, J. E., Bryan, D., Erdman, F. M., Malone, K. S., Russell, G. N., Applegate, R. D., Fenton, H., Niedringhaus, K., & Miller, A. N. (2018). Common cutaneous bacteria isolated from snakes inhibit growth of *Ophidiomyces ophiodiicola*. *EcoHealth*, **15**, 109–120.
- Hill, A. G., Sandy, J. R., & Begg, A. (2019a). Mycotic dermatitis in juvenile freshwater crocodiles (*Crocodyles johnstoni*) caused by *Nannizziopsis crocodili*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **50**(1), 225–230.
- <https://oruxmaps.com/cs/en/>. (2024).
- Hyatt, A., Boyle, D., Olsen, V., Boyle, D., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F. and Colling, A. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* **73**, 175–192.
- Ip, H. S., Lorch, J. M., & Blehert, D. S. (2016). Detection of spring viraemia of carp virus in imported amphibians reveals an unanticipated foreign animal disease threat. *Emerging Microbes & Infections*, **5**(1), 1–7.
- Jamwal, P., 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*, **31**(2), 176–181.
- Johnson, R. S. P., Sangster, C. R., Sigler, L., Hambleton, S., & Paré, J. A. (2011). Deep fungal dermatitis caused by the Chrysosporium anamorph of *Nannizziopsis vriesii* in captive coastal bearded dragons (*Pogona barbata*). *Australian Veterinary Journal*, **89**(12), 515–519.
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, **451**(7181), 990–993.

- Jørgensen, D. (2015). Conservation implications of parasite co-reintroduction. *Conservation Biology*, **29**(2), 602–604.
- Joudrier, N., Blanvillain, G., Meier, G., Hoyt, J., Chèvre, M., Dubey, S., Origgi, F. C., & Ursenbacher, S. (2024a). Unravelling the disease ecology of snake fungal disease: high genetic variability and ecological features of *Ophidiomyces ophidiicola* in Switzerland. *Amphibia-Reptilia*, **45**(1), 85–98.
- Joudrier, N., Blanvillain, G., & Ursenbacher, S. (2024b). First detection of apparent ophidiomycosis in the *Vipera* genus in Europe: findings on two asp vipers, *Vipera aspis* (Linnaeus, 1758), in Switzerland. *Herpetology Notes*, **17**, 311–314.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P. and Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, **28**, 1647–1649
- Kandemir, H., Dukik, K., de Melo Teixeira, M., Stielow, J. B., Delma, F. Z., Al-Hatmi, A. M. S., Ahmed, S. A., Ilkit, M., & de Hoog, G. S. (2022). Phylogenetic and ecological reevaluation of the order Onygenales. *Fungal Diversity*, **115**(1), 1–72.
- Katoh, K. and Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 772–780.
- Koenig, K., & Schneckenburger, H. (1994). Laser-induced autofluorescence for medical diagnosis. *Journal of Fluorescence*, **4**, 17–40.
- Ladner, J. T., Palmer, J. M., Ettinger, C. L., Stajich, J. E., Farrell, T. M., Glorioso, B. M., Lawson, B., Price, S. J., Stengle, A. G., Grear, D. A., & Lorch, J. M. (2022). The population genetics of the causative agent of snake fungal disease indicate recent introductions to the USA. *PLOS Biology*, **20**(6), e3001676-.

- Lardner, B., Adams, A. A. Y., Knox, A. J., Savidge, J. A., & Reed, R. N. (2019). Do observer fatigue and taxon bias compromise visual encounter surveys for small vertebrates? *Wildlife Research*, *46*(2), 127–135. *Wildlife Research*, **46**(2), 127–135.
- Last, L. A., Fenton, H., Gonyor-McGuire, J., Moore, M., & Yabsley, M. J. (2016). Snake fungal disease caused by *Ophidiomyces ophiodiicola* in a free-ranging mud snake (*Farancia abacura*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **28**(6), 709–713.
- La'Toya, V. L., & Klaphake, E. (2020). Selected emerging infectious diseases of amphibians. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, **23**(2), 397–412.
- La'Toya, V. L., & Wellehan, J. F. X. (2013). Selected emerging infectious diseases of Squamata. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, **16**(2), 319–338.
- La'Toya, V. L., & Wellehan, J. F. X. (2020). Selected emerging infectious diseases of Squamata: An update. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, **23**(2), 353–371.
- Laux, K., Teixeira, M. de M., & Barker, B. (2023). Love in the time of climate change: A review of sexual reproduction in the order Onygenales. *Fungal Genetics and Biology*, **167**, 103797.
- Lind, C. M., Lorch, J. M., Moore, I. T., Vernasco, B. J., & Farrell, T. M. (2019). Seasonal sex steroids indicate reproductive costs associated with snake fungal disease. *Journal of Zoology*, **307**(2), 104–110.
- Lind, C. M., McCoy, C. M., & Farrell, T. M. (2018). Tracking Outcomes of Snake Fungal Disease in Free-ranging Pygmy Rattlesnakes (*Sistrurus miliarius*). *Journal of Wildlife Diseases*, **54**(2), 352–356.
- Lind, C., Moore, I. T., Akçay, Ç., Vernasco, B. J., Lorch, J. M., & Farrell, T. M. (2017). Patterns of Circulating Corticosterone in a Population of Rattlesnakes Afflicted with Snake Fungal Disease: Stress Hormones as a Potential Mediator of Seasonal Cycles in Disease Severity and Outcomes. *Physiological and Biochemical Zoology*, **91**(2), 765–775.
- Long, R. B., Love, D., Seeley, K. E., Patel, S., Allender, M. C., Garner, M. M., & Ramer, J. (2019). Host factors and testing modality agreement associated with *Ophidiomyces*

- ophidiicola* infection in a free-ranging snake population in Southeast Ohio, USA. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **50**(2), 405–413.
- Lorch, J. M., Knowles, S., Lankton, J. S., Michell, K., Edwards, J. L., Kapfer, J. M., Staffen, R. A., Wild, E. R., Schmidt, K. Z., & Ballmann, A. E. (2016). Snake fungal disease: an emerging threat to wild snakes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **371**(1709), 20150457.
- Lorch, J. M., Lankton, J., Werner, K., Falendysz, E. A., McCurley, K., & Blehert, D. S. (2015). Experimental Infection of Snakes with *Ophidiomyces ophidiicola* Causes Pathological Changes That Typify Snake Fungal Disease. *MBio*, **6**(6), 10.1128/mbio.01534-15.
- Lorch, J., Price, S., Lankton, J., & Drayer, A. (2021). Confirmed Cases of Ophidiomycosis in Museum Specimens from as Early as 1945, United States. *Emerging Infectious Disease Journal*, **27**(7), 1986.
- MacKinnon, M. (2010). ‘Sick as a dog’: zooarchaeological evidence for pet dog health and welfare in the Roman world. *World Archaeology*, **42**(2), 290–309.
- Major, T., Bracegirdle, R., Gandini, A., Russell, G. L., Pozzi, A. V, Morgan, R., Mulley, J. F., & Wüster, W. (2023). Mate today, gone tomorrow: male on female cannibalism in *Zamenis longissimus* (Laurenti, 1768) in North Wales. *Herpetology Notes*, **16**, 51–54.
- Margarot, J., & Deveze, P. (1925). Aspect de quelques dermatoses lumiere ultraparaviolette. Note preliminaire. *Bull Soc Sci Med Biol Montpellier*, **6**, 375–378.
- Marí Saéz, A., Weiss, S., Nowak, K., Lapeyre, V., Zimmermann, F., Düx, A., Köhl, H. S., Kaba, M., Regnaut, S., & Merkel, K. (2015). Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic. *EMBO Molecular Medicine*, **7**(1), 17–23.
- Marini, D., Di Nicola, M. R., Crocchianti, V., Notomista, T., Iversen, D., Coppari, L., Di Criscio, M., Brouard, V., Dorne, J.-L. C. M., Rüegg, J., & Marenzoni, M. L. (2023a). Pilot survey reveals ophidiomycosis in dice snakes *Natrix tessellata* from Lake Garda, Italy. *Veterinary Research Communications*, **47**(3), 1707–1719.

- Marini, D., Filippi, E., Montinaro, G., & Origgi, F. C. (2023b). Screening of *Ophidiomyces ophidiicola* in the free-ranging snake community annually harvested for the popular ritual of San Domenico e dei Serpari (Cocullo, AQ, Italy). *Direttore Responsabile (Editor)*, **18**(1), 45–52.
- Marini, D., Oliveri, M., Coppari, L., Zampetti, M., Di Feliciantonio, M., Di Feliciantonio, S., Carafa, M., Di Francesco, N., Di Tizio, L., & Origgi, F., C. (2022). No detection of *Ophidiomyces ophidiicola* in snakes from “rito dei serpari” of Pretoro (Abruzzi, Italy) showing gross signs of disease. Abstract book of *Conservation Medicine and Wildlife Health International Seminar*, p. 30. 16th–17th June 2022, Teramo (Italy).
- Marini, D., Szczygieł, P., Kurek, K., Di Nicola, M. R., Dorne, J.-L., Marenzoni, M. L., Rüegg, J., Bury, S., & Kiraga, Ł. (2024). Retrospective Detection of *Ophidiomyces ophidiicola* from Snake Moults Collected in Bieszczady Mountains, Poland. *Microorganisms*, **12**(7), 1467.
- Marschang, R. E., Meddings, J. I., & Ariel, E. (2021). Viruses of Reptiles. In *Studies in Viral Ecology* (pp. 449–510).
- Martinez-Silvestre, A., Blanvillain, G., Gonzalez, J., & Ribo, J. (2024). First record of ophidiomycosis in a wild Aesculapian Snake, *Zamenis longissimus* (Laurenti, 1768), in Spain. *Herpetology Notes*, **17**, 423–426.
- Marx, P. A., Alcabes, P. G., & Drucker, E. (2001). Serial human passage of simian immunodeficiency virus by unsterile injections and the emergence of epidemic human immunodeficiency virus in Africa. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **356**(1410), 911–920.
- Masters, N. J., Alexander, S., Jackson, B., Sigler, L., Chatterton, J., Harvey, C., Gibson, R., Humphrey, S., Rawdon, T. G., & Spence, R. P. (2016). Dermatomycosis caused by *Paranannizziosis australasiensis* in five tuatara (*Sphenodon punctatus*) and a coastal bearded dragon (*Pogona barbata*) in a zoological collection in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, **64**(5), 301–307.

- McArthur, D. B. (2019). Emerging infectious diseases. *The Nursing Clinics of North America*, **54**(2), 297.
- McBride, M. P., Wojick, K. B., Georoff, T. A., Kimbro, J., Garner, M. M., Wang, X., Childress, A. L., & Wellehan, J. F. X. (2015). *Ophidiomyces ophidiicola* dermatitis in eight free-ranging timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) from Massachusetts. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **46**(1), 86–94.
- McCoy, C. M., Lind, C. M., & Farrell, T. M. (2017). Environmental and physiological correlates of the severity of clinical signs of snake fungal disease in a population of pigmy rattlesnakes, *Sistrurus miliarius*. *Conservation Physiology*, **5**(1).
- McKenzie, C. M., Oesterle, P. T., Stevens, B., Shirose, L., Lillie, B. N., Davy, C. M., Jardine, C. M., & Nemeth, N. M. (2020a). Pathology associated with ophidiomycosis in wild snakes in Ontario, Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, **61**(9), 957.
- McKenzie, C. M., Oesterle, P. T., Stevens, B., Shirose, L., Mastromonaco, G. F., Lillie, B. N., Davy, C. M., Jardine, C. M., & Nemeth, N. M. (2020b). Ophidiomycosis in Red Cornsnakes (*Pantherophis guttatus*): Potential Roles of Brumation and Temperature on Pathogenesis and Transmission. *Veterinary Pathology*, **57**(6), 825–837.
- McKenzie, J. M., Price, S. J., Connette, G. M., Bonner, S. J., & Lorch, J. M. (2021). Effects of snake fungal disease on short-term survival, behavior, and movement in free-ranging snakes. *Ecological Applications*, **31**(2), e02251.
- McKenzie, J. M., Price, S. J., Fleckenstein, J. L., Drayer, A. N., Connette, G. M., Bohuski, E., & Lorch, J. M. (2019). Field diagnostics and seasonality of *Ophidiomyces ophidiicola* in wild snake populations. *EcoHealth*, **16**, 141–150.
- McLelland, D. J., Johnson, L., & Reuter, R. (2010). Fatal cutaneous mycosis in a broad-headed snake (*Hoplocephalus bungaroides*) caused by the Chrysosporium anamorph of *Nannizziopsis vriesii*. *Proc Wildl Dis Assoc.*, **55**.

- Meier, G., Notomista, T., Marini, D., & Ferri, V. (2018). First case of snake fungal disease affecting a free-ranging *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) in Ticino Canton, Switzerland. *Herpetology Notes*, **11**, 885–891.
- Mitchell, M. A., & Walden, M. R. (2013). Chrysosporium Anamorph *Nannizziopsis vriesii*: An Emerging Fungal Pathogen of Captive and Wild Reptiles. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, **16**(3), 659–668.
- Mondino, A., Crovadore, J., Lefort, F., & Ursenbacher, S. (2022). Impact of invading species on biodiversity: Diet study of the green whip snake's (*Hierophis viridiflavus*, L. 1789) in Switzerland. *Global Ecology and Conservation*, **38**, e02239.
- Morand, S., McIntyre, K. M., & Baylis, M. (2014). Domesticated animals and human infectious diseases of zoonotic origins: domestication time matters. *Infection, Genetics and Evolution*, **24**, 76–81.
- Murray, K. N., Clark, T. S., Kebus, M. J., & Kent, M. L. (2022). Specific Pathogen Free – A review of strategies in agriculture, aquaculture, and laboratory mammals and how they inform new recommendations for laboratory zebrafish. *Research in Veterinary Science*, **142**, 78–93.
- Naguib, M. (2022). Veterinary approach to the amphibian patient. *In Practice*, **44**(2), 91–99.
- Nania, D., Lumbierres, M., Ficetola, G. F., Falaschi, M., Pacifici, M., & Rondinini, C. (2022). Maps of area of habitat for Italian amphibians and reptiles. *Nature Conservation*, **49**, 117–129.
- Nichols, D. K., Weyant, R. S., Lamirande, E. W., Sigler, L., & Mason, R. T. (1999). Fatal Mycotic Dermatitis in Captive Brown Tree Snakes (*Boiga irregularis*). *Source: Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **30**(1), 111–118.
- O'Brien, S. J. (2000). Adaptive cycles: parasites selectively reduce inbreeding in Soay sheep. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**(1), 7–9.
- Ohkura, M., Fitak, R., Wisecaver, J. H., DeBlasio, D., Niazi, F., Egholm, M., Rounsley, S. D., Kodira, C. D., & Orbach, M. J. (2017). Genome Sequence of *Ophidiomyces ophiodiicola*, an

- Emerging Fungal Pathogen of Snakes. *Genome Announcements*, **5**(30), 10.1128/genomea.00677-17.
- Origgi, F. C., Otten, P., Lohmann, P., Sattler, U., Wahli, T., Lavazza, A., Gaschen, V., & Stoffel, M. H. (2021). Herpesvirus-associated proliferative skin disease in frogs and toads: proposed pathogenesis. *Veterinary Pathology*, **58**(4), 713–729.
- Origgi, F., Pisano, S. R. R., Glaizot, O., Hertwig, S., Schmitz, A., & Ursenbacher, S. (2022). *Ophidiomyces ophiodiicola*, Etiologic Agent of Snake Fungal Disease, in Europe since Late 1950s. *Emerging Infectious Disease Journal*, **28**(10), 2064.
- Ovchinnikov, R. S., Vasilyev, D. B., Gaynullina, A. G., Yuzhakov, A. G., Kapustin, A. V., Savinov, V. A., & Gulyukin, A. M. (2021). Detection of *Ophidiomyces ophiodiicola* in three file snakes (*Acrochordus granulatus*) imported from Indonesia to the Moscow Zoo (Russia). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **52**(3), 1074–1078.
- Paré, J. A. (2007). Mycotic diseases of reptiles. In *Jacobson: Infectious diseases and Pathology*. Florida: CRC Press.
- Paré, J. A., & Conley, J. K. (2020). Mycotic diseases of reptiles. In *Infectious diseases and pathology of reptiles* (pp. 795–858). CRC Press.
- Paré, J. A., Coyle, K. A., Sigler, L., Maas III, A. K., & Mitchell, R. L. (2006). Pathogenicity of the Chrysosporium Anamorph of *Nannizziopsis vriesii* for veiled chameleons (*Chamaeleo calyptatus*). *Medical Mycology*, **44**(1), 25–31.
- Paré, J. A., & Sigler, L. (2016). An overview of reptile fungal pathogens in the genera *Nannizziopsis*, *Paranannizziopsis*, and *Ophidiomyces*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, **26**(1–2), 46–53.
- Paré, J. A., Sigler, L., Hunter, D. B., Summerbell, R. C., Smith, D. A., Machin, K. L., Par, J. A., Sc, D. V., & Sc, M. (1997). Cutaneous Mycoses in Chameleons Caused by the Chrysosporium Anamorph of *Nannizziopsis vriesii* (Apinis) Currah. *Source: Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **28**(4), 443–453.

- Paré, J. A., Wellehan, J., Perry, S. M., Scheelings, T. F., Keller, K., & Boyer, T. (2020). Onygenalean dermatomycoses (formerly yellow fungus disease, snake fungal disease) in reptiles. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, **30**(4), 198–209.
- Parrish, K., Kirkland, P. D., Skerratt, L. F., & Ariel, E. (2021). Nidoviruses in reptiles: a review. *Frontiers in Veterinary Science*, **8**, 733404.
- Parry, N. M. A. (2020). COVID-19 and pets: When pandemic meets panic. *Forensic Science International: Reports*, **2**, 100090.
- Patel, S., Meixner, J. A., Smith, M. B., & McGinnis, M. R. (2017). 17 - Superficial Mycoses and Dermatophytes. In S. K. Tying, O. Lupi, & U. R. Hengge (Eds.), *Tropical Dermatology (Second Edition)* (pp. 189–201). Elsevier.
- Patterson, J. R., Bender, M. J., Duckworth, C. E., Noble, E., Patterson, D. B., & Pilgrim, Z. (2021). The occurrence of *Ophidiomyces ophiodiicola* in Northern Georgia wild and captive snake populations. *The Journal of Wildlife Diseases*, **57**(3), 643–647.
- Peterson, N. R., Rose, K., Shaw, S., Hyndman, T. H., Sigler, L., Kurtböke, D. İ., Llinas, J., Littleford-Colquhoun, B. L., Cristescu, R., & Frère, C. (2020). Cross-continental emergence of *Nannizziopsis barbatae* disease may threaten wild Australian lizards. *Scientific Reports*, **10**(1), 20976.
- Picquet, P., Heckers, K. O., Kolesnik, E., Heusinger, A., & Marschang, R. E. (2018). Detection of *Ophidiomyces ophiodiicola* in two captive bocourt water snakes (*Subsessor bocourti*) and one captive pueblan milk snake (*Lampropeltis triangulum campbelli*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **49**(1), 219–222.
- Pohly, A. E. (2020). *Pathological characterization of natural Ophidiomyces ophiodiicola infection in wild-caught Lake Erie watersnakes: a standardized approach to documentation of disease*. [PhD Thesis]. University of Illinois at Urbana-Champaign.

- Příbyl, M., Kabelka, R., Hanzlík, P. M., Mikulíček, P., Folk, N., Piaček, V., Pikula, J., & Balážl, V. (2023). *Ophidiomyces ophidiicola* in free-ranging and captive snakes in the Czech and Slovak Republics. *Journal of Vertebrate Biology*, **72**(23050), 23050.1.
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rajeev, S., Sutton, D. A., Wickes, B. L., Miller, D. L., Giri, D., M, V. M., Thompson, E. H., Rinaldi, M. G., Romanelli, A. M., Cano, J. F., & Guarro, J. (2009). Isolation and Characterization of a New Fungal Species, *Chrysosporium ophidiicola*, from a Mycotic Granuloma of a Black Rat Snake (*Elaphe obsoleta obsoleta*). *Journal of Clinical Microbiology*, **47**(4), 1264–1268.
- Robert, J. (2010). Emerging Ranaviral Infectious Diseases and Amphibian Decline. *Diversity*, **2**(3), 314–330.
- Robertson, J., Chinnadurai, S. K., Woodburn, D. B., Adkesson, M. J., & Landolfi, J. A. (2016). Disseminated *Ophidiomyces ophidiicola* infection in a captive eastern massasauga (*Sistrurus catenatus catenatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **47**(1), 337–340.
- Rosetta, B., Karin, S., Briante, C., Tomasello, P., Cannizzaro, D., Florio, T., Cefali, F., & Cefali, C. (2010). Risultati di un programma di monitoraggio della lepre italiana (*Lepus corsicanus* De Winton, 1989) in provincia di Messina. *Workshop nazionale sulla conservazione della lepre italiana*, **69**.
- Rowland, M. (2020). Veterinary care of guinea pigs. *In Practice*, **42**(2), 91–104.
- Ryser-Degiorgis, M.-P. (2013). Wildlife health investigations: needs, challenges and recommendations. *BMC Veterinary Research*, **9**(1), 223.
- Rzadkowska, M., Allender, M. C., O'Dell, M., & Maddox, C. (2016). Evaluation of common disinfectants effective against *Ophidiomyces ophidiicola*, the causative agent of snake fungal disease. *Journal of Wildlife Diseases*, **52**(3), 759–762.

- Savannah, G., M, L. J., S, L. J., & Anne, P. (2023). A Cross-Inoculation Experiment Reveals that *Ophidiomyces ophidiicola* and *Nannizziopsis guarroi* Can Each Infect Both Snakes and Lizards. *Applied and Environmental Microbiology*, **89**(5), e02168-22.
- Schilliger, L., Paillusseau, C., François, C., & Bonwitt, J. (2023). Major emerging fungal diseases of reptiles and amphibians. *Pathogens*, **12**(3), 429.
- Schlatter, D., Kinkel, L., Thomashow, L., Weller, D., & Paulitz, T. (2017). Disease suppressive soils: new insights from the soil microbiome. *Phytopathology*, **107**(11), 1284–1297.
- Schüler, L., Lenz, S., & Marschang, E. R. (2022). *Ophidiomyces ophidiicola* bei wildlebenden Würfelnattern (*Natrix tessellata*) in Deutschland im Jahre 2021. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere/Heimtiere*, **50**(02), P12.
- Schüler, L., Lenz, S., Mittenzwei, F., Gletscher, I., Müller, E., Heckers, K., & Marschang, R. E. (2024). Ophidiomycosis in wild dice snakes (*Natrix tessellata*) in Germany. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, **34**(1), 11–15.
- Sharp, P. M., Bailes, E., Chaudhuri, R. R., Rodenburg, C. M., Santiago, M. O., & Hahn, B. H. (2001). The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **356**(1410), 867–876.
- Sigler, L. (2013). *Ophidiomyces Sigler* L, *Hamleton* S, *Paré* JA, gen. nov. IF550166 and IF550167. *Nomenclatural novelties: Lynne Sigler. Index Fungorum no. 19*.
- Sigler, L., Hambleton, S., & Paré, J. A. (2013). Molecular Characterization of Reptile Pathogens Currently Known as Members of the *Chrysosporium* Anamorph of *Nannizziopsis vriesii* Complex and Relationship with Some Human-Associated Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**(10), 3338–3357.
- Sindaco, R., & Razzetti, E. (2021). An updated check-list of Italian amphibians and reptiles. *Natural History Sciences*, **8**(2), 35–46.

- Sleeman, J. (2013). Snake fungal disease in the United States. *National Wildlife Health Center Wildlife Health Bulletin*, **2**, 1–3.
- Sooksawasdi Na Ayudhya, S., & Kuiken, T. (2021). Reverse zoonosis of COVID-19: lessons from the 2009 influenza pandemic. *Veterinary Pathology*, **58**(2), 234–242.
- Spitzen-van der Sluijs, A., Martel, A., Asselberghs, J., Bales, E. K., Beukema, W., Bletz, M. C., Dalbeck, L., Goverse, E., Kerres, A., & Kinet, T. (2016). Expanding distribution of lethal amphibian fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, **22**(7), 1286.
- Stark, T., Beukema, W., Gilbert, M. J., Goverse, E., Spitzen-van der Sluijs, A., Struijk, R., Verbrugghe, E., Pasmans, F., & Martel, A. (2024). Detection of *Ophidiomyces ophidiicola* in wild barred grass snakes (*Natrix helvetica*) in the Netherlands. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, **93**(2).
- Stchigel, A. M., Sutton, D. A., Cano-Lira, J. F., Cabañes, F. J., Abarca, L., Tintelnot, K., Wickes, B. L., García, D., & Guarro, J. (2013a). Phylogeny of chryso sporidia infecting reptiles: Proposal of the new family Nannizziopsiaceae and five new species. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, **31**, 86–100.
- Steil, J. C., Hope, K. L., Evans, M., Peters, A., & Cartoceti, A. (2018). Multifocal *Ophidiomyces ophidiicola* Infection in an Eastern Diamondback Rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) without the Presence of Skin Lesions. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, **28**(3–4), 76–80.
- Stengle, A. G., Farrell, T. M., Freitas, K. S., Lind, C. M., Price, S. J., Butler, B. O., Tadevosyan, T., Isidoro-Ayza, M., Taylor, D. R., Winzeler, M., & Lorch, J. M. (2019). Evidence of Vertical Transmission of the Snake Fungal Pathogen *Ophidiomyces ophidiicola*. *Journal of Wildlife Diseases*, **55**(4), 961–964.

- Strand, D. A., Jussila, J., Johnsen, S. I., Viljamaa-Dirks, S., Edsman, L., Wiik-Nielsen, J., Viljugrein, H., Engdahl, F., & Vrålstad, T. (2014). Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. *Journal of Applied Ecology*, **51**(2), 544–553.
- Sun, P.-L., Yang, C.-K., Li, W.-T., Lai, W.-Y., Fan, Y.-C., Huang, H.-C., & Yu, P.-H. (2022). Infection with *Nannizziopsis guarroi* and *Ophidiomyces ophiodiicola* in reptiles in Taiwan. *Transboundary and Emerging Diseases*, **69**(2), 764–775.
- Swabe, J. (1998). *Animals, Disease and Human Society: Human-animal Relations and the Rise of Veterinary Medicine* (1st ed.). Routledge.
- Takami, Y., Nam, K.-O., Takaki, Y., Kadokaru, S., Hemmi, C., Hosoya, T., & Une, Y. (2021). First report of ophidiomycosis in Asia caused by *Ophidiomyces ophiodiicola* in captive snakes in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, **83**(8), 1234–1239.
- Team, R. C. (2016). R: 3.2. 4 for Windows. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*.
- Tetzlaff, S. J., Allender, M., Ravesi, M., Smith, J., & Kingsbury, B. (2015). First report of snake fungal disease from Michigan, USA involving Massasaugas, *Sistrurus catenatus* (Rafinesque 1818). *Herpetology Notes*, **8**, 31–33.
- Tetzlaff, S. J., Ravesi, M. J., Allender, M. C., Carter, E. T., DeGregorio, B. A., Josimovich, J. M., & Kingsbury, B. A. (2017). Snake fungal disease affects behavior of free-ranging massasauga rattlesnakes (*Sistrurus catenatus*). *Herpetological Conservation and Biology*, **12**(3), 624–634.
- Thompson, J. N., & Cunningham, B. M. (2002). Geographic structure and dynamics of coevolutionary selection. *Nature*, **417**(6890), 735–738.
- Tiwari, R., Dhama, K., Sharun, K., Iqbal Yattoo, M., Malik, Y. S., Singh, R., Michalak, I., Sah, R., Bonilla-Aldana, D. K., & Rodriguez-Morales, A. J. (2020). COVID-19: animals, veterinary and zoonotic links. *Veterinary Quarterly*, **40**(1), 169–182.
- Todd, G., Jodrey, A., & Stahlschmidt, Z. (2016). Immune activation influences the trade-off between thermoregulation and shelter use. *Animal Behaviour*, **118**, 27–32.

- Turner, G. G., Meteyer, C. U., Barton, H., Gumbs, J. F., Reeder, D. M., Overton, B., Bandouchova, H., Bartonička, T., Martínková, N., & Pikula, J. (2014). Nonlethal screening of bat-wing skin with the use of ultraviolet fluorescence to detect lesions indicative of white-nose syndrome. *Journal of Wildlife Diseases*, **50**(3), 566–573.
- Van Dyke, M. C. C., Teixeira, M. M., & Barker, B. M. (2019). Fantastic yeasts and where to find them: the hidden diversity of dimorphic fungal pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, **52**, 55–63.
- Vissiennon, Th., Schüppel, K.-F., Ullrich, E., & Kuijpers, A. F. A. (1999). Case Report. A disseminated infection due to *Chrysosporium queenslandicum* in a garter snake (Thamnophis). *Mycoses*, **42**(1–2), 107–110.
- Vivirito, K., Haynes, E., Adamovicz, L., Wright, A., Durante, K., Stanford, K., Scott, E., & Allender, M. (2021). Ultraviolet fluorescence as a field-applicable screening tool for lesions consistent with Ophidiomycosis in Lake Erie Watersnakes (*Nerodia sipedon insularum*). *The Journal of Wildlife Diseases*, **57**(2), 380–385.
- Walker, D. M., Leys, J. E., Grisnik, M., Grajal-Puche, A., Murray, C. M., & Allender, M. C. (2019). Variability in snake skin microbial assemblages across spatial scales and disease states. *The ISME Journal*, **13**(9), 2209–2222.
- Wang, H., & Ye, J. (2015). Regulation of energy balance by inflammation: common theme in physiology and pathology. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, **16**, 47–54.
- Wellehan, J. F. & D. S. J. (2019). In Mader's reptile and amphibian medicine and surgery. *Mycology, WB Saunders.*, 270–280.
- Wells, D. L. (2009). The Effects of Animals on Human Health and Well-Being. *Journal of Social Issues*, **65**(3), 523–543.
- Wells, K., & Clark, N. J. (2019). Host specificity in variable environments. *Trends in Parasitology*, **35**(6), 452–465.

- Wittwer, C., Stoll, S., Strand, D., Vrålstad, T., Nowak, C., & Thines, M. (2018). eDNA-based crayfish plague monitoring is superior to conventional trap-based assessments in year-round detection probability. *Hydrobiologia*, **807**, 87–97.
- Woodburn, D. B., Miller, A. N., Allender, M. C., Maddox, C. W., & Terio, K. A. (2019a). *Emydomyces testavorans*, a new genus and species of onygenalean fungus isolated from shell lesions of freshwater aquatic turtles. *Journal of Clinical Microbiology*, **57**(2), 10–1128.
- Xie, G. Y., Olson, D. H., & Blaustein, A. R. (2016). Projecting the global distribution of the emerging amphibian fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*, based on IPCC climate futures. *PLOS One*, **11**(8), e0160746.
- Zimmerman, L. M., Vogel, L. A., & Bowden, R. M. (2010). Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *Journal of Experimental Biology*, **213**(5), 661–671.