



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DEL LAZIO E DELLA TOSCANA
"M. ALEANDRI"



Sezione di Pisa
Responsabile dott. Massimo Mari
S.S. dell'Abetone e del Brennero, 4 - 56123 - Pisa
Tel. 050/553563 - Fax. 050/550615
pisa@izslt.it

Relazione sulle indagini diagnostiche effettuate su tartarughe marine rinvenute morte lungo le coste della Regione Toscana nel 2018

In Toscana nel 2018 sono state rinvenute (spiaggiate, catturate avvistate) 49 tartarughe marine. Di queste 35 morte e 14 vive. L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana (IZSLT) sez di Pisa ,(UOT Toscana Nord) ha effettuato la necropsia su 6 soggetti, 5 appartenenti alla specie *Caretta caretta* ed 1 alla specie *Chelonia mydas*, recuperate morte lungo le coste toscane e in condizioni tali da permettere la necropsia ed i successivi accertamenti diagnostici (microbiologici, parassitologici, virologici e genetici). Inoltre sono stati esaminati presso i laboratori IZSLT le uova e gli embrioni provenienti da 4 nidi di *Caretta caretta*. Come da protocollo, vista la complessità degli esami, sono stati coinvolti diversi laboratori e diversi enti per le indagini diagnostiche. Gli esami **batteriologicali** sono stati eseguiti dai laboratori di Diagnostica di Pisa e Roma IZSLT; i **virologici** dai Laboratori di Biotecnologie e Diagnostica delle malattie virali di Roma IZSLT; quelli **parassitologici** dal Laboratorio Diagnostica IZSLT di Pisa; quelli **istologici** dal Laboratorio istopatologia IZSLT di Roma; quelli **genetici** dal Centro di Referenza nazionale per la medicina forense IZSLT di Rieti; quelli **chimici** dal laboratorio chimico IZSLT Firenze; quelli **ecotossicologici** dal Dipartimento di Scienze Fisiche, della Terra e dell'Ambiente, Università di Siena; quelli del **contenuto alimentare dello stomaco** da ARPAT Area Mare, Livorno.

Le indagini effettuate sono rivolte ad individuare le possibili cause di morte con particolare attenzione a quelle di origine antropica.

Di seguito vengono descritti con breve referto gli esiti degli esami effettuati presso i laboratori dell'IZSLT.

1. *Caretta caretta* 18005024 (RT 210CC)

Soggetto giovane (7cm.CCL). Carapace di colore marrone rossastro. Lesione circolare di circa 2cm nelle regione inguinale arto posteriore sx di colorito chiaro e rugosa. Assenza di grasso sottocutaneo. Polmoni chiari ed enfisematosi. Stomaco

pieno di materiale gelatinoso biancastro, con mucosa iperemica. Fegato chiaro. Intestino con materiale poltaceo e sangue. Alta carica parassitaria. Isolato *Citrobacter freundii* da polmone
Ipotesi causa morte: sconosciuta

2. *Caretta caretta*: 18028340 (RT215Cc)



lesioni traumatiche sul carapace 3° scudo dx e sx. Occhi sporgenti e molto arrossati. Versamento in cavità celomatica. Fegato e milza e pancreas molto congesti. Intestino con petecchie emorragiche. Presenza di cibo nello stomaco. Schiuma nei bronchi. polmoni enfisematosi con tratti di edema.

Ipotesi causa mortis: Bycatch (annegamento)

3. *Caretta caretta*:18029917 (RT216Cc)



Soggetto giovane. Ricoverata in acquario e poi deceduta, presentava punti di sutura piatto della coscia sx posteriore. Assenza di grasso di deposito, muscolatura pallida ed edema gelatinoso del grasso (cachettica). Enterite e gastrite emorragica; estesi tratti di invaginazione intestinale, notevole ispessimento della mucosa e sottomucosa intestinale con estese lesioni necrotiche. le lesioni erano presumibilmente ascrivibili alla lenza, passante l'intestino, asportata chirurgicamente. Stomaci ed intestino privi di contenuto alimentare. vene addominali dilatate. milza congesta.

Ipotesi causa mortis: conseguenze da Bycatch

4. *Caretta caretta*:18030837 (RT217Cc)



Soggetto sub-adulto. Lesione pregressa a carico del carapace di circa 10 cm, con aree di necrosi e di continuità con la cavità celomatica. Grave deformazione della ranfoteca da probabile vecchio traumatismo. Stato di nutrizione mediocre. Presenza di numerosi epibionti su carapace ed arti posteriori. Esteso versamento emorragico nell'area pericardica con infarcimento emorragico diffuso. Stomaco con grosso quantitativo di corpi estranei di plastica, resti di reti da pesca (marine litter) con gastrite emorragica e catarro in assenza di contenuto alimentare. Enterite catarrale nel primo tratto intestinale con materiale gelatinoso rossastro. Polmoni con formazioni nodulari calcificate diffuse in tutto il parenchima. Formazioni nodulari biancastre a carico dell'ovidutto e dei reni. Isolato *Aeromonas Hydrophila* da cervello e vescica

Ipotesi causa mortis: animale molto defedato con infezione batterica in atto(sospetto traumatismo)

5. *Chelonia mydas*: 18052446 (RT229Cm/2018)



Soggetto in cod 3/4. difficile evidenziare alterazioni macroscopiche. Contenuto dello stomaco ed intestinale con notevole presenza di brandelli di plastica immersi in materiale vegetale (alghe).

Ipotesi causa morte: sconosciuta

6. *Caretta caretta*: 18082302 (RT252 Cc) Castiglione della Pescaia



Soggetto cachettico femmina (CCL 60cm) presenza di amo da pesca in esofago ben agganciato. e lenza passante tutto l'apparato digerente fino alla cloaca. Impaccamento intestinale, con fenomeni necrotici diffusi della mucosa intestinale).

Ipotesi causa morte: antropica

Diagnostica sui nidi di *Caretta caretta* rinvenuti nel 2018 sulle coste della toscana

Nel 2018 si sono avute 4 nidificazioni di *Caretta caretta* sulle coste toscane. Gli interventi di monitoraggio e gestione dei nidi sono stati gestiti dall'OTB (osservatorio toscano biodiversita) che ha richiesto l'intervento e supporto scientifico dell'IZSLT sez di Pisa . Quindi con il coordinamento dell'OTB si è istituito un gruppo di lavoro costituito da ARPAT mare Livorno, Università di Siena, IZSLT e associazioni ambientaliste (tartamare, legambiente , WWF) .

Le attività dell'IZSLT sez di Pisa hanno riguardato il monitoraggio sanitario di 4 nidi. L'IZSLT ha partecipato allo scavo dei nidi alla rilevazione morfometrica del materiale ritrovato ed alle caratteristiche della camera di nidificazione. Tutto il materiale recuperato dai nidi aperti (uova, embrioni, piccoli morti non emersi/pipped, larve di ditteri) è stato portato nel laboratorio di Pisa dove sono stati eseguiti esami diagnostici di vario genere, misurazioni accurate e documentazione fotografica del materiale ritrovato all'apertura delle camere dei nidi ed esami morfometrici.

I nidi esaminati sono stati:

- 1) **Rimigliano (LI)** (n reg IZSLT: 18067123/18067126) con deposizione il 10 giugno 2018 e inizio schiusa il 28/07/2018 (48 gg di incubazione) ed emersione in totale di 58 piccoli. All'apertura della camera di schiusa, (profonda 48 cm) il 3 agosto 2018 è stato ritrovato il seguente materiale
 - 29 pipped morti, (dimensioni: CCL tra 3 cm e 4.2 cm) allegato file con pesi e dimensioni.
 - Larve di ditteri di 3° stadio, classificate come appartenenti alla famiglia Sarcophagidae genere *Sarcophaga* specie "*Sarcophila meridionalis*"
 - 2 piccoli morti con sviluppo completo (rinvenuti a 11 e 41 cm di profondità della camera del nido)
 - 9 uova intere con presenza di embrione
 - Gusci vuoti

L'esame del nido ha rilevato una deposizione di 103 uova con nascita di 58 tartarughine vive e vitali quindi con successo riproduttivo del 56%.

I pipped si presentavano in iniziale stato di decomposizione e disidratati, con iniziale stato di mummificazione del cranio. Dalle indagini batteriologiche e micologiche non sono risultati agenti patogeni primari ma solo microorganismi tipici della putrefazione. In un soggetto è stato isolato da cervello Betanodavirus (biblio 4), virus responsabile di patologie gravi nei pesci, ma non è chiaro in bibliografia il ruolo patogeno di questo virus nelle tartarughe marine. Le larve di ditteri riscontrate appartengono ad una specie che si alimenta di materiale in putrefazione quindi non sono da considerare pericolose per la vita degli embrioni, ma indice di decomposizione di materiale organico

Dalle dimensioni e pesi rilevati, i pipped risultavano in uno stadio di sviluppo pressochè terminato, con assenza di vitello (yolk assorbito) confrontando i dati con quelli presenti in bibliografia (biblio1). Questo blocco dello sviluppo ad uno stesso stadio, secondo quanto riportato in letteratura, potrebbe anche essere determinato da sbalzi di temperatura nella camera del nido. Ma i rilevamenti termometrici che si sono potuti effettuare con la strumentazione utilizzata non consentono di affermare con certezza cosa sia avvenuto nei 4 giorni della schiusa. In letteratura vengono segnalate come pericolose per la sopravvivenza dei piccoli alla schiusa temperature superiori ai 35°C.

L'esame del materiale genetico del nido ha determinato come profilo genetico l'aplotipo mitocondriale **CC-A10.4**.

2) **Isola d'Elba** (n.Reg 18070676) (spiaggia di Straccoligno : lat 42,748059° long 10,406111°) Il nido non era stato individuato al momento della deposizione quindi non si conosce la data di deposizione , ma è stato rinvenuto solo quando sono stati visti emergere dalla sabbia i piccoli in data 18/08/2018.

All' apertura del nido effettuata in data 22/08/2018 si sono recuperati

- 68 gusci vuoti .
3 uova con contenuto liquido probabilmente non fecondate ,
- 1 uovo chiuso con due embrioni (gemelli)
- 4 morti pipped completamente sviluppati

Dal materiale esaminato non sono stati isolati agenti micotici , batterici o virologici di rilievo.

E difficile ipotizzare la data del blocco di sviluppo degli embrioni ritrovati non conoscendo la data di deposizione e le temperature di incubazione . Valutando solo i dati morfometrici rilevati si potrebbe solo ipotizzare per i due embrioni gemelli un blocco dello sviluppo intorno ai 36 -40 gg di sviluppo .

Con le 76 uova ritrovate e dal conteggio dei 68 gusci vuoti si stima un successo riproduttivo del 89% ca.

Gli esami batteriologici , micologici, e virologici sono risultati tutti negativi

L'esame del materiale genetico del nido dell' isola d'Elba del 2018 ha definito come Profilo genetico l' aplotipo mitocondriale **CC-A10.4** .



foto di embrioni gemelli

3) **Rosignano M.mo** (18072014) deposizione 9 agosto 2018 (spiaggia di Santa Lucia: lat 43,425112° long 10,40055°) Il 26 /08/2018 sono state recuperate dopo 19 giorni di incubazione 95 uova dal nido che appariva invaso dal mare . Tutte le uova sono state misurate, pesate ed aperte per l'ispezione del contenuto . Le dimensioni delle uova che apparivano intere, ma spesso con ammaccature, sono risultate comprese tra 3 - 3.5 cm di diametro ed il peso tra i 19 -25 gr . All' apertura dell'uovo, laddove possibile evidenziarlo, sono risultate solo tracce di iniziale sviluppo (disco embrionale) . Confrontando con i dati in bibliografia, lo sviluppo osservato non corrispondeva a quanto descritto a 19 gg di incubazione, ma risultava decisamente uno sviluppo inferiore, si presume fermo già da 1 una settimana circa prima dell'apertura .

L'esame genetico del materiale recuperato dal nido di Rosignano M.mo ha definito come profilo genetico: aplotipo mitocondriale **CC-A2.1**.

Da questa nidificazione non risulta nata nessuna tartaruga.

L'esame batteriologico effettuato a pool su gruppi di 10 uova ha evidenziato in tre pool presenza di *Shewanella putrefaciens*, confermando lo stato di putrefazione già iniziato. La ricerca per miceti è risultata costantemente negativa.

4) **Baia del Quercetano (LI)** (n reg 18072015 18080850) il nido era stato deposto in data 8 agosto nella spiaggia di Santa Lucia-Rosignano, traslocato il 28 agosto nella spiaggia del Quercetano ritenuta più idonea allo sviluppo delle uova. La traslocazione è avvenuta a 20gg di incubazione. Nel corso della delicata operazione sono state effettuate delle sperature delle uova ed eliminate 4 che non presentavano sviluppo embrionale (n Reg 18072015). Decisa l'apertura della camera del nido già a 60gg di incubazione, malgrado le condizioni di sviluppo fossero senz'altro alterate per la traslocazione delle uova, i conseguenti sbalzi di temperatura e umidità subiti dalle uova, potessero aver rallentato lo sviluppo. Ritrovate all'apertura del nido il 28/092018:

- 89 uova intere non schiuse con presenza di embrioni a vario stadio di sviluppo,
- 5 gusci
- 2 tartarughine in fase di emersione (vive e vitali che hanno preso il mare in totale autonomia).

Successo di schiusa 5%. All'apertura delle 89 uova si sono osservate caratteristiche morfologiche del materiale all'interno dell'uovo catalogabile in tre stadi di sviluppo alquanto distinguibili. Per 7 uova non si evidenziava alcuno sviluppo ma solo materiale amorfo (cat 3). Per le altre 82 uova sono stati ritrovati embrioni morti. Le misurazioni del carapace e del vitello (yolk) di questi ha consentito con una certa attendibilità di differenziare in 2 categorie gli embrioni ritrovati.

Lo sviluppo embrionale delle **89 uova** è stato suddiviso in 3 categorie:

1. Sviluppo parzialmente completo con presenza di abbondante vitello: 30 soggetti
2. Sviluppo incompleto: 52 soggetti
3. Assenza di sviluppo : 7 uova

Difficile definire con certezza il periodo di sviluppo delle due categorie con presenza di embrioni. I dati ambientali che abbiamo a disposizione non risultano completi e non sappiamo quanto la traslocazione abbia potuto incidere sui tempi di incubazione. Si aprono dei dubbi e nuovi quesiti relativi all'apertura del nido in tempi forse troppo precoci, considerando che in letteratura lo sviluppo embrionale di *Caretta caretta* si attesta tra i 45 ed i 90gg di incubazione

Gli agenti batterici isolati dal materiale contenuto nelle uova e dagli embrioni sono in questo caso da ritenersi germi di probabile contaminazione ambientale in assenza di lesioni specifiche. :*Aeromonas hydrophila* dagli embrioni della categoria 2, *Citrobacter koseri* e *Enterobacter cloacae* dagli embrioni categoria 1, dalle uova senza sviluppo *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila* e *Citrobacter koseri*.



Foto di embrioni cat. 2

Agenti micotici isolati : *Fusarium solani* è stato isolato da alcune uova con sviluppo incompleto. Tale microrganismo è riportato in letteratura come responsabile di mortalità massive in nidi di *Caretta caretta* (biblio3). Comunque viene segnalata in bibliografia crescita di questi miceti anche in assenza di lesioni nelle uova. Viene riportato che condizioni microclimatiche particolari , composizione della sabbia, naturale immunodepressione degli embrioni o immunosoppressioni dovute ad accumulo di tossici possono determinare la morte degli embrioni .

Profilo genetico identificato: Aplotipo mitocondriale **CC-A2**.

Conclusioni e considerazioni :

In letteratura risultano alcuni agenti batterici e micotici primari come responsabili di infezioni e di conseguente blocco dello sviluppo embrionale. Le nostre indagini specifiche per la ricerca di questi come *Salmonella spp* e *Vibrio spp* è risultata costantemente negativa.. In bibliografia invece risulta il *Fusarium solani* come agente micotico responsabile di morti embrionali. Abbiamo riscontrato delle positività negli embrioni del nido di Rosignano che presentavano, a carico del guscio, lesioni macroscopicamente riferibili allo sviluppo di tale micete; quali presenza di piccole macchie circolari rosse . Possiamo solo ipotizzare un danno agli embrioni ma non possiamo attribuire con certezza la causa di morte degli embrioni allo sviluppo di questo potenziale patogeno perchè sugli embrioni, che si presentavano già in decomposizione, non è stato possibile effettuare indagini istologiche che avrebbero consentito di evidenziare lesioni specifiche ad organi vitali. Dall'esame genetico e per la modalità di deposizione della tartaruga si può ipotizzare che la nidificazione della spiaggia di Santa Lucia sia stata effettuata dallo stesso animale in tempi successivi.Sarà oggetto di ulteriori considerazioni l'elaborazione di tutta la mole di informazioni raccolte fino ad ora da tutti i soggetti che hanno collaborato al monitoraggio delle nidificazioni . Al fine di migliorare le modalità operative nell'ambito della gestione dei nidi e soprattutto di definire in maniera chiara protocolli condivisi e definiti alla luce dei nuovi dati scientifici emersi dall'esperienza effettuata sulle coste della Toscana .

(foto effettuate da Giuliana Terracciano)

Dott.ssa Giuliana Terracciano
IZSLT Sezione di Pisa
Referente Toscana
Rete Nazionale Spiaggiamenti Mammiferi Marini (ReNaSMM)

Bibliografia consultata :

1) A Field Key to the Developmental Stages of Marine Turtles (Cheloniidae) with Notes on the Development of *Dermochelys*

Author(s): Jeffrey D. Miller, Jeanne A. Mortimer, and Colin J. Limpus
Source: Chelonian Conservation and Biology, 16(2):111-122.

2) Pathologic findings in hatchling and posthatchling leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) from Florida

Author(s): Debra L. Miller, Jeanette Wyneken, Sreekumari Rajeev, Justin Perrault, Douglas R. Mader, James Weege, and Charles A. Baldwin
Source: Journal of Wildlife Diseases, 45(4):962-971.

3) *Fusarium solani* is responsible for mass mortalities in nest of loggerhead sea turtle *Caretta caretta* in Boavista , Cape Verde

Author(s): Jullie M. Sarmiento Ramirez Elena Abella, Maria P Martin Maria T Telleria Luis Lpez Jurado, Adolfo Marco, J.D. Uribeondo
Source: FEMS Microbiol Lett 312 (2010) 192-200

4) Bacterial and viral pathogens detected in sea turtles stranded along the coast of Tuscany, Italy

Author(s): G. Fichi G. Cardeti, A. Cersini, C. Mancusi, M. Guarducci, G. Di Guardo, G. Terracciano
Source: Veterinary Microbiology 185 (2016) 56–61

Esami diagnostici effettuati sui 4 nidi di *Caretta caretta* rinvenuti in Toscana nel 2018:

NIDO1 Rimigliano (LI) esaminato il 3/08/2018 (nreg 18067123 - 18067126)

NIDO 2 Straccoligno (LI) esaminato il 22/08/2018 (n reg 180 70676)

NIDO 3 Santa Lucia (LI) esaminato il 27/09/2018 (n reg 18072015 - 18080850) nido traslocato

NIDO 4 Santa Lucia (LI) esaminato il 26/08/2018(n REG18072014)

A seguito dell'apertura del Nido 1 sono stati esaminati i gusci delle uova schiuse ed piccoli rinvenuti morti

Nido 3 spiaggia del quercetano nido traslocato in data 28/08/2018 sono state ritrovate 89 uova intere 5 gusci 2 tartarughine vive uscite all'apertura della camera del nido. Di queste 89 non schiuse : 30 cat 1 52 cat 2 ,7 senza sviluppo