

CHYTRIDIOMYCOSE BIJ AMFIBIEËN

NIELS NORMON

Studentennummer: 01309183

Promotor: Prof. dr. An Martel

Promotor: Prof. dr. Frank Pasmans

Onderdeel van de Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de diergeneeskunde
Academiejaar: 2018 – 2019



Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

Woord vooraf

Omdat deze thesis een vorm van bekroning is van mijn ganse opleiding, en je deze dus moeilijk alleen kunt maken wil ik een aantal mensen in het bijzonder bedanken die mij hierbij geholpen en gesteund hebben.

In de eerste plaats wil ik mijn promotor Prof. Dr. An Martel bedanken om mij de kans te geven in haar domein een thesis te volbrengen. En de ondersteuning die zij mij heeft gegeven in het schrijven van de thesis. Zij stond altijd klaar om mij te helpen met tips en het geven van inzichten in het onderwerp. Gedurende de praktische uitvoering van de experimenten werd ik goed begeleid door Sarah Van Preat die ik hiervoor wil bedanken.

Omdat dit het laatste jaar is van mijn opleiding wil ik ook mijn ouders bedanken voor de steun die ze mij gegeven hebben tijdens mijn volledige opleiding diergeneeskunde.

Inhoudsopgave

| | |
|---|-----------|
| Woord vooraf | 3 |
| Inhoudsopgave | 4 |
| Samenvatting | 6 |
| I. Inleiding | 7 |
| II. Literatuurstudie | 9 |
| 1 Batrachochytrium dendrobatidis | 9 |
| 1.1 <i>Etiologie</i> | 9 |
| 1.2 <i>Epidemiologie</i> | 10 |
| 1.3 <i>Levenscyclus</i> | 11 |
| 1.4 <i>Pathogenese</i> | 12 |
| 1.4.1 <i>Kolonisatie van de huid</i> | 13 |
| 1.4.2 <i>Verstoring van de huidfunctie</i> | 15 |
| 1.4.3 <i>Immunititeit</i> | 15 |
| 1.4.4 <i>Gevoeligheid voor Bd-infectie</i> | 19 |
| 1.5 <i>Klinische presentatie</i> | 20 |
| 2 Batrachochytrium salamandrivorans | 22 |
| 2.1 <i>Etiologie</i> | 22 |
| 2.2 <i>Epidemiologie</i> | 22 |
| 2.3 <i>Levenscyclus</i> | 23 |
| 2.4 <i>Pathogenese</i> | 24 |
| 2.4.1 <i>Kolonisatie van de huid</i> | 24 |
| 2.4.2 <i>Verstoring van de huidfunctie</i> | 25 |
| 2.4.3 <i>Immunititeit</i> | 25 |
| 2.4.4 <i>Gevoeligheid voor Bs-infectie</i> | 25 |
| 2.5 <i>Klinische presentatie</i> | 26 |
| 3 Diagnosetechniek | 27 |
| 3.1 <i>Q-PCR bij B. dendrobatidis en B. salamandrivorans</i> | 27 |
| 3.2 <i>Histologie</i> | 28 |
| 4 Behandeling | 30 |
| 4.1 <i>Behandeling van de amfibie</i> | 30 |
| 4.1.1 <i>Temperatuur als behandeling</i> | 30 |
| 4.1.2 <i>Antimycotica</i> | 30 |
| 4.2 <i>Behandeling van de omgeving</i> | 31 |
| 5 Praktisch plan voor de bestrijding van Chytridiomycose geïnfecteerde amfibieën | 33 |
| III. Discussie | 36 |

| | |
|------------------------------|-----------|
| Referentielijst | 39 |
| Bijlagen..... | 45 |

Samenvatting

Batrachochytrium dendrobatidis en *B. salamandrivorans* zijn parasitaire schimmels van amfibieën die behoren tot het fylum Chytridiomycota. Ze infecteren de huid en verstoren zo tal van functies wat kan leiden tot klinisch zieke dieren of sterfte. Hoewel de twee chytriden vrij gelijkaardig zijn op het gebied van pathogenese zijn er toch enkele duidelijke verschillen. Deze zijn te vinden in het gastheerbereik, de optimale groeitemperatuur, de levenscyclus en de sporevormen. De schimmels zouden afkomstig zijn uit Azië en via onder andere handel in kwetsbare regio's geïntroduceerd zijn. Dit leidt tot nefaste gevolgen voor de amfibieënpopulatie. Er is dus nood aan vlugge detectie- en effectieve behandelingsmethoden. Aan de hand van een literatuurstudie zullen de beste methoden om Chytridiomycose bij amfibieën op te sporen en te bestrijden besproken worden. Uit deze studie bleken Q-PCR en histologie de beste diagnostie technieken te zijn. De behandeling kan worden opgedeeld naargelang de schimmel. Voor Bd wordt 1,25 µg/ml voriconazole voor 7 dagen bij een temperatuur van 25°C aangeraden. Bs kan bestreden worden met een temperatuur van 25°C als de amfibiesoort het aan kan. In de andere gevallen is een combinatie van 2000 IU/ml polymyxine E en 12,5 µg/ml voriconazole voor 10 dagen bij 20°C nodig om Bs te elimineren. De beste desinfectantia voor de omgeving zijn 1% Virkon, 4% natriumchloride of 70% ethanol. Met behulp van deze bevindingen werd een protocol opgesteld voor houders van amfibieën om Chytridiomycose te elimineren.

I. Inleiding

Fungi zijn wijdverspreid aanwezig over de hele wereld. Ze vervullen zowel een positieve als negatieve rol in het ecosysteem. Deze interactie wordt onder andere beschreven door de mycoloop. (Kagami et al., 2014) In onze samenleving zijn er enkele positieve eigenschappen verbonden aan schimmels zoals de ontwikkeling van penicilline, recycling van organisch materiaal of eetbare soorten. Daarnaast is ziekte bij mens en dier een van de meest ongewenste effecten die schimmels kunnen veroorzaken. (Fisher et al., 2012) In deze literatuurstudie zal er worden ingegaan op schimmels die ziekte veroorzaken bij amfibieën.

Chytridiomycota behoren tot het lagere fungi fylum (Fig. 1). Dit fylum heeft een karakteristieke zoöspore namelijk een bewegelijke spore met een flagel. Een tweede levensstadium, het zoösporangium, is het reproductief lichaam die op asexuele wijze zoösporen voortbrengt. De schimmels behorend tot de Chytridiomycota leven als saprofyten of parasieten in waterige of vochtige omgevingen. Een infectie met een van deze schimmels die leidt tot zieke dieren wordt Chytridiomycose genoemd. (Van Rooij et al., 2015)

Twee parasitaire Chytridiomycota zijn verantwoordelijk voor een dramatische terugval van de amfibieënpopulatie. Meer specifiek gaat om *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) en *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bs). Deze twee schimmels zijn afzonderlijk en met enige tijd ertussen van elkaar ontdekt op verschillende plaatsen. Er zijn grote gelijkenissen tussen de twee maar ook enkele typische verschillen op het vlak van gastheerbereik, klinische presentatie, pathogenese en levenscyclus.

Voor de twee chytriden worden twee hypothesen voorgesteld. Ten eerste is er de invasieve pathogeen hypothesen. Deze houdt in dat de schimmel geïntroduceerd wordt in een regio waar die niet voorkomt. Afhankelijk van de gevoeligheid en andere factoren zorgt deze schimmel voor nefaste gevolgen voor de amfibieënpopulaties. Deze hypothesen wordt gesteund door het feit dat de schimmel zowel endemisch als invasief aanwezig kan zijn in een gastheer. De tweede hypothesen, de endemische pathogeen hypothesen, zegt dat de schimmel in een lage prevalentie kan voorkomen maar door omstandigheden virulenter wordt. Voorbeelden van een stijging in virulentie zijn de beschikbaarheid van een gevoelige gastheer die toeneemt of een gunstige omgeving die beschikbaar wordt. Omdat de schimmel aanwezig kan zijn voor verschillende jaren in een amfibiesoort en pas later leidt tot een afname in de populatie is het bewijs voor deze hypothesen. (Van Rooij et al., 2015)

Bd is aanwezig over de hele wereld. Er bestaan verschillende lijnen van de schimmel, waaronder endemische en een globale pandemische lijn (GPL). De een is al lethaler dan de andere. De oorsprong van Bd zou in Oost-Azië liggen. Want in deze regio komt een lijn voor die alle genetische eigenschappen vertoont als de GPL. (O'Hanlon et al., 2018)

Bs is enkel terug te vinden in Oost-Azië en Europa. De schimmel zou zijn oorsprong vinden in Azië omdat die daar endemisch aanwezig is. Vanuit deze regio zou het door handel verspreid zijn naar andere landen in Europa. (Martel et al., 2014)

Deze twee chytriden zijn een mooi voorbeeld van hoe de mens ongewenst zorgt voor de verspreiding van levende organismen. In vele gevallen leidt de introductie van invasieve exoten tot negatieve gevolgen voor bepaalde inheemse soorten. In dit geval heeft Bs geleid tot een grote terugval van de vuursalamanders. (Martel et al., 2013) Maar er zijn tal van andere voorbeelden zoals de Aziatische karpers, de zebra mossel of de reuzenpad.¹

¹ <https://bcinvasives.ca/news-events/recent-highlights/top-10-invasive-species-from-around-the-gl>

De chytriden infecteren een essentieel orgaan van de amfibieën namelijk de huid. Hierdoor richten de schimmels veel schade aan de dieren. Een infectie leidt niet altijd tot klinisch zieke dieren, maar ook asymptomatische dragers zijn gekend voor zowel Bd als Bs. (Yap et al., 2017) (Stegen et al., 2017) (Van Rooij et al., 2015)

Chytriden zijn zowel een groot probleem bij de amfibieën in gevangenschap als bij de wildpopulatie. De schimmels hebben grote gevolgen voor de leefbaarheid van amfibieën. Het is dan ook essentieel om geïnfecteerde dieren zo vroeg mogelijk te detecteren en zo efficiënt mogelijk te behandelen. Omdat er zowel symptomatische als asymptomatische dieren voorkomen is detectie een eerste belangrijke stap in de bestrijding. Hierbij is Real-time PCR een handig hulpmiddel voor de diagnose van Bd en Bs. (Blooi et al., 2013) Eens de positieve dieren gedetecteerd zijn kan er gepast behandeld worden. Naast de behandeling van de dieren moet ook de omgeving gedesinfecteerd worden. Want er bestaan verschillende vectoren en reservoirs die zorgen voor overleving en/of verspreiding van de chytriden. (Stegen et al., 2017)

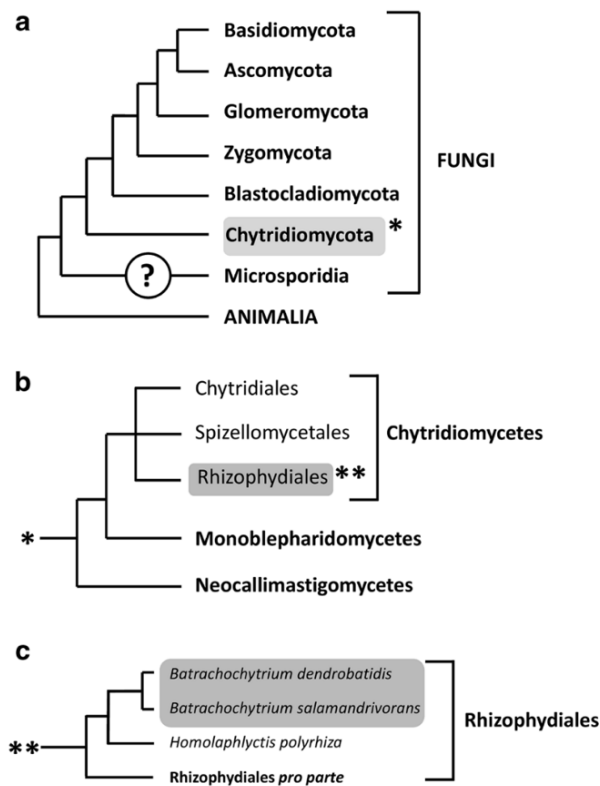
In deze masterproef zal de focus vooral liggen op de houders van amfibieën. Doormiddel van een literatuurstudie zal een overzichtelijk protocol worden opgesteld om Chytridiomycose bij amfibieën te diagnosticeren en te behandelen.

II. Literatuurstudie

1 *Batrachochytrium dendrobatidis*

1.1 Etiologie

Batrachochytrium dendrobatidis (Bd) is een schimmel die behoort tot het Fylum *Chytridiomycota*, de Klasse *Chytridiomycetes*, de Orde *Rhizophydiales* en het Geslacht *Batrachochytrium* (Fig. 1). Omdat de schimmel zoösporen vormt en een specifieke ontwikkeling van het kinetosoom heeft in dit stadium valt hij respectievelijk binnen het Fylum *Chytridiomycota* en de Orde *Rhizophydiales*. Toch is Bd te onderscheiden van andere chytridiale schimmels zoals *Rhizophlyctis harderi* en *Lacustromyces hiemalis* doordat de microtubuli ontstaan uit het 9-1 triplet kinetosoom en parallel verlengen tot de ribosomen. (Longcore et al., 1999)



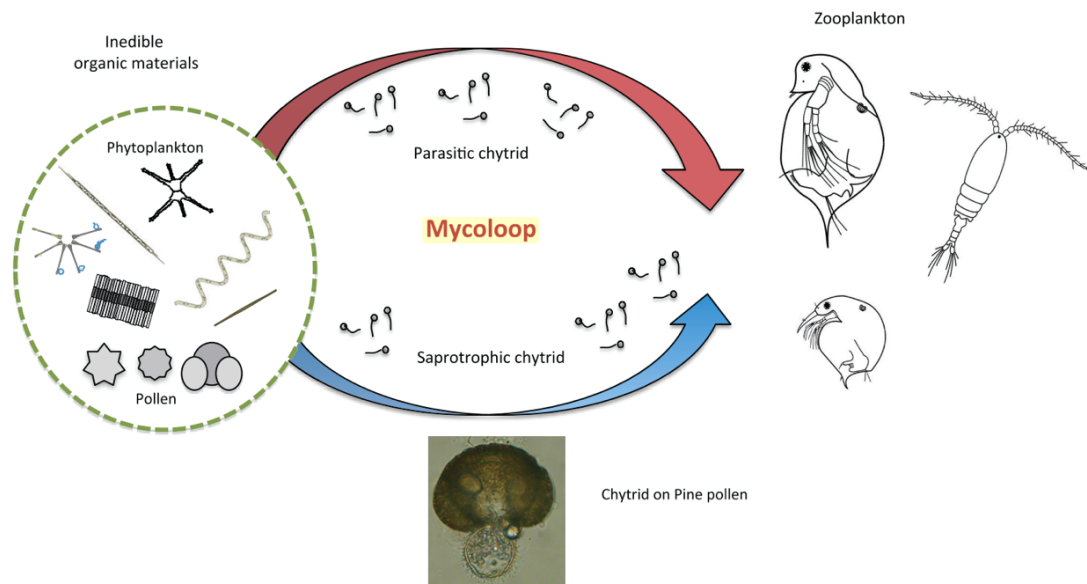
Figuur 1. Etiologie van *Batrachochytrium dendrobatidis* en *B. salamandrivorans*. A. De schimmels behoren tot het rijk van de fungi en het Fylum *Chytridiomycota*. B. Verder in te delen in de Klasse *Chytridiomycetes* en de Orde *Rhizophydiales*. C. Tenslotte vallen de schimmels in het genus *Batrachochytrium*. (Van Rooij et al., 2015)

Bd is een parasiet van amfibieën. De schimmel is in staat de huid van amfibieën te infecteren en dit kan leiden tot de ziekte Chytridiomycose waarvan de klinische symptomen in het deel klinische presentatie (§ 1.5) worden besproken. (Van Rooij et al., 2015)

Er zijn verschillende genetische lijnen van Bd gekend (§ 1.2). Waarvan de globale pandemische lijn (GPL) over de hele wereld verspreid is.

De chytriden, waar Bd onder valt, spelen een belangrijke rol in het waterecosysteem. Ze vervullen hierbij verschillende functies. Ten eerste zijn de zoösporen een bron van voeding voor het zoöplankton. Ten tweede breken ze organisch materiaal af. Ten derde zijn het parasieten van planten en aquatische dieren. Ten vierde zetten ze anorganisch materiaal om in organisch materiaal. (Gleason et al., 2008)

De interactie van zoösporen met het ecosysteem kan worden omschreven door de mycoloop (Fig. 2). De zoösporen leven als saprofyten en/of parasieten. Bijkomend vormen ze het voedsel voor de kleinere organismen zoals zoöplankton. Hierdoor verlaagt de kans op infectie met Bd voor de amfibieën. (Kagami et al., 2014)



Figuur 2. De mycoloop, het effect van chytriden op de voedselketen in het water. Saprofytische chytriden leven van niet eetbaar organisch materiaal zoals pollen en andere. Ze vermeerderen en maken zoösporen aan die op hun beurt voedsel zijn voor het zoöplankton. Of ze parasiteren de aquatische dieren zoals Bd bij amfibieën. (Kagami et al., 2014)

1.2 Epidemiologie

Bd werd voor het eerst gediagnosticeerd in wilde en in gevangenschap gehouden kikkers in Noord- en Centraal-Amerika, *Dendrobates azuatus* (blauwe gifkikker), *D. auratus* (gouden gifkikker) en *Litoria caerulea* (koraalteenboomkikker). (Longcore et al., 1999) Later werd Bd op alle andere continenten gevonden waar amfibieën aanwezig zijn.

De schimmel heeft een breed gastheerbereik. Zo kan het dieren behorend tot de anura, de urodela en de caecilia infecteren. (Van Rooij et al., 2015)

Er zijn verschillende aanwijzingen dat Bd afkomstig is uit Oost-Azië. Met volgende studies wordt geïllustreerd dat Bd endemisch is in Azië. Hiermee wordt bedoeld dat de amfibieën weinig nadelige effecten ondervinden van de schimmel die er in lage concentraties aanwezig is.

Fong et al. (2015) en Laking et al. (2017) konden respectievelijk Bd aantonen in Korea in de *Rugosa emeljanovi* (Japanse gerimpelde kikker) en in Vietnam in de *Tylotriton zieglerei* (krokodilsalamander). Daarnaast werden in Kameroen zowel de GPL als enkele andere endemische lijnen gevonden m.b.v. fylogenetisch onderzoek. Er werden meer dan 46 soorten per gebied getest. De gevonden endemische lijnen zijn afkomstig uit Brazilië en Zuid-Korea. (Miller et al., 2018) De GPL zou aan de basis liggen van de enorme daling in de amfibieënpopulatie eens ze geïntroduceerd was in Europa, Noord-Amerika en Australië. (Farrer et al., 2011) Deze GPL is wereldwijd verspreid. Een ander bewijs voor de oorsprong van Bd is dat er een lijn in Oost-Azië is die alle genetische eigenschappen heeft van de GPL. (O'Hanlon et al., 2018) Nog een andere studie kon een Bd-lijn in China in de *Babina pleuraden* (bruine kikker) en in Japan in de *Andrias japonicus* (Japanse reuzensalamander) aantonen die reeds bestond voor de GPL. (Bai et al., 2012)

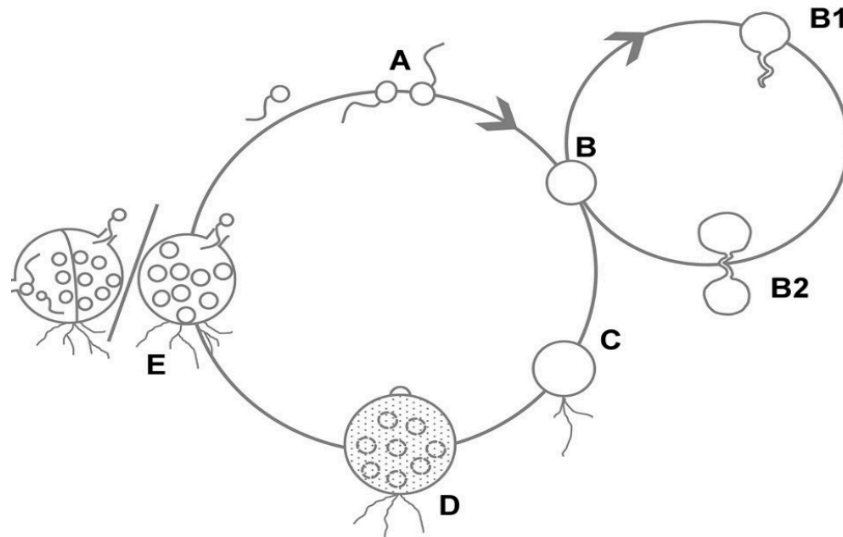
1.3 Levenscyclus

De levenscyclus is het best beschreven *in vitro* waar deze in 5 dagen wordt vervolledigd. Het proces is temperatuurgevoelig met een optimale groeitemperatuur tussen 17°C en 25°C. (Piotrowski et al., 2004) Bd kan *in vitro* groeien op kikkerhuidagar, veren en schubben van ganzenpoten, maar het best op trypton-gelatine hydrolysaat-lactose agar. (Garmyn et al., 2012)

Bijkomend kan de schimmel ook vasthechten op chitine waarbij het koolhydraat-binding molecule (CBM18, ook chitine-binding module 18 genoemd) van belang is. De expansie van het gen CBM18 speelt een rol in de verschuiving van een niet-pathogene naar een pathogene schimmel. Er werden initieel 11 kopieën van het CBM18 teruggevonden in het genoom van Bd. Maar een latere studie van Farrer et al. (2017) vond 21 genkopieën en 90 domeinen van CBM18. Naast het CBM-domein bevatten deze genen nog drie bijkomende bindingsdomeinen. Het gaat om een deacetylase, een lectine en een tyrosinase domein. (Abramyan and Stajich, 2012)

De levenscyclus *in vitro* start bij de bewegelijke zoöspore (Fig. 3.). Deze heeft een posterieur gerichte flagel, geen celwand en is meestal sferisch van uitzicht. Na dit stadium wordt de spore omgevormd tot een cyste, ontwikkelt het een celwand en wordt de flagel geabsorbeerd. Vervolgens wordt een kiem gevormd met verschillende draadvormige vertakkingen die rhizoïden worden genoemd. Deze worden vooral *in vitro* gezien omdat ze *in vivo* moeilijk te bekijken zijn. Daarna zal de kiem rijpen en wordt er gesproken van een zoösporangium of sporangium. Dit ontstaat doordat het cytoplasma mitotische deling ondergaat en zoösporen vormt. Het geheel wordt een reproductief lichaam of thallus genoemd. Er zijn twee types van ontwikkeling, een monocentrische en een koloniale. Bij het eerste type is er geen compartimentiesatie van de zoösporen en is er sprake van een groot zoösporangium. In het tweede type is er compartimentiesatie en heeft de thallus meerdere sporangia. Ten slotte worden uitscheidingspapillen of -buizen gevormd die langs de binnenzijde geblokkeerd zijn door een soort plug. Door de rijping lost deze fysische blokkade op en kunnen de zoösporen ontsnappen. Opmerkelijk is dat de vrijstelling kan worden uitgesteld in een droog klimaat en pas gebeurt als de omstandigheden gunstig zijn voor de overleving van de spores. (Berger et al., 2005a)(Van Rooij et al., 2015)

De cyclus *in vivo* is grotendeels hetzelfde als *in vitro*. Er is eerst kolonisatie van de epidermis door de zoösporen die later omvormen tot cysten. Er wordt een celwand gevormd en de flagel wordt geabsorbeerd. Daarna ontstaat een kiem met een kiembuis die de epidermiscellen penetreert. Tijdens dit stadium worden *in vitro* meer rhizoïden gezien. De tip van de kiembuis vormt een sporangium intracellulair. Vervolgens is er vermeerdering en uitbreiding in het stratum corneum en het stratum granulosum. De ontwikkelingsduur van het sporangium duurt ongeveer even lang als de differentiatie van de huid. Zo wordt een onrijp sporangium langzaam naar de oppervlakte gebracht tot het rijp is. Tenslotte wordt een uitscheidingsbuis gevormd. Hieruit kunnen de zoösporen worden vrijgesteld eens ze aan het huidoppervlak zijn. (Van Rooij et al., 2015)



Figuur 3. De levenscyclus van *Batrachochytrium dendrobatidis* en *B. salamandrivorans*. A. De zoösporen met flagel die de huid infecteren. B. De cyste met een celwand en een geabsorbeerde flagel wordt gevormd. C. Uit de cyste ontstaat de kiem met rhizoïden. D. De thallus met sporangium en ontwikkeling van de uitscheidingspapil of -buis. E. Matuur thallus met zoösporen die kunnen worden vrijgesteld uit de papil of buis. In de figuur is de koloniale vorm links afgebeeld en de monocentrische rechts. Een aftakking van de cyclus zien we bij Bs bij punt B. B1. Cyste wordt gevormd met een kiembuis. B2. Vanuit de kiembuis wordt een nieuw sporangium gevormd. (Van Rooij et al., 2015)

De transmissie gebeurt door infectie met bewegelijke zoösporen in de omgeving of door direct contact met een geïnfecteerd dier. Er wordt een onderscheid gemaakt tussen vectoren en reservoirs. Bij de eerste kan de schimmel vermeerderen en verspreiden doordat de vector zelf beweegt. De tweede zorgt enkel voor vermeerdering van de schimmel. De verspreiding gebeurt door andere mechanismen voorbeeld doordat een amfibie in direct contact komt met het reservoir. Verder kunnen vectoren onderverdeeld worden in biotisch en abiotisch.

De sporen kunnen overleven en verspreiden via het water, de aarde (Johnson and Speare, 2005), amfibieën of niet-amfibieën. De overleving in water kan gaan van 7 weken tot zelfs maanden (Johnson and Speare, 2003). Enkele voorbeelden van niet-amfibieën verspreiders zijn veren en keratine van schubben van verschillende watervogels (Garmyn et al., 2012) (Hanlon et al., 2017), het exoskelet van arthropoda (Abramyan and Stajich, 2012) en het gastro-intestinaal stelsel van rivierkreeften. (McMahon et al., 2013)

Algemeen is het water een belangrijke factor gebleken in de spreiding van Bd. Zo is er een positieve correlatie tussen Bd-prevalentie en de waterdensiteit. Water wordt gezien als een abiotische vector. (Ruggeri et al., 2018)

1.4 Pathogenese

Zoals hierboven (§ 1.3) aangehaald spelen factoren zoals temperatuur, reservoirs en vectoren een grote rol in de infectie van amfibieën door Bd. Maar ook de dieren op zich hebben een bepaalde weerstand en gevoeligheid voor de schimmel. Dit kan zowel op individueel als op populatieniveau bekeken worden. (Berger et al., 2016)

In wat volgt zullen verschillende factoren besproken worden die belangrijk zijn om een infectie met Bd te hebben die leidt tot een klinisch ziek dier.

Eerst zal de kolonisatie aan bod komen (§ 1.4.1), daarna het effect op de huidfunctie (§ 1.4.2), vervolgens de rol van de gastheerimmunititeit (§ 1.4.3) en tenslotte de gevoeligheid en resistentie van de gastheer tegenover Bd (§ 1.4.4).

1.4.1 Kolonisatie van de huid

Kolonisatie van de huid is de eerste factor, die verder kan opgedeeld worden in drie stappen. Kort houdt dit in dat er eerst aantrekking is van de zoösporen tot de huid en daarna vasthechting. Vervolgens worden kiemen gevormd met een kiembuis die in de epidermis groeien. Dit resulteert in het verlies van cytoplasma van de gastheercel. Tenslotte is er vermeerdering van de schimmel in de huid.

De eerste stap bij kolonisatie is de aantrekking van de zoösporen tot de huid. Dit fenomeen wordt chemotaxis genoemd. Hierbij is de interactie met de slijmbarrière van de huid heel belangrijk. Er moeten triggers zijn waardoor de schimmel verkiest de huid te infecteren. Keratine is de meest voor de hand liggende omwille van de aanwezigheid in huid maar ook in gekeratiniseerde teenschubben van ganzen. Men kon bewijzen dat de schimmel actief bewoog naar verschillende triggers waaronder suikers, aminozuren en eiwitten. In een studie van Moss et al. (2008) werd aangetoond dat Bd de voorkeur gaf om te migreren naar α -D-galactose, α -D-mannose en β -D-N-acetylglucosamine. Suikers die aanwezig zijn in het geglycosyleerde proteïne mucine die een hoofdbestanddeel is van het huidslijm.

Naast chemotaxis van de schimmel biedt de slijmbarrière ook bescherming tegen schadelijke stoffen of kiemen. Er zijn verschillende stoffen aanwezig in deze laag die beschermend werken tegen Bd. Voorbeelden zijn de antimicrobiële peptiden geproduceerd door de granulaire klieren, mucosale antilichamen, lysozymen en de bacteriële flora. (Ramsey et al., 2010)

Er zijn enkele bacteriën die deel uit maken van de huidflora die antimycotische eigenschappen hebben. Harris et al. (2006) vond verschillende bacteriën die de groei van Bd konden afremmen zie later (§ 1.4.3). In een studie van Brucker et al. (2008) werden twee metabolieten geïdentificeerde die de groei van Bd vertraagden. Violaceïne dat door *Janthinobacterium lividium* geproduceerd wordt en indole-3-carboxaldehyde. Er werd bewezen dat het beschermend werkte tegen Bd als *Rana muscosa* (geelpotige bergkikker) er eerst mee werd geïnfecteerd. (Brucker et al., 2008)

In een latere studie zag men dat de bacteriële populatie verschillend was naargelang het metamorfose stadia, levenscyclus en ziekte-toestand. (Bates et al., 2018)

Deze slijmbarrière is dus een eerste obstakel die de schimmel moet overwinnen om succesvol de amfibie te kunnen infecteren.

De volgende stap bij kolonisatie is de adhesie aan de huid. In dit stadium is de schimmel een cyste. De vasthechting wordt gefaciliteerd door een fijn fibrillaire netwerk dat vergelijkbaar is met de pathogene schimmel *Trichophyton mentagrophytes* als bij de mens. (Baldo et al., 2012) Agglutamine- of lectine-achtige proteïnen die in andere pathogene schimmels beschreven zijn zouden ook een rol kunnen spelen in deze stap. Wat de precieze samenstelling is moet nog verder onderzocht worden.

Een reeds gedefinieerde bindingsmolecule is CBM18 (§ 1.3). Deze helpt Bd te binden aan de gastheer en biedt bescherming tegen chitinase. Dit is een verdedigingsmechanisme van de gastheer tegen schimmels. Daarnaast helpt CBM18 Bd te verspreiden door vast te hechten aan andere niet-amfibië dieren die chitine bevatten. (Abramyan and Stajich, 2012)

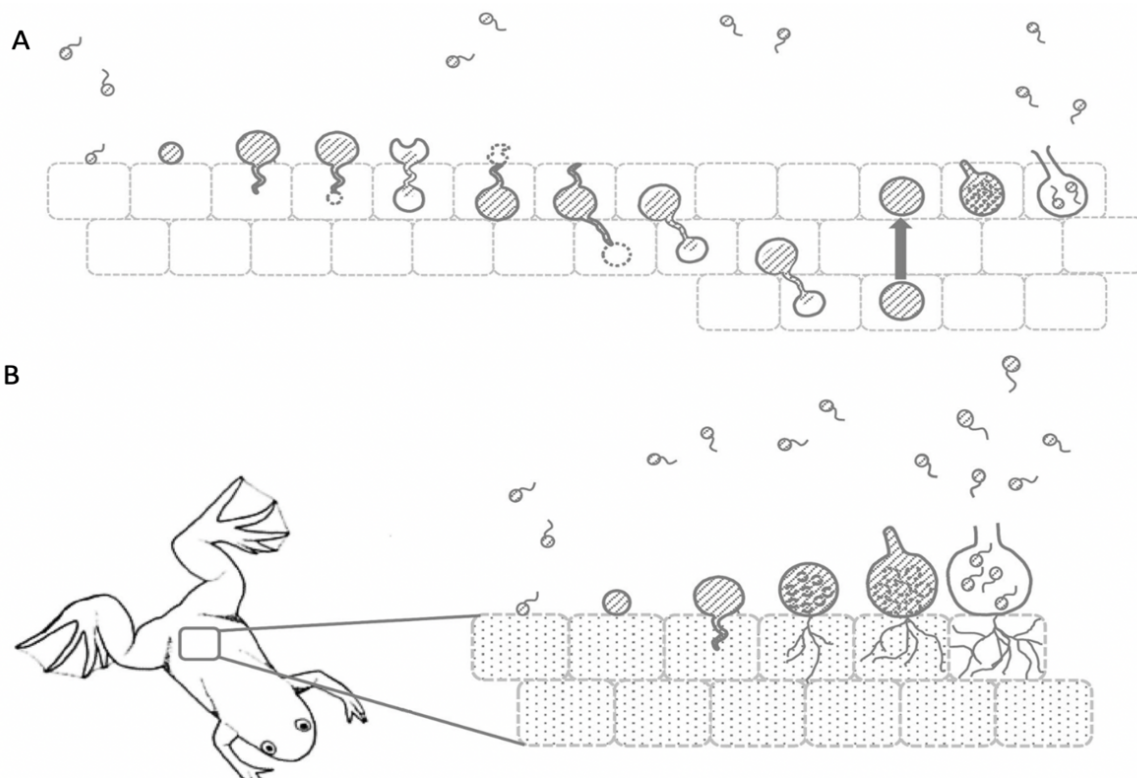
De laatste stap in kolonisatie is de invasie van de epidermis. De schimmel zal de epidermale cellen penetreren en zijn genetische materiaal overdragen m.b.v. de kiembuis. Proteasen zijn hierbij nodig om door de celmembraan van de gastheer te breken. Bij verder onderzoek bleek het om een enzym te gaan die zowel elastine, gelatine en caseïne *in vitro* kon degraderen. Dit bewijst dat Bd een efficiënt pathogeen is want de protease past niet in één klasse van proteolytische enzymen. De protease van Bd is mogelijks gelijkaardig als die van *Aspergillus*. Want de zoösporen en de sporangia reageerden met een antiserum tegen het *A. fumigatus* protease (Moss et al., 2010).

Eens de schimmel de epidermis heeft gepenetreerd is er vermeerdering volgens twee verschillende mechanismen.

Het eerste mechanisme wordt endobiose genoemd (Fig. 4A). Nieuwe intracellulaire thalli worden gevormd uit de distale kiembuis die de cel heeft gepenetreerd. Via deze weg kan de schimmel in de diepere lagen van de huid doordringen. Uit de oudere thalli komen rhizoïde-achtige structuren die verder in de diepte cellen infecteren en aanleiding geven tot nieuwe thalli. De thalli die zoösporen bevatten rijpen verder tot ze het huidoppervlak bereikt hebben. Daarna kunnen de zoösporen worden vrijgesteld via de uitscheidingsbuis.

Epibiose is een tweede mechanisme naast endobiose (Fig. 4B). In dit proces penetreren de zoösporen de epidermis niet en ontwikkelen de sporangia aan de oppervlakte. De huid dient als een nutriëntenbron voor de groeiende sporangia. Een verklaring voor dit proces zou zijn dat het de eerste stap is in de pathogenese van de schimmel. Daarna zou de kiembuis de epidermis penetreren en verder ontwikkelen volgens het mechanisme endobiose. Deze hypothese kon *in vitro* aangetoond worden bij verschillende huidexplanten van de *Alytes muletensis* (Baalearnpad), de koraalteenboomkikker en de *Xenopus laevis* (klauwkikker). Bij de klauwkikker werd zowel epibiose en endobiose waargenomen terwijl bij de andere soorten enkel endobiose te zien was. (van Rooij et al., 2012) Dit zou eventueel individuele gevoeligheid kunnen verklaren. Maar dit moet nog verder onderzocht worden.

Een andere opmerkelijke vaststelling is dat enkel gekeratiniseerde of gestratificeerde huid werd gekoloniseerd. Zo zag men dat de anura larven enkel aangetast waren ter hoogte van de monddelen. (Greenspan et al., 2012)(Van Rooij et al., 2015)



Figuur 4. A. Endobiose. De zoöspore hecht zich vast aan de epidermisoppervlakte en vormt een cyste. Deze cyste ontwikkelt een kiembuis die de celmembraan penetreert en zijn genetische materiaal overdraagt. Het distale deel van de kiembuis zwelt op en een nieuwe thalli worden intracellulair gevormd. De thalli gaan dieper en dieper in de lagen doordringen. Wanneer ze rijp zijn en zoösporen bevatten komen ze aan de oppervlakte en worden de zoösporen vrijgesteld. B. Epibiose. Hierbij zal de zoöspore zich aan de oppervlakte van de epidermis vasthechten en een kiem met een kiembuis vormen. Nu blijft het volledige proces oppervlakkig en dringt het niet dieper door in de epidermis. Tenslotte wordt een rijp sporangium gevormd met de vrijstelling van zoösporen tot gevolg. (Van Rooij et al., 2015)

1.4.2 Verstoring van de huidfunctie

De tweede factor die een rol speelt bij Bd-infectie is de verstoring van de huidfunctie die veroorzaakt wordt bij amfibieën door Bd. Om dit beter te begrijpen worden eerst de verschillende functies van de huid opgesomd. Hieronder vallen het sensorisch orgaan, het afweermechanisme, het osmoregulatiesysteem, O₂ en CO₂ uitwisseling en reproductie.

Bd leidt zowel tot fysiologische als fysische veranderingen van de huid, beide geven een ontregeling van de verschillende huidfuncties. Als voorbeeld kunnen huidlaesies worden genomen die een gevolg zijn van de schimmelinfectie. Deze ontstaan door inwerking van proteasen geproduceerd door Bd of door het afsterven van epidermiscellen. Hierdoor is de fysische eigenschap en dus ook de afweer van de huid verstoord. De fysiologische veranderingen zijn te zien op het niveau van de elektrolyten die ontregeld zijn. Er is een vermindering in transepitheliale weerstand door een fysisch defect. Hierdoor lekken er verschillende ionen. Dit heeft als resultaat dat het dier uitdroogt omwille van een slechte osmoregulatie. (Van Rooij et al., 2015)

1.4.3 Immuniteit

De gastheerimmuniteit is de derde factor die besproken zal worden. Het is een essentiële stap voor het bestrijden van de schimmel-infectie. Hierbij kunnen twee systemen onderscheiden worden namelijk de aangeboren en de verworven immuniteit. Deze omzeilen is dan ook een belangrijke eigenschap van een pathogeen. Is de schimmel hiertoe in staat dan kan een infectie leiden tot een klinisch ziek amfibie. Omdat Bd de huid infecteert wordt er in de volgende alinea's dieper ingegaan op de huidimmuniteit.

Eerst zal een algemeen overzicht worden gegeven van hoe de immuniteit werkt bij een amfibie. Deze kan in zes stappen worden opgedeeld (Fig. 5). Daarna worden enkele afweermechanismen besproken die in te delen zijn in de aangeboren of de verworven immuniteit.

Er wordt gestart bij een fysiologisch gezonde huid (Fig. 5-A). In deze toestand kunnen verschillende weefsels en cellen van elkaar worden onderscheiden. Naast de typisch huidcellen zijn 2 verschillende immunologische cellen aanwezig, de dendritische cel (Carrillo-Farga et al., 1990) en de dendritische epidermale T-cel. Deze laatste presenteert efficiënt antigenen doormiddel van MHC II moleculen tot expressie te brengen aan het celoppervlak. Er zijn ook bloedvaten aanwezig in de dermis die belangrijk zijn om immuniteitscellen naar de plaats van infectie te brengen. Tenslotte zitten in de onderste laag, de milt, naïeve T- en B-cellen. De milt bij de amfibieën is verschillend van andere dieren want deze dient zowel als primair en secundair lymfoïd orgaan.

Stap twee is infectie van de huid met de pathogene schimmel (Fig. 5-B). De zoösporen worden via chemotaxis aangetrokken tot de huid en starten het infectieproces. De eerste lijn van afweer zijn mucus, bacteriële flora, lysozymen, antilichamen en nog meer. Deze behoren allemaal tot het aangeboren immuniteitssysteem. De volgende stappen vallen onder de verworven immuniteit waar bewezen is dat het soms faalt bij Bd-infectie.

De derde stap (Fig. 5-C) is de infectie bekeken in een verder tijdsverloop. De antigeen-presenterende cellen beginnen hun functie te doen. Er is migratie van deze cellen naar de milt waar ze T- en B-cellen selecteren op hun antigeen-antistof-interactie.

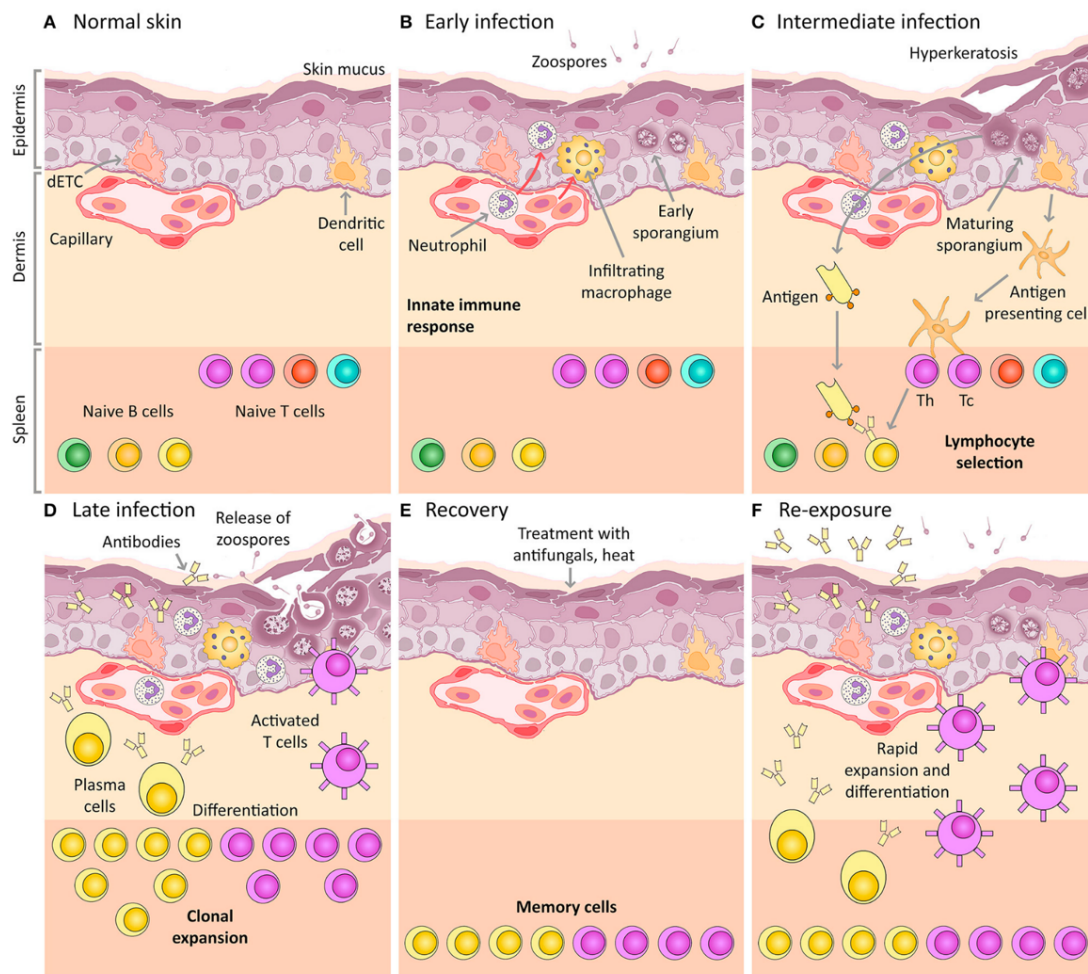
De klonale expansie van de T- en B-cellen en de bestrijding van de schimmel zijn de volgende stap (Fig. 5-D).

De vijfde stap (Fig. 5-E) hangt af van dier tot dier en ook van soort tot soort. Want niet alle dieren kunnen Bd-infectie bestrijden en/of verwijderen. Bij sommigen treedt er genezing op bij anderen leidt het tot de dood. Daarnaast is er ook nog een groep "draggers". Deze dieren zijn klinisch in orde maar

de schimmel kan nog uitscheiden worden. Bij deze stap is de behandeling essentieel om de dieren te helpen de infectie te overwinnen en te elimineren.

Herinfectie door dezelfde kiem is de laatste stap (Fig. 5-F). Er wordt vlug gereageerd op de infectie door de vermeerdering van geheugencellen. Hierdoor is er een vlugge eliminatie van de schimmel. In deze stap kan het concept immunisatie belangrijk zijn.

We moeten wel vermelden dat er nog weinig onderzoek beschikbaar is over het verworven immuunstelsel tegen Bd. Daarom gelden de stappen van 3 tot 6 eerder algemeen van hoe het systeem reageert tegen een pathogene schimmel. Dit is niet specifiek voor Bd. (Laura F Grogan et al., 2018)



Figuur 5. De huidimmuuniteit bij amfibieën. A. De normale huid met epidermis, dermis en milt. In de epidermis zitten dendritische epidermale T-cellen en dendritische cellen. De milt is zowel een secundair als een primair lymfoïd orgaan dat naïeve T- en B-cellen bevat. B. Het begin van de infectie. Zoösporen infecteren de epidermis. De eerste lijn van afweer zoals mucus, bacteriële flora, lysozymen, ... zijn hier belangrijk. Dit is het aangeboren immuunstelsel. C. Antigen-presenterende cellen nemen antigen op en selecteren de T- en B-cellen. Hier begint het verworven immuunstelsel. D. De infectie is nu al ver gevorderd. Er zijn geactiveerde T-cellen en B-cellen die antilichamen produceren. Beide bestrijden de infectie. In deze stap is er klonale expansie van T- en B-cellen. E. De infectie is verwijderd en geheugen cellen blijven achter in de milt. F. Herinfectie, maar nu is het immuunstelsel vlugger opgestart en geactiveerde T-cellen en plasmacellen vallen de schimmel aan. (Laura F Grogan et al., 2018)

Nu zal er dieper worden ingegaan op enkele specifieke onderwerpen van de immuuniteit en de rol die het speelt bij Bd-infectie. Er wordt een onderscheid gemaakt tussen aangeboren en verworven immuuniteit.

Er is een link te vinden tussen genetica en immuniteit. Namelijk MHC-allelen en -supertypen gelinkt aan Bd-overleving zijn positief geselecteerd bij de *Lithobates yavapaiensis* (lageland luipaard kikker). Dit in tegenstelling tot kikkers die vatbaar zijn voor Bd-infectie. Er is sprake van selectieve druk die onafhankelijk van de omgeving en de demografie is. Dit wordt ook directionele selectie genoemd. Er wordt richting een bepaald fenotype geselecteerd, de overleving met Bd-infectie zonder sterfte. De frequentie voor deze eigenschap zal stijgen in de populatie en tijd. (Savage and Zamudio, 2016)

Onder het aangeboren immuniteit vallen antimicrobiële peptiden (AMP), antifungale metabolieten en lysozymen. Deze worden in de volgende alinea's grondiger toegelicht.

De AMP's zijn de eerste lijn van afweer tegen Bd en worden door de granulaire klieren geproduceerd. In een studie van Ramsey et al. (2010) ging men de gevoeligheid voor Bd testen bij de klauwkikker en het effect van AMP's hierbij. Er werd eerst bewezen dat zowel rustende als gestreste kikkers deze peptiden konden aanmaken in een voldoende hoge concentratie om Bd te remmen *in vitro*. De stress werd geïnduceerd door norepinefrine injecties te geven wat uitputting van de AMP's te weeg brengt. Ten tweede werden kikkers bestraald met X-stralen wat een daling in leukocyten gaf. Dit had geen effect op de AMP-secretie zelf maar leidde wel tot een verhoogde infectiegraad.

Een studie van Rollins-Smith (2009) kon aantonen dat minder Bd-gevoelig amfibieën werkzaamere AMP's hadden tegen Bd dan meer Bd-gevoelige dieren. Daarnaast konden ze ook bewijzen dat er een correlatie was tussen de werkzaamheid van AMP's en de resistentie tegen Bd-infectie *in vitro*. Deze resultaten duiden op het belang van AMP's als eerstelijns verdediging tegen de schimmel en dat er een zeker verschil in werkzaamheid zit tussen dieren.

Een tweede aangeboren immuniteit zijn de antifungale metabolieten. Deze worden meestal geproduceerd door bacteriën die deel uitmaken van de huidflora. Zo zijn er al verschillende geïdentificeerd die in staat zijn Bd af te remmen. In een studie van Harris et al. (2006) werden 3 verschillende genera getest van de *Plethodon cinereus* (roodrugsalamander) en 7 van de *Hemidactylium scutatum* (viertenige salamander). Hieruit bleek dat sommige bacteriën, *Arhrobacter*, *Bacillus*, *Lysobacter*, *Pseudomonas* en *Streptomyces*, antischimmel eigenschappen bezaten. Deze eigenschap is niet te wijten aan een nutriëntenafname maar eerder door de productie van remmende stoffen. Want zowel de remmende als de niet-remmende bacteriën vertoonden dezelfde conflente groei. Daarnaast hadden ze ook een effect op andere schimmels dan Bd. Er kan besloten worden dat de microbiële huidflora een rol speelt in de gevoeligheid voor Bd. Meer bepaald zou de densiteit van deze flora belangrijk zijn. Brucker et al. (2008) heeft twee metabolieten kunnen identificeren die antimycotisch werken tegen Bd zie eerder (§ 1.4.1).

In een latere studie konden Harris et al. (2009) de beschermende bacteriële flora overbrengen naar salamanders om ze vervolgens bloot te stellen aan Bd. Er was een significant verschil waar te nemen tussen de groep met en zonder de beschermende flora. Namelijk de ernst van de symptomen was significant lager bij de eerste groep.

In § 1.4.1 haalden we al aan dat de microbiota verschillende kan zijn in verschillende fysiologische toestanden.

Een laatste factor behorend tot het aangeboren immuniteitssysteem zijn de lysozymen. Deze zouden ook fungicide werking hebben maar meer onderzoek naar deze eigenschap is nog nodig. (Rollins-Smith, 2009)

De verworven immuniteit is de volgende stap in de verdediging tegen infecties. Hiertoe behoren de antilichamen en de celgedieerde immuniteit. Het meest primair geproduceerde antilichaam bij zoogdieren is IgA. Analooft hieraan wordt IgY en IgX in de huidmucus van amfibieën uitgescheiden.

Ramsey et al. (2010) kon aantonen dat immuniseren leidt tot een verhoging van het antilichaam IgY in de mucus. Andere studies konden juist niet bewijzen dat vaccineren hielp tegen Bd. Zo werden in twee aparte studies eens geelpotige bergkikkers en de *Bufo boreas* (noordelijke pad) geïmmuniseerd met Bd. Er werd geen verschil gezien op het niveau van sterfte, tijd tot infectie, prevalentie of infectie-intensiteit tussen geïmmuniseerde dieren met compleet, incompleet of adjuvans met zout. (Stice and Briggs, 2010)(Rollins-Smith et al., 2009) Dit roept ook vragen op of er een verworven immuniteit is tegen Bd. In een latere studie gaf men een mogelijke verklaring voor het niet werken van de immunisatie. Zo werd er gesteld dat Bd-infectie vóór de studie niet in rekening werd gebracht. Hierdoor kan het dus zijn dat dieren al reeds geïnfecteerd zijn voordat ze geïmmuniseerd werden. Het is zeker een mogelijkheid als men weet dat dieren soms uit een gebied kwamen waar de prevalentie voor Bd 90% is. Er moet dus een onderscheid gemaakt worden tussen de dieren met en zonder blootstelling aan Bd. (Catenazzi et al., 2017) McMahon et al. (2014) sluit immuniseren niet volledig uit. Er was geen verschil te zien in de immuniteit na contact met dode of levende schimmels. In beide gevallen was de verworven resistentie even groot. Dit zou een mogelijk manier geven van bescherming door immuniseren.

Tot nu zijn er geen eenduidige studies dat er een celgemedieerde immuniteit is tegen Bd. Maar toch zijn er enkele bewijzen dat de verworven immuniteit een rol speelt bij Bd-infectie. Voorbeeld Bd kan witte bloedcellen remmen en gemetamorfoseerde kikkers zijn gevoeliger voor Bd-infectie dan de andere levensstadia. Dit tweede voorbeeld komt doordat Bd een gekeratiniseerde en een gestratificeerde huid verkiest om te infecteren. Maar ook belangrijk is dat de celgemedieerde immuniteit nog aan het uitrijpen is. (Rollins-Smith et al., 2011) De volgende alinea's versterken het bewijs voor een celgemedieerde immuniteit.

Er werd gekeken naar het effect van evolutie op Bd-resistentie. Hiervoor werden 51 wilde *Litoria verreauxii* (fluitende boomkikker) gevangen en vergeleken op 4, 8 en 14 dagen na blootstelling met Bd. De kikkers waren afkomstige uit verschillende populaties, de een al langer blootgesteld aan Bd dan de andere. Men onderzocht de huid, lever en milt via transcriptoom- en genexpressie-analyse voor aangeboren en verworven immuniteit. Hieruit bleek dat een langer blootgestelde en meer fenotypische resistente populatie een beter aangeboren en verworven immuniteit had in een vroeg subklinisch stadium. Dit was in vergelijking met meer gevoelige populaties van de kikkersoort. Deze resultaten komen overeen met een evolutionaire resistentie tegen Bd. (Laura F. Grogan et al., 2018)

Ontsnappen aan de immuniteit is een troef voor een pathogene schimmel. Aan de hand van enkele studies wordt aangetoond dat dit ook het geval is bij Bd.

De Bd-sporangia kunnen een oplosbare factor vrijstellen die de vermeerdering van T- en B-cellen verstoort. Het zorgt voor een lokale remming van de lymfocyten. Dit leidt tot een onderdrukking van de celgemedieerde immuniteit. (Scott Fites et al., 2014)(Fites et al., 2013) In een latere studie werd bewezen dat Bd witte bloedcellen *in vitro* in apoptose doet gaan door de caspase weg te activeren. (Berger et al., 2016)

Young et al. (2014) toonde immuniteitsonderdrukking door Bd aan in verschillende soorten zoals de koraalteenboomkikker met bloed- en proteïne-electroforesebiomerkers. Dit was de eerste studie die *in vivo* immuniteitsonderdrukking kon aantonen door de schimmel. Het besluit bij deze studie is dat er een onvoldoende antwoord is door de gastheer op de schimmel.

Een studie van Rollins-Smith et al. (2015) is één van de enige studies die specifieke stoffen kon identificeren die geproduceerd worden door Bd en de immuniteit kunnen onderdrukken. Het ging om twee metaboliëten, methylthioadenosine en kynurenine, die de lymfocyten konden remmen en in apoptose laten gaan zowel *in vitro* als *in vivo*.

De rol van chemicaliën werd ook onderzocht. Maar er werd geen link gevonden met de onderdrukking van de immuniteit. (Rollins-Smith et al., 2011)

1.4.4 Gevoeligheid voor Bd-infectie

De laatste factor die een invloed heeft op Bd-infectie is de gevoeligheid voor en de resistentie tegen Bd. Er is veel variatie op populatie en individueel niveau met betrekking tot de infectiegevoeligheid. Dit kan worden geïllustreerd a.d.h.v. de studie van Spitzen-Van Der Sluijs et al. (2017). Bd is aanwezig in de populatie van *Bombina variegata* (geelbuikvuurpad) maar heeft nog niet gezorgd voor een afname van de dieren. De schimmel heeft wel een effect op het individueel niveau, namelijk een afname van de overlevingskans. Maar op populatieniveau is er geen verschil te zien met andere gezonde populaties.

In wat volgt worden enkele mogelijke factoren gegeven die een bijdrage zouden kunnen hebben tot een effectieve infectie met Bd bij de amfibie. Verder wordt er een onderscheid gemaakt tussen een epidemie en een endemie, een stabiele toestand.

Een studie van Kinney et al. (2011) onderzocht wat het effect was op de Peruviaanse amfibieën 10 jaar nadat Bd voor het eerst werd gediagnosticeerd. De schimmel had gezorgd voor een serieuze daling in de amfibieënpopulatie. Van de 8 overlevende soorten waren er drie die gevoelig bleven en één niet, respectievelijk nam hun aantal af en toe. Er werd ook opgemerkt wanneer de infectiedruk hoog was dat de overleving daalde wat overeenkomt met de >100 000 zoösporen regel van Vredenburg. (Kinney et al., 2011) Een andere opmerking die kon worden gemaakt is dat een lage infectie-intensiteit werd gevonden bij een stabiele gastheer-Bd-interactie. (Briggs et al., 2010) Terwijl een hoge intensiteit overeenkwam met een hoge mortaliteit. Men kon ook vaststellen dat de fylogenetische verwantschap tussen de soorten geen goede voorspeller was voor Bd-gevoeligheid. Het algemeen besluit is dat Bd na een epidemie nog steeds een grote impact kan hebben op een populatie zelfs bij een lagere concentratie dan de pre-epidemische toestand. Maar dit is niet de regel. (Catenazzi et al., 2017)

Een andere studie in Australië toonde aan dat er soorten waren die daalden in aantal, stabiel bleven en zelf toenamen na een Bd-infectie te hebben doorgemaakt. Men haalde in deze studie het belang aan van reservoirs die een belangrijke rol spelen in het onderhouden van Bd. Daarnaast is de omgeving ook een cruciale speler. Het kan ervoor zorgen dat de schimmel ingeperkt wordt of juist gemakkelijker vermeerderd. (Scheele et al., 2017)

Zoals eerder aangehaald (§ 1.4.3) speelt de genetica ook een rol. Men zag dat er directionele selectie was op de gevoeligheid voor Bd met betrekking tot MHC II. (Savage and Zamudio, 2016)

Om verder in te gaan op het onderwerp van immuniteit, is stress een mogelijk factor die in rekening moet worden gebracht. Want cortisone die wordt vrijgesteld tijdens een stresssituatie kan de immuniteit onderdrukken. Gabor et al. (2013) besloot dat verschillende Bd-lijnen verschillende niveaus van stress induceerden. Een hoger virulente stam gaf een hoger niveau van cortisol tegenover een minder virulente stam. Later ging men het effect na van cortisone op de gevoeligheid voor Bd. Men kon geen effect vinden op Bd-infectie in de geteste soorten en levensstadia. Er moet dus voorzichtig worden omgegaan met het linken van cortisone alleen met Bd-gevoeligheid. Het is veel complexer dan één hormoon die een rol zou spelen in de immuniteit en infectie. (Searle et al., 2014) Kort samengevat zijn er verschillende genotypen met elk hun eigen virulentie. Zo zijn er verschillende endemische vormen die een stabiele interactie hebben met hun gastheer.

De groei van Bd is sterk afhankelijk van de temperatuur. Zo ligt het ideale bereik tussen de 17°C en de 25°C. Maar dit alleen als voorspellende factor gebruiken is niet voldoende. Er zijn meerdere spelers die een rol spelen bij Bd-infectie in het wild. Vandaar dat men de klimaat gelinkte hypothese gebruikt. Er werd een model gemaakt om de groei van Bd te simuleren. Hierbij werden onder andere temperatuur, regen, straling, relatieve vochtigheid, transpiratie, verdamping, dampdruk, lichaamsgewicht, locatie, geslacht, jaar en seizoen gebruikt. Vervolgens werd dit model getest op een populatie *Litoria pearsoniana* (Pearsons groene boomkikker) waar verschillende stalen werden genomen op verschillende plaatsen en jaren. Daarna werd een simulatie gedaan met het model en zag men een sterke correlatie tussen de prevalentie en de infectie intensiteit van Bd. Men kon besluiten dat het een zeer handig model is om zowel voorspellingen te doen als om in het verleden te kijken naar patronen van amfibieënpopulaties. Dit model geldt voornamelijk voor endemische Chytridiomycose. (Murray et al., 2013)

Het seizoen speelt een belangrijke rol. Zo heeft Ruggeri et al. (2018) kunnen concluderen dat de Bd-prevalentie hoger is in het regenseizoen. Dit wordt gecorreleerd met de hogere aanwezigheid van water. Het brengt met zich mee dat de schimmel vlugger kan spreiden. Maar dat de infectiegraad lager ligt dan tijdens de winter.

Naast al deze factoren zou ook het gedrag van de dieren een invloed kunnen hebben op de gevoeligheid. Namelijk kikkers leerden Bd te ontwijken na eenmalig contact ermee te hebben en een temperatuur geïnduceerde behandeling te ondergaan. Opmerkelijk is wanneer men dit gedrag tegenhield ontwikkelden de kikkers een verworven immuniteit tegen de immuniteitsverlagende eigenschappen van Bd. (McMahon et al., 2014)

Zoals eerder vermeld zijn er verschillende virulente stammen van Bd aanwezig op de wereld. Ze worden onderverdeeld volgens hun genotype. Er werden tot nu 6 verschillende Bd-lijnen ontdekt waarvan één hypervirulente stam, de Bd-GPL. Deze stam zorgt voor een sterke daling in de amfibieënpopulatie eens geïntroduceerd in een nieuw gebied. Het was ook de grootste bijdrage voor de Bd-epidemie in Europa, Noord-Amerika en Australië. (Farrer et al., 2011) Een belangrijke opmerking is dat er recombinatie mogelijk is tussen de verschillende lijnen. Wat het geval was bij de pandemische en de endemische Bd-lijnen. Dit is alarmerend want zo kan handel opnieuw leiden tot de vorming van nieuwe hybridisaties en een grote bedreiging vormen voor de amfibieën. (Schloegel et al., 2012)

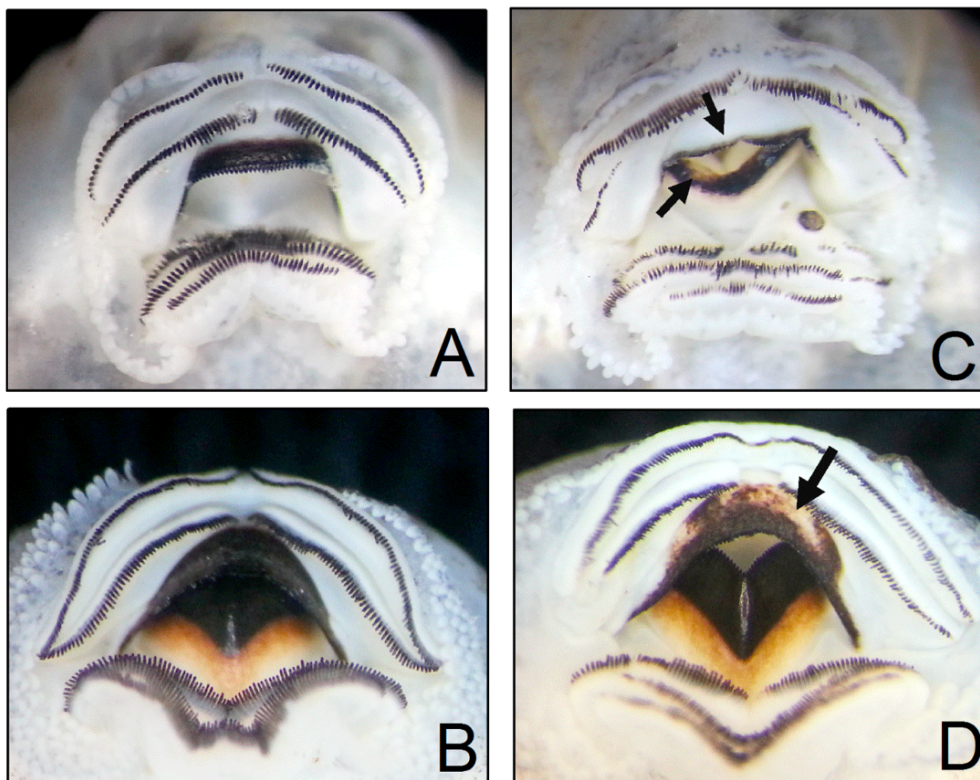
Er zijn verschillende factoren en mechanismen die een rol spelen in de gevoeligheid voor en de resistentie tegen Bd. Kort samengevat hebben het klimaat, de immuniteit, het dierlijk gedrag en de Bd-infectiedruk een effect hierop. Door de omgeving en de pathogeen kan er stabilisatie zijn tussen gastheer en Bd. Maar een wijziging in een van bovenstaande factoren zoals de verhoging in temperatuur in het ecosysteem zorgt voor een toename in Bd-infectie. De stabiele toestand wordt dan verstoord en leidt tot afname van de populatie. Dit bewijst hoe fragiel zo een toestand zou kunnen zijn. (Spitzen-Van Der Sluijs et al., 2017)

1.5 Klinische presentatie

De klinische presentatie van Bd kan vrij divers zijn. Zoals hierboven beschreven zijn er dragers en klinisch zieke dieren. Daarnaast wordt ook het onderscheid gemaakt tussen de verschillende soorten amfibieën en de ontwikkelingsstadiums op het gebied van gevoeligheid. De ernst van de letsels zal zich dan ook vertalen in deze verschillende gevoeligheden voor Bd.

De schimmel parasiteert de huid van de amfibie waardoor er hyperkeratose optreedt van de buitenste lagen van de epidermis. Want de cellen willen de schimmel verwijderen en hebben hierdoor een verhoogde turnover. Er is hyperplasie van het stratum spinosum en soms erosie van het stratum corneum. (Berger et al., 2005a)

Bij Anura hebben de kikkervisjes vaak orale misvormingen primair of secundair door Bd. De meest voorkomende presentatie is dekeratinisatie van de monddelen, meer bepaald de kaakbladen (Fig. 6). Maar niet alle Bd-positieve dieren hebben orale deformiteiten. In een studie werden verschillende kikkervisjes onderzocht en waren er maar 87,7% die zowel positief waren voor Bd en orale misvormingen hadden. (Navarro-Lozano et al., 2018)



Figuur 6. Orale misvormingen in Boana albopunctata en Scinax hayii kikkervisjes. A. en B. zijn normale larvale stadia. C. In deze figuur is dekeratinisatie te zien van de kaakbladen, aangeduid met zwarte pijl. Ook de tanden zijn gedepigmenteerd. D. Enkel een depigmentatie van het bovenste kaakblad is te zien. A en C zijn B. albopunctata en B en D zijn S. hayii. (Navarro-Lozano et al., 2018)

Het is belangrijk om te vermelden dat bij de larvale stadia de dekeratinisatie niet gepaard gaat met mortaliteit. De schimmel had wel een effect op hun foerageergedrag. Er kon minder voeding worden opgenomen wat leidt tot een sublethaal effect maar niet per se tot sterfte. (Hanlon et al., 2015)

Bij de volgende stadiums zijn de symptomen meer uiteenlopend. Deze kunnen variëren van asymptomatische dragers tot erge klinische symptomen met zelfs dood tot gevolg. De meest voorkomende presentaties zijn overvloedig vervellen, erythema en huidverkleuring. Minder voorkomend is lethargie, anorexie, abnormale houding en neurologische verschijnselen. (Van Rooij et al., 2015) Er kunnen ook ergere letsels aanwezig zijn zoals bij de koraalteenboomkikker waar ulceraties van de rug te zien waren. (Berger et al., 2005b)

Bij de kikkers en de padden zijn de predilectieplaatsen de ventrale buik, de voeten en de tenen. Terwijl bij de salamanders de voor- en achterbenen, de heup regio en het ventrale deel van de staart meest aangetast zijn. (Van Rooij et al., 2015)

In een studie van Salla et al. (2018) vonden ze een link tussen Bd-infectie en de hartfunctie. Bd verstoort de elektrolytenbalans en produceert toxines die zorgen voor de verstoring van de hartfunctie. Deze twee effecten waren het grootst voor de *Physalaemus albonotatus*. Terwijl de klauwkikker een hoger aanpassingsvermogen heeft voor de schimmel waardoor de hartfunctie niet of minder verstoord was. Dit kan verklaard worden doordat de levenscyclus van de klauwkikker volledig in het water afspeelt en zo andere immunologische aanpassingen heeft dan landdieren. Maar ook de proefopzet is verschillende. De klauwkikker werd ondergedompeld met de zoösporen en kreeg een lagere concentraties dan *P. albonotatus* die in ondiep water werd gehouden. (Salla et al., 2018)

2 *Batrachochytrium salamandrivorans*

2.1 Etiologie

In 2013 werd voor het eerst een nieuwe schimmel, *Batrachochytrium salamandrivorans*, uit de huid van *Salamandra salamandra* (vuursalamander) uit het Bunderbos (Nederland) geïsoleerd. Daarna werden in verschillende gebieden in Europa salamanders gevonden die positief waren voor Bs (§ 2.2). Bs behoort, net als Bd, tot het Geslacht *Batrachochytrium* (Fig. 1). De schimmel is een nieuw beschreven lijn dat een clade vormt met Bd. Het zou ongeveer 67,7 miljoen jaar geleden gedivergeerd zijn van Bd. De genetische afstand tussen beide schimmels is 3.47–4.47% voor het basepaar 1,513 18S + 28S rRNA. Omdat deze gebieden sterk geconserveerd zijn in de chytriden worden ze gebruikt om de verwantschap na te gaan. (Martel et al., 2013)

Bs zou de tweede pathogene chytride zijn die de huid van amfibieën kan koloniseren en het dier doden. Veel van de etiologie is gelijkaardig aan die van Bd waaronder de mycoloop (Fig. 2).

2.2 Epidemiologie

Het gastheerbereik van Bs is eerder beperkt tot salamanders (urodela) in vergelijking met Bd die meerdere soorten amfibieën aantast. Vooral de niet-Aziatische soorten, de Westerse Paeleartische salamanders, zijn het gevoeligst. (Martel et al., 2013) Een recentere studie toonde aan dat ook *Alytes obstetricans* (vroedmeesterpad), een anura, konden worden geïnfecteerd zonder dat ze symptomen vertoonden. (Stegen et al., 2017)

In de volgende alinea's wordt een chronologisch overzicht gegeven van studies die Bs-aanwezigheid hebben onderzocht in verschillende landen.

Een eerste studie toonde aan bij meer dan 5000 amfibieën over vier verschillende continenten dat Bs beperkt was tot Oost-Azië en Europa. Azië is een endemisch gebied met *Cynops pyrrhogaster* (vuurbuiksalamander), *Cynops cyanurus* (vuurbuikwatersalamander) en *Paramesotriton deloustali* (Tam dao salamander) als potentiële dragers voor Bs. Vanuit dit endemische gebied zou de schimmel geïntroduceerd zijn in Europa door handel van de mens. (Martel et al., 2014)

In Europa is de schimmel vooral verspreid over Nederland, België en Duitsland. Bs werd voor het eerst geïsoleerd in Nederland uit wilde vuursalamanders en later in verschillende Europese landen zowel in het wild als in de private collecties.

In latere studies zag men dat het gastheerbereik en het geografische bereik van de schimmel kon worden uitgebreid. Sabino-Pinto et al. (2015) kon aantonen dat Bs alle vier de soorten van *Salamandra* kon infecteren, namelijk de vuursalamander, *S. algira* (Noord-Afrikaanse vuursalamander), *S. corsica* (Corsicaanse vuursalamander) en *S. infraimmaculata* (ondersoort vuursalamander). Daarnaast waren *Ichthyosaura alpestris* (de alpenwatersalamander) en *Lissotriton vulgaris* (de kleine watersalamander) ook positief voor Bs in de studie van Spitzen-van der Sluijs et al. (2016). Nog wat

later kon Fitzpatrick et al. (2018) besluiten dat Bs verspreid is in de private collecties, vooral in West-Europa. In deze studie werd gebruik gemaakt van contact-tracing op private verzamelingen waarbij een positieve verzameling in het Verenigd Koninkrijk werd gebruikt.

De mogelijke oorsprong van Bs zou Oost-Azië zijn. Dit kan verklaard worden door ten eerste dat Bs vaker voorkomt dan Bd in deze endemische gebieden. Ten tweede dat de positieve dieren in deze gebieden geen symptomen hadden. Deze salamanders kunnen dienen als drager voor de schimmel. Dit alles wijst op Bs als een endemisch pathogeen in Oost-Azië. (Laking et al., 2017)(Yap et al., 2017)

In Europa komt Bs al voor in verschillende regio's en soorten salamanders. Een overzicht van alle soorten die gevoelig zijn voor de schimmel zijn weergegeven in de Bijlage I. (Yap et al., 2017)

Het is geweten dat Amerika een grote diversiteit aan salamanders heeft daarom heeft Klocke et al. (2017) gekeken naar de aanwezigheid van Bs en Bd in diverse amfibieën. Doormiddel van een instructievideo en materiaal om stalen te nemen aan te bieden aan de mensen werden meer dan 600 stalen geanalyseerd via Q-PCR. Zowel inheemse als uitheemse soorten waren aanwezig in de onderzochte stalen. De focus lag vooral op de geïmporteerde soorten, daarom dat ze 73% van deze stalen representeerden. Het resultaat was dat er 1,3% positief waren voor Bd en geen voor Bs (95% CI 0.0000–0.0071). Er kon besloten worden dat Bs nog niet aanwezig is in de Amerikaanse salamanderpopulatie of met een zeer lage prevalentie. Het is dus belangrijk om voorzorgsmaatregelen te nemen om te voorkomen dat Bs wordt geïntroduceerd in de populatie. Enkele voorbeelden hiervoor zijn importbeperkingen op soorten die gevoelig zijn voor Bs of in het algemeen salamanderimport verminderen. Deze controles zouden moeten gebeuren op de lucht- of zeehavens. Een nadeel is dat screenen tijd, geld en ervaring vraagt, zeker om een Q-PCR uit te voeren. (Klocke et al., 2017)

De vorige studie benadrukt nogmaals het feit dat naïeve populaties beschermt moeten worden. Nu komt Bs vooral voor in Europa en Azië. We moeten dus verhinderen dat andere populaties ook ten prooi vallen voor Bs. Want de vuursalamander in Europa is een voorbeeld van een inheemse soort die extreme gevolgen ondervindt van de pathogene schimmel. Het is noodzakelijk om aan screening en preventie te doen. Iets wat globalisatie uitdagend maakt. (Berger et al., 2016)

2.3 Levenscyclus

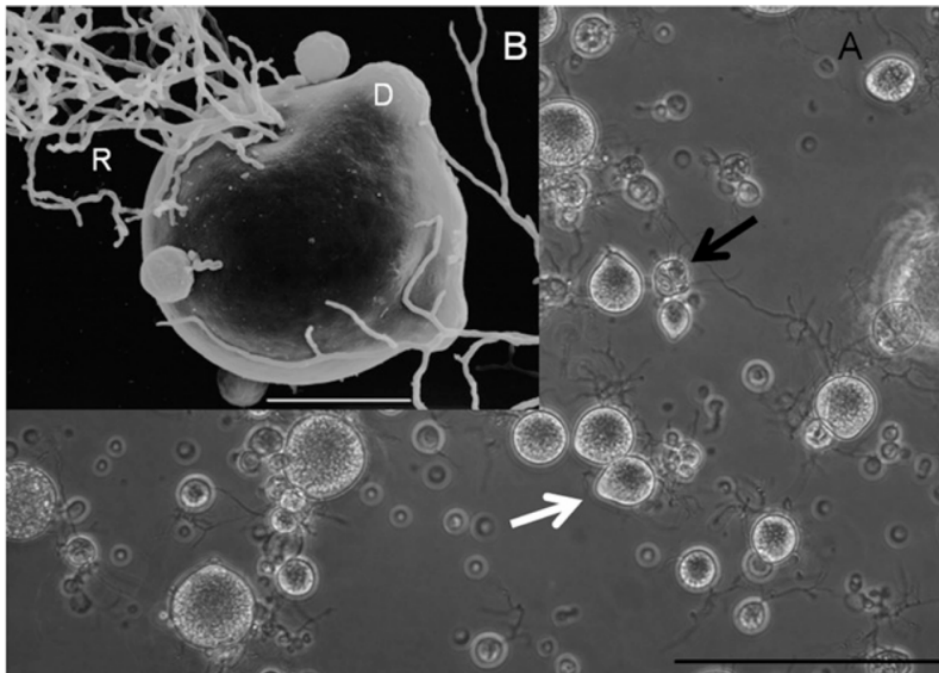
De levenscyclus van Bs is vrij gelijkaardig aan die van Bd. Zo zijn er twee verschillende levensstadiums, een infectieuze zoöspore in het water en een thallus die zoösporangia produceert. Het verloop van de cyclus *in vitro* en *in vivo* is grotendeels hetzelfde als bij Bd en daarom wordt er verwezen naar Bd (§ 1.3) (Fig.2). Er zijn wel enkele duidelijke verschillen met Bd die in de volgende alinea's zullen worden aangehaald.

Ten eerste heeft Bs een andere optimale groeitemperatuur. Deze ligt tussen 10°C en 15°C wat lager is dan bij Bd. Toch werden er in een studie van Laking et al. (2017) salamanders gevonden die Bs-positief bleken te zijn bij een temperatuur van 26°C. Dit zou kunnen duiden dat Bs toch een groter bereik heeft dan eerst beschreven. Of dat de schimmel meer resistent is aan temperaturen buiten zijn comfortzone. (Yap et al., 2017)

Ten tweede heeft de levenscyclus een kleine zijsporangie die *in vitro* wordt geobserveerd (Fig. 3-B). Namelijk uit de cyste kan een kiembuis ontwikkelen die aanleiding geeft tot een nieuwe thallus. Terwijl bij Bd de vorming van een kiembuis nooit wordt opgemerkt *in vitro*, enkel *in vivo*. (Yap et al., 2017)

Ten derde bestaat er bij Bs nog een andere type spore, een niet-bewegelijke en zeer resistente spore in de omgeving. Deze kan zich zowel vasthechten aan amfibieën en niet-amfibieën. Het is een belangrijk stadium voor de spreiding en overleving van de schimmel. (Stegen et al., 2017)

Een laatste verschil is dat de thalli meer koloniaal ontwikkelen in vergelijking met Bd (Fig. 7). Maar in het algemeen is monocentrische ontwikkeling de meest voorkomende vorm bij Bs. (Martel et al., 2013)



Figuur 7. In vitro Batrachochytrium salamandrivorans. A. Er is voornamelijk een monocentrische ontwikkeling te zien van de thalli met soms koloniale ontwikkeling, zie zwarte pijl. Daarnaast is ook een uitscheidingsbuis te zien, witte pijl. B. Is een scanning elektron microscopie beeld van een matuur sporangium met rhizoïden (R) en een uitscheidingsbuis (D). (Martel et al., 2013)

2.4 Pathogenese

Er is minder gekend omtrent de factoren die een rol spelen in de pathogenese bij Bs dan bij Bd. In wat volgt zullen enkele studies worden besproken over de pathogenese van Bs.

2.4.1 Kolonisatie van de huid

De kolonisatie van de huid door Bs wordt verondersteld min of meer hetzelfde te zijn als bij Bd. De schimmel start met chemotaxis tot de huid. Hierbij is de slijmbarrière de eerste interactie tussen schimmel en amfibie. Vervolgens hechten de schimmelsporen zich vast aan de epidermis. Daarna treedt er invasie op en vermeerderd de schimmel.

Het mucosoom is een belangrijk onderdeel van de slijmbarrière om de schimmelinfectie tegen te houden. Het bestaat uit mucusproteïnen, granulaire kliersecreties en bacteriële flora. In een studie hebben ze het mucosoom van vier verschillende soorten amfibieën, de vuursalamander, de alpenwatersalamander, de vuurbuksalamander en de vinpootsalamander, getest op het vermogen om Bs-zoösporen af te doden. Bij alle vier de soorten was het resultaat positief. Bij de alpenwatersalamander en de vinpootsalamander was het vermogen van het mucosoom het grootst in het bestrijden van de schimmel. Dit resultaat kan deels verklaren waarom de ene soort gevoeliger is voor Bs dan de andere. (Smith et al., 2018)

De expansie van het CBM18 gen wordt gelinkt met de pathogeniciteit van de schimmel omdat het helpt met de adhesie aan een gastheer en/of het blokkeren van chitinase. Bij Bd was een uitbreiding

van deze regio reeds bevestigd (§ 1.3). Voor Bs werden er 15 genen met 30 domeinen van CBM18 teruggevonden. In vergelijking met Bd zijn de genen korter en bevatten ze minder CBM18 domeinen. De CBM18 genen in de verschillend chytriden waren geen 1:1 orthologen van elkaar. (Farrer et al., 2017)

2.4.2 Verstoring van de huidfunctie

De huidfunctie wordt verstoord volgens hetzelfde principe als bij Bd. Er is zowel fysische als fysiologische schade aan de huid. De schimmel beschadigt de epidermis en de beschermende barrière wordt verbroken. Hierdoor worden de volgende functies verstoord, het sensorisch orgaan, het osmoregatiesysteem, het defensiemechanisme, de O₂ en CO₂ uitwisseling en de reproductie. (Van Rooij et al., 2015)

2.4.3 Immuniteit

Op het gebied van immuniteit en Bs is er nog niet zoveel onderzoek naar gedaan. Een van de weinige studies kon aantonen dat Bs minder genen tot expressie bracht in vergelijking met Bd. Wanneer *Tylotriton wenxianensis* (Wenxiaanse knobbelige salamander) werd besmet met Bd zag men een verhoging van de immuniteitsgenen. Wat niet het geval was bij Bs. Dit zou erop kunnen wijzen dat Bs immuniteit verlagende eigenschappen zou hebben of dat het immuniteit niet in staat is te reageren op de schimmel. (Farrer et al., 2017)

2.4.4 Gevoeligheid voor Bs-infectie

Bs is afkomstig van een endemische regio (Oost-Azië) en werd geïntroduceerd in een naïeve populatie met desastreuze gevolgen. Het eerste zicht lijkt de schimmel een efficiënte pathogeen. Het heeft een hoge virulentie, een stadium dat resistent is in de omgeving en de gastheer heeft geen of zeer weinig immuniteit ertegen. In de volgende alinea's zullen enkele aspecten worden aangehaald waarom het een perfecte pathogeen is of juist niet om uiteindelijk tot een algemeen besluit te komen.

Bs werd voor het eerst waargenomen in 2013 bij vuursalamander in het Bunderbos (Nederland). In 2014 werd de schimmel ook gevonden in Robertville (België). Deze populatie werd bestudeerd over een periode van 2 jaar door Stegen et al. (2017). Ten eerste kwamen ze tot het besluit dat over een 10 dagen interval de waarschijnlijkheid voor infectie 33% en de overlevingskans slechts 13% was. Bijkomend, na 2 jaar was slecht 1% van de populatie ontsnapt aan Bs. Ten tweede zagen ze dat de infectie dosis- en temperatuurafhankelijk was. Dit beaamt het eerder besproken temperatuurbereik waarin de schimmel kan infecteren/groeien. (Stegen et al., 2017)

Uit deze studie kunnen we zien dat Bs even virulent en dodelijk blijft als bij het begin van de introductie in de regio. Normaal in de loop van de tijd worden pathogenen minder agressief omdat hun doel vermeerderen is. Als ze de gastheer doden dan sterft de pathogeen ook. Voorbeeld bij Bd zijn er lijnen die minder pathogeen zijn dan jaren geleden. Er is een globale lijn aanwezig die een stabiele toestand heeft met de amfibieën. Misschien is het nog te vroeg om dit waar te nemen bij Bs.

Bs heeft zoals eerder vermeld twee vormen van sporen (§ 2.3). Een gelijkaardige spore als bij Bd en een spore die resistent is in de omgeving. Deze tweede heeft als voordeel dat de schimmel langer kan overleven in de omgeving. Maar heeft als nadeel dat ze passief migreert en dus gebruik moet maken

van vectoren om te spreiden. In de volgende twee alinea's worden voorbeelden gegeven van vectoren. (Stegen et al., 2017)

Het gastheerbereik van Bs is beperkt tot salamanders waar enkele soorten zeer gevoelig zijn zoals de vuursalamander en de alpenwatersalamander die eerder een dosis gerelateerd infectie hebben. Terwijl de anura zoals de vroedmeesterpad asymptomatisch geïnfecteerd kunnen zijn. De alpenwatersalamander en de vroedmeesterpad kunnen dienen als dragers van de schimmel. Ze zorgen dat Bs kan vermeerderen en uitgescheiden wordt in de omgeving zonder dat de gastheer grote schade ervan ondervindt. Een andere manier van spreiden is dat sporen kunnen vasthechten aan de poten van watervogels zoals bij Bd. (Hanlon et al., 2017) (Stegen et al., 2017)

In de studie van Sabino-Pinto et al. (2018) werden 20 collecties uit Zweden en Duitsland bemonsterd voor Bs. Het ging om gevoelige soorten zoals de vuursalamander en *Pleurodeles waltl* (ribbensalamander) en *P. nebulosus* (Algeriaanse ribbenwatersalamander). De schimmel werd gedetecteerd in 10 collecties waarvan er 9 asymptomatisch waren. Deze collecties kunnen gezien worden als dragers voor de schimmel. Dit resultaat moet wel met enige voorzichtigheid benaderd worden omdat enkel gevoelige soorten werden onderzocht. (Sabino-Pinto et al., 2018)

Er werd een model gemaakt voor Bs om de gastheer dynamiek te berekenen. Het is een mathematisch model dat gevoeligheid, latentie en infectie in rekening brengt. Uit dit model kon besloten worden dat een uitbraak mogelijk is in zeer lage densiteit en dat alle populaties een groot risico lopen op infectie. Dit besluit benadrukt het belang van preventie. Het basismodel werd later uitgebreid tot een ruimtelijk model en hieruit kwam dat de spreiding van Bs 11 km per jaar was. Dit model staft de theorie dat Bs een efficiënte pathogeen is. (Schmidt et al., 2017)

In een recente studie werd gekeken naar twee genetisch verwante subpopulaties van vuursalamander, de Broek en het Bunderbos. Enkel in het Bunderbos werden ooit Bs-positieve salamanders gevonden. In 2016 werden stalen genomen op verschillende plaatsen in deze twee gebieden en deze waren negatief voor Bs. Hiervoor kunnen verschillende verklaringen zijn. Ten eerste kan de sterke virulentie de zieke dieren hinderen van verder te migreren dan een gezond dier. Ten tweede kunnen de minder gevoelige soorten, zoals de alpenwatersalamander, die samenleeft met de vuursalamander een negatief effect hebben op Bs-spreiding. Deze resultaten zijn een bewijs dat Bs geen goede pathogeen is. (Spitzen-Van Der Sluijs et al., 2018)

Uit de voorgaande alinea's zijn er zowel voorbeelden die aantonen dat Bs een goede en een slechte pathogeen kan zijn. Een belangrijke speler is telkens de nood aan vectoren. Ze zorgen voor vermeerdering en spreiding van de schimmel. Deze kunnen biotische en abiotisch zijn. Voorbeeld van een biotische zijn de poten van watervogels en van een abiotische is een stroom die positieve dieren verbindt met negatieve. Maar deze abiotische weg is niet altijd succesvol. Want in de studie van Spitzen-Van Der Sluijs et al. (2018) was de naïeve populatie van de Broek verbonden met het Bunderbos via een stroom. Maar er werden nooit positieve dieren gevonden in de Broeck. Op het gebied van spreiding kan er besloten worden dat Bs geen goed pathogeen is. Zeker niet zoals Schmidt et al. (2017) met zijn model voorspeld.

2.5 Klinische presentatie

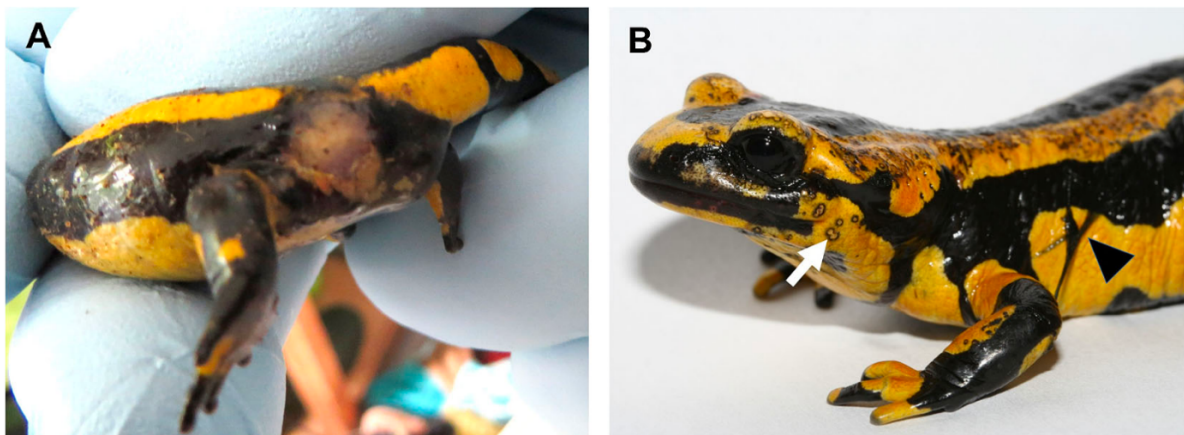
Zoals bij Bd infecteert Bs de gekeratiniseerde epidermis en dringt door in de diepere lagen. Dit resulteert in oppervlakkige erosies, diepe ulceraties, overvloedig vervellen en verdikking van de huid. De laesies zijn geassocieerd met intracellulaire koloniale thalli die necrose veroorzaken bij de naburige keratinocyten. De letsels kunnen over het volledige lichaam voorkomen in vergelijking met Bd die een

voorkeur heeft voor bepaalde lichaamsdelen. Opmerkelijk is dat de typische hyperplasie en hyperkeratose van *Bd* niet aanwezig is bij *Bs*. (Van Rooij et al., 2015)(Yap et al., 2017)

De presentatie bij de gemetamorfoseerde urodela bestaat uit multifocale oppervlakkige erosies en erge epidermale ulceraties (Fig. 8). Andere symptomen zijn overvloedig vervellen, lethargie, anorexie, ataxie en abnormale houding.

De urodela larven en anura hebben meestal een asymptomatisch verloop van de schimmel. Dit werd gezien bij de vroedmeesterpad. (Van Rooij et al., 2015)

De meest gevoelige soort is de vuursalamander en die vertoont de ernstigste symptomen. tegenstrijdig hiermee vond Sabino-Pinto et al. (2018) asymptotische amfibieën van deze soort in gevangenschap. (Yap et al., 2017)



Figuur 8. Klinische presentatie van *Bs*-infectie bij de vuursalamander. A. Huidletsel ter hoogte van de staartbasis. B. Meerdere huidulceraties (witte pijl) en de aanwezigheid van stukken huidverveling (zwarte pijl). (Sabino-Pinto et al., 2015)

3 Diagnosetechniek

De twee meest gebruikte technieken om de diagnose te stellen van *Bd* en *Bs* bij amfibieën zijn “real-time polymerase chain reaction” (Q-PCR) en histologie. In de volgende alinea’s zal eerst Q-PCR aan bod komen en vervolgens histologie.

3.1 Q-PCR bij *B. dendrobatidis* en *B. salamandrivorans*

Q-PCR is een techniek waarbij de genomische informatie van stalen vermeerderd en meteen gekwantificeerd wordt. De kwantificatiestap kan met verschillende merkers worden gedaan. De fluorescente merkers zijn de meest voorkomende.

Q-PCR kan onderverdeeld worden naar gelang het aantal primers die gebruikt worden. Het aantal primers komt overeen met hoeveel DNA-fragmenten onderzocht worden. Voorbeeld bij Chytridiomycose worden stalen voor *Bd* en *Bs* geanalyseerd dus zijn er twee verschillende primers nodig. In dit geval wordt een duplex PCR gebruikt om beide schimmels te gelijk op te sporen. Wordt slechts één schimmel gecontroleerd dan wordt een simplex PCR uitgevoerd met een primer. Worden er meer dan drie DNA-fragmenten onderzocht dan wordt een multiplex PCR gebruikt. Dit is nuttig bij amfibieën als men naast Chytridiomycose ook ranavirose wil opsporen.

De volgende vraag is, hoe efficiënt en specifiek is deze test als er meerdere DNA-fragmenten worden opgespoord? Uit de studie van Standish et al. (2018) bleek de multiplex Q-PCR heel betrouwbaar te

zijn om voor Bs, Bd en ranavirose te screenen. Maar hier wordt gefocust op de duplex Q-PCR om beide chytriden op te sporen.

In een studie van Thomas et al. (2018) werd er gekeken naar de eigenschappen van de duplex Q-PCR. Ten eerste behaalden ze een specificiteit van 100% en een sensitiviteit tussen 100% en 96,2%. De reproduceerbaarheid van deze techniek is dus zeer goed. Ten tweede ligt de latentietijd om Bs te detecteren tussen de 2 tot 3 weken. Zelfs 28 dagen post-mortem kon Bs worden aangetoond als de stalen bij -20°C waren bewaard. Ten derde is er in de meeste gevallen geen interferentie in het detecteren van Bd en Bs. Enkel als de concentratie van een van de twee schimmels 10 tot 10 000 keer hoger was dan de andere dan kon de schimmel met de laagste concentratie niet aangetoond worden. Om deze reden wordt er aangeraden om een simplex Q-PCR uit te voeren om fout-negatieve resultaten uit te sluiten. Voor de specifieke uitleg over de materialen en methode van de duplex Q-PCR wordt er verwezen naar Blooi et al. (2013). Op dit protocol zullen we ons baseren om de diagnose te stellen voor Bs en Bd in het protocol (§ 5).

Een belangrijke parameter die vermeld moet worden bij Q-PCR is de genomische eenheid (GE). GE vergemakkelijkt de interpretatie van Q-PCR. GE komt overeen met het aantal ITS1-fragmenten (internal transcribed spacer) in het genoom van de schimmel. Dit wil zeggen dat 1 GE niet hetzelfde is als één spore aangezien een spore meerdere ITS1-fragmenten kan bezitten. 1 GE komt wel overeen met 1 ITS1-fragment.

Waarom wordt nu dit ITS1-fragment gebruikt? In het genoom van de schimmels zitten sterk geconserveerde regio's zoals de 5.8, 18 en 28s genen. Deze genen worden gescheiden door ITS-fragmenten. Omdat deze fragmenten vlug evolueren en dus specifiek zijn voor Bs en Bd worden ze gebruikt als schimmel specifieke primers. Zo bestaat de primer voor Bs en Bd uit het ITS1-fragment die het 5,8s gen flankiert en een deel van het gen zelf. (Boyle et al., 2004)(Martel et al., 2013)

De waarde van de GE kan gebruikt worden in de Q-PCR om een grenswaarde in te stellen. Omdat er abnormale vermeerderingscurves kunnen optreden bij negatieve stalen wordt de detectielimiet op 1 GE geplaatst (Thomas et al., 2018). Wordt deze verlaagd onder 1 dan is er een grotere kans op fout-positieve resultaten. Dit benadrukt het nut van bijkomende diagnosemiddelen om zowel positieve als negatieve dieren te bevestigen.

De meerwaarde van deze bijkomende testen wordt aan de hand van een voorbeeld geïllustreerd. Een eigenaar wil zijn dood amfibie testen op Bs en Bd. Er wordt een duplex Q-PCR uitgevoerd en hieruit komt als resultaat dat het dier 20 GE heeft voor Bs of Bd. Dit is boven de detectielimiet dus het dier is positief voor Bs of Bd. Dan is het zeker nodig histologie te doen om te bevestigen dat het dier gestorven is aan een van de chytriden of dat het een asymptomatische drager was. Zit de huid vol met sporen dan is er een grote kans dat de chytride de oorzaak van de sterfte was. Bijkomend is het nuttig om te kijken naar het dier zelf. Heeft het klinische symptomen of niet? Als er symptomen aanwezig zijn dan kunnen ze gelinkt worden aan de bevindingen van histologie en Q-PCR. Het wordt dus veel moeilijker om de GE alleen te gebruiken als diagnose bij subklinische dieren.

3.2 Histologie

Naast Q-PCR is histologie ook een belangrijke diagnosetechniek om chytriden op te sporen. Zoals hierboven aangehaald (§ 3.1) kan het nuttig zijn beide technieken te combineren. Onder histologie vallen verschillende methoden waaronder de klassieke histologie en immunohistologie. We zullen vooral de eerste bespreken in de volgende alinea's.

De chytriden hebben verschillende predilectieplaatsen in de huid en op deze plaatsen worden de stalen genomen voor histologie. Dit zijn bij voorkeur waar de letsels aanwezig zijn. Bijvoorbeeld voor

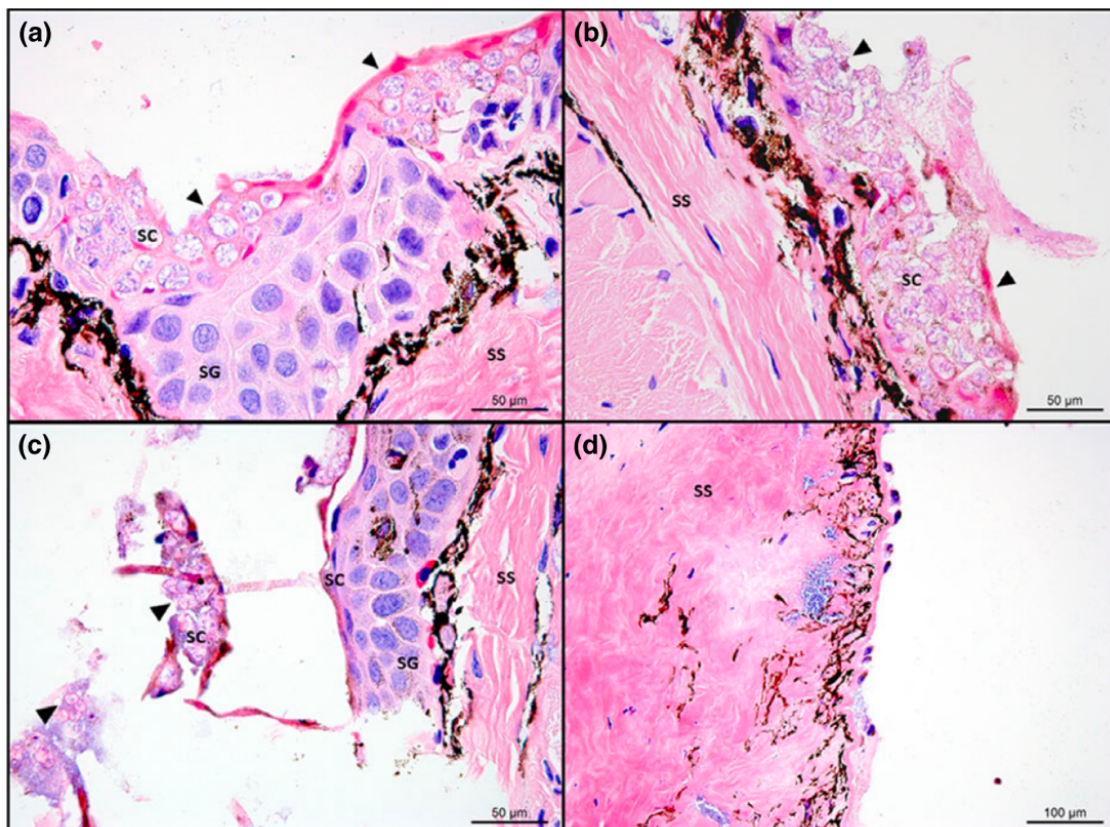
Bd zijn dit de tenen. Vervolgens worden de stalen verwerkt en gekleurd. De kleuring wordt gedaan met Lillie–Mayer haematoxyline en eosine kleuring (H&E). Daarna kan het staal met behulp van microscopie onderzocht worden op de aanwezigheid van de schimmels. Hierop kunnen de zoösporen in de epidermis geïdentificeerd worden (Fig. 9). De stalen worden meestal post-mortem genomen. Er wordt dan gesproken van histopathologie. (Hyatt et al., 2007)(Thomas et al., 2018) Bij levende dieren wordt een staartbiopt genomen om te onderzoeken.

Histologie heeft enkele minpunten. Ten eerste moet er een bepaalde concentratie aan sporen aanwezig zijn voor detectie. Terwijl PCR de schimmels in een vroeger stadium kan identificeren en het heeft een hogere sensitiviteit. Ten tweede is er een zekere ervaring nodig in het bekijken van de microscopische stalen.

Een voordeel van histologie is dat er kan gekeken worden naar andere infecties. Bij PCR moet je op voorhand bepalen naar wat gezocht wordt. Er moet een primer gekozen worden bij Q-PCR (Hyatt et al., 2007)

De reden dat klassieke histo(patho)logie verkozen wordt boven immunohistologie is omdat het minder tijd inneemt. De productie van antilichamen en de kleuring gebeurt in meerdere stappen wat tijdrovend is. Daarnaast werd in een studie van Thomas et al. (2018) aangetoond dat alle positieve stalen met H&E-kleuring ook met immunohistologie konden bevestigd worden. Het gaf dus geen bijkomende meerwaarde.

We kunnen concluderen dat het beter is histo(patho)logie te combineren met Q-PCR. Omwille van hun aanvullende eigenschappen naar diagnose toe.



Figuur 9. Haematoxyline en eosine kleuring van de huid bij vuursalamanders geïnfecteerd met Bs. A. Het staal is genomen meteen na de dood. Er zijn meerdere Bs-thalli aanwezig zie zwarte pijl. B. en C. Deze stalen zijn genomen 2 tot 3 dagen na de dood. Er zijn terug meerdere thalli aanwezig samen met bacteriële overgroei zie zwarte pijl. D. Dit staal is van 3 tot 4 dagen na de dood. De volledige epidermis is afwezig. Volgende afkortingen worden gebruikt in de figuren, SC (stratum corneum), SG (stratum germinativum) en SS (stratum spinosum).

4 Behandeling

De behandeling van Chytridiomycose is complex. Deze moet veilig, betrouwbaar, eenvoudig, effectief, toepasbaar voor verschillende species en omgevingen zijn. Er wordt een onderscheid gemaakt tussen de behandeling van het dier en de omgeving. Eerst zal temperatuur aan bod komen als mogelijke behandeling van amfibieën. Vervolgens worden enkele antimycotica besproken. Om tenslotte te eindigen met de desinfectie van de omgeving.

4.1 Behandeling van de amfibie

4.1.1 Temperatuur als behandeling

Beide schimmels hebben een verschillende voorkeurstemperatuur. Voor Bd ligt die tussen 17°C en 25°C en voor Bs tussen 10°C en 15°C. Door een temperatuur in te stellen hoger dan de bovengrens van Bd of Bs kunnen de schimmels afgedood of de groei ervan gestopt worden.

Woodhams et al. (2003) kon bij *Litoria chloris* (roodoogboomkikker) Bd elimineren door ze te huisvesten bij een temperatuur van 37°C gedurende 16u. Deze hoge temperatuur kan niet worden gebruikt bij salamanders aangezien hun bovenste limietwaarde onder de 37°C gelegen is. Lagere temperaturen zullen moeten worden toegepast over een langere periode om salamanders te genezen van de schimmel. Chatfield and Richards-Zawacki (2011) hielden verschillende Bd-positieve kikkersoorten bij een temperatuur van 30°C gedurende 10 dagen. Na deze behandeling waren alle dieren Bd-negatief.

Bs-geïnfecteerde vuursalamanders werden bij een temperatuur van 15°C, 20°C of 25°C gehouden. De groep gehouden bij 25°C kreeg de behandeling voor 7 of 10 dagen. Er werd gekeken naar de GE om infectiegraad te beoordelen. Slechts de amfibieën gehouden bij een temperatuur van 25°C voor 10 dagen waren volledig vrij van de schimmel. Daarnaast waren bij deze groep ook alle letsels genezen. Temperatuur alleen als behandeling is effectief om amfibieën Bs-vrij te krijgen als de soort 25°C kan verdragen (Bloom et al., 2015).

4.1.2 Antimycotica

Antimycotica kunnen toegediend worden om de chytriden te elimineren. Ze kunnen aanvullend bij temperatuur als behandeling of alleen gebruikt worden. Een voordeel van behandelingen te combineren is dat een lagere temperatuur of concentratie aan antimycotica kan gebruikt worden. Dit is gunstig voor de amfibie aangezien ze niet altijd hoge temperaturen kunnen tolereren. Daarnaast zullen er ook minder toxische effecten van de antimycotica optreden.

In de volgende alinea's zullen enkele effectieve bestrijdingsmiddelen worden besproken. Eerst zullen de studies over Bd aan bod komen en vervolgens die over Bs. Tenslotte wordt de beste behandelingsmethode voor beide schimmels kort toegelicht.

Forzán et al. (2008) en Garner et al. (2009) onderzochten de werking van itraconazole. De eerste studie testte dit op kikkers, *Ambystoma mexicanum* (axolotl) en *Potomotyphlus kaupii* (wormsalamander). Hierbij was een concentratie van 0,01% itraconazole in een 0,6% zoutoplossing voldoende om Bd-negatieve amfibieën te verkrijgen. De tweede studie onderzocht het effect bij de Balearenpad. De laagst geteste dosis van 0,5 mg/l itraconazole gedurende 7 dagen bleek effectief te zijn om Bd te bestrijden bij kikkervisjes. Er werd wel een neveneffect gezien namelijk depigmentatie. Het werkte wel

niet irriterend aangezien ze bleven eten en er geen sterfte of lethargie waar te nemen was. Mogelijks is de depigmentatie de oorzaak van een verstoorde melanine productie. Door dit negatief effect wordt itraconazole niet aangeraden bij larvale stadiums.

In een studie van Martel et al. (2011) werd er gekeken naar de werking van amfotericine B en voriconazole. De eerste kon Bd volledig elimineren bij een concentraties van 8 µg/l en de tweede bij 1,25 µg/l. Beide werden gedurende 10 dagen toegediend. Een belangrijke opmerking is dat 8 µg/l amfotericine B toxisch is voor kikkervisjes van de Balearenpad dus niet aangewezen is als behandeling. Tenslotte werd het protocol van 1,25 µg/ml voriconazole voor 7 dagen getest door geïnfecteerde vroegmeesterpadden een keer per dag onder te spuiten. Deze bleek effectief te zijn in het elimineren van Bd bij de padden.

Wat later testte Muijsers et al. (2012) verschillende antibiotica en antimycotica. Hieruit werd geconcludeerd dat florfenicol, sulfamethoxazole, sulfadiazine en trimetoprim/sulfonamiden Bd *in vitro* konden doden. Dit was niet geval *in vivo* omwille van de lage concentraties die werden gebruikt. Florfenicol werd meer in detail bekeken omwille van zijn stabiliteit in water gedurende 10 dagen. Maar bij een concentratie van 10 µg/l bleek het niet in staat te zijn Bd volledig te elimineren. De beste antimycotische behandeling tot op heden is met itraconazole of voriconazole.

De meeste antimycotica tegen Bd werken niet tegen Bs omwille van een andere minimale inhibitorische concentratie. Blooi et al. (2015b) kwamen tot de conclusie dat de topische behandeling van 10 dagen met 2000 IU/ml polymyxine E en 12,5 µg/ml voriconazole bij een temperatuur van 20°C leidde tot Bs-negatieve vuursalamanders. De polymyxine E behandeling bestond uit eenmaal per dag de dieren in een bad te plaatsen gedurende 10 minuten. Terwijl voor voriconazole de dieren tweemaal per dag ondergespoten moesten worden. 12,5 µg/ml voriconazole of 0,6 µg/ml itraconazole alleen of in combinatie met polymyxine E bij een temperatuur van 15°C konden Bs niet succesvol bestrijden. Itraconazole wordt liever niet gebruikt omwille van de negatieve effecten bij kikkervisjes zoals depigmentatie (Garner et al., 2009).

Er is een duidelijk verschil in behandeling van Bd en Bs. De meest effectieve therapie voor Bd bestaat uit de amfibieën eenmaal per dag onder te spuiten met 1,25 µg/ml voriconazole voor 7 dagen bij een temperatuur van 25°C. Maar meestal is deze temperatuur niet vereist en is de antimycotica alleen voldoende. Uit de vorige alinea's (§ 4.1.1) blijkt een temperatuur van 25°C voldoende te zijn om Bs te elimineren. Kunnen de dieren deze temperatuur niet overleven dan is een behandeling met antimycotica aangewezen. Namelijk eenmaal per dag een bad van 2000 IU/ml polymyxine E voor 10 min en tweemaal per dag de dieren onderspuiten met 12,5 µg/ml voriconazole. Beide producten worden gedurende 10 dagen bij een temperatuur van 20°C aangebracht.

4.2 Behandeling van de omgeving

Naast de dieren zijn de chytriden ook aanwezig in de omgeving. Daar kunnen ze enige tijd overleven om dan later een amfibie te infecteren. Vandaar dat niet enkel de dieren maar ook de omgeving moet worden behandeld.

In een studie van Van Rooij et al. (2017) hebben ze enkele chemische desinfectantia getest om de omgeving Bs-vrij te krijgen. De meeste konden zowel Bs als Bd elimineren (Fig. 10). Toch lag de blootstellingstijd gemiddeld hoger en waren er minder ontsmettingsmiddelen actief voor Bs dan voor

Bd. De reden hiervoor is dat Bs een hogere katalase-activiteit en een meer resistente spore stadium heeft. Er werd aanbevolen van 1% Virkon, 4% natriumchloride of 70% ethanol te gebruiken om de omgeving te ontsmetten. Waarbij de contacttijd voor Virkon 5 minuten en voor de twee andere 1 minuut bedraagt. Deze tijden en concentraties moeten goed gerespecteerd worden alsook het drogen erna. Dit is nodig om een effectieve desinfectie te verkrijgen. Naast de chytriden zijn deze drie desinfectantia ook werkzaam tegen ranaviruse.

Het is heel belangrijk om de omgeving voordien grondig te kuisen om al het organisch en zichtbare vuil te verwijderen. Want dit kan interfereren met de producten van de ontsmettingsstap en resulteren in een minder effectieve desinfectie.

| Disinfectant | Concentration Al | Minimal exposure time for 100% killing | |
|--|------------------|--|-----------|
| | | Bsal | Bd |
| Ethanol (EtOH) | 70% | 30s | 20 s |
| Disolol® | undiluted | 30s | 30 s |
| Hibiscrub® | 0.25, 0.5, 0.75% | 30s | 1 min |
| Copper sulphate (CuSO ₄) | 0.001-0.05% | inactive | inactive |
| | 0.1% | inactive | inactive |
| | 0.5% | inactive | inactive |
| | 1% | inactive | inactive |
| Chloramine-T® | 0.5% | 5 min | 5 min |
| | 1% | 2 min | 2 min |
| Bleach | 1:5 dilution | 5 min | 30s |
| | 4% | 30s | 30s |
| Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂) | 0.5% | inactive | inactive |
| | 1% | inactive | 10 min |
| | 3% | inactive | 2 min |
| | 6% | inactive | 1 min |
| Kickstart® | 0.01% | inactive | 10 min |
| | 0.05% | 5 min | 30 s |
| | 0.1% | 2 min | 30 s |
| Potassium permanganate (KMnO ₄) | 1% | 10 min | 10 min |
| | 2% | 5 min | 5 min |
| Virkon S® | 0.5% | 5 min | NA |
| | 1% | 2 min | 20s/1 min |
| Dettol medical® | 1:20 dilution | 5 min | 30 s |
| Biocidal® | undiluted | 30s | 30 s |
| Safe4® | undiluted | 30s | 30 s |
| F10 ® | 1:100 dilution | 30s | NA |
| | 1:250 dilution | 30s | 1min |
| | 1:500 dilution | 30s | NA |
| | 1:1000 dilution | 30s | 1min |
| | 1:3000 dilution | NA | 1min |
| | 1:3500 dilution | NA | 10 min |
| Sodium chloride (NaCl) | 0.3% | inactive | NA |
| | 0.5% | inactive | NA |
| | 1% | inactive | NA |
| | 5% | inactive | 5 min |
| | 10% | 10 min | 2 min |

Figuur 10. De doeltreffendheid van verschillende desinfectiemiddelen tegen Bs en Bd. De eerste kolom bevat de namen van de desbetreffende middelen, de tweede de concentratie, de derde en de vierde de blootstellingstijd nodig om Bs en Bd te doden.

Naast deze middelen zijn fysische barrières ook een goede manier om infectie met chytriden tegen te gaan. Dit werd in een studie van Spitzen-Van Der Sluijs et al. (2018) aangetoond. Bs kon vuursalamanders gescheiden door een fysische barrière van 1cm dikte niet infecteren. Dit is vooral van belang bij amfibieën gehouden in gevangenschap. De schimmel kan niet zomaar verspreiden van het ene aquarium naar de andere. Besmetting zal voornamelijk komen van de eigenaar.

Een goede algemene hygiëne speelt een grote rol zowel in de preventie als de bestrijding van chytriden.

5 Praktisch plan voor de bestrijding van Chytridiomycose geïnfecteerde amfibieën

Aan de hand van de bovenstaande literatuurstudie zullen we een protocol opstellen die houders van amfibieën kunnen volgen bij Chytridiomycose. We zullen eerst ingaan op het screenen van amfibieën zonder en met klinische symptomen indicatief voor Chytridiomycose. Daarna kijken we naar geïnfecteerde amfibieën en wat de passende diagnose en behandeling van de dieren en de omgeving is. Vervolgens komt ook de verdere opvolging aan bod. Ten slotte zal het protocol in een overzichtelijk flowdiagram (fig. 11) gepresenteerd worden.

Zowel klinische gezonde als zieke amfibieën worden gescreend op Bs en Bd met duplex Q-PCR (§ 3.1). Tijdens het screenen kan een onderscheid gemaakt worden tussen chytride-positieve en -negatieve amfibieën. Verder kan de positieve groep opgedeeld worden in asymptomatische en symptomatische dieren. (Blooï et al., 2013)

Bij de klinisch zieke amfibieën wordt de diagnose gesteld door duplex Q-PCR te combineren met histo(patho)logie (§ 3.1). Door beide technieken toe te passen worden fout-negatieve en fout-positieve resultaten vermeden. De duplex Q-PCR wordt uitgevoerd volgens de studie van Blooï et al. (2013). Bij histologie zijn er twee mogelijkheden. Ten eerste kan er histologie uitgevoerd worden op levende dieren. Er wordt dan een staartbiopt genomen. Ten tweede is er histopathologie wat meer informatie kan geven aangezien de letsels kunnen onderzocht worden en niet enkel de staartregio. Histopathologie kan enkel gedaan worden als men dieren kan opofferen. Dit kan bijvoorbeeld niet gedaan worden voor zeer waardevolle of individueel gehouden dieren.

Bij de niet-klinisch zieke dieren kan beslist worden van bijkomend met de Q-PCR histopathologie te doen om dezelfde reden als bij de andere groep.

Eens duidelijk is welke amfibieën positief en negatief zijn voor Bs en/of Bd kunnen ze behandeld worden (§ 4). De behandeling moet gezien worden per aquarium. Die kunnen ingedeeld worden in drie groepen. De eerste en de tweede groep bestaan respectievelijk uit allemaal positieve en negatieve dieren. De derde groep is een mengeling van beide. De eerste en derde groep worden behandeld voor Chytridiomycose dus ook de negatieve dieren die aanwezig zijn in die groep. Bij de tweede groep moet er worden gekeken of de dieren klinisch ziek zijn. Enkel klinisch zieke dieren worden oorzakelijk behandeld.

Voor de dieren effectief behandeld worden kan er gekozen worden om de ernstig zieke te elimineren en de rest te behandelen. Afhankelijk met welke chytride de dieren geïnfecteerd zijn zal een andere behandeling toegepast worden.

Bs kan bestreden worden met een temperatuur 25°C als de amfibie soort het verdraagt. Zoniet worden Bs-positieve amfibieën eenmaal per dag in een bad van 2000 IU/ml polymyxine E voor 10 min geplaatst en tweemaal per dag onderspoten met 12,5 µg/ml voriconazole. Beide producten worden gedurende 10 dagen bij een temperatuur van 20°C aangebracht.

De behandeling voor Bd bestaat uit eenmaal per dag onderspuiten met 1,25 µg/ml voriconazole voor een periode van 7 dagen.

In het geval de dieren met beide chytriden geïnfecteerd zijn dan wordt de behandeling van Bs met de antimycotica aangeraden omdat die ook werkzaam blijkt te zijn tegen Bd.

Ter gelijker tijd moet ook de omgeving behandeld worden. Hiervoor wordt 1% Virkon, 4% natriumchloride of 70% ethanol gebruikt. De contacttijd voor Virkon is 5 minuten en voor de twee andere producten bedraagt die 1 minuut. Het is belangrijk om voor de ontsmetting grondig te kuisen

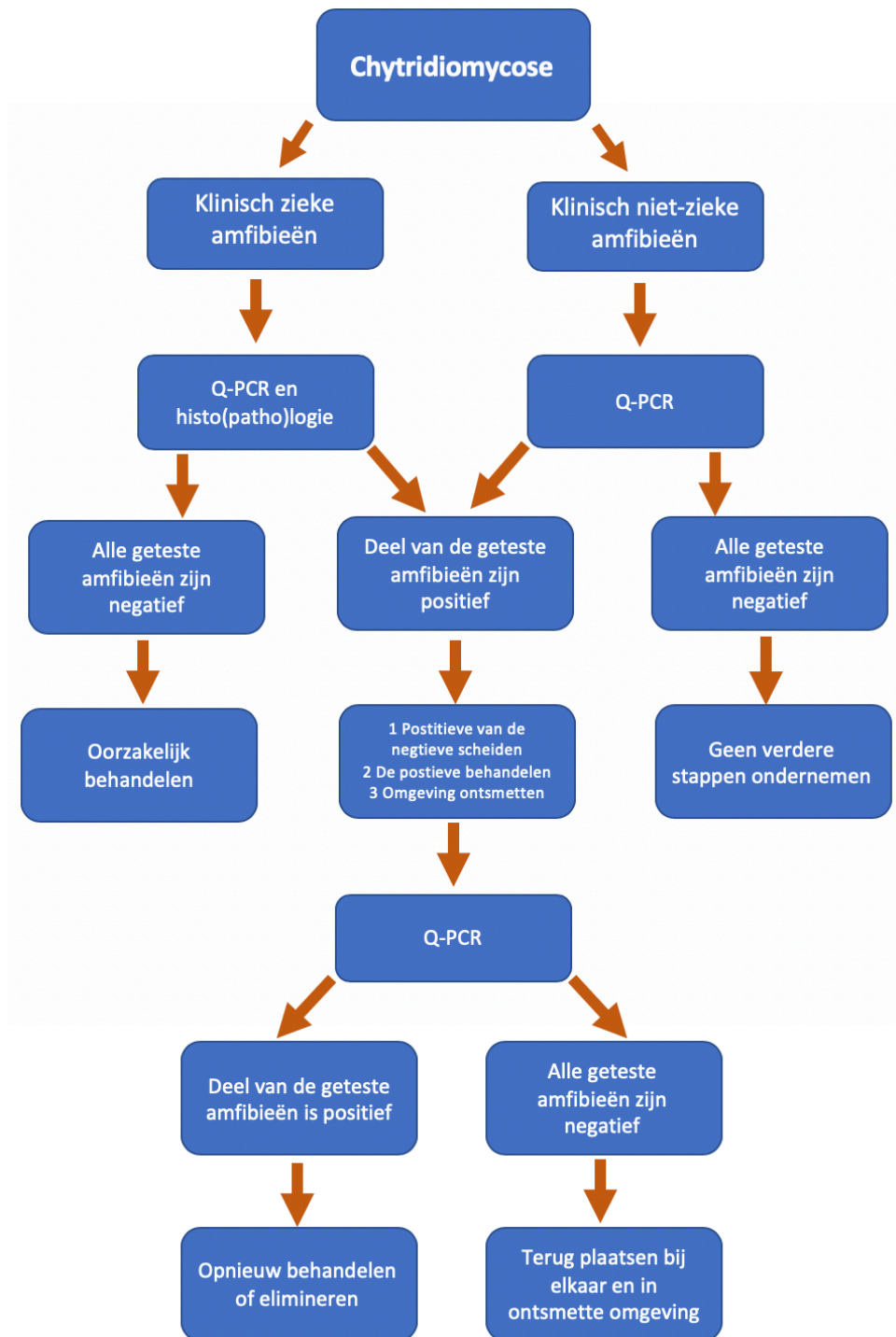
om al het organisch materiaal te verwijderen. Erna is het van belang alles goed te laten drogen zodat de ontsmetting effectief is.

Tijdens de ontsmetting van de omgeving en de behandeling van de amfibieën wordt alles op een propere plaats gedaan en weg van de ontsmette omgeving. Een goede algemene hygiëne is essentieel gedurende het volledige proces maar ook erna. Na de behandeling worden de dieren getest of ze infectie-vrij zijn voor ze teruggeplaatst worden. Dit geldt voor zowel de chytride-positieve als de -negatieve groep. Indien er nog dieren positief zijn dan kunnen deze nog eens behandeld of een meer drastische oplossing geëlimineerd worden. Dit heeft als doel een gezonde chytride-vrije collectie te verkrijgen.

Voor de opvolging kan men kijken naar het optreden van klinische symptomen bij de amfibieën. Vermoed men opnieuw een infectie dan kan er duplex of simplex Q-PCR gedaan worden om te screenen. Dit kan samen met histologie gedaan worden als er twijfel is over de resultaten van de Q-PCR. Afhankelijk van het resultaat wordt er terug een behandeling opgestart.

Als er nieuwe dieren worden aangekocht is het aan te raden deze eerst te controleren op Bs en Bd. Gedurende deze tijd worden ze best in quarantaine gehouden. Pas na de resultaten kunnen ze in de collectie geïntroduceerd worden.

Als men regelmatig in contact komt met andere amfibieën is het belangrijk van een goede algemene hygiëne op alle vlakken toe te passen. Daarnaast is het zeker niet slecht om ook de eigen collectie te screenen.



Figuur 11. Flowdiagram Chytridiomycose. Eerst wordt het onderscheid gemaakt tussen klinische zieke en niet-zieke amfibieën. De zieke worden getest met duplex Q-PCR en histo(patho)logie voor Bs en Bd infectie. De niet-zieke wordt enkel met duplex Q-PCR getest. Als alle dieren negatief zijn dan moet er niets ondernomen worden in de niet-klinische groep. De klinisch zieke dieren die negatief zijn moeten oorzakelijk behandeld worden. Zijn er enkele positief dan volgen er verdere stappen. Ten eerste worden alle dieren behandeld. Ten tweede wordt de volledige omgeving ontsmet. De volgende stap is opnieuw testen met duplex Q-PCR. Zijn alle dieren negatief dan kunnen deze teruggeplaatst worden in de ontsmette omgeving. Zijn er nog positief dan kunnen deze opnieuw worden behandeld of geëlimineerd.

III. Discussie

Zowel Bd als Bs hebben een grote impact op de amfibieënpopulatie en -diversiteit. Er is een goede kennis van de pathogenese van Bd. Omdat Bs recenter geïdentificeerd is komen de studies wat achter. Maar verder onderzoek is nodig om de schimmels tegen te houden in wilde en private populaties. De focus van deze studie lag op het bestrijden van chytriden bij houders van amfibieën.

In de volgende alinea's zal er eerst worden ingegaan op de verschillende gevoeligheden van de schimmels en hoe dit kan bijdragen tot een behandeling. Ten tweede komt de diagnose en behandeling vanuit het protocol aan bod. Ten derde zal de wildpopulatie besproken worden samen met eventuele behandelingen. Ten vierde wordt er afgesloten met enkele vooruitzichten omtrent Chytridiomycose bij amfibieën.

Er is een groot verschil tussen de twee schimmels op het gebied van gevoeligheid. Enkele factoren die een rol spelen bij Bd-gevoeligheid zijn onder andere de genetica (Savage and Zamudio, 2016), het eerder contact met de schimmel (Catenazzi et al., 2017), het klimaat (Ruggeri et al., 2018) of de soort chytride lijn (Farrer et al., 2011). Wat al deze onderzoeken gemeenschappelijk hebben is dat de schimmel bekeken werd bij slechts één of enkele specifieke soort(en) amfibie(ën). Terwijl amfibieën zeer veel soorten omvatten. Zo is een kikker niet hetzelfde als een salamander, ze verschillen al in hun voorkeurstemperatuur. Er kan dus niet zomaar van uitgegaan worden dat de gevonden resultaten bij een soort dezelfde zullen zijn voor alle soorten amfibieën. Er zou ten minste verschillende anura en urodela moeten worden onderzocht in een proefopzet. Naast de verschillende soorten zijn er ook de verschillende levensstadia die elk een andere gevoeligheid hebben voor de schimmel. Er kan dus enkel besloten worden dat de onderzochte factoren gelden voor de onderzochte soorten. Er mag niet zomaar veralgemeend worden voor alle amfibieën. Anders krijg je tegenstrijdige resultaten zoals bij het onderwerp van immuniseren. De ene studie zeg dat het werkt de andere dan weer niet. (Ramsey et al., 2010)(Stice and Briggs, 2010)

Meestal start de schimmel als een epidemie in een naïeve populatie. Later evolueert die naar een verdere drastische of langzame daling of een herstel van de amfibieënpopulatie. (Scheele et al., 2017) Het doel van de schimmel is om te overleven door gebruik te maken van een gastheer. Bij een lage infectiedruk zal er eerder een stabiele toestand ontstaan waar zieke en asymptomatische dieren samenleven. Deze asymptomatische dieren worden ook wel dragers genoemd. Naast deze dragers zijn ook vectoren en reservoirs nodig om de schimmel te onderhouden. (Kinney et al., 2011) (Briggs et al., 2010) Of er nu een epidemie of een endemie ontstaat hang sterk af van de omstandigheden. Spitzen-Van Der Sluijs et al. (2017) toonde aan dat er rekening moet worden gehouden met de verschillende factoren die de gevoeligheid voor de schimmel bepalen.

Zoals eerder aangehaald staat het onderzoek over Bs minder ver dan Bd. Daarom wordt in de literatuurstudie nagegaan of Bs een goed of slecht pathogeen is. Schmidt et al. (2017) argumenteert dat Bs een goed pathogeen is maar dat vectoren cruciaal zijn. Een andere studie van Spitzen-Van Der Sluijs et al. (2018) beweert eerder dat Bs een matig pathogeen is. (Stegen et al., 2017) misschien is dit niet een goede vraag of Bs een goed of slecht pathogeen is. Er zijn veel factoren die hier een rol spelen. Zoals bij Bd zijn vectoren en reservoirs essentieel in de spreiding van Bs. Verder onderzoek is nodig naar de pathogenese van Bs en welke factoren een rol spelen.

Alles moet samen bekeken worden zoals dat in de natuur is. De omgeving, het klimaat, de verschillende schimmels, de infectiedruk en nog veel meer. Het is moeilijk om dit allemaal samen te onderzoeken.

Daarom dat iedere factor eerst apart moet worden onderzocht alvorens verschillende samen kunnen worden bekeken.

Q-PCR en histologie worden als de beste diagnosetechnieken voor Bd en Bs beschouwt in deze literatuurstudie. Door de combinatie worden fout-negatieve en fout-positieve resultaten vermeden. De duplex Q-PCR die gebruikt wordt volgens het protocol van Blooi et al. (2013) heeft een hoge specificiteit en sensitiviteit. Twee aparte studies van Standish et al. (2018) en Thomas et al. (2018) bevestigden dat het een zeer betrouwbare techniek is. Er kan besloten worden dat we een zeer goede manier hebben om Chytridiomycose op te sporen. Een voordeel van deze techniek is de niet invasiviteit zoals bij histologie. Een ander is dat Q-PCR zowel post- als ante-mortem kan gebruikt worden. Het nadeel van deze techniek is dat er geen groot verschil mag zijn in de zoöspore concentraties. Anders zal de laagste concentratie niet gedetecteerd worden wat een fout-negatief resultaat heeft. Een oplossing om dit te vermijden is histologie of een single Q-PCR uit voeren. Naast een fout-negatief kan ook een fout-positief resultaat optreden, dit wordt voorkomen door de grenswaarde op 1 GE te vast te leggen. (Thomas et al., 2018)

Histologie heeft als voordeel tegenover Q-PCR dat de chytriden lange tijd na opslag kunnen worden gedetecteerd. In de studie van Thomas et al. (2018) konden ze Bs niet aantonen met histologie. Dit werd verklaard doordat er geen stalen werden genomen van de laesies zelf. Daarom wordt histologie het best uitgevoerd op de predilectieplaatsen of van de letsels.

De behandeling kan worden ingedeeld in twee types. Er kan behandeld worden met temperatuur of antimycotica of beide.

Behandeling met een temperatuur van 25°C alleen is effectief gebleken bij de bestrijding van Bs bij amfibieën. (Blooi et al., 2015a) Voor Bd werkt het ook, maar hier zijn hogere temperaturen voor nodig en niet alle amfibiesoorten kunnen dit aan. (Chatfield and Richards-Zawacki, 2011) Uiteindelijk is dit een heel goede en kosteloze therapie als de dieren het kunnen verdragen. Dit benadrukt nog eens de complexiteit van amfibieën die meer dan één soort omvat.

Als temperatuur niet werkt kan overgegaan worden naar antimycotica. Deze producten hebben een zekere toxiciteit. Dit is gebleken uit de studie van Garner et al. (2009) waar depigmentatie optrad bij kikkervisjes na behandeling met itraconazole. Maar ook amfotericine B is toxisch gebleken voor de larvale stadia. Variconazole zou het veiligst zijn en kan Bd elimineren bij amfibieën. (Martel et al., 2011) Een opmerking bij deze studie is dat enkel de toxiciteit werd getest bij de vroedmeesterpad. Het effect zou moeten worden onderzocht bij verschillende soorten en levensstadia.

Verschillende antibiotica konden de schimmel *in vitro* elimineren maar niet *in vivo*. Deze studie toont aan dat *in vitro* niet hetzelfde is als *in vivo*. (Muijsers et al., 2012)

Om Bs te bestrijden werden verschillende producten getest die werkzaam zijn tegen Bd. Enkel de combinatie van polymyxine E en variconazole konden de schimmel elimineren. Ook moest dit bij een temperatuur van 20°C gebeuren. Dit benadrukt het belang van temperatuur bij Bs. (Blooi et al., 2015b) Bijkomend onderzoek kan het effect van één antimycotica nagegaan bij verschillende temperaturen. Maar we weten dat de temperatuur voldoende kan zijn om Bs te elimineren. Het nut van antimycotica is dus enkel bij soorten die deze temperatuur van 25°C niet kunnen overleven.

Uit de studie van Van Rooij et al. (2017) kwamen drie chemische desinfectantia om de omgeving Chytridiomycose vrij te krijgen. Het gaat om de producten Virkon1%, natriumchloride 4% of ethanol 70%. Zoals eerder vermeld is het belangrijk om genoeg tijd en de juiste temperatuur te hanteren voor een goede ontsmettingsstap. Dit moet worden voorafgegaan door een grondige kuisstap waarbij al het zichtbare vuil verwijderd wordt.

Ons protocol is gebaseerd op de diagnosetechnieken duplex Q-PCR en histologie (§3) en de meest efficiënte behandelingen (§4). Zoals hierboven aangehaald zijn dit zeer goede methoden.

In het protocol wordt eerst een onderscheid gemaakt tussen symptomatische en asymptomatische dieren. Bij de tweede groep wordt een screening gedaan met duplex Q-PCR. Zoals eerder gezegd kan dit fout-negatieve resultaten opleveren. Een simplex Q-PCR is dan de beste manier om dit te vermijden. Het screenen kan ook op regelmatige basis gedaan worden bijvoorbeeld bij introductie van nieuwe dieren of contact met anderen. De symptomatische groep wordt getest met de twee technieken, duplex Q-PCR en histologie. Vervolgens zijn er opnieuw twee groepen, negatieve en positieve dieren. Bij de negatieve moeten geen stappen worden ondernomen. Tenzij er twijfel is dan kan zoals eerder vermeld een simplex Q-PCR worden uitgevoerd ter controle. De positieve groep wordt gepast behandeld. Maar als negatieve en positieve dieren tot dezelfde aquarium behoren dan moeten alle dieren behandeld worden. Sowieso moet de omgeving ontsmet worden en alle dieren apart worden gehouden. Voor de specifieke behandeling wordt verwezen naar §4.

Deze literatuurstudie gaat vooral over dieren gehouden in gevangenschap. Maar Chytridiomycose zorgt ook voor negatieve gevolgen in de wildpopulatie. Kunnen deze dieren ook behandeld worden met de voorgestelde technieken?

Er is een groot verschil tussen de natuur en een gecontroleerde omgeving waar de dieren in gevangenschap worden gehouden. Dit zorgt voor een complexere benadering naar behandeling en diagnose toe voor de wildpopulatie. Antimycotica of antibiotica kunnen niet zomaar in de natuur worden toegediend. Want dit kan gevolgen hebben voor andere dieren. Daarnaast is gebleken uit de studie van Geiger et al. (2017) dat dieren vangen, behandelen en terug vrijlaten geen efficiënte manier is om de schimmels te elimineren. Een ideale bestrijding is veilig, goedkoop, toepasbaar op verschillende soorten, omgevingen en gemakkelijk toe te passen. (Garner et al., 2016) Een eventueel voorbeeld zou probiotica kunnen zijn. Er zijn bacteriën gevonden die chytriden afremmen. (Harris et al., 2006)(Brucker et al., 2008) Probiotica zou veiliger zijn voor het dier dan antimycotica. Dit moet verder onderzocht worden aangezien er studies zijn die het nut in twijfel trekken. Antwis et al. (2015) toonde aan dat bacteriën Bd-GPL niet wereldwijd kon afdoden. Het is complexer dan een soort bacterie die de groei van Bd remt.

Andere mogelijke manieren om chytriden te elimineren zijn vaccineren of manipuleren van de omgeving. Uit de literatuurstudie is gebleken dat immuniseren een twijfelachtige piste is. Er zijn studies die voor zijn zoals Ramsey et al. (2010) en Catenazzi et al. (2017) en tegenstanders zoals Stice and Briggs (2010) en Rollins-Smith et al. (2009). Het manipuleren van de omgeving moet gezien worden als bijvoorbeeld temperatuur verhogen (Blooï et al., 2015a), verzilting van het water (Stockwell et al., 2015) of natuurfenomenen (Roznik et al., 2015). Dit zijn allemaal maatregelen die kunnen toepast worden maar wat het effect ervan is op andere organismen moet onderzocht worden. Zo kan een soort er beter van worden maar een andere dan juist niet. Verder onderzoek is vereist om de veiligheid en doeltreffendheid van de verschillende technieken na te gaan.

De behandeling van de wildpopulatie is waarschijnlijk een multidisciplinaire aanpak en niet zomaar antimycotica toedienen.

Algemeen kan gesteld worden dat er goede diagnose- en bestrijdingsmethoden bestaan voor beide schimmels. Maar bijkomende kennis omtrent beide pathogenesen en welke factoren hierbij een rol spelen zijn nodig. Dit moet leiden tot betere bestrijdingsmiddelen die eventueel ook in de wildpopulatie kunnen worden gebruikt.

Referentielijst

- Abramyan, J., Stajich, J.E., 2012. Species-specific chitin-binding module 18 expansion in the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *MBio* 3, e00150-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00150-12>
- Antwis, R.E., Preziosi, R.F., Harrison, X.A., Garner, T.W.J., 2015. Amphibian Symbiotic Bacteria Do Not Show a Universal Ability To Inhibit Growth of the Global Panzootic Lineage of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 3706–3711. <https://doi.org/10.1128/aem.00010-15>
- Bai, C., Liu, X., Fisher, M.C., Garner, T.W.J., Li, Y., 2012. Global and endemic Asian lineages of the emerging pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* widely infect amphibians in China. *Divers. Distrib.* 18, 307–318. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2011.00878.x>
- Baldo, A., Monod, M., Mathy, A., Cambier, L., Bagut, E.T., Defaweux, V., Symoens, F., Antoine, N., Mignon, B., 2012. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. *Mycoses* 55, 218–223. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02081.x>
- Bates, K.A., Clare, F.C., O'Hanlon, S., Bosch, J., Brookes, L., Hopkins, K., McLaughlin, E.J., Daniel, O., Garner, T.W.J., Fisher, M.C., Harrison, X.A., 2018. Amphibian chytridiomycosis outbreak dynamics are linked with host skin bacterial community structure. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02967-w>
- Berger, L., Hyatt, A.D., Speare, R., Longcore, J.E., 2005a. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Organ.* <https://doi.org/10.3354/dao068051>
- Berger, L., Roberts, A.A., Voyles, J., Longcore, J.E., Murray, K.A., Skerratt, L.F., Sabino-Pinto, J., Bletz, M., Hendrix, R., Perl, R.G.B., Martel, A., Pasmans, F., Lötters, S., Mutschmann, F., Schmeller, D.S., Schmidt, B.R., Veith, M., Wagner, N., Vences, M., Steinfartz, S., Voyles, J., Rosenblum, E.B., Berger, L., Woodhams, D.C., Kenyon, N., Bell, S.C., Alford, R.A., Chen, S., Billheimer, D., Shyr, Y., Rollins-Smith, L.A., 2016. History and recent progress on chytridiomycosis in amphibians. *Divers. Distrib.* 36, 703–712. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.09.007>
- Berger, L., Speare, R., Skerratt, L.F., 2005b. Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs *Litoria caerulea* with severe chytridiomycosis. *Dis. Aquat. Organ.* 68, 65–70. <https://doi.org/10.3354/dao068065>
- Blooi, M., Martel, A., Haesebrouck, F., Vercammen, F., Bonte, D., Pasmans, F., 2015a. Treatment of urodelans based on temperature dependent infection dynamics of *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Sci. Rep.* 5, 8037. <https://doi.org/10.1038/srep08037>
- Blooi, M., Pasmans, F., Longcore, J.E., Spitzen-Van Der Sluijs, A., Vercammen, F., Martel, A., 2013. Duplex real-Time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples. *J. Clin. Microbiol.* 51, 4173–4177. <https://doi.org/10.1128/JCM.02313-13>
- Blooi, M., Pasmans, F., Rouffaer, L., Haesebrouck, F., Vercammen, F., Martel, A., 2015b. Successful treatment of *Batrachochytrium salamandrivorans* infections in salamanders requires synergy between voriconazole, polymyxin e and temperature. *Sci. Rep.* 5. <https://doi.org/10.1038/srep11788>
- Boyle, D.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T., Hyatt, A.D., 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis. Aquat. Organ.* 60, 141–148. <https://doi.org/10.3354/dao060141>
- Briggs, C.J., Knapp, R.A., Vredenburg, V.T., 2010. Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 9695–9700. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912886107>
- Brucker, R.M., Harris, R.N., Schwantes, C.R., Gallaher, T.N., Flaherty, D.C., Lam, B.A., Minbiole, K.P.C., 2008. Amphibian chemical defense: Antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. *J. Chem. Ecol.* 34, 1422–1429. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9555-7>
- Carrillo-Farga, J., Castell, A., Pérez, A., Rondán, A., 1990. Langerhans-like cells in amphibian epidermis.

- J. Anat. 172, 39–45.
- Catenazzi, A., Swei, A., Finkle, J., Foreyt, E., Wyman, L., Vredenburg, V.T., 2017. Epizootic to enzootic transition of a fungal disease in tropical Andean frogs: Are surviving species still susceptible? *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186478>
- Chatfield, M.W.H., Richards-Zawacki, C.L., 2011. Elevated temperature as a treatment for *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in captive frogs. *Dis. Aquat. Organ.* 94, 235–238. <https://doi.org/10.3354/dao02337>
- Farrer, R.A., Martel, A., Verbrugghe, E., Abouelleil, A., Ducatelle, R., Longcore, J.E., James, T.Y., Pasmans, F., Fisher, M.C., Cuomo, C.A., 2017. Genomic innovations linked to infection strategies across emerging pathogenic chytrid fungi. *Nat. Commun.* 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14742>
- Farrer, R.A., Weinert, L.A., Bielby, J., Garner, T.W.J., Balloux, F., Clare, F., Bosch, J., Cunningham, A.A., Weldon, C., du Preez, L.H., Anderson, L., Pond, S.L.K., Shahar-Golan, R., Henk, D.A., Fisher, M.C., 2011. Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 18732–18736. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111915108>
- Fites, J.S., Ramsey, J.P., Holden, W.M., Collier, S.P., Sutherland, D.M., Reinert, L.K., Gayek, A.S., Dermody, T.S., Aune, T.M., Oswald-Richter, K., Rollins-Smith, L.A., 2013. The invasive chytrid fungus of amphibians paralyzes lymphocyte responses. *Science* (80-.). 342, 366–369. <https://doi.org/10.1126/science.1243316>
- Fitzpatrick, L.D., Pasmans, F., Martel, A., Cunningham, A.A., 2018. Epidemiological tracing of *Batrachochytrium salamandrivorans* identifies widespread infection and associated mortalities in private amphibian collections. *Sci. Rep.* 8, 13845. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31800-z>
- Forzán, M.J., Acvp, D., GunnBSc, H., ScottMSc, P., Forzán, M.J., Gunn, H., Scott, P., 2008. Chytridiomycosis in an Aquarium Collection of Frogs: Diagnosis, Treatment, and Control. *Source J. Zoo Wildl. Med. J. Zoo Wildl. Med.* 39, 406–411. <https://doi.org/10.1638/2007-0091.1>
- Garmyn, A., van Rooij, P., Pasmans, F., Hellebuyck, T., van den Broeck, W., Haesebrouck, F., Martel, A., 2012. Waterfowl: Potential environmental reservoirs of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035038>
- Garner, T.W.J., Garcia, G., Carroll, B., Fisher, M.C., 2009. Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Dis. Aquat. Organ.* 83, 257–260. <https://doi.org/10.3354/dao02008>
- Garner, T.W.J., Schmidt, B.R., Martel, A., Pasmans, F., Muths, E., Cunningham, A.A., Weldon, C., Fisher, M.C., Bosch, J., 2016. Mitigating amphibian chytridiomycoses in nature. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 371. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0207>
- Geiger, C.C., Bregnard, C., Maluenda, E., Voordouw, M.J., Schmidt, B.R., 2017. Antifungal treatment of wild amphibian populations caused a transient reduction in the prevalence of the fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05798-9>
- Gleason, F.H., Kagami, M., Lefevre, E., Sime-Ngando, T., 2008. The ecology of chytrids in aquatic ecosystems: roles in food web dynamics. *Fungal Biol. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2008.02.001>
- Greenspan, S.E., Longcore, J.E., Calhoun, A.J.K., 2012. Host invasion by *Batrachochytrium dendrobatidis*: Fungal and epidermal ultrastructure in model anurans. *Dis. Aquat. Organ.* 100, 201–210. <https://doi.org/10.3354/dao02483>
- Grogan, Laura F., Cashins, S.D., Skerratt, L.F., Berger, L., McFadden, M.S., Harlow, P., Hunter, D.A., Scheele, B.C., Mulvenna, J., 2018. Evolution of resistance to chytridiomycosis is associated with a robust early immune response. *Mol. Ecol.* 27, 919–934. <https://doi.org/10.1111/mec.14493>
- Grogan, Laura F., Robert, J., Berger, L., Skerratt, L.F., Scheele, B.C., Castley, J.G., Newell, D.A., McCallum, H.I., 2018. Review of the Amphibian Immune Response to Chytridiomycosis, and Future Directions. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02536>
- Hanlon, S.M., Henson, J.R., Kerby, J.L., 2017. Detection of amphibian chytrid fungus on waterfowl

- integument in natural settings. *Dis. Aquat. Organ.* 126, 71–74. <https://doi.org/10.3354/dao03160>
- Hanlon, S.M., Lynch, K.J., Kerby, J., Parris, M.J., 2015. *Batrachochytrium dendrobatidis* exposure effects on foraging efficiencies and body size in anuran tadpoles. *Dis. Aquat. Organ.* 112, 237–242. <https://doi.org/10.3354/dao02810>
- Harris, R.N., James, T.Y., Lauer, A., Simon, M.A., Patel, A., 2006. Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. *Ecohealth* 3, 53–56. <https://doi.org/10.1007/s10393-005-0009-1>
- Harris, R.N., Lauer, A., Simon, M.A., Banning, J.L., Alford, R.A., 2009. Addition of antifungal skin bacteria to salamanders ameliorates the effects of chytridiomycosis. *Dis. Aquat. Organ.* 83, 11–16. <https://doi.org/10.3354/dao02004>
- Hyatt, A.D., Boyle, D.G., Olsen, V., Boyle, D.B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F., Colling, A., 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Organ.* <https://doi.org/10.1002/adhm.201300318>
- Johnson, M.L., Speare, R., 2005. Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Dis. Aquat. Organ.* 65, 181–186. <https://doi.org/10.3354/dao065181>
- Johnson, M.L., Speare, R., 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: Quarantine and disease control implications. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 922–925. <https://doi.org/10.3201/eid0908.030145>
- Kagami, M., Miki, T., Takimoto, G., 2014. Mycoloop: Chytrids in aquatic food webs. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00166>
- Kinney, V.C., Heemeyer, J.L., Pessier, A.P., Lannoo, M.J., 2011. Seasonal pattern of *batrachochytrium dendrobatidis* infection and mortality in *lithobates areolatus*: Affirmation of vredenburgh's "10,000 zoospore rule." *PLoS One* 6, e16708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016708>
- Klocke, B., Becker, M., Lewis, J., Fleischer, R.C., Muletz-Wolz, C.R., Rockwood, L., Aguirre, A.A., Gratwicke, B., 2017. *Batrachochytrium salamandrivorans* not detected in U.S. survey of pet salamanders. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13500-2>
- Laking, A.E., Ngo, H.N., Pasmans, F., Martel, A., Nguyen, T.T., 2017. *Batrachochytrium salamandrivorans* is the predominant chytrid fungus in Vietnamese salamanders. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/srep44443>
- Longcore, J.E., Pessier, A.P., Nichols, D.K., 1999. *Batrachochytrium Dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. *Mycologia* 91, 219. <https://doi.org/10.2307/3761366>
- Martel, A., Blooi, M., Adriaensen, C., Van Rooij, P., Beukema, W., Fisher, M.C., Farrer, R.A., Schmidt, B.R., Tobler, U., Goka, K., Lips, K.R., Muletz, C., Zamudio, K.R., Bosch, J., Lötters, S., Wombwell, E., Garner, T.W.J., Cunningham, A.A., Spitzen-Van Der Sluijs, A., Salvidio, S., Ducatelle, R., Nishikawa, K., Nguyen, T.T., Kolby, J.E., Van Bocxlaer, I., Bossuyt, F., Pasmans, F., 2014. Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science* (80-.). 346, 630–631. <https://doi.org/10.1126/science.1258268>
- Martel, A., Spitzen-van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M.C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F., Pasmans, F., 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 15325–15329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307356110>
- Martel, An, Spitzen-van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M.C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F., Pasmans, F., 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 15325–15329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307356110>
- Martel, A., Van Rooij, P., Vercauteren, G., Baert, K., Van Waeyenberghe, L., Debacker, P., Garner, T.W.J., Woeltjes, T., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Pasmans, F., 2011. Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Med. Mycol.* 49, 143–149. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.508185>
- McMahon, T.A., Brannelly, L.A., Chatfield, M.W.H., Johnson, P.T.J., Joseph, M.B., McKenzie, V.J.,

- Richards-Zawacki, C.L., Venesky, M.D., Rohr, J.R., 2013. Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian hosts and releases chemicals that cause pathology in the absence of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 210–215. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200592110>
- McMahon, T.A., Sears, B.F., Venesky, M.D., Bessler, S.M., Brown, J.M., Deutsch, K., Halstead, N.T., Lentz, G., Tenouri, N., Young, S., Civitello, D.J., Ortega, N., Fites, J.S., Reinert, L.K., Rollins-Smith, L.A., Raffel, T.R., Rohr, J.R., 2014. Amphibians acquire resistance to live and dead fungus overcoming fungal immunosuppression. *Nature* 511, 224–227. <https://doi.org/10.1038/nature13491>
- Miller, C.A., Canis Tasse Taboue, G., Ekane, M.M.P., Robak, M., Sesink Clee, P.R., Richards-Zawacki, C., Fokam, E.B., Fuashi, N.A., Anthony, N.M., 2018. Distribution modeling and lineage diversity of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) in a central African amphibian hotspot. *PLoS One* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199288>
- Moss, A.S., Carty, N., San Francisco, M.J., 2010. Identification and partial characterization of an elastolytic protease in the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Organ.* 92, 149–158. <https://doi.org/10.3354/dao02223>
- Moss, A.S., Reddy, N.S., Dortaj, I.M., San Francisco, M.J., 2008. Chemotaxis of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* and its response to a variety of attractants. *Mycologia* 100, 1–5. <https://doi.org/10.3852/mycologia.100.1.1>
- Muijsers, M., Martel, A., Van Rooij, P., Baert, K., Vercauteren, G., Ducatelle, R., De Backer, P., Vercammen, F., Haesebrouck, F., Pasmans, F., 2012. Antibacterial therapeutics for the treatment of chytrid infection in amphibians: Columbus's egg? *BMC Vet. Res.* 8, 175. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-175>
- Murray, K.A., Skerratt, L.F., Garland, S., Kriticos, D., McCallum, H., 2013. Whether the Weather Drives Patterns of Endemic Amphibian Chytridiomycosis: A Pathogen Proliferation Approach. *PLoS One* 8, 61061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061061>
- Navarro-Lozano, A., Sánchez-Domene, D., Rossa-Feres, D.C., Bosch, J., Sawaya, R.J., 2018. Are oral deformities in tadpoles accurate indicators of anuran chytridiomycosis? *PLoS One* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190955>
- O'Hanlon, S.J., Rieux, A., Farrer, R.A., Rosa, G.M., Waldman, B., Bataille, A., Kosch, T.A., Murray, K.A., Brankovics, B., Fumagalli, M., Martin, M.D., Wales, N., Alvarado-Rybak, M., Bates, K.A., Berger, L., Böll, S., Brookes, L., Clare, F., Courtois, E.A., Cunningham, A.A., Doherty-Bone, T.M., Ghosh, P., Gower, D.J., Hintz, W.E., Höglund, J., Jenkinson, T.S., Lin, C.F., Laurila, A., Loyau, A., Martel, A., Meurling, S., Miaud, C., Minting, P., Pasmans, F., Schmeller, D.S., Schmidt, B.R., Shelton, J.M.G., Skerratt, L.F., Smith, F., Soto-Azat, C., Spagnoletti, M., Tessa, G., Toledo, L.F., Valenzuela-Sánchez, A., Verster, R., Vörös, J., Webb, R.J., Wierzbicki, C., Wombwell, E., Zamudio, K.R., Aanensen, D.M., James, T.Y., Thomas, M., Weldon, C., Bosch, J., Balloux, F., Garner, T.W.J., Fisher, M.C., 2018. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science* (80-.). 360, 621–627. <https://doi.org/10.1126/science.aar1965>
- Piotrowski, J.S., Annis, S.L., Longcore, J.E., 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96, 9–15. <https://doi.org/10.1080/15572536.2005.11832990>
- Ramsey, J.P., Reinert, L.K., Harper, L.K., Woodhams, D.C., Rollins-Smith, L.A., 2010. Immune defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus linked to global amphibian declines, in the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Infect. Immun.* 78, 3981–3992. <https://doi.org/10.1128/IAI.00402-10>
- Rollins-Smith, L.A., 2009. The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.008>
- Rollins-Smith, L.A., Ramsey, J.P., Pask, J.D., Reinert, L.K., Woodhams, D.C., 2011. Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: Impacts of changing environments, in: *Integrative and Comparative Biology*. pp. 552–562. <https://doi.org/10.1093/icb/icr095>

- Rollins-Smith, L.A., Ramsey, J.P., Reinert, L.K., Woodhams, D.C., Livo, L.J., Carey, C., 2009. Immune defenses of *Xenopus laevis* against *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)* 1, 68–91.
- Roznik, E.A., Sapsford, S.J., Pike, D.A., Schwarzkopf, L., Alford, R.A., 2015. Natural disturbance reduces disease risk in endangered rainforest frog populations. *Sci. Rep.* 5. <https://doi.org/10.1038/srep13472>
- Ruggeri, J., De Carvalho-E-silva, S.P., James, T.Y., Toledo, L.F., 2018. Amphibian chytrid infection is influenced by rainfall seasonality and water availability. *Dis. Aquat. Organ.* 127, 107–115. <https://doi.org/10.3354/dao03191>
- Sabino-Pinto, J., Bletz, M., Hendrix, R., Perl, R.G.G.B., Martel, A., Pasmans, F., Lötters, S., Mutschmann, F., Schmeller, D.S., Schmidt, B.R., Veith, M., Wagner, N., Vences, M., Steinfartz, S., 2015. First detection of the emerging fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* in Germany. *Amphib. Reptil.* 36, 411–416. <https://doi.org/10.1163/15685381-00003008>
- Sabino-Pinto, J., Veith, M., Vences, M., Steinfartz, S., 2018. Asymptomatic infection of the fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* in captivity. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30240-z>
- Salla, R.F., Rizzi-possignolo, G.M., Oliveira, C.R., Franco-belussi, L., Leite, D.S., M, E.C., Abdalla, F.C., Jenkinson, T.S., Toledo, L.F., 2018. Novel findings on the impact of chytridiomycosis on the cardiac function of anurans: sensitive vs . tolerant species. *PeerJ* 1–23. <https://doi.org/10.7717/peerj.5891>
- Savage, A.E., Zamudio, K.R., 2016. Adaptive tolerance to a pathogenic fungus drives major histocompatibility complex evolution in natural amphibian populations. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283, 20153115. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.3115>
- Scheele, B.C., Skerratt, L.F., Grogan, L.F., Hunter, D.A., Clemann, N., McFadden, M., Newell, D., Hoskin, C.J., Gillespie, G.R., Heard, G.W., Brannelly, L., Roberts, A.A., Berger, L., 2017. After the epidemic: Ongoing declines, stabilizations and recoveries in amphibians afflicted by chytridiomycosis. *Biol. Conserv.* <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.12.010>
- Schloegel, L.M., Toledo, L.F., Longcore, J.E., Greenspan, S.E., Vieira, C.A., Lee, M., Zhao, S., Wangen, C., Ferreira, C.M., Hipolito, M., Davies, A.J., Cuomo, C.A., Daszak, P., James, T.Y., 2012. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Mol. Ecol.* 21, 5162–5177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05710.x>
- Schmidt, B.R., Bozzuto, C., Lötters, S., Steinfartz, S., 2017. Dynamics of host populations affected by the emerging fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans*. *R. Soc. Open Sci.* 4, 160801. <https://doi.org/10.1098/rsos.160801>
- Scott Fites, J., Reinert, L.K., Chappell, T.M., Rollins-Smith, L.A., 2014. Inhibition of local immune responses by the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Infect. Immun.* 82, 4698–4706. <https://doi.org/10.1128/IAI.02231-14>
- Searle, C.L., Belden, L.K., Du, P., Blaustein, A.R., 2014. Stress and chytridiomycosis: Exogenous exposure to corticosterone does not alter amphibian susceptibility to a fungal pathogen. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 321, 243–253. <https://doi.org/10.1002/jez.1855>
- Smith, H.K., Pasmans, F., Dhaenens, M., Deforce, D., Bonte, D., Verheyen, K., Lens, L., Martel, A., 2018. Skin mucosome activity as an indicator of *Batrachochytrium salamandrivorans* susceptibility in salamanders. *PLoS One* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199295>
- Spitzen-Van Der Sluijs, A., Canessa, S., Martel, A., Pasmans, F., 2017. Fragile coexistence of a global chytrid pathogen with amphibian populations is mediated by environment and demography. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 284. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1444>
- 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., Kirst, K., Laudelout, A., Marin da Fonte, L.F., Nöllert, A., Ohlhoff, D., Sabino-Pinto, J., Schmidt, B.R., Speybroeck, J., Spikmans, F., Steinfartz, S., Veith, M., Vences, M., Wagner, N., Pasmans, F., Lötters, S., 2016. Expanding distribution of lethal amphibian fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1286–1288. <https://doi.org/10.3201/eid2207.160109>

- Spitzen-Van Der Sluijs, A., Stegen, G., Bogaerts, S., Canessa, S., Steinfartz, S., Janssen, N., Bosman, W., Pasmans, F., Martel, A., 2018. Post-epizootic salamander persistence in a disease-free refugium suggests poor dispersal ability of *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22225-9>
- Standish, I., Leis, E., Schmitz, N., Credico, J., Erickson, S., Bailey, J., Kerby, J., Phillips, K., Lewis, T., 2018. Optimizing, validating, and field testing a multiplex qPCR for the detection of amphibian pathogens. *Dis. Aquat. Organ.* 129, 1–13. <https://doi.org/10.3354/dao03230>
- Stegen, G., Pasmans, F., Schmidt, B.R., Rouffaer, L.O., Van Praet, S., Schaub, M., Canessa, S., Laudelout, A., Kinet, T., Adriaensen, C., Haesebrouck, F., Bert, W., Bossuyt, F., Martel, A., 2017. Drivers of salamander extirpation mediated by *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Nature* 544, 353–356. <https://doi.org/10.1038/nature22059>
- Stice, M.J., Briggs, C.J., 2010. IMMUNIZATION IS INEFFECTIVE AT PREVENTING INFECTION AND MORTALITY DUE TO THE AMPHIBIAN CHYTRID FUNGUS *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*. *J. Wildl. Dis.* 46, 70–77. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.1.70>
- Stockwell, M.P., Storrie, L.J., Pollard, C.J., Clulow, J., Mahony, M.J., 2015. Effects of pond salinization on survival rate of amphibian hosts infected with the chytrid fungus. *Conserv. Biol.* 29, 391–399. <https://doi.org/10.1111/cobi.12402>
- Thomas, V., Blooi, M., Van Rooij, P., Van Praet, S., Verbrugge, E., Grasselli, E., Lukac, M., Smith, S., Pasmans, F., Martel, A., 2018. Recommendations on diagnostic tools for *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, e478–e488. <https://doi.org/10.1111/tbed.12787>
- van Rooij, P., Martel, A., D’Herde, K., Brutyn, M., Croubels, S., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Pasmans, F., 2012. Germ tube mediated invasion of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amphibian skin is host dependent. *PLoS One* 7, e41481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041481>
- Van Rooij, P., Martel, A., Haesebrouck, F., Pasmans, F., 2015. Amphibian chytridiomycosis: A review with focus on fungus-host interactions. *Vet. Res.* <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0266-0>
- Van Rooij, P., Pasmans, F., Coen, Y., Martel, A., 2017. Efficacy of chemical disinfectants for the containment of the salamander chytrid fungus *Batrachochytrium salamandrivorans*. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186269>
- Woodhams, D.C., Alford, R.A., Marantelli, G., 2003. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Dis. Aquat. Organ.* 55, 65–67. <https://doi.org/10.3354/dao055065>
- Yap, T.A., Nguyen, N.T., Serr, M., Shepack, A., Vredenburg, V.T., 2017. *Batrachochytrium salamandrivorans* and the Risk of a Second Amphibian Pandemic. *Ecohealth.* <https://doi.org/10.1007/s10393-017-1278-1>
- Young, S., Whitehorn, P., Berger, L., Skerratt, L.F., Speare, R., Garland, S., Webb, R., 2014. Defects in host immune function in tree frogs with Chronic Chytridiomycosis. *PLoS One* 9, 107284. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107284>

Bijlagen

Bijlage I (soorten die vatbaar zijn voor Bs-infectie (Yap et al., 2017))

Table 1. Species Detected with *Batrachochytrium salamandrivorans*.

| Order | Family | Species name | Sample type | Location of specimen | Infection outcome | References |
|--------------------------|----------------|---|-------------------------------|-----------------------------------|---|--|
| Species native to Europe | | | | | | |
| Anura | Alytidae | <i>Alytes obstetricans</i> ^a | Laboratory | Not applicable | ~ 60% infection, 0% mortality in experimental infection trials | Stegen et al. (2017) |
| Caudata | Plethodontidae | <i>Hydromantes strinatii</i> | Laboratory | Not applicable | 100% mortality in experimental infection trials | Martel et al. (2014) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Ichthyosaura alpestris</i> ^a | Wild | Netherlands Belgium | Detected in wild populations Some evidence of disease in the wild Dose-dependent response in experimental infection trials; high doses lead to mortality, low doses lead to eventual pathogen clearance | Spitzen-van der Sluijs et al. (2016), Martel et al. (2014), and Stegen et al. (2017) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Lissotriton vulgaris</i> ^a | Wild | Netherlands Belgium Germany | Detected in wild populations Some evidence of disease in the wild | Spitzen-van der Sluijs et al. (2016) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Pleurodeles wahl</i> | Laboratory | Not applicable | 100% mortality in experimental infection trials | Martel et al. (2014) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Salamandra algira</i> (native to Northern Africa) | Captive | Germany | Lethal in captive specimens (sample size not given) | Sabino-Pinto et al. (2015) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Salamandra corsica</i> | Captive | Germany | Lethal in captive specimens (sample size not given) | Sabino-Pinto et al. (2015) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Salamandra infraimmaculata</i> (native to the Middle East) | Captive | Germany | Lethal in captive specimens (sample size not given) | Sabino-Pinto et al. (2015) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Salamandra salamandra</i> | Wild Captive Laboratory | Netherlands Belgium Germany | Mass mortalities in wild populations in the Netherlands and Belgium Detected in wild populations in Germany Lethal in captive populations 100% mortality in experimental infection trials | Martel et al. (2013), Martel et al. (2014), and Spitzen-van der Sluijs et al. (2016) |

Table 1. continued

| Order | Family | Species name | Sample type | Location of specimen | Infection outcome | References |
|------------------------|---------------|--|--------------------|----------------------|--|--|
| Caudata | Salamandridae | <i>Triturus cristatus</i> | Laboratory | Not applicable | 100% mortality in experimental infection trials | Martel et al. (2014) |
| Species native to Asia | | | | | | |
| Caudata | Hynobiidae | <i>Hynobius nebulosus</i> ^a | Wild | Japan | Detected in wild populations Disease disposition in the wild unknown | Martel et al. (2014) |
| Caudata | Hynobiidae | <i>Onychodactylus japonicus</i> ^a | Wild | Japan | Detected in wild populations Disease disposition in the wild unknown | Martel et al. (2014) |
| Caudata | Hynobiidae | <i>Salamandrella keyserlingii</i> ^a | Wild Laboratory | Japan | Detected in wild populations Disease disposition in the wild unknown 100% infection, 0% mortality in experimental infection trials | Martel et al. (2014) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Cynops cyanurus</i> ^a | Wild Laboratory | China | 100% infection, 60% mortality in experimental infection trials | Martel et al. (2014) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Cynops ensicauda</i> ^a | Wild | Japan | Detected in wild populations Disease disposition in the wild unknown | Martel et al. (2014) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Cynops pyrrhogaster</i> ^a | Wild Laboratory | Japan | Detected in wild populations 100% infection, 50% mortality in experimental infection trials | Martel et al. (2014) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Paramesotriton deloustali</i> ^a | Wild Laboratory | Vietnam | Detected in wild populations No sign of disease in the wild 100% infection, 75% mortality in experimental infection trials | Martel et al. (2014) and Laking et al. (2017) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Paramesotriton sp.</i> ^a | Wild | Vietnam | Detected in wild populations No sign of disease in the wild | Laking et al. (2017) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Tylototriton asperrimus</i> ^a | Wild | Vietnam | Detected in wild populations No sign of disease in the wild | Laking et al. (2017) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Tylototriton uyanoi</i> ^a | Wild | Thailand | Detected in wild populations Disease disposition in the wild unknown | Martel et al. (2014) |

Table 1. continued

| Order | Family | Species name | Sample type | Location of specimen | Infection outcome | References |
|---------------------------------|---------------|---|-------------|----------------------|--|--|
| Caudata | Salamandridae | <i>Tylototriton vietnamensis</i> ^a | Wild | Vietnam | Detected in wild populations No sign of disease in the wild | Laking et al. (2017) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Tylototriton wuxianensis</i> | Laboratory | Not Applicable | 100% mortality in experimental infection trials | Martel et al. (2014) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Tylototriton zieglerei</i> ^a | Wild | Vietnam | Detected in wild populations No sign of disease in the wild | Martel et al. (2014) and Laking et al. (2017) |
| Species native to North America | | | | | | |
| Caudata | Salamandridae | <i>Notophthalmus viridescens</i> | Laboratory | Not applicable | 100% mortality in experimental infection trials | Martel et al. (2014) |
| Caudata | Salamandridae | <i>Taricha granulosa</i> | Laboratory | Not applicable | 100% mortality in experimental infection trials | Martel et al. (2014) |
| Caudata | Sirenidae | <i>Siren intermedia</i> ^a | Laboratory | Not applicable | 100% infection, 0% mortality in experimental infection trials | Martel et al. (2014) |