

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2011- 2012

CHYTRIDIOMYCOSE BIJ AMFIBIEËN

door

Sarah FOCKEDEY

Promotor: Prof. Dr. Frank Pasmans
Medepromotor: Prof. Dr. An Martel

Literatuurstudie in het kader
van de Masterproef

De auteur en de promotor(en) geven de toelating deze studie als geheel voor consultatie beschikbaar te stellen voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van gegevens uit deze studie. Het auteursrecht betreffende de gegevens vermeld in deze studie berust bij de promotor(en). Het auteursrecht beperkt zich tot de wijze waarop de auteur de problematiek van het onderwerp heeft benaderd en neergeschreven. De auteur respecteert daarbij het oorspronkelijke auteursrecht van de individueel geciteerde studies en eventueel bijhorende documentatie, zoals tabellen en figuren. De auteur en de promotor(en) zijn niet verantwoordelijk voor de behandelingen en eventuele doseringen die in deze studie geciteerd en beschreven zijn.

VOORWOORD

Graag wil ik mijn dank betuigen aan mijn promotor, Prof. Dr. Frank Pasmans, voor het met raad en daad bijstaan, het ter beschikking stellen van artikels, de snelle en efficiënte hulp alsook de bemoedigende schouderklopjes. Ook mijn medepromotor, Prof. Dr. An Martel, de Universiteit Gent, de Faculteit Diergeneeskunde en in het bijzonder de vakgroep pathologie, bacteriologie en pluimveeziekten wil ik bedanken voor de hulp bij het realiseren van deze literatuurstudie.

Mijn ouders, broer en zus, mijn omgeving en mijn vrienden als nietsontziende steun en toeverlaat. Mijn nicht, Stephanie, die mij geholpen heeft bij de lay-out van dit alles. En laatst, maar zeker niet allerminst, de amfibieën zelf, die mij al van kindsbeen af weten te boeien en ervoor gezorgd hebben dat mijn kinderlijke verwondering bewaard is gebleven.

INHOUDSOPGAVE

Samenvatting	1
Inleiding- probleemstelling	1
Literatuurstudie	3
1. Etiologie	3
2. Epidemiologie	3
3. Pathogenese van chytridiomycose	5
3.1. Normale structuur en functie van de amfibieënhuid	5
3.2. Fysiologie van de amfibieënhuid	6
3.3. Levenscyclus van <i>B. dendrobatidis</i>	6
3.4. Interactie tussen <i>B. dendrobatidis</i> en de gevoelige gastheer	8
3.5. Afweer van de amfibie tegen <i>B. dendrobatidis</i>	10
3.6. Reorganisatie van het immuunsysteem tijdens de metamorfose	12
3.7. Factoren die het immuunsysteem kunnen beïnvloeden	12
3.8. Persistentie	13
4. Letsels en symptomen	14
4.1. Klinische presentatie	14
4.2. Factoren die de klinische presentatie kunnen beïnvloeden:	15
4.2.1. Stadium in de levenscyclus van de amfibie	15
4.2.2. Verschillende speciesgevoeligheid voor <i>B. dendrobatidis</i>	15
4.2.3. Verschil in virulentie bij verschillende stammen van <i>B. dendrobatidis</i>	16
4.2.4. Omgevings- en lichaamstemperatuur	17
5. Diagnose	18
5.1 Staalname:	18
5.1.1. Swabben	18
5.1.2. ‘Bathing’	19
5.1.3. Filteren van het badwater	19
5.1.4. ‘Toe clipping’	19
5.2. Diagnostische technieken	19
5.2.1. Histologie en immunohistochemie	20
5.2.2. TaqMan PCR assay	20
6. Behandeling	21
7. Bestrijding	23
8. Toekomst	24
Referentielijst:	25

SAMENVATTING

Deze literatuurstudie geeft een overzicht van de beschikbare literatuur die handelt over *Batrachochytrium dendrobatidis* infecties die de ziekte chytridiomycose veroorzaakt bij amfibieën. Er wordt dieper ingegaan op de etiologie, epidemiologie en pathogenese van de ziekte, in het bijzonder de immunemechanismen die de amfibie bezit ten opzichte van de schimmel. Ook klinische presentatie, diagnose, behandeling en bestrijding worden uitgediept. Tot slot wordt even stilgestaan bij de toekomst die wildlevende amfibieën wereldwijd nog hebben, in aanwezigheid van de schimmel *B. dendrobatidis*.

SUMMARY

This literature study gives an idea of the literature and data available about the subject *Batrachochytrium dendrobatidis* and chytridiomycosis, a disease frequently found in amphibian species. Etiology, epidemiology and pathogenesis of the disease are to be discussed, in particular the immune mechanisms amphibians have in order to defeat the fungus. In addition, clinical presentation, diagnostic assays, treatment and control are being put under attention. Finally, the question is being asked if wild amphibians, all over the world, still have a future with the fungus *B. dendrobatidis* breathing in their necks.

Key words: amphibian pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*, chytrid fungus, chytridiomycosis

INLEIDING- PROBLEEMSTELLING

Deze literatuurstudie handelt over de schimmel *Batrachochytrium dendrobatidis* en de ziekte chytridiomycose waarvoor deze schimmel verantwoordelijk is. Chytridiomycose komt wereldwijd voor en veroorzaakt een golf van uitsterven onder amfibieën, vergelijkbaar met het uitsterven van de dinosauriërs, zo'n 65 miljoen jaar geleden (Pasmans 2012).

De schimmel interfereert met de fysiologische werking van de amfibieënhuid en uit zich klinisch als lethargie, een abnormale zithouding, vertraagde respons op stimuli zoals porren, het zich niet meer kunnen oprichten, hyperkeratose, anorexie en uiteindelijk sterfte 10 tot 47 dagen na infectie (Nichols et al. 2001 en Daszak et al. 2005).

Hoe *B. dendrobatidis* juist sterfte veroorzaakt is nog niet helemaal duidelijk. Wel is er reeds een duidelijk protocol voor diagnosestelling en behandeling van de schimmel bij amfibieën in gevangenschap voorhanden. Of deze controlemaatregelen ook bij wildlevende amfibieën toepasbaar zijn moet nog verder worden onderzocht. Problemen, zoals de onmogelijkheid om de werkzame dosis van antifungale middelen te bekomen, alsook de verstoring van de fungale componenten van het ecosysteem die daarmee gepaard zou gaan, steken al snel de kop op (Daszak et al. 2005). Daarom dat bij wildlevende populaties een investering in een protocol voor prevalentie en monitoring van de ziekte mogelijks een betere denkpiste zou kunnen zijn.

Het eerste klinische geval van chytridiomycose, vastgesteld in België, dateert van 2010. Dit eerste geval van sterfte ten gevolge van chytridiomycose was een recent gemetamorfoseerde vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*), gevonden in een wildlevende populatie ter hoogte van Marche-en-Famenne (Pasmans et al. 2010). Deze problematiek is dus niet langer een 'ver-van-mijn-bed-show' en vereist inzicht en verder wetenschappelijk onderzoek om de infectie te bestrijden en het steeds sneller slinken van amfibieënpopulaties aan banden te leggen.

LITERATUURSTUDIE

1. ETIOLOGIE

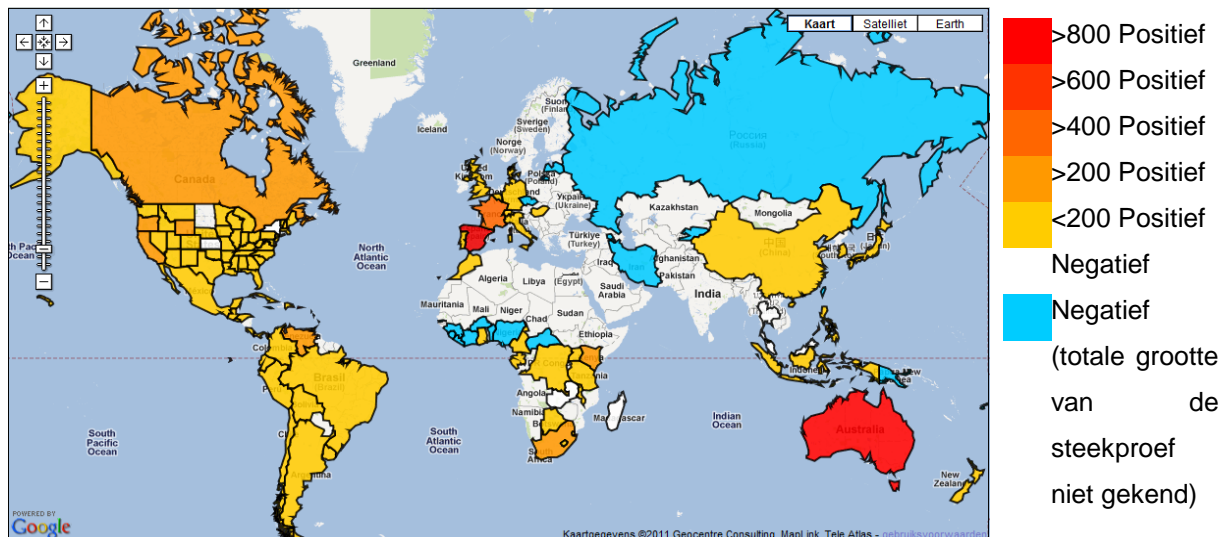
De schimmel *Batrachochytrium dendrobatidis*, die in staat is amfibieën te infecteren met al dan niet de ziekte chytridiomycose tot gevolg, behoort tot het phylum van de Chytridiomycota, Klasse Chytridiomycetes, Orde Chytridiales en genus *Batrachochytrium* (Longcore et al. 1999).

Schimmels die behoren tot de Klasse van de *Chytridiomycota* hebben typisch een aquatische levensstijl en worden gekenmerkt door de aanwezigheid van zoösporen die zich voortbewegen met een enkelvoudige flagel, die naar achteren is gericht. Vele chytride species worden beschreven als vrijlevende of commensale organismen die zich huisvesten in waterige milieus en bodems. Ze zijn gekend als parasieten van algen, invertebraten, fungi en planten (Gleason et al. 2007). Ultrastructureel onderzoek van de morfologie van de zoösporen (die gebruikt wordt om de verschillende ordes en genera van elkaar te onderscheiden), de aanwezigheid van een amfibie als gastheer en ribosomale DNA sequenties tonen aan dat *B. dendrobatidis* echter helemaal anders is dan andere, gekende, chytriden. *B. dendrobatidis* is het enige lid van het Phylum *Chytridiomycota* dat erin slaagt vertebraten te parasiteren (Berger et al. 2005a).

De schimmel dankt zijn naam aan de blauwe pijlgifkikkers (*Dendrobates azureus*), de groen-met-zwarte pijlgifkikkers (*Dendrobates auratus*) en de witte boomkikkers (*Litoria caerulea*) die in 'The National Zoologic Park' in Washington, USA, gedurende de periode 1996-1998 stierven aan een unieke huidziekte, geassocieerd met sferische eukaryote organismen gelokaliseerd in de epidermis. Uit deze species werd *B. dendrobatidis* voor het eerst geïsoleerd en benoemd. "Batrach" zijnde kikker en "chytr" verwijzende naar de lege sporangia die doen denken aan de vorm van een aarden pot (Longcore et al. 1999).

2. EPIDEMIOLOGIE

Niettegenstaande *B. dendrobatidis* relatief recent werd 'ontdekt' wordt de schimmel toch beschouwd als een belangrijke boosdoener wat betreft de populatiedaling van amfibieën wereldwijd. De schimmel infecteerde reeds 350 amfibieënspecies, terug te vinden op alle continenten van de wereld, uitgezonderd Antarctica (Fisher et al. 2009). Reeds bij 200 van deze 350 species werd een significante populatiedaling gezien en werd *B. dendrobatidis* met de vinger gewezen (Skerratt et al. 2007). *B. dendrobatidis* behoort hierdoor tot een select groepje van virulente pathogenen die een stempel hebben gedrukt op gehele populaties en ecosystemen. Hiermee verdient de schimmel een plaats naast onder andere het West Nile virus, het panzoötische influenzavirus bij vogels en de runderpest in Afrika (Fisher et al. 2009).



Figuur 1: screenshot, genomen van de site [HTTP://WWW.SPATIALEPIDEMIOLOGY.NET/BD-MAPS/](http://www.spatialepidemiology.net/bd-maps/). Op een GoogleMaps wereldkaart wordt de voorlopig gekende globale verspreiding van *B. dendrobatidis* weergegeven aan de hand van het aantal positieve en negatieve rapporteringen.

De bakermat van *B. dendrobatidis* zou volgens Weldon et al. (2004) terug te vinden zijn in Afrika. Het vroegste bewijs van *B. dendrobatidis* werd gevonden in huidstalen van de Afrikaanse klauwkikker, *Xenopus laevis*, geïsoleerd in 1938. James et al. (2009) vonden echter, na genetisch onderzoek, een sterkere allelische diversiteit in isolaten van de Noord-Amerikaanse stierkikker *Rana catesbeiana*, dan in isolaten van de species *Xenopus laevis*. Zij suggereerden dan ook dat niet Afrika maar wel Noord-Amerika de bakermat zou zijn en zetten zo de Afrika-stelling op de helling.

De *Xenopus laevis*-species werden gedurende de jaren 1930-1960 wereldwijd verhandeld daar ze hun nut bewezen in de zwangerschapsdiagnostiek in de humane geneeskunde. Verspreiding van de schimmel door menselijk toedoen is dan ook een plausibele verklaring voor de globale verspreiding van chytridiomycose (Weldon et al 2004). Ook de handel in bepaalde amfibieënsoorten die relatief ongevoelig zijn voor het ontstaan van een klinische infectie werkten de verspreiding in de hand. Deze species, die drager zijn van een *B. dendrobatidis* infectie zonder morbiditeit te vertonen, fungeren als reservoirs voor de ziekte. Toch komt *B. dendrobatidis* ook voor in gebieden waar introductie door de mens weinig waarschijnlijk wordt geacht. De mogelijkheid van *B. dendrobatidis* tot persistentie wordt hier gesuggereerd en alhoewel nog geen sluitend bewijs werd geleverd werd er wel reeds *B. dendrobatidis* DNA teruggevonden in waterlichamen en op stenen (Kirhstein et al. 2007).

Op de vraag of *B. dendrobatidis* een nieuwe snel verspreidende of een wereldwijd aanwezige endemische pathogeen is, zijn 2 hypothesen van toepassing. Enerzijds is er de 'nieuwe pathogeen hypothese' (NPH), anderzijds de 'endemische pathogeen hypothese' (EPH) (Rachowicz et al 2005). Deze laatste suggereert dat *B. dendrobatidis* een wijdverspreide endemische commensaal of symbiont van amfibieën is die, gedreven door veranderingen in het milieu (zoals de opwarming van de aarde), een grotere virulentie heeft bekommen (Pounds et al. 2006). Het is nodig deze 2 hypothesen van elkaar te onderscheiden daar de maatregelen, die moeten genomen worden om een verspreiding of uitbraak tegen te gaan, in beide gevallen verschillend zijn. Genetisch onderzoek van *B. dendrobatidis* kan hierbij een hulpmiddel zijn. Rachowicz et al. (2005) suggereert dat de NPH wel eens de juiste zou kunnen zijn, maar zolang er niet geweten is wat juist de genetische variatie mag zijn in een endemische stam, zou conclusies trekken te voorbarig zijn.

Hoe en waarom *B. dendrobatidis* zo snel verspreid is nog niet duidelijk. Is *B. dendrobatidis* een snelverspreidende pathogeen of is die verspreiding het gevolg van een evenwichtsverschuiving in een voorheen stabiele associatie tussen pathogeen en gastheer? Welke factoren bepalen een uitbraak van chytridiomycose? Wat is de onderliggende genetische basis van de virulentie van *B. dendrobatidis*? Deze en nog vele andere vragen blijven, zelfs na meer dan 10 jaar intensief onderzoek, nog steeds zo goed als onbeantwoord (Fisher et al. 2009).

3. PATHOGENESE VAN CHYTRIDIOMYCOSE

3.1. Normale structuur en functie van de amfibieënhuid

In de pathogenese van chytridiomycose speelt de amfibieënhuid een belangrijke rol. De huid functioneert enerzijds als barrière tegen *B. dendrobatidis* en anderzijds als ingangspoort voor de schimmel.

De amfibieënhuid bestaat uit een epidermis, een dermis en een hypodermis. De epidermis is opgebouwd uit meerdere lagen epitheelcellen (gemiddeld 5 tot 7 lagen) met gespecialiseerde celtypes. Deze epidermale lagen worden, van diep naar oppervlakkig, ingedeeld in: het stratum germinativum, stratum spinosum, stratum granulosum en het stratum corneum. Ter hoogte van het stratum germinativum, ook wel basale cellaag genoemd, vindt de celdeling plaats. Deze nieuwgevormde cellen migreren vanaf de basale laag naar de oppervlakte van de huid terwijl ze differentiëren. Eens ter hoogte van het stratum corneum gekomen zijn de cellen gedifferentieerd en gekeratiniseerd tot keratinocyten (Erspamer et al. 1994). Deze keratinocyten zijn van groot belang in de pathogenese van chytridiomycose daar *B. dendrobatidis* zich daar huisvest, alsook in de minder gedifferentieerde cellen in de diepere epidermale lagen van de epidermis (Berger et al. 2005a).

Naast de aanwezige keratinocyten in de huid, spelen ook secretorische huidklieren een belangrijke rol in de pathogenese van de infectie. Deze bieden een defensiemechanisme tegen potentiële pathogenen (Clarke et al. 1997). Er zijn 2 soorten huidklieren aanwezig, namelijk muceuze en sereuze klieren. Deze laatste worden ook wel eens granulaire of gifklieren genoemd.

De muceuze huidklieren produceren geglycosyleerde mucines (Schumacher et al. 1994) en mucopolysacchariden (Duellman en Treub 1986) en hebben als functie: uitdroging vermijden, lichaamstemperatuur regelen en het beschermen van de huid tegen schuur- en schaafwonden (Clarke et al. 1997).

De sereuze huidklieren produceren bioactieve peptiden zoals neuropeptiden en antimicrobiële peptiden die een rol spelen in de defensie tegen predatoren en de invasie van micro-organismen (Rollins-Smith 2009).

Er moet echter rekening gehouden worden met zowel individuele verschillen tussen amfibieën als speciesverschillen wat betreft integument en sereuze klieren. Deze laatste kunnen verschillen qua aanwezigheid (Erspamer et al 1994), verspreiding, morfologie en functionele eigenschappen van de secreties (Bevins et al 1990).

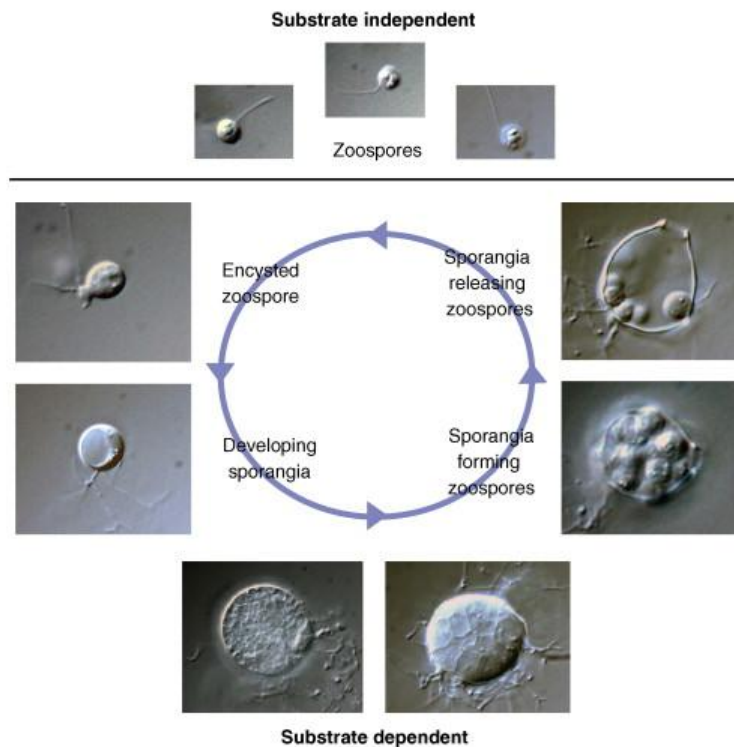
3.2. Fysiologie van de amfibieënhuid

De amfibieënhuid vormt de barrière tussen het hypo-osmotische externe milieu en het hyperosmotische interne milieu van de amfibie. Een osmotische balans wordt verkregen door een actieve regulatie van het elektrolyten- en watertransport doorheen de huid. Dit elektrolyttransport omvat de elektrolyten natrium, magnesium, chloor en kalium (Berger et al 2005a). Ook voor gassen is de huid permeabel. De permeabiliteit voor water, elektrolyten en respiratoire gassen varieert naargelang de plaats of het lichaamsoppervlak van het individu en naargelang de species (Erspamer et al 1994).

Van belang in de fysiologie is ook het proces van vervellen dat bij gezonde amfibieën regelmatig plaatsvindt. Het proces, waarbij de buitenste gekeratiniseerde laag wordt afgestoten en een nieuwe stratum corneum wordt gevormd, is afhankelijk van de species-specifieke fysiologie alsook van het gedrag van de amfibie. Ook de frequentie van vervellen varieert naargelang de species en kan variëren van een aantal dagen tot verschillende weken, afhankelijk van o.a. temperatuur, leeftijd, grootte en geslacht (Larsen et al. 1976).

3.3. Levenscyclus van *B. dendrobatidis*

De levenscyclus van *B. dendrobatidis* bestaat uit 2 fasen. De eerste fase bevat de beweeglijke zoösporen. Deze bevinden zich in het water en zorgen voor de verspreiding van de pathogeen. De tweede fase bevat de stationaire, monocentrische thallus (het parasitaire stadium in de huid van de amfibie) die ontwikkelt tot het zoösporangium waar de asexuele vermeerdering plaatsvindt, met vorming van nieuwe zoösporen. De totale levenscyclus *in vitro* duurt, bij 22°C, zo'n 4 tot 5 dagen. Aangenomen wordt dat dit *in vivo* ook zo is, maar verder onderzoek moet dit nog uitwijzen (Berger et al. 2005a).

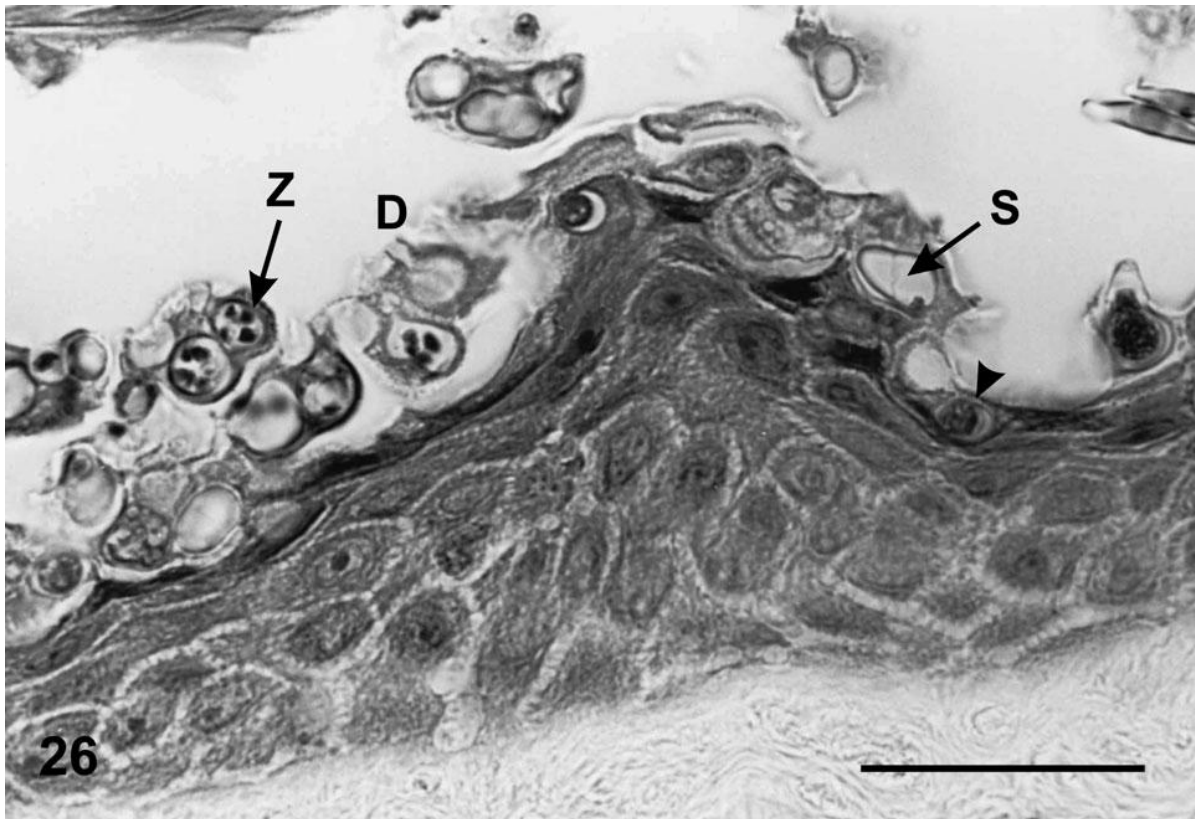


TRENDS in Ecology & Evolution

Figuur 2: De levenscyclus van *B. dendrobatidis* (naar Kilpatrick et al 2010). De eerste fase, bestaat uit geflagelleerde zoösporen die vrijlevend zijn en niet afhankelijk van enig substraat. Dit in tegenstelling tot de tweede fase die wel substraatafhankelijk is. De diameter van deze zoösporen bedraagt zo'n 3 tot 5 μm . De flagellen zijn 19 à 20 μm lang (Longcore et al. 1999).

Infectie gebeurt door zoösporen van *B. dendrobatidis* die zich vastzetten op de huid of de monddelen van de respectievelijk volwassen amfibie en de larven. Vervolgens gaan deze zoösporen encystreren. Gedurende dit encystreren resorberen ze hun flagellum en vormen een celwand. Vanaf het stratum corneum migreert de schimmel naar het stratum granulosum waar het gezonde epidermale cellen binnendringt, groeit en ontwikkelt tot een sporangium, waarin de zoösporen ontwikkelen. Er kunnen zich tot 3 zoösporangia bevinden in één enkele epidermale cel.

Gedurende de normale fysiologie van de huid migreren deze geïnfecteerde epidermale cellen mee naar de oppervlakte, waarbij het zoösporangium rijpt. Wanneer het zoösporangium in de dode oppervlakkige gekeratiniseerde cellen terechtkomt zal de 'discharge papilla' versmelten met deze cellen en hun epidermale celmembranen oplossen zodat de zoösporen vrij kunnen komen. Soms gebeurt het echter dat de papil niet tot aan de oppervlakte reikt en dat de zoösporen ter hoogte van de intercellulaire ruimte terechtkomen. Deze gespecialiseerde adaptaties aan de amfibieënhuid suggereren dat *B. dendrobatidis* al een lange evolutie achter de rug heeft om in huid te kunnen overleven (Berger et al. 2005a).



Figuur 3: histologische coupe van de huid van een *Litoria caerulea* (naar Berger et al. 2005a). Kleuring: Haematoxyline en eosine kleuring. Maatstaf: 30 μm . Pijl: donkere immature stadia van *B. dendrobatidis*, in de diepere cellen. Z: mature zoösporangia met donkere bolvormige zoösporen. D: sporangium in het stratum corneum waar de zoösporen reeds vrijgekomen zijn via de papil. S: thallus met intern septum.

Zoösporen zijn beweeglijk vooraleer ze encystreren of sterven. Volgens Woodhams et al. (2008) en Piotrowski et al. (2001) is deze beweeglijkheid sterk temperatuursafhankelijk. Bij 23°C zouden zoösporen beweeglijk blijven gedurende 24 uur, bij 4-14°C wordt dit interval verlengd tot 48 uur. De richting waarin de zoösporen zich bewegen is volgens Moss et al. (2008) sterk gericht naar nutritionele signalen zoals glucose, lactose, cysteïne en keratine. Dit laatste is het belangrijkste bestanddeel van de huidcellen van de amfibie en monddelen van de larven.

3.4. Interactie tussen *B. dendrobatidis* en de gevoelige gastheer

Als gastheer werd door Carey et al. (2006) gebruik gemaakt van de species *Bufo boreas*. Deze *B. boreas* werden experimenteel blootgesteld aan *B. dendrobatidis* om zo de interactie tussen gastheer en pathogeen na te gaan. Een eerste opmerkelijke bevinding was dat de tijdspanne tussen blootstelling en sterfte sterk afhankelijk was van de dosis toegediende infectieuze zoösporen. Dit zou dus betekenen dat de mate van infectie een zekere drempel moet bereiken, met name $10^7 - 10^8$ zoösporen vooraleer sterfte wordt waargenomen.

Verder was deze tijdsspanne ook sterk afhankelijk van de duur van blootstelling en de lichaamsgrootte van de pad. Padden met een grotere massa overleefden langer bij een bepaalde dosis zoösporen dan padden met een kleinere lichaamsmassa.

Variatie in omgevingstemperatuur gaf geen significant verschil in overlevingsduur. De omgevingstemperatuur varieerde in deze experimenten tussen de 12°C en de 23°C.

Verder werd in deze studie aangetoond dat fysiek contact niet noodzakelijk is om de infectie te verspreiden. Er werd namelijk gevonden dat de infectie kan worden overgedragen via het zoösporenbevattende water waarin geïnfecteerde dieren verbleven.

Op de vraag hoe *B. dendrobatidis* sterfte veroorzaakt worden twee hypothesen vooropgesteld. Beiden worden tot op heden nog in vraag gesteld. Een eerste hypothese stelt dat sterfte wordt veroorzaakt door een verstoring in osmoregulatie ter hoogte van de huid. In een tweede hypothese wordt gesteld dat sterfte het gevolg zou zijn van een toxine, geproduceerd door *B. dendrobatidis*, dat de inwendige organen aantast (Voyles et al. 2007).

Ter ondersteuning van de eerste hypothese vonden Voyles et al (2009) bij amfibieën, aangetast door *B. dendrobatidis*, een hyperplasie en een hyperkeratose van de epidermis. Verder werd er ook een cytoplasmatische degeneratie en vacuolisatie van de diepere lagen van de epidermis waargenomen. Significante veranderingen in interne organen werden niet teruggevonden.

Deze morfologische veranderingen hadden een impact op de normale functie van de huid. Er vond een inhibitie van het elektrolytentransport doorheen de huid plaats, waardoor de elektrolytenconcentraties in het plasma gereduceerd werden. In bloedstalen, genomen van klinisch aangetaste dieren werd een verlaagd plasmagehalte aan natrium en kalium teruggevonden. Plasma albumineconcentratie, hematocriet en ureum werden stabiel bevonden. Dit alles zou leiden tot een verstoring van de elektrische hartactiviteit met een asystolische hartstilstand tot gevolg.

De hartstilstand zou volgens Voyles et al. (2009) eerder te maken hebben met het verlies aan elektrolyten uit de circulatie dan aan een verstoring van de osmoregulatie met een verhoogde wateropname als gevolg. Hypoxie zou ook een rol kunnen spelen in het ontstaan van een hartstilstand, alhoewel dat veranderingen in CO₂ levels nog niet zijn waargenomen in klinisch geïnfecteerde kikkers.

De tweede hypothese wordt ondersteund door Blaustein et al. (2005). Zij vonden dat met *B. dendrobatidis* geïnfecteerde larven reeds sterfte vertoonden vanaf 48 uur na blootstelling. Aangezien *B. dendrobatidis* in cultuur een generatietijd heeft van 4 dagen, werd hier gesuggereerd dat een toxine een mogelijke oorzaak kon zijn van de larvaire sterfte.

3.5. Afweer van de amfibie tegen *B. dendrobatidis*

Omdat de zoösporen zich moeten kunnen vastzetten op de huid om een infectie teweeg te brengen is een belangrijk aspect in de afweer tegenover *B. dendrobatidis* de mucus die een onderdeel vormt van de amfibieënhuid (Rollins-Smith et al. 2011).

Deze mucusbarrière bevat onder andere gesecreteerde antimicrobiële peptiden (Rollins-Smith 2009, Rollins-Smith en Conlon 2005) en een lysozyme (Zhao et al. 2006). Individuele gezuiverde antimicrobiële peptiden, waaronder Temporine A en structureel verwante peptiden (Rollins-Smith 2003), inhiberen de groei van *B. dendrobatidis*. Er werden reeds MIC waarden bekomen voor een veertigtal antimicrobiële peptiden (Rollins-Smith 2009).

De peptiden worden aangemaakt en opgestapeld in granules in de sereuze (granulaire of gif) klieren (Dockray en Hopkins 1975). Ze zijn werkzaam tegen Gram positieve en Gram negatieve bacteriën, fungi, protozoa en virussen (Nicolas en Mor 1995; Zasloff 2002; Apponyi et al. 2004), en zijn meer werkzaam tegen zoösporen dan tegen mature sporangia (Rollins-Smith et al. 2002b, 2002c)

De werking van de antimicrobiële peptiden zou volgens Yeaman en Yount (2003) te maken hebben met hun vermogen om, in een membraanachtig milieu een alfa-helix te vormen en zo de biologische membranen te verstoren. De aan- of afwezigheid van de antimicrobiële peptiden is speciesafhankelijk. Families waar de peptiden tot nu toe niet werden gevonden zijn: de Bufonidae, Ceratophryidae, Dicroglossidae, Eleutherodactylidae, Microhylidae, Pelobatidae, Pyxicephalidae, Rhacophoridae en Scaphiopodidae (Conlon 2011). Ramsey et al. (2010) toonden aan dat een depletie in antimicrobiële peptiden in *Xenopus laevis* resulteerde in een grotere vatbaarheid voor *B. dendrobatidis*. Aanpassingen op gebied van antimicrobiële huidpeptiden door natuurlijke selectiedruk zou dan ook een mogelijke respons zijn van de amfibieënpopulatie op *B. dendrobatidis* (Woodhams et al. 2010).

Daar de granulaire klieren omgeven zijn door een laag van myoepitheliale cellen, die op hun beurt geïnnerveerd zijn door sympatische axonen en alfa-adrenoreceptoren bevatten, zullen deze op epinefrine en norepinefrine reageren wat een contractie van de klier en een vrijstelling van de klierinhoud tot gevolg heeft (Rollins-Smith et al. 2011). Wanneer *X. laevis* en *Rana pipiens* worden achtervolgd, zoals bij een aanval door een predator, zal de vrijstelling van peptiden sterk toenemen en zal de peptidenconcentratie hoog genoeg zijn om de groei van *B. dendrobatidis* te inhiberen (Ramsey et al. 2010).

Ook de adaptieve immuniteit zou een rol spelen in de resistentie tegen *B. dendrobatidis*. Volgens Ramsey et al. (2010) bevat de mucus van de Afrikaanse klauwkikker (*Xenopus laevis*) antilichamen. Door immunisatie tegen *B. dendrobatidis* werden er verhoogde pathogeen-specifieke IgM en IgY serum antilichamen vastgesteld. Deze, samen met IgX, waren ook terug te vinden in de mucus secreties van de *X. laevis*. De antilichamen konden de binding aangaan met *B. dendrobatidis*.

Bij wijze van onderzoek of conventionele immunisatie, die een stijging van serum antilichamen teweegbrengt, soelaas kon bieden werd door Rollins-Smith et al. (2009) en Stice en Briggs (2010) *B. dendrobatidis* (gedood na verhitting) toegediend aan *Bufo boreas* en *Rana muscosa*. Het ontstaan van een beschermende immuunrespons kon echter niet worden opgemerkt bij deze species. Wel wordt gesuggereerd dat een protocol dat verhoogde mucosale antilichamen opwekt meer succes zou kunnen oogsten (Rollins-Smith et al. 2011).

Op de vraag of leukocyten een functie hebben in de afweer tegenover *B. dendrobatidis* vond Ramsey et al. (2010) dat een sublethale bestraling met X-stralen *X. laevis* vatbaarder maakte voor infectie en werd er een groter gewichtsverlies vastgesteld. De X-stralen zorgden enkel voor een daling van het aantal leukocyten, de werking van de granulaire klieren bleef ongemoeid.

Waarom de adaptieve immuniteit van *X. laevis* de infectie met *B. dendrobatidis* niet kan controleren moet nog verder onderzocht worden. Rollins-Smith et al. (2011) suggereert dat de fungus *B. dendrobatidis* zelf factoren zou kunnen produceren die de interactie aangaan met het immuunsysteem en de ontwikkeling van een celgemedieerde immuunrespons zouden kunnen tegengaan. Volgens Ramsey et al. (niet gepubliceerde gegevens) zouden deze factoren, gesecreteerd door levende of dode sporangia, apoptose van de lymfocyt populatie veroorzaken.

In de mucus kunnen ook *B. dendrobatidis* inhiberende metabole producten teruggevonden worden, afkomstig van symbiotische bacteriën die leven op de huid van de amfibie (Rollins-Smith 2011). Brucker et al. (2008a, 2008b) isoleerden bacteriën van *Plethodon cinereus* en vond dat deze de antifugale metabolieten 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG), violaceïne en indole-3-carboxaldehyde produceerden. Ook bij *Rana pipiens*, *Rana muscosa* en *Hyalinobatrachium colymbiphyllum* werden soortgelijke huidbacteriën gevonden (Woodhams et al 2007b, 2007c).

Harris et al. (2009) identificeerden enkele species van de huidbacteriën die *in vitro* *B. dendrobatidis* inhibeerden. Een van deze bacteriespecies werd vervolgens toegevoegd aan de huid van salamanders (*Plethodon cinereus*) die experimenteel geïnfecteerd waren. Er werd gevonden dat de negatieve effecten, teweeggebracht door een infectie met *B. dendrobatidis*, gereduceerd werden. Brucker et al. (2008b) voegde de bacterie *Janthinobacterium lividum* toe aan de huidmicrobiota van *Plethodon cinereus* en bekwam als resultaat een verhoogde secretie van het *B. dendrobatidis*-inhiberende volaceïne op de huid. Harris et al. (2009) suggereerde dan ook dat probiotische manipulatie van huidmicrobiota een potentiële denkpiste zou kunnen zijn om de vatbaarheid van amfibieën voor *B. dendrobatidis* in de natuur te kunnen reduceren.

3.6. Reorganisatie van het immuunsysteem tijdens de metamorfose

De ontwikkeling van het immuunsysteem gebeurt in 2 fasen. Een snelle expansie van lymfocyten gedurende de larvaire fase wordt gevolgd door een significant verlies aan lymfocyten gedurende het vergevorderde stadium van metamorfose. Deze daling zou veroorzaakt worden door een snelle stijging van corticosteroiden gedurende de metamorfose. Na dit verlies volgt een tweede expansie en ontwikkelt zich het immuunsysteem, terug te vinden bij de adulte amfibie (Rollins-Smith 1998).

Gedurende de metamorfose ondergaat ook de huid een transformatie. Dit, samen met de involutie van het adaptieve immuunsysteem, zou een mogelijkheid kunnen bieden voor de zoösporen van *B. dendrobatidis* om de larvaire monddelen te verlaten en de nieuwgevormde adulte huid op te zoeken. Zo zou *B. dendrobatidis* snel een enorme infectie kunnen veroorzaken (Rachowicz en Vredenburg 2004). Bovbjerg (1963) wijst er echter op dat, vanaf de transformatie, de productie van antimicrobiële peptiden begint. Deze nieuwgevormde eenheden van antimicrobiële peptiden hebben al de capaciteit om te beschermen tegen *B. dendrobatidis* wanneer het aantal zoösporen in de omgeving gelimiteerd is. Kanttekening hierbij is echter dat Wabnitz et al. (1998) reeds bij het larvaire stadium van sommige species antimicrobiële peptiden in de huidsecreties vonden.

3.7. Factoren die het immuunsysteem kunnen beïnvloeden

Rollins-Smith et al (1997) toonde aan dat de lymfocytenpopulaties onderdrukt kunnen worden door nanomolaire concentraties van corticosterone en aldosterone. Ruben et al (1994) voegde ook het synthetische steroïde dexamethasone toe aan het lijstje.

Gestegen concentraties van corticosterone worden gezien bij hongeren (Crespi en Denver 2005), metamorfose (Jaudet en Hately 1984) en voortplanting bij explosief-kwekende species (Orchinik et al. 1988). Ook kan een infectie met *B. dendrobatidis*, door een verstoring van ionentransport doorheen de huid, resulteren in een stijging van glucocorticoiden en mineralocorticoiden. Deze gestegen concentraties van corticosteroiden onderdrukken niet alleen de lymfocytenpopulaties maar ook de vernieuwing van de antimicrobiële huidpeptiden (Rollins-Smith et al. 2011).

Ook omgevingstemperatuur speelt een rol in de onderdrukking van het immuunsysteem volgens Rohr en Raffel (2010). Omdat *B. dendrobatidis* goed gedijt bij lage temperaturen, zou de immuniteit het onderspit moetend delven ten opzichte van de schimmel wanneer de omgevingstemperatuur begint te dalen.

Blootstelling van amfibieën aan pesticiden zou ook kunnen bijdragen tot een veranderde immuunrespons en dus ook tot een gewijzigde vatbaarheid voor parasieten of pathogenen (Rohr et al. 2009). Davidson et al (2007) vond dat, na blootstelling van *Rana boylei* aan het insecticidebestanddeel carbaryl, hun concentraties aan huidpeptiden sterk afnamen. Tot nu toe is er echter nog geen duidelijke link gevonden tussen de blootstelling aan pesticiden en een gestegen vatbaarheid voor *B. dendrobatidis* (Rollins-Smith 2011).

3.8. Persistentie

Zoals eerder vermeld kunnen larven dienen als reservoir voor *B. dendrobatidis*. De schimmel infecteert de monddelen van de larven maar veroorzaakt zelden mortaliteit. Volgens Rachowicz en Vredenburg (2004) zou de lengte van het larvaire stadium een rol spelen in de persistentie van *B. dendrobatidis*. Zo zou de lange larvaire periode bij *Rana yayapaiensis* de mogelijkheid bieden voor de schimmel om langer zoösporen uit te scheiden en zo het interval tussen geobserveerde seizoensafhankelijke uitbraken te overbruggen (Bradley et al 2002). De species *Afrana fuscigula*, die een lange larvaire periode van 2-4 jaar heeft, zou volgens Hopkins en Channing (2002) net daarom vatbaarder zijn voor een ernstige *B. dendrobatidis* infectie. Deze stelling wordt deels ontkracht door een uitzondering op de regel. Hoewel de Amerikaanse stierkikker *Rana catesbeiana* een lange larvaire periode doormaakt werd er slechts een laag niveau van infectie waargenomen. Ook mortaliteit kwam zelden voor (Bradley et al 2002).

Naast larven vormen ook species die minder gevoelig zijn voor *B. dendrobatidis* een mogelijk reservoir. Een voorbeeld van zo'n species is de hierboven vermelde stierkikker, *Rana catesbeiana* (Daszak et al. 2004). Ook zoetwatergarnalen kunnen volgens Rowley en Alford (2006) als mogelijke tijdelijke gastheer worden aangeduid.

Opmerkelijk is echter dat er niet noodzakelijk een amfibie in de buurt moet zijn opdat de schimmel zou overleven. Longcore et al. (1999) toonden aan dat, onder labo-omstandigheden, *B. dendrobatidis* in cultuur kon worden gebracht zonder de aanwezigheid van keratine, gebruik makende van een bouillon van verschillende nutriënten. Voorbeelden van mogelijke media zijn onder andere: lactose, glucose, asparagine, gist of mout extracten, sucrose, maltose, sorbitol en glycerol. Ook op steriele slangenhuiden blijkt *B. dendrobatidis* zeer goed te gedijen (Longcore et al. 1999).

Verder vonden Johnson en Speare (2005) dat ook vochtige aarde en veren van vogels als transportmedium voor de schimmel kunnen fungeren. Bij *in vitro* experimenten overleefde *B. dendrobatidis* tot 3 maanden lang in steriel, vochtig rivierzand, zonder toevoeging van andere nutriënten. Op steriele veren werd opgemerkt dat *B. dendrobatidis* zich kon vasthechten en groeien en kon worden overgebracht via de veren naar andere media, waar op hun beurt nieuwe culturen werden gevormd. Dit bleef mogelijk tot 1 à 3 uur na drogen van de veren.

Garmyn et al. (2012) voegde ook ganzenpoten toe aan het lijstje. Zij onderzochten 397 ganzen op de aanwezigheid van *B. dendrobatidis*, dit met behulp van real-time quantitative PCR. Van deze 397 bleken 76 ganzen positief te testen. Uit verder *in vitro* onderzoek bleek dat *B. dendrobatidis*, aangetrokken werd door de keratine-houdende tenen van de watervogels, waarop de schimmel zich kon vastklampen en vermenigvuldigen.

Dit alles zou kunnen verklaren waarom *B. dendrobatidis* erin slaagt te persisteren bij een zeer beperkt aantal gastheren, zoals wanneer een populatie bijna is uitgeroeid, en hoe de schimmel bij rekolonisatie van het territorium opnieuw kan toeslaan (Daszak et al. 2005).

4. LETSELS EN SYMPTOMEN

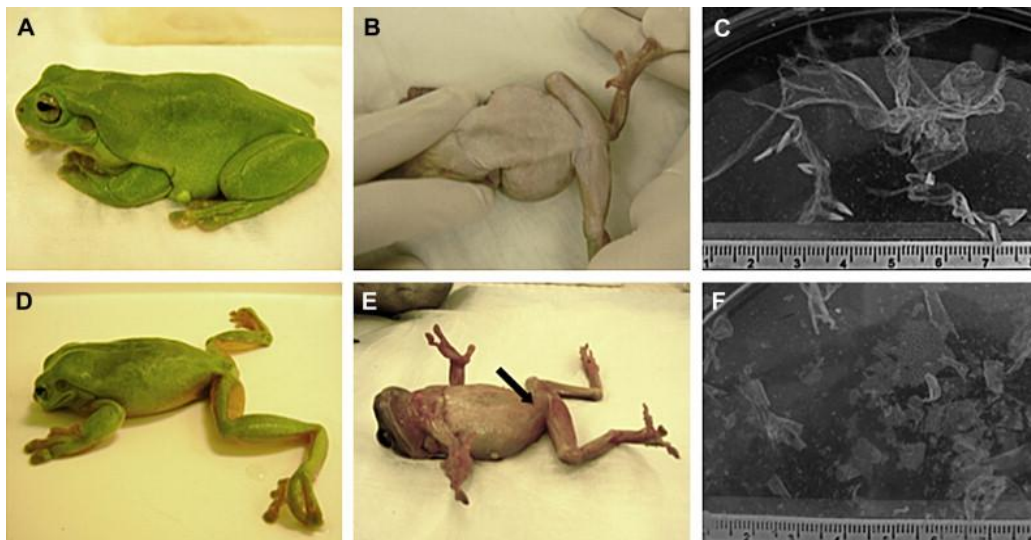
4.1. Klinische presentatie

Volgens Berger et al. (2005c) leidt infectie bijna altijd tot hyperkeratose rond de thallus. Ook onregelmatige multifocale hyperplasieën, ongeordende cellagen, erosies en ulceraties van de huid zouden het gevolg zijn van een infectie met *B. dendrobatidis*.

De dikte van de epidermis is zeer variabel. Op sommige plaatsen vindt er een diffuse of gelokaliseerde verdikking plaats terwijl de epidermis op andere plaatsen sterk verdunt. Pyknose of vacuolisatie van individuele epidermale cellen wordt af en toe gezien.

Larven van *Bufo boreas* die klinisch geïnfecteerd zijn met *B. dendrobatidis* vertonen desoriëntatie, lethargie en een verzwakte respons wanneer aangepord, en uiteindelijk sterfte (Blaustein et al. 2005). Deze klinische tekenen bij larven mogen echter niet veralgemeend worden. Aan- of afwezigheid van klinische symptomen is sterk afhankelijk van de species, stadium in de levenscyclus en habitat (Daszak et al. 2005).

Nichols et al. (2001) vond ook bij volwassen geïnfecteerde *Bufo boreas* gelijkaardige symptomen, namelijk, abnormale zithouding, lethargie, vertraagde respons op stimuli zoals porren, het zich niet meer kunnen oprichten, anorexie en sterfte. Daszak et al (2005) vermeldde ook een verhoogd voorkomen van vervellen, vooral ter hoogte van de poten en de buik van de amfibie.



Figuur 4: experimenteel geïnfecteerde *Litoria caerulea* en de veruiterlijking van klinische symptomen en het patroon van vervellen. A) lateraal aanzicht van een gezonde kikker. B) ventraal aanzicht van een gezonde kikker. C) één enkele huidschilfer van een gezonde kikker. D) een kikker met ernstige klinische symptomen te wijten aan chytridiomycosis. De kikker vertoont een abnormale houding met een verlaagde kopstand en geabduceerde achterpoten. E) een kikker die, na in rugligging gebracht te zijn, de onmogelijkheid heeft zich opnieuw om te draaien. De pijl duidt cutaan erytheem aan in de ventrale epidermis. F) verschillende kleine huidschilfers, verzameld uit het containerwater van een kikker met een ernstige chytridiomycosis infectie (Voyles et al. 2009).

Waarom de amfibieën hyperkeratose gaan vertonen is nog onduidelijk. Wel werd de schimmel reeds gevonden in de vervelde en afgestoten huid. Zo rees de hypothese dat dit vervellen een mogelijk hulpmiddel zou zijn om zich als amfibie te ontdoen van de infectie met *B. dendrobatidis*. (Davidson et al. 2003). Deze hypothese vond ook bijval bij Berger et al. (2004) die suggereerden dat een verhoogde frequentie van vervellen een mogelijke reden zou zijn waarom amfibieën zich kunnen ontdoen van infectie bij hogere temperaturen.

4.2. Factoren die de klinische presentatie kunnen beïnvloeden:

4.2.1. Stadium in de levenscyclus van de amfibie

Blaustein et al. (2005) toonden aan dat de monddelen van de *Rana cascadae* larven aangetast waren, ook al werden er geen klinische symptomen of mortaliteit vastgesteld. De orale deformaties zouden het graasvermogen van de larven negatief kunnen beïnvloeden en zo aanleiding geven tot een gereduceerde groei en een vertraagde ontwikkeling. Zo zou het lichaamsgewicht van de geïnfecteerde amfibie bij metamorfose lager zijn dan bij de controledieren (Parris 2004). Deze verlaagde conditie bij metamorfose zou aanleiding kunnen geven tot een verhoogde mortaliteit in de levensfase die daarop volgt.

Smith et al. (2007) vond echter geen bewijs dat orale chytridiomycose aanleiding gaf tot een verminderde groei van larven. Gedurende hun proefopzet werd opgemerkt dat geïnfecteerde larven van de species *Heleophryne natalensis* en *Strongylopus hymenopus* groter waren dan hun niet geïnfecteerde soortgenoten. Smith et al besloten hieruit dat het opgemerkte verschil in lichaamsgewicht niet het resultaat is van een verandering in groeisnelheid, maar eerder afhankelijk is van het tijdstip van infectie gedurende de larvaire ontwikkeling. Zo zouden grotere, meer ontwikkelde larven meer kans hebben om geïnfecteerd te raken.

Er zijn nog geen gegevens bekend aangaande een eventuele infectie bij ontwikkelende embryo's in ovo of gameten. Wel wordt dit als weinig waarschijnlijk beschouwd daar er in die stadia nog geen gekeratineseerde weefsels aanwezig zijn (Garner et al. niet gepubliceerde gegevens).

4.2.2. Verschillende speciesgevoeligheid voor *B. dendrobatidis*

De mate van aantasting door *B. dendrobatidis* verschilt sterk binnen verschillende species, populaties en individuen. Onder labo-omstandigheden varieert de graad van mortaliteit sterk, afhankelijk van species, leeftijd en omgevingstemperatuur. In het wild gaan sommige populaties ten onder aan de gevolgen van *B. dendrobatidis* terwijl andere een manier vinden om de initiële populatiedaling te overleven en te persisteren (Rosenblum et al. 2010).

De mogelijkheid tot kolonisatie door *B. dendrobatidis* en zo ontstaan van ziekte zou sterk afhankelijk zijn van het immuunmechanisme van de gastheer (zie 4.5. Immune mechanismen van de amfibie tegen *B. dendrobatidis*), zoals de mogelijkheid tot secretie van antimicrobiële peptiden (Yeaman en Yount 2003), aanwezigheid van pathogeen-specifieke IgM en IgY serum antilichamen (Ramsey et al. 2010) of *B. dendrobatidis* inhiberende metabole producten afkomstig van symbiotische bacteriën die leven op de huid van de amfibie (Rollins-Smith 2011).

Blaustein et al. (2005) onderzocht larven van 4 experimenteel geïnfekteerde amfibieënsoorten op interspecifieke verschillen in larvaire gevoeligheid voor *B. dendrobatidis*. Er werd enkel bij de geïnfekteerde *Bufo boreas* larven significante sterfte gezien ten opzichte van de controlegroep. Bij de andere soorten, *Rana cascadae*, *Rana catesbeiana* en *Hyla regilla* werd geen verschil gezien in overleving tussen de geïnfekteerde kikkers en de controlegroep. Ook de mate van aantasting van de monddelen verschilde naargelang de soort. De vastgestelde abnormaliteiten varieerden van deels tot volledig ontbreken van de gekeratiniseerde structuren van de tandenrijen of kaakscheden.

4.2.3. Verschil in virulentie bij verschillende stammen van *B. dendrobatidis*

Verschillende stammen van *B. dendrobatidis* vertonen op genetisch vlak vele gelijkenissen. Morehouse et al. (2003) onderzochten 35 stammen van de schimmel, via multilocus sequentie typering, op genetische diversiteit en verwantschap. Deze stammen waren afkomstig uit Noord-Amerika, centraal-Amerika, Afrika en Australië. Van de 10 loci die aan onderzoek werden onderworpen, werden slechts 5 gewijzigde nucleotide posities waargenomen bij deze 35 stammen. Aan de hand van deze bevinding wordt dan ook aangenomen dat deze verschillende stammen het resultaat zijn van recentelijke klonale expansie.

Fisher et al. (2009) vonden echter, naast genetische verschillen tussen verschillende isolaten, ook verschillen in eiwitprofielen, groei, fenotypische/morfologische symptomen en virulentie in *B. bufo*. Zo wordt er dan ook gesuggereerd dat de isolaten kunnen geclassificeerd worden volgens genotype en eiwitprofielen, alsook volgens de grootte van hun gevormde sporangia.

Dat deze stammen vele gelijkenissen vertonen wil echter niet zeggen dat ze amfibieën ook op dezelfde manier beïnvloeden. Berger et al. (2005b) onderwierpen 3 groepen van telkens 15 groene boomkikkers (*Litoria caerulea*) aan 3 verschillende isolaten van *B. dendrobatidis*. Alhoewel de mortaliteit bij deze 3 groepen telkens 100% bedroeg was er toch een verschil op te merken in de tijdsduur tot sterfte optrad. Het virulentieverschil van de 3 stammen zou te maken kunnen hebben met de omgeving en gastheer waaruit de stammen werden geïsoleerd maar ook met de *in vitro* handelingen die de stammen hebben moeten doorstaan en de tijd sinds isolatie. De stam met de hoogste virulentie was degene die het laatst was geïsoleerd.

4.2.4. Omgevings-en lichaamstemperatuur

Berger et al. (2004) onderzochten 241 vrijlevende amfibieën in Australië. Bij 133 van deze wilde kikkers was chytridiomycose de doodsoorzaak. Daarbij werd gevonden dat de incidentie van chytridiomycose hoger was gedurende de winter. Andere ziektes waren veel minder voorkomend en werden vooral gezien gedurende de lente of de zomer.

In een ander experiment werden 16 experimenteel geïnfecteerde kikkers onderworpen aan een omgevingstemperatuur tussen de 17 en de 23°C, 8 andere werden onderworpen aan 27°C. Van die 16 overleefde geen enkele kikker, van de 8 overleefden er 4. Wel moet opgemerkt worden dat het interval infectie-sterfte bij 27°C korter was dan bij lage temperaturen. De kikkers die de infectie overleefden waren volledig vrij van *B. dendrobatidis* na 98 dagen.

Wanneer echter experimenteel geïnfecteerde kikkers van het species *Litoria chloris* gedurende 16 uur aan 37°C werden blootgesteld werd gevonden dat deze kikkers zich konden ontdoen van *B. dendrobatidis*. Woodhams et al. (2003) suggereert dan ook dat thermale manipulatie van amfibieën, mits verder onderzoek, een veilige en effectieve manier zou kunnen zijn om *B. dendrobatidis* te elimineren in populaties in gevangenschap.

Dat niet alleen omgevingstemperatuur maar ook lichaamstemperatuur een belangrijke rol speelt in het verhaal werd aangehaald door Richards-Zawacki (2010). Zij testten de hypothese door middel van een combinatie van metingen van de lichaamstemperatuur en voorkomen van ziekte, voor en na de introductie van de schimmel bij *Atelopus zeteki*, ook wel de Panama gouden kikker genoemd. Hierbij werd ondervonden dat gedurende de epidemie vele gouden kikkers hun thermoregulatie bijstelden tot een lichaamstemperatuur hoger dan hun normale gemiddelde en dat de kans op infectie kleiner werd naarmate de lichaamstemperatuur steeg.

Met deze overwegingen in gedachten zou er een link kunnen gelegd worden tussen klimaatverandering en incidentie van chytridiomycose. Volgens Harvell et al (2002) zou de opwarming van de aarde een verspreiding van chytridiomycose tegengaan, daar de ziekte vooral geassocieerd is met koude, vochtige omstandigheden op grote hoogte, en zou chytridiomycose dus een van de weinige ziekten zijn waarop klimaatverandering een gunstige invloed zou hebben. Dit wordt echter genuanceerd door Pounds et al (2006) die duiden op het feit dat deze stelling niet opgaat voor tropische gebieden van Centraal Amerika en het Noord-oosten van Australië, waar de grootste verliezen worden opgetekend, geruggensteund door Bosch et al (2007) die hierbij ook de gematigde streken van de Alpen voegden. Opwarming van de aarde matigt namelijk in deze streken de zeer koude omstandigheden. Dit, samen met de winters die korter en milder worden, zou dan weer een stijging van chytridiomycose-incidentie kunnen teweegbrengen.

5. DIAGNOSE

5.1 Staalname:

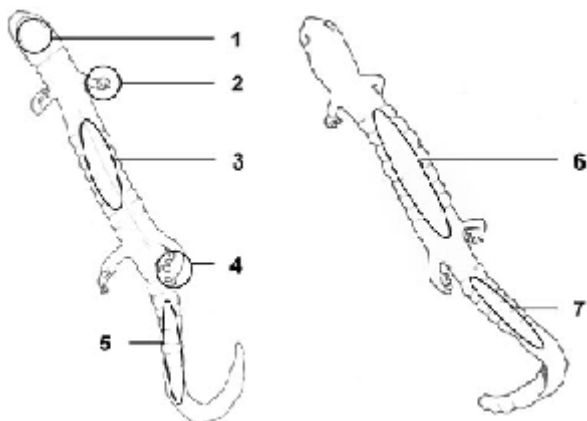
Vier onderzoeksprotocols werden door Hyatt et al. (2007) ontwikkeld en uitgetest. Allen zijn ze gebaseerd op het collecteren van huid, daar *B. dendrobatidis* een verhoogde frequentie van vervellen teweegbrengt en er bij licht- en electronenmicroscopisch onderzoek van deze vervelde huid de typische hyperkeratose en zoösporangia teruggevonden werden (Berger et al. 2005c).

5.1.1 Swabben:

Deze methode van staalname heeft de hoogste sensitiviteit en geniet dan ook de voorkeur. Het is een niet-invasieve methode die zowel in het laboratorium als in het veld op volwassen amfibieën en larven kan uitgevoerd worden (Hyatt et al. 2007).

North en Alford (2008) onderzochten de spatiale verspreiding van *B. dendrobatidis* op het integument en vonden een verband tussen de verschillende lichaamsregio's van *Litoria genimaculata* en het aantal aanwezige zoösporen. Vastgesteld werd dat de lichtste infecties terug te vinden waren ter hoogte van het abdomen en dat de zwaardere infecties zich vooral concentreerden ter hoogte van de poten en voeten van de kikker. De rug bleek niet of weinig geïnfecteerd. North en Alford (2008) suggereren dat staalname van zowel de poten als het abdomen een grotere sensitiviteit oplevert dan wanneer één enkele regio wordt gewabd. Bij kikkervisjes zou het swabben moeten gebeuren in de orale gekeratiniseerde regio (Hyatt et al. 2007).

Of deze plaatsen van staalname ook bruikbaar zijn bij salamanders werd onderzocht door Van Rooij et al. (2011). Zeven regio's werden gewabd bij Mexicaanse longloze salamanders.



Figuur 5: schematische voorstelling van de lichaamsdelen die werden gewabd voor diagnose van *B. dendrobatidis* bij Mexicaanse Bolitoglossine salamanders (naar Van Rooij et al. 2011): 1) de kin 2) de plantaire zijde van de linker voorpoot 3) ventrale zijde van het abdomen 4) plantaire zijde van de linker achterpoot 5) ventrale zijde van de staart 6) de rug 7) dorsale zijde van de staart.

Van deze 7 bemonsterde lichaamsdelen werd *B. dendrobatidis* (in vergelijking met bemonsterd lichaamsoppervlak) het meest teruggevonden ter hoogte van het bekken, achterpoten, voorpoten en de ventrale zijde van de staart. Hieruit wordt besloten dat deze regio's het meest geschikt zijn voor bemonstering en diagnose van een *B. dendrobatidis* infectie bij salamanders (Van Rooij et al. 2011)..

5.1.2. 'Bathing'

'Bathing', waarbij de kikkers worden ondergedompeld in een bad met de bedoeling de sporen te laten vrijkomen uit de amfibieënhuid, kan ook geschikte stalen opleveren. Dit protocol is onafhankelijk van de tijd van baden. Nadeel van deze techniek is dat bij bewaren van deze staalnames tot 70 procent van de zoösporen verloren gaan. Dit zou te wijten zijn aan het feit dat de zoösporen zich vasthechten aan het oppervlak van de containers waarin het water bewaard wordt. Dit verlies aan zoösporen zou teniet gedaan kunnen worden door het badwater te centrifugeren binnen de acht uur na collectie en bij kamertemperatuur te bewaren.

5.1.3. Filteren van het badwater

Hierbij wordt het filtermembraan na filteren van het badwater onderzocht. Dit protocol is niet aangewezen daar het membraan van wegwerpfilters moeilijk van de filter kan gehaald worden en er kruiscontaminatie kan optreden bij gebruik van herbruikbare filters.

Zowel 'bathing' als filtreren hebben een gelijkaardige sensitiveit maar zijn onmogelijk uit te voeren in veldomstandigheden. Ze kunnen echter wel zoösporen collecteren van het gehele dier en zo de beste en meest betrouwbare benadering geven van het totaal aantal zoösporen, aanwezig op het dier.

5.1.4. 'Toe clipping'

Dit protocol, waarbij een teen wordt afgeknipt voor onderzoekdoeleinden, detecteert een hoger aantal zoösporen dan andere protocols gedurende het beginstadium van een infectie. Daar de pathogeen zich dan in het stratum granulosum en corneum bevindt wordt hyperkeratose en vervellen nog niet gezien en is een detectie van de schimmel via swabben of badwater onderzoek dan ook minder waarschijnlijk.

Dit alles in overweging gebracht besloten Hyatt et al. (2007) dat swabben de meest aangewezen techniek voor staalname is.

5.2. Diagnostische technieken

Zowel histologie, immuno-histochemie als TaqMan PCR maken het mogelijk de diagnose van *B. dendrobatidis* te stellen. Wel zijn histologische onderzoeken significant minder sensitief (Hyatt et al. 2007).

5.2.1. Histologie en immunohistochemie

Beide technieken kunnen uitgevoerd worden op huidstalen, verkregen door swabbing of het afknippen van een teen. Bij larven kan een deel van de gekeratiniseerde monddelen gebruikt worden. Deze laatste moeten na staalname geëthanaseerd worden.

Het verkregen weefsel wordt, na fixatie in 10% formaldehyde of 10% alcohol ingebed in paraffine. Sneden van 5 µm worden gekleurd met een haematoxyline en eosine kleuring en onder de microscoop onderzocht op aanwezigheid van sfeervormige, 6-15 µm grote sporangia en eventueel daarbijhorende papillen (Berger et al. 1999). In geval van immunohistochemie wordt er geen HE kleuring gedaan maar worden er anti-konijn of anti-schaap immunoglobulines, gemerkt met fluoresceïne isothiocyanaat, toegevoegd. Deze immunoglobulines werden verkregen door respectievelijk konijnen of schapen te injecteren met *B. dendrobatidis* antigeen op 0, 7 en 11 weken. Na dertien weken werden serumstalen afgenomen en 1000 maal verdund. Het preparaat kan bekeken worden met een fluorescentiemicroscoop (Berger et al. 2002).

Histologie en immunohistochemie kunnen gebruikt worden voor diagnose van de pathogeen daar *B. dendrobatidis* de enige is van de Chytridiales die vertebraten infecteert en andere schimmels, zoals *Mucor amphibiorum*, die amfibieën infecteren niet reageren op de gebruikte antilichamen. De zwakte van de test zit hem echter in de sensitiviteit. De kans dat de schimmel terug te vinden is in het te onderzoeken huidstaal is terug te brengen op het stadium van infectie en het feit of het staal al dan niet geïnfecteerde huid omvat. Dit laatste valt te omzeilen door geavanceerde technieken waarbij men de buitenste gekeratiniseerde epidermis kleurt. Afwezigheid van kleur en dus afwezigheid van een gekeratiniseerde laag duidt erop dat het dier op die plaats onlangs vervelde en dat die huid dus niet voor diagnose bruikbaar is. Dus, bij gebruik van histologie of immunohistochemie, van eenzelfde staalname of van verschillende staalnames (bij verschillende tijdstippen) van hetzelfde dier meerdere secties onderzocht moeten worden (Hyatt et al. 2007).

Argumenten tegen het gebruik van deze technieken zijn de onmogelijkheid om *B. dendrobatidis* op te sporen in een vroeg stadium van infectie, de lage specificiteit van de testen en het feit dat ervaring en expertise van toepassing is. Voordelen zijn dan weer de mogelijkheid van het screenen op andere infectieuze agentia alsook het bekomen van archiefmateriaal die kan gebruikt worden in andere, niet gerelateerde onderzoeken (Hyatt et al. 2007).

5.2.2. TaqMan PCR assay (Hyatt et al. 2007)

Deze techniek spoort, via primers, het fungale DNA van *B. dendrobatidis* op en kan de schimmel reeds detecteren 4 dagen na infectie. De test kan uitgevoerd worden op zowel huidschilfers, afgeknipte tenen, badwater na 'bathing', filters en swabs. Het succes van de test staat of valt met het gebruik van correcte standaarden en de nodige interne controle. Wanneer een staal op een gepaste wijze is verkregen, zoals een ventrale swab in plaats van een dorsale swab, en wanneer ook de bewaring op een correcte manier gebeurt, kunnen betrouwbare resultaten worden bekomen.

Belangrijke opmerking hierbij is dat men wel degelijk een onderscheid moet maken tussen infectie en ziekte. De ziekte chytridiomycose mag slechts geconcludeerd worden wanneer men te maken heeft met grote aantallen van de schimmel bij een klinisch ziek dier met histologisch aantoonbare letsels (Pasmans 2012).

6. BEHANDELING

Zowel voor dieren in gevangenschap, bedreigde wilde populaties alsook om spreiding van de ziekte tegen te gaan is een effectieve en veilige behandeling noodzakelijk. Om mortaliteit te voorkomen werden al verschillende antifungale middelen getest. Tien ervan werden door Berger et al (2009) onder de loep genomen. Om de minimale inhibitorische concentratie (MIC-waarde) van deze producten te bepalen werden 96 well plaatjes gevuld met verschillende concentraties van de 10 antifungale producten waaraan zoösporen van *B. dendrobatidis* werden toegevoegd. Of er inhibitie van encytering en groei van de zoösporen plaatsvond werd na vier dagen onder de microscoop onderzocht (tabel 1).

Tabel 1. Concentraties van antifungale producten waarbij inhibitie van encytering en groei van *B. dendrobatidis* zoösporen werd waargenomen (naar Berger et al. 2009)

Antifungaal product	Minimum concentratie waarbij na 30 minuten verlies van motiliteit optrad	MIC-waarde (resulteerde in dood van de zoösporen, tenzij anders vermeld.)
Benzalkonium chloride	6,25 µg/ml	<0,78 µg/ml
Povidone jood	312,5 µg/ml	312,5 µg/ml
Amfotericine B	50 µg/ml	3,125 µg/ml
Fluconazole	>100 µg/ml	<1,56 µg/ml, bij alle concentraties werd een onvolledige encytering waargenomen
Itraconazole	>100 µg/ml	<1,56 µg/ml, bij alle concentraties werd een onvolledige encytering waargenomen
Methyleen blauw	>100 µg/ml	<1,56 µg/ml
Mercurochroom	12,5 µg/ml	6,25 µg/ml
Natriumchloride	6,25 mg/ml	12,5 mg/ml, bij 6,25 mg/ml werden reeds onvolgroeide zoöspores waargenomen
Enilconazole	1,56 µg/ml	<1,56 µg/ml
Virkon	12,5 µg/ml	3,125 µg/ml, bij 1,56 µg/ml werd reeds een onvolledige encytering waargenomen

Deze 10 geteste antifungale middelen bleken dus werkzaam *in vitro*. Na *in vivo* testen door Berger et al. (2009) werd echter duidelijk dat 2 van deze producten ontoereikend waren in de strijd tegen *B. dendrobatidis*. Zowel benzalkonium chloride (dosis: 1 mg/L) en fluconazole (dosis: 25 mg/L) bleken ontoereikend wanneer als behandeling aangewend bij *L. caerulea*. Ondanks een verlengde overlevingstijd werd er toch een mortaliteit van 100 % genoteerd. Berger et al. (2009) dringen echter aan op verdere testen met hogere dosissen, aangezien fluconazole veiliger is dan itraconazole en benzalkonium chloride. Ook de combinatie van medicatie en een verhoogde omgevingstemperatuur wordt vermeld als onderzoekswaardig.

Dat een protocol bestaande uit een itraconazolebad effectief kan zijn in de bestrijding van *B. dendrobatidis* werd beschreven door María en Forzàn (2008). Zij vonden dat geïnfecteerde pijlgifkikkers (Dendrobatidae) die, gedurende 11 opeenvolgende dagen, 5 minuten in een bad met 0,01% itraconazoleoplossing in 0,6% zoutoplossing hadden doorgebracht, volledig vrij waren van *B. dendrobatidis*. Aquatische amfibieën, zoals *Ambystoma mexicanum* en *Potymotyphlus kaupii*, konden worden behandeld met 0,01 % itraconazole, die gedurende 30 minuten aan het water werd toegevoegd, en dit gedurende 4 behandelingen om de 5 dagen. Toch raden Garner et al. (2009) itraconazole niet aan als behandeling. Bij larvair *A. muletensis* werd een depigmentatie waargenomen die zou kunnen suggereren dat de productie van melanine werd verstoord. Daar deze productie door o.a. de Kupffer cellen in de lever gebeurt zou dit erop kunnen wijzen dat itraconazole ook bij amfibieën hepatotoxiciteit met zich meebrengt die reeds bij zoogdieren werd gerapporteerd. Verder onderzoek wordt aangeraden.



Figuur 6: voorbeeld van de waargenomen depigmentatie bij larven van *Alytes muletensis* (naar Garner et al. 2009). A) niet behandeld kikkervisje met normale pigmentatie. B) kikkervisje met depigmentatie, blootgesteld gedurende 7 dagen aan 1,0 mg/l itraconazole.

In een studie van Martel et al. (2011) werd nagegaan of naast amfotericine B, ook voriconazole werkzaam was en aan welke concentraties de gewenste effecten werden bekomen. Vijf *B. dendrobatidis* stammen werden onderworpen aan deze antifungale middelen. De concentratie waarbij de groei van deze stammen werd geïnhibeerd was terug te brengen op 0,8 mg/ml voor amfotericine B en 0,0125 mg/ml voor voriconazole. Om de sporangia volledig uit te roeien met amfotericine B was een concentratie van 8 mg/ml nodig, en dit gedurende 48 uur. Zoösporen werden bij dezelfde concentratie geëlimineerd binnen de 0,5 uur. Bij voriconazole vereiste een volledige eliminatie van sporangia een concentratie van 1,25 mg/ml gedurende 10 dagen. Zoösporen bleven echter na 24 uur blootstelling aan 1,25 mg/ml nog steeds leefbaar. Hogere concentraties aan amfotericine B, namelijk 8 mg/ml, bleken acute sterfte te veroorzaken bij *Alytes muletensis* kikkervistjes terwijl dit bij een hogere concentratie van voriconazole, namelijk 12,5 mg/ml gedurende 7 dagen, niet het geval was. Aansluitend bij deze bevindingen werd, bij experimenteel geïnfekteerde postmetamorfose *Alytes cisternasii*, de *B. dendrobatidis* infectie succesvol bestreden door middel van een 1,25 mg/ml voriconazole-spray, die gedurende 7 dagen werd toegebracht. Dit protocol zorgde er ook voor dat, in combinatie met desinfectie van de omgeving, een natuurlijk geïnfekteerde kolonie van pijlgifkikkers (*Dendrobatidae*) vrij van infectie kon worden verklaard.

Naast antifungale middelen werden ook andere protocols uitgetest. Eén ervan, namelijk het verhogen van omgevingstemperatuur, werd door Woodhams et al. (2003) beschreven en hierboven reeds aangehaald (zie 4.2.4 omgevings- en lichaamstemperatuur). Ook een verhoging van het zoutgehalte (White 2006) of formaline/malachiet groen (Parker et al. 2002) zou een infectie met *B. dendrobatidis* kunnen bestrijden. Kanttekening hierbij is echter dat een verhoging van omgevingstemperatuur of zoutgehalte door de meeste species slecht worden verdragen en dat malachiet groen carcinogeen en cytotoxisch is, daar het interageert met dubbelstrengig DNA en zo mutaties kan veroorzaken. Malachiet groen is dan ook niet toegestaan als behandeling in Europa en Noord-Amerika (Garner et al. 2009).

Alle bovenstaande behandelingsprotocols zijn tot nu toe enkel toepasbaar onder labo omstandigheden. Een efficiënte behandeling voor wildlevende amfibieën is totnogtoe niet voorhanden. Daarom worden dan ook, in wildlevende populaties de pijlen (voorlopig) gericht op bestrijding en terugdringen van incidentie van *B. dendrobatidis*.

7. BESTRIJDING

Chytridiomycose is een van de 2 amfibie pathogenen die reeds zijn opgenomen in de lijst van belangrijke pathogenen, opgesteld door het OIE of World Organisation for Animal Health. Behalve rapportering van voorkomen die deze organisatie oplegt is er geen bestaande nationale of Europese wetgeving die verspreiding van *B. dendrobatidis* aan banden zou kunnen leggen (Garner et al. niet gepubliceerde gegevens).

Alhoewel introductie van de schimmel in naïeve populaties absoluut vermeden moet worden is dit niet altijd mogelijk. Quarantaine van gevoelige, schimmelvrije amfibieënhabitats blijkt in de praktijk niet haalbaar. Beter wordt de focus gelegd op een goed hygiëneprotocol om zo een uitbraak te voorkomen en dit niet alleen onder labo omstandigheden, maar ook voor materiaal, veldwerk, onderzoekers... en toeristen. Voor deze laatste subcategorie en veldonderzoekers in het algemeen stelde Daszak et al (2005) schoeisel voor, ondergedompeld in een 10% bleekwateroplossing, te dragen bij betreden van regio's met populaties 'at risk'. Ook bij het verplaatsen of herintroduceren van ziektevrrije dieren zouden deze hygiëneprotocols moeten worden nageleefd. Verder zou de handel in geïnfecteerde dieren als voedsel, onderzoeksobject, zoodier of hobbydier verboden moeten worden (Garner et al. niet gepubliceerde gegevens).

8. TOEKOMST

Naast een degelijk hygiëneprotocol moet er ook blijvend geïnvesteerd worden in een onderzoeksprotocol dat, door bemonstering en diagnose, een monitoring van de incidentie van *B. dendrobatidis* mogelijk maakt. Ook een risico-analyse die de verschillende mogelijke intredewegen van *B. dendrobatidis* verduidelijkt en een vastleggen van geografische zones met een verhoogd risico op klinische infectie zouden hun nut bewijzen.

Of de piste 'vaccinatie' moet bewandeld worden is nog maar zeer de vraag. Momenteel zijn er geen vaccins ter beschikking en de ontwikkeling ervan zou waarschijnlijk vele jaren in beslag nemen. Ook het behandelen van wildlevende populaties met antifungale middelen lijkt onmogelijk. Om de werkzame dosis te bekomen zou een enorme hoeveelheid moeten toegediend worden die meer dan waarschijnlijk catastrofale neveneffecten zouden teweegbrengen op de fungale componenten van het ecosysteem (Daszak et al 2005).

Een andere mogelijke denkpiste is de weerstand van de kikker tegenover chytridiomycose te verhogen. Of dit mogelijk zou zijn, zoals Harris et al. (2009) suggereerde, door probiotische manipulatie van de huidmicrobiota of door aanpassingen op gebied van antimicrobiële huidpeptiden door selectiedruk (Woodhams et al. 2010), valt nog af te wachten.

De toekomst van amfibieën wereldwijd kunnen we niet vrijwaren noch de geleden verliezen compenseren. In een poging de biodiversiteit te bewaren is er wel het amphibian conservation action plan, worden biobanken aangelegd en ook de frogpod werd onlangs geïnduceerd.

REFERENTIELIJST:

- Berger L, Hyatt AD, Speare R, Longcore JE, (2005a). Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. Diseases of Aquatic Organisms. 68: 51-63.
- Berger L, Marantelli G, Skerratt LF, Speare R. (2005b). Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. Diseases of aquatic organisms 68:47-50.
- Berger L, Speare LF, Skerratt LF. (2005c). Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs *Litoria caerulea* with severe chytridiomycosis. Diseases of Aquatic Organisms. 68:65-70.
- Berger L, Speare R, Hines HB, Marantelli G, Hyatt AD, McDonald KR, Skerratt LF, Olsen V, Clarke JM, Gillespie G, Mahony M, Sheppard N, Williams C, Tyler MJ. (2004). Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. Australian veterinary journal. 82:434-439.
- Berger L, Hyatt AD, Olsen V, Hengstberger SG, Boyle D, Marantelli B, Humphreys K, Longcore JE. (2002). Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. Diseases of Aquatic Organisms 48:213-220.
- Berger L, Speare R, Kent A. (1999). Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histologic examination. Internetreferentie: <http://eprints.jcu.edu.au/17586/15/05Chapters6-7.pdf>
- Berger L, Speare R, Marantelli G, Skerratt LF. (2009). A zoospore inhibition technique to evaluate the activity of antifungal compounds against *Batrachochytrium dendrobatidis* and unsuccessful treatment of experimentally infected green tree frogs (*Litoria caerulea*) by fluconazole and benzalkonium chloride. Research in Veterinary Science 87: 106-110.
- Bevins CL, Zasloff M. (1990). Peptides from frog skin. Annu. Rev. Biochem. 59:395-414.
- Blaustein AR, Romansic JM, Scheessele EA, Han BA, Pessier AP, Longcore JE. (2005). Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. Conservation Biology. 19:1460-1468.
- Bosch J, Carrascal LM, Durán L, Walker S, Fisher MC. (2007). Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of central Spain, is there a link? Proceedings of the royal society B- biological sciences 274: 253-260.
- Bovbjerg AM. (1963). Development of the glands of the dermal plicae in *Rana pipiens*. J Morph 113:231-243. ("vermeld in Rollins-Smith 2011")
- Bradley GA, Rosen PC, Sredl MJ, Jones TR, Longcore JE. (2002). Chytridiomycosis in native Arizona frogs. Journal of Wildlife Disease 38:206-212. ("vermeld in Rachowicz en Vredenburg 2004")
- Brucker RM, Baylor CM, Walters RL, Lauer A, Harris RN, Minbiole KPC. (2008a). The identification of 2,4-diacetyl-phloroglucinol as an antifungal metabolite produced by cutaneous bacteria of the salamander *Plethodon cinerius*. Journal of Chemical Ecology 34:39-43.
- Brucker RM, Harris RN, Schwantes CR, Gallaher TN, Flaherty DC, Lam BA, Minbiole KPC. (2008b). Amphibian chemical defense: Antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the Salamander *Plethodon cinereus*. Journal of Chemical Ecology 34:1422-9.

- Castanho LM, De Luca IMS. (2001). Moulting behaviour in leaf frogs of the genus *phyllomedusa* (*Anura: hylidae*). *Zoological. Anzeiger.* 240:3-6.
- Clarke BT. (1997). The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Microbiology and Molecular Biology. Reviews.* 72:365-379.
- Conlon JM. (2011). The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. *Cell and Tissue Research* 343:201–12.
- Crespi EJ, Denver RJ. (2005). Roles of stress hormones in food intake regulation in anuran amphibians throughout the life cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology* 141:381–90.
- Daszak P, Lips K, Alford R, Carey C, Collins JP, Cunningham A, Harris R, Ron S. (2005). Chapter 4, infectious diseases. *Amphibian Conservation Action Plan*:21-25.
- Daszak P, Strieby A, Cunnigham A, Longcore JE, Brown C, Porter D. (2004). Experimental evidence that the bullfrog (*Rana Catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetological journal* 14:201-207.
- Davidson C, Bernard MF, Shaffer HB, Parker JM, O’leary C, Conlon MJ, Rollins-Smith LA. (2007). Effects of chytrid and carbaryl exposure on survival, growth and skin peptide defenses in foothill yellow legged frogs. *Environmental Science and Technology* 41(5):1771-1776
- Davidson EW, Parris M, Collins JP, Longcore JE, Pessier AP, Brunner J. (2003). Pathogenicity and transmission of chytridiomycosis in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia* 3:601-607.
- Duellman WE, Treub L. (1986). *Biology of amphibians*. New York, NY: McGraw-Hill. (“vermeld in Rollins-Smith L.A. et al. 2011”)
- Erspamer V, Heatwole H, Barthalmus GT. (1994). *Amphibian biology volume 1 the integument*. Surrey Beatty and sons. Australia. (“vermeld in Voyles et al 2011”)
- Fisher MC, Garner TWJ, Walker SF. (2009). Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time and host. *Annual Reviews Microbiology* 63:291-310.
- 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* 7:1-5.
- Garner TWJ, García G, Carroll B, Fisher MC. (2009). Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Diseases of aquatic organisms* 83:257-260.
- Gleason FH, Kagami M, Lefevre E, Sime-Ngando T. (2008). The ecology of chytrids in aquatic ecosystems: roles in food web dynamics. *Fungal Biology. Reviews.* 22:17-25. (“vermeld in Fisher et al. 2009”).
- Harris RN, Lauer A, Simon MA, Banning JL, Alford RA. (2009). Addition of antifungal skin bacteria to salamanders ameliorates the effects of chytridiomycosis. *Diseases of aquatic organisms.* 83:11-16.
- Harvell CD, Mitchell CE, Ward JR, Altizer S, Dobson AP, Ostfeld RS, Samuel MD. (2002). Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 296: 2158-2162.
- Hopkins S, Channing A. (2002). Chytridiomycosis in Northern and Western Cape frog populations, South Africa. *Herp-Digest* 3:334-336. (“vermeld in Rachowicz en Vredenburg 2004”)

- Hyatt AD, Boyle DG, Olsen V, Boyle DB, Berger L, Obendorf D, Dalton A, Kriger K, Heros M, Hines H, Phillott R, Campbell R, Marantellis G, Gleason F, Colling A. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms* 73:175-192.
- James TY, Litvintseva AP, Vilgalys R, Morgan JAT, Talor JW, Fisher MC, Berger L, Weldon C, Du Preez L, Longcore J. (2009). Rapid global expansion of the fungal disease chytridiomycosis into declining and healthy amphibian populations. *PLoS Pathogens* 5:e1000458.
- Jaudet GJ, Hately JL. (1984). Variations in aldosterone and corticosterone plasma levels during metamorphosis in *Xenopus laevis* tadpoles. *General and Comparative Endocrinology* 56:59–65. (“vermeld in Rollins-Smith 2011”)
- Johnson ML, Speare R. (2005). Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Diseases of aquatic organisms* 65:181-186.
- Kilpatrick AM, Briggs CJ, Daszak P. (2010). The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and evolution*. 25:109-118.
- Kirshtein JD, Anderson CW, Wood JS, Longcore JE, Voytek MA. (2007). Quantitative PCR detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* DNA from sediments and water. *Diseases of Aquatic Organisms* 77:11-15.
- Larsen LO in Moore JA, Lofts B. (1976). *Physiology of the Amphibia*. Academic Press USA. 53-100. (“vermeld in Voyles et al 2011”)
- Longcore JL, Pessier AP, Nichols DK. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91:219-227.
- María J, Forzàn MVZ. (2008). Chytridiomycosis in an aquarium collection of frogs: diagnosis, treatment, and control. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 39:406-411.
- Martel A, Van Rooij P, Vercauteren G, Baert K, Van Waeyenberghe L, Debachter P, Garner TWJ, Woeltjes T, Ducatelle R, Haesebrouck F, Pasmans F. (2011). Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Medical Mycology* 49:143-149.
- Morehouse EA, James TY, Ganley ARD, Vilgalys R, Berger L, Murphy PJ, Longcore JE. (2003). Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Molecular Ecology* 12:395-403.
- Moss AS, Reddy NS, Dortag IM, San Francisco MF. (2008). Chemotaxis of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* and its response to a variety of attractants. *Mycologia* 100:1-5.
- Nichols DK, Lamirande EW, Pessier AP, Longcore JE. (2001). Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in dendrobatid frogs. *Journal of Wildlife Diseases* 37:1–11.
- North S, Alford RA. (2008). Infection intensity and sampling locality affect *Batrachochytrium dendrobatidis* distribution among body regions on green-eyed tree frogs *Litoria genimaculata*. *Diseases of aquatic organisms* 81:177-188.
- Orchinik M, Licht P, Crews D. (1988). Plasma steroid concentrations change in response to sexual behavior in *Bufo marinus*. *Hormones Behav* 22:338–50. (“vermeld in Rollins-Smith 2011”)

- Parker JM, Mikaelian I, Hahn N, Diggs HE. (2002). Clinical diagnosis and treatment of epidermal chytridiomycosis in African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Comparative Medicine* 52:265-268.
- Parris MJ. (2004). Hybrid response to pathogen infection in interspecific crosses between two amphibian species (*Anura:Ranidae*). *Evolutionary ecology research* 6:1-15.
- Pasmans F, Muijsers M, Maes S, Van Rooij P, Brutyn M, Ducatelle R, Haesebrouck F, Martel A. (2010). Chytridiomycosis related mortality in a midwife toad (*Alytes obstetricans*) in Belgium. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 79:460-462.
- Pasmans F. (2012). Inleiding tot de ziekten van reptielen en amfibieën in gevangenschap, mycosen inclusief chytridiomycose. *Gezondheidszorg van reptielen en amfibieën in gevangenschap*. 128-129.
- Piotrowski JS, Annis LS, Loncore JE. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96:9-15.
- Pounds AJ, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MPL, Foster PN, La Marca E, Masters KL, Viteri AM, Puschendorf R, Ron SR, Sanchez-Azofeifa A, Still CJ, Young BE. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439:161-167.
- Rachowicz LJ, Hero JM, Alford RA, Taylor JW, Morgan JAT, Vredenburg VT, Collins JP, Briggs CJ. (2005). The novel and endemic pathogen hypotheses: competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife. *Conservation biology* 19:1441-1448.
- Rachowicz LJ, Vredenburg VT. (2004). Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of Aquatic Organisms* 61:75–83.
- Ramsey JP, Reinert LK, Harper LK, Woodhams DC, Rollins-Smith LA. (2010). Innate and adaptive immune defenses against a fungus linked to global amphibian declines in the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Infection and Immunity* 78:3981–3992.
- Richards-Zawacki C. (2010). Thermoregulatory behaviour affects prevalence of chytrid fungal infection in a wild population of Panamanian golden frogs. *Proceedings of the royal society B-biological sciences* 277: 519-528.
- Rohr J, Raffel T, Sessions SK. (2009). Digenetic trematodes and their relationship to amphibian declines and deformities. In: Heatwole H, Wilkinson JW, editors. *Amphibian biology*, Chapter 4. Baulkham Hills, Australia: Surrey Beatty & Sons. p. 3067–88. (“vermeld in Rollins-Smith 2011”)
- Rohr JR, Raffel TR. (2010). Linking global climate and temperature variability to widespread amphibian declines putatively caused by disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 107:8269–74.
- 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. *Integrative and Comparative Biology* 51: 552-562.
- Rollins-Smith LA, Barker KS, Davis AT. (1997b). Involvement of glucocorticoids in the reorganization of the amphibian immune system at metamorphosis. *Developmental and Comparative Immunology* 5:145–52.

- Rollins-Smith LA, Carey C, Conlon JM, Reinert LK, Doersam JK, Bergman T, Silberring J, Lankinen H, Wade D. (2003). Activities of Temporin family peptides against the chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) associated with global amphibian declines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47:1157-1160.
- Rollins-Smith LA, Carey C, Longcore J, Doersam JK, Boutte A, Bruzgal JE, Conlon JM. (2002b). Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines. *Developmental and Comparative Immunology* 26:471–479.
- Rollins-Smith LA, Conlon JM. (2005). Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. *Developmental and Comparative Immunology* 29: 589–598.
- Rollins-Smith LA, Ramsey JP, Reinert LK, Woodhams DC, Livo LJ, Carey C. (2009). Immune defenses of *Xenopus laevis* against *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Frontiers in Bioscience* 1:68–91.
- Rollins-Smith LA, Reinert LK, Miera V, Conlon JM. (2002c). Antimicrobial peptide defenses of the Tarahumara frog, *Rana tarahumarae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 297:361–7.
- Rollins-Smith LA. (1998). Metamorphosis and the amphibian immune system. *Immunological Reviews* 166:221–30.
- Rollins-Smith LA. (2009). The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788:1593–1599.
- Rosenblum EB, Voyles J, Poorten TJ, Stajich JE. (2010). The deadly chytrid fungus: a story of an emerging pathogen. *PLoS Pathogens* 6(1):e1000550. .
- Rowley JLL, Alford RA. (2006). The amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* occurs in freshwater shrimps in rainforest streams in northern Queensland, Australia. *Ecolhealth* 3:49-52.
- Ruben LN, Buchholz DR, Ahmadi P, Johnson RO, Clothier RH, Shiigi S. (1994). Apoptosis in the thymus of adult *Xenopus laevis*. *Developmental and Comparative Immunology* 18:231–8.
- Schumacher U, Adam W, Hauser F, Probst JC, Hoffmann W. (1994). Molecular anatomy of a skin gland: Histochemical and biochemical investigations on the mucous glands of *Xenopus laevis*. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 42:57–65.
- Skerratt LF, Berger L, Speare R, Cashins S, Mcdonalds KR. (2007). Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *Ecohealth* 4:125-134.
- Smith KG, Weldon C, Conradie W, du Preez L. (2007). Relationships among size, development, and *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in African tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms*. 74:159-164.
- Stice MJ, Briggs CJ. (2010). Immunization is ineffective at preventing infection and mortality due to the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Journal of Wildlife Diseases* 46:70–78.

- Van Rooij P, Martel A, Nerz J, Voitel S, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Pasmans F. (2007). Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Mexican Bolitoglossine Salamanders using an optimal sampling protocol. *Ecohealth* 8:237-243.
- Voyles J, Berger L, Young S, Speare R, Webb R, Warner J, Rudd D, Campbell R, Skerratt LF (2007). Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms*. 77:113-118.
- Voyles J, Rosenblum EB, Berger L. (2011). Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. *Microbes and Infection* 13:25-32.
- Voyles J, Young S, Berger L, Campbell C, Voyles WF, Dinudom A, Cook D, Webb R, Alford RA, Skerratt LF. (2009). Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*. 326:582-585.
- Wabnitz PA, Walters H, Tyler MJ, Wallace JC, Bowie JH. (1998). First record of host defence peptides in tadpoles. The magnificent tree frog *Litoria splendida*. *Journal of Peptide Research*.53:477–481.
- Weldon C, du Preez LH, Hyatt AD, Muller R, Speare R. (2004). Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases* 10:2100-2105.
- White AW. (2006). A trial using salt to protect green and golden bell frogs from chytrid infection. *Herpetofauna* 36:93-96.
- Woodhams DC, Alford RA, Marantelli G. (2003). Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of Aquatic Organisms*. 55:65-67.
- Woodhams DC, Ardipradja K, Alford RA, Marantelli G, Reinert LK, Rollins-Smith LA. (2007b). Featured paper. Resistance to chytridiomycosis varies by amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. *Animal Conservation* 10:409–417.
- Woodhams DC, Kenyon N, Bell SC, Alford RA, Chen S, Billheimer D, Shyr Y, Rollins-Smith LA. (2010). Adaptations of skin peptide defences and possible response to the amphibian chytrid fungus in populations of Australian green-eyed treefrogs, *Litoria genimaculata*. *Diversity and Distributions*. 16:703-712.
- Woodhams DC, Rollins-Smith LA, Alford RA, Simon MA, Harris RN. (2007c). Response. Innate immune defenses of amphibian skin: antimicrobial peptides and more. *Animal Conservation* 10:425–428.
- Yeaman MR, Yount NY. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews* 55:27–55.
- Zasloff M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389–395.
- Zhao Y, Jin Y, Lee WH, Zhang Y. (2006). Purification of lysozyme from skin secretions of *Bufo andrewsi*. *Comparative Biochemistry and Physiology- part C: Toxicology and Pharmacology* 142:46–52.