

Vigilancia epidemiológica y seguimiento poblacional de los anfibios ibéricos

Epidemiological surveillance and monitoring of Iberian amphibian populations

Jaime Bosch^{1,2}, Albert Martínez-Silvestre³, Barbora Thumsová^{4,5}

¹ IMIB Research Unit of Biodiversity (CSIC, UO, PA), Universidad de Oviedo. 33600 Mieres. España. Correspondencia: jaime.bosch@csic.es

² Centro de Investigación, Seguimiento y Evaluación, Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama, Cta. M-604, Km 27,6. Rascafría, España.

³ Centro de Recuperación de Anfibios y Reptiles de Cataluña (CRARC). 08783 Masquefa, Barcelona. España.

⁴ Asociación Herpetológica Española. José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid. España.

⁵ Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC. José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid. España.

RESUMEN

Los anfibios son los vertebrados más amenazados. Las enfermedades emergentes de los anfibios, como la quitridiomycosis y ranaviriosis, constituyen una de sus amenazas más relevantes, causando mortalidades masivas, declives poblacionales y extinciones. Dada la preocupación internacional por la crisis de los anfibios, en las últimas décadas han surgido muchas iniciativas para el seguimiento de poblaciones. Desgraciadamente, muchas de estas iniciativas no resultan eficaces para determinar la emergencia de estas enfermedades ni para evaluar su impacto real en las poblaciones, dado que: no se centran en las especies, los estadios de desarrollo y las épocas del año adecuadas, y no incluyen la toma de datos de infección de manera regular. En el caso de las poblaciones con incidencia de patógenos conocida la situación no es mejor, dado que raramente se llevan a cabo programas de seguimiento a largo plazo una vez que los brotes de mortalidad han cesado. Por lo tanto, mientras que cada vez son más frecuentes los casos publicados de mortalidades masivas de anfibios asociados a las enfermedades emergentes, existe un vacío de conocimiento significativo sobre la incidencia real de estas enfermedades y de sus efectos a medio y largo plazo.

PALABRAS CLAVE: Enfermedades emergentes, quitridiomycosis, *Batrachochytrium dendrobatidis*, ranaviriosis, *Ranavirus*, ADN ambiental, monitoreo de anfibios, estrategias de conservación.

ABSTRACT

Amphibians are the most threatened vertebrate group. The emerging diseases such as chytridiomycosis and ranaviriosis are important amphibian threats, being responsible for mass mortality events, population declines and extinctions. Given the global scale of the amphibian crisis, numerous monitoring efforts have emerged in recent decades. Unfortunately, many of them are not effective in determining the emergence of diseases, nor in assessing their real impact on populations. This is partly because these efforts are not species-specific nor focused on appropriate developmental stage and/or time of year, but also due to the lack of a routine collection of infection data. In populations with known incidence of pathogens the situation is no better because long-term monitoring programs are rarely carried out once disease outbreaks have ceased. Therefore, while there is an increase in the report of disease-associated mass mortality events, we still face a significant lack of knowledge about the real incidence and impacts of these diseases in the medium and long term.

KEY WORDS: Emerging diseases, chytridiomycosis, *Batrachochytrium dendrobatidis*, ranaviriosis, *Ranavirus*, environmental DNA, amphibian monitoring, conservation strategies.

LABURPENA

Anfibioak dira ornodun talde mehatxatuena. Anfibioen gaixotasun kutsakor emergenteak, hala nola kitridiomycosis eta ranaviriosia, mehatxu garrantzitsuenetako bat dira, eta hilkortasun masiboak, populazioaren gainbehera eta iraungipenak eragiten dituzte. Anfibioen krisiaren inguruko nazioarteko kezka dela eta, azken hamarkadetan ekimen asko burutu dira populazioen jarraipena egiteko. Zoritxarrez, ekimen horietako asko ez dira eraginkorrak ez gaixotasun horien larrialdia zehazteko, ez populazioetan duten benetako eragina balioztatzeko ere. Izan ere, ez dira espezieetan, garapen-faseetan eta urteko garai egokietan oinarritzen, eta ez dute infekzio-daturik erregularitasunez hartzen. Patogenoen intzidentzia duten populazioen kasuan, egoera ez da hobea, hilkortasun-agerraldiak amaitu ondoren epe luzerako jarraipen-programak oso gutxitan egiten baitira. Beraz, gaixotasun kutsakor emergenteekin lotutako anfibioen hilkortasun masiboek kasu argitaratuak gero eta ugariagoak diren bitartean, gaixotasun horien eta haien epe ertain eta luzeko ondorioen benetako eraginari buruzko ezagutza-hutsune esanguratsu bat dago.

GAKO-HITZAK: Gaixotasun emergentea, kitridiomycosis, *Batrachochytrium dendrobatidis*, ranaviriosia, *Ranavirus*, ingurumen DNA, anfibioen jarraipena, kontserbazio estrategia.

INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas han provocado una crisis sin precedentes en la biodiversidad por la modificación del medio, la explotación de la vida salvaje y la alteración de la composición de los ecosistemas a través de las invasiones biológicas (Ceballos *et al.*, 2015). La evidencia de que esta pérdida contemporánea de biodiversidad incluye el declive global de los anfibios se sustenta ya en décadas de investigación (Stuart *et al.*, 2004, 2008). La alteración y destrucción del medio, la contaminación y el cambio climático reducen sistemáticamente el hábitat de los anfibios. Además, el comercio legal e ilegal reduce la abundancia y altera la composición de las comunidades (Hughes *et al.*, 2021), pudiendo facilitar la introducción de nuevos patógenos que causan mortalidades masivas o impiden el reclutamiento (p.ej. Berger *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 2002; Finlay y Vredenberg, 2007; McMenamin *et al.*, 2008; Johnson *et al.* 2011; Fisher *et al.*, 2012; Faruk *et al.*, 2013; Martel *et al.*, 2014; Price *et al.*, 2014).

Es bien sabido que las enfermedades emergentes pueden tener consecuencias importantes en la dinámica de las poblaciones de los hospedadores (Anderson y May, 1979), y muchas veces conducen a las poblaciones a su declive, o incluso a su extinción (Daszak *et al.*, 2000). En este contexto, es importante distinguir entre vigilancia, infección y enfermedad. Con el término vigilancia ('surveillance', en inglés) entendemos el estudio de la ocurrencia de un patógeno y de sus efectos en las poblaciones de los hospedadores en la naturaleza. Muchas veces, estos estudios van destinados a determinar si se ha producido su posible emergencia; es decir, si la distribución geográfica de un patógeno se ha expandido, o si el número de especies a las que infecta se ha incrementado drásticamente (Daszak *et al.*, 2000). Así, las tareas de vigilancia epidemiológica incluyen la detección en el medio de uno o varios patógenos, pero también la detección de la infección en sus hospedadores e, incluso, la aparición de las enfermedades que producen. Por lo tanto, infección no debe confundirse con enfermedad. Hablamos de enfermedad cuando el patógeno está alterando la fisiología y disminuyendo la posibilidad de la supervivencia del hospedador, mientras que infección es cuando el patógeno se encuentra vivo dentro del hospedador y se replica con frecuencia (Mörner *et al.*, 2002). Por otro lado, las tareas de seguimiento de las poblaciones de los hospedadores incluyen la estimación de abundancias de sus efectivos y, a veces, el cálculo de sus tamaños poblacionales, a lo largo del tiempo para determinar así sus tendencias demográficas. Sólo conociendo la relación entre la ocurrencia de un patógeno en el medio y la infección o enfermedad que está produciendo en sus hospedadores podremos además, evaluar el posible efecto del patógeno en las tendencias poblacionales de sus hospedadores.

En el caso de los anfibios, los hongos quitridios del género *Batrachochytrium* y los virus del género *Ranavirus* son patógenos emergentes que están teniendo un impacto muy relevante en la dinámica de centenares de especies de todo el mundo en las últimas décadas (Skerratt *et al.*, 2007, Duffus *et al.*, 2015). *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*)

es originario del sureste asiático (O'Hanlon *et al.*, 2018), desde donde se habría expandido, a partir de los inicios del siglo pasado, a prácticamente todo el mundo. Se trata de un patógeno muy generalista capaz de infectar, al menos, al 50% de las especies de anfibios estudiadas, y llegando ya a más de 1.000 especies afectadas de 86 países distintos (Castro-Monzón *et al.*, 2020). *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) es la otra especie conocida del género; aunque capaz de infectar tanto anuros como urodelos, resulta altamente patogénica sólo para estos últimos. Hasta el momento, *Bsal* se encuentra sólo introducida en Europa Central y, en mucha menor medida, aunque provocando también mortalidad, en un área natural cercana a Barcelona (Stegen *et al.*, 2017, Martel *et al.*, 2020, Bosch *et al.*, 2021a). De forma similar, las infecciones por *Ranavirus* (*Rv*) se han multiplicado en las últimas décadas en todo el mundo, estando acompañadas de mortalidades masivas y descensos poblacionales acusados (Green *et al.*, 2002, Price *et al.*, 2017). Sin embargo, al contrario que para *Bd* y *Bsal*, su distribución general permanece aún desconocida y, con seguridad, subestimada (Duffus *et al.*, 2015).

Los efectos de ambos grupos de patógenos sobre las poblaciones de anfibios varían enormemente entre localidades y especies. Así, *Bd* es tolerado por un número importante de especies y, en general, las zonas más calientes del globo sufren menor incidencia dada la inhibición que provoca las altas temperaturas sobre su crecimiento y, a la vez, la mayor respuesta del sistema inmunológico de los anfibios a temperaturas más elevadas (Rollins-Smith, 2020). Los requerimientos térmicos de *Bsal* son menores que los de *Bd*, y su grado de patogenicidad es elevada para muchas especies de urodelos, por lo que su previsible futura expansión es altamente preocupante (Martel *et al.*, 2013, Van Rooij *et al.*, 2015). Por último, la gran mayoría de especies de anfibios son altamente sensibles a *Rv*, y la reciente subida de temperaturas ha sido señalada como una de las causas implicadas en su emergencia (Price *et al.*, 2019).

Mientras que existen ya muchos casos descritos de mortalidades masivas asociadas a *Bd*, *Bsal* y *Rv* (p.ej. Bosch *et al.*, 2001, Price *et al.*, 2014, Rosa *et al.*, 2017, Martel *et al.*, 2020), el número de estudios sobre las tendencias a largo plazo de las poblaciones afectadas es, sin embargo, aún muy reducido por razones operativas. De hecho, aunque *Bd* ha sido señalado como el causante del declive de 500 especies de anfibios (Scheele *et al.*, 2019), en realidad no existen datos cuantitativos que apoyen estas conclusiones (Lambert *et al.*, 2020). Así, dentro de los escasos estudios existentes sobre el declive de anfibios por enfermedades emergentes, algunos describen impactos muy importantes sólo para algunos taxones, otros describen declives demográficos para una única especie dentro de una comunidad, y otros describen una respuesta heterogénea en las distintas poblaciones estudiadas (p.ej. Bosch *et al.*, 2001, Lips *et al.*, 2006, 2008; Vredenburg *et al.*, 2010; Phillips y Puschendorf, 2013). Estas inconsistencias sugieren que los estudios de corta duración no serían válidos para evaluar el impacto real de las enfermedades, y que sus impactos podrían estar subestimados por la existencia de efectos leves, inadvertidos o indirectos, cuya repercusión

se extendería más allá de los eventos de mortalidad inicial (p.ej. Clare *et al.*, 2016; Scheele *et al.*, 2017). Alternativamente, otros estudios indican que algunas poblaciones de anfibios que han experimentado declives por *Bd* podrían estar recuperándose y que, por tanto, los efectos de la enfermedad podrán estar sobrestimados (Knapp *et al.*, 2016; Scheele *et al.*, 2017). En el caso de *Bsal*, por el contrario, existen datos precisos del declive superior al 90% de *Salamandra salamandra* en centroeuropa (Stegen *et al.*, 2017). Por último, no existen datos generalizados de los efectos de *Rv* en las poblaciones de anfibios a largo plazo, aunque ya se han constatado caídas bruscas de los efectivos poblacionales tras episodios de mortalidades masivas (p.ej. Price *et al.*, 2014; Rosa *et al.*, 2017) y, puntualmente, serios declives poblacionales (Bosch *et al.*, 2021b).

Mientras que para los casos de *Bd* y *Bsal* existe un amplio consenso sobre sus efectos negativos para muchas especies y, por lo tanto, se han establecido programas de alerta temprana y seguimiento específicos, para *Rv* no se han desarrollado aún propuestas de gestión concretas. De hecho, para muchos autores *Rv* sigue considerándose un patógeno emergente 'de segundo nivel', con escasa relevancia en el declive generalizado de los anfibios (Bosch *et al.*, 2021b).

Lógicamente, el análisis de las tendencias poblacionales requiere datos cuantitativos de abundancia recogidos de forma sistemática durante un periodo largo de tiempo. Sin embargo, el carácter discreto de los anfibios, y sus fuertes oscilaciones poblacionales dada su dependencia de las condiciones ambientales, complican la estimación de sus abundancias y hacen necesario largos periodos de estudio para conocer sus tendencias poblacionales. Además, la escala temporal a la que la presencia del patógeno, y la emergencia de enfermedad, se manifiestan en las tendencias poblacionales de los anfibios puede ser muy amplia (p. ej. Bosch *et al.*, 2018). Así, si la incidencia del patógeno, y las correspondientes mortalidades masivas asociadas, se concentran en las larvas y en los ejemplares recién metamorfoseados, los descensos significativos en la abundancia de adultos tardarán varios años en ser apreciados.

En aquellas regiones del mundo que son reconocidas como las más impactadas por las enfermedades emergentes de anfibios, como Australia y Centro América, se han establecido programas de vigilancia y de seguimiento de poblaciones durante las dos últimas décadas. Como resultado, Scheele *et al.* (2017), por ejemplo, concluyeron que la quitridiomycosis estaba implicada en el declive de 43 de las 238 especies australianas, aunque también encontraron enormes diferencias en las trayectorias de las especies en declive: mientras algunas especies mostraban un declive continuado, otras parecían experimentar cierta recuperación. En Europa, por el contrario, aún no se han establecido programas de seguimiento específicos para evaluar la incidencia de las enfermedades emergentes. De hecho, los programas de seguimiento de anfibios europeos no han conseguido, por ahora, reportar mortalidades masivas asociadas a *Bd*, pese a que estas podrían estar produciéndose, al menos, en aquellas especies más sensibles (p.ej. Harnos *et al.*, 2021).

La cuenca mediterránea en general, y la Península Ibérica en particular, representan un punto caliente de diversidad de anfibios, en parte debido a la larga historia reciente de convivencia entre los ecosistemas naturales y las actividades humanas (López-López *et al.*, 2011). De hecho, la Europa mediterránea alberga más del 88% de las 94 especies de anfibios europeos, de las que el 33% son endémicas (Cox *et al.*, 2006). En España, y aunque se han reportado distintos casos de mortalidades masivas asociadas a enfermedades emergentes y algunos de ellos son objeto de seguimiento desde hace años, tampoco existen programas específicos de incidencia de patógenos. Recientemente, y para suplir estas carencias, la Asociación Herpetológica Española ha puesto en marcha la iniciativa SOSanfibios.org, cuyo objetivo es enriquecer el programa general de seguimiento de poblaciones (SARE, <https://siare.herpetologica.es/sare>) con datos de infección de patógenos.

A continuación, discutimos la importancia del diseño de los programas de seguimiento de poblaciones de anfibios en el contexto de las enfermedades emergentes. Así, y para la generalidad de las especies de anfibios ibéricos, proponemos unas pautas para el monitoreo de poblaciones antes de la emergencia de los patógenos, una vez que esta se ha producido, y tras la aplicación de actuaciones de mitigación de las enfermedades. Para ello, repasamos las especies, los momentos del año, los estadios de desarrollo, los tipos de medios y las técnicas más adecuadas para la obtención de datos relevantes sobre la presencia y la incidencia de *Bd*, *Bsal* y *Rv*.

DISEÑO DE PROGRAMAS DE SEGUIMIENTO EN EL CONTEXTO DE LAS ENFERMEDADES EMERGENTES

Cualquier programa de seguimiento de poblaciones de anfibios debería, como mínimo, ser capaz de detectar posibles episodios de mortalidad masiva provocados por enfermedades emergentes. Además, sería deseable que cualquier programa de seguimiento fuese también capaz de detectar los primeros indicios de incidencia de enfermedad e, incluso, la mera presencia de patógenos de anfibios, aun cuando estos no estén provocando enfermedad. Evidentemente, todo esto sólo es posible si se tiene en cuenta la dinámica de las distintas enfermedades emergentes existentes.

Desgraciadamente, muchas veces la época del año, la etapa de desarrollo y los lugares de reproducción más favorables para la obtención de datos de abundancia poblacional no son los más idóneos para la detección temprana de los patógenos o de su incidencia en las poblaciones. En esos casos, será necesario realizar, por separado, muestreos específicos para patógenos, y muestreos específicos para estimar abundancias poblacionales. Por ejemplo, si bien el conteo de puestas de bufónidos puede arrojar datos válidos para calcular tendencias poblacionales, no sirve para detectar la presencia o incidencia de *Bd/Bsal/Rv*. En otras ocasiones, como en el caso de las especies del género *Alytes*, el muestreo de sus larvas es ideal para, con poco esfuerzo, estimar tamaños poblacionales y, a la

vez, analizar la presencia e incidencia de todos los patógenos emergentes importantes, incluyendo *Bsal* (Stegen *et al.*, 2017).

Época del año

La época del año resulta especialmente relevante para maximizar la probabilidad de detectar la presencia y, sobre todo, la incidencia de patógenos emergentes. En el caso de la quitridiomycosis por *Bd*, mientras que en zonas tropicales la elevada humedad ambiental hace que los hospedadores adultos presenten una incidencia elevada (p.ej. Murray *et al.*, 2010), en las zonas templadas, y en la Península Ibérica en concreto, la escasa humedad ambiental hace que los ejemplares adultos presenten cargas de infección menores durante la fase terrestre (p.ej. Daversa *et al.*, 2018). Por el contrario, las larvas suelen presentar mayor infección, sobre todo al final de la metamorfosis cuando la queratina ya está presente en todo el cuerpo y el sistema inmune deja de actuar para no interferir con los cambios drásticos en la morfología de los animales (p.ej. Garner *et al.*, 2009). Por lo tanto, las larvas no sufren, en general, mortalidad por *Bd*, y esta se concentra en los ejemplares recién metamorfoseados. Sin embargo, la inmensa mayoría de los programas de seguimiento de anfibios sólo contemplan visitas durante el inicio de la estación reproductiva, cuando es más sencillo contabilizar los ejemplares adultos que se encuentran reproduciéndose en las masas de agua. Por lo tanto, los programas de seguimiento deberían incluir, al menos, una visita a las poblaciones en el momento de la metamorfosis con objeto de comprobar que no se están produciendo episodios de mortalidad masiva de metamórficos por *Bd*.

Por otro lado, y también para el caso de la quitridiomycosis, los períodos fríos son los más favorables para el desarrollo de la infección, dado que, aunque las temperaturas de crecimiento óptimo en cultivo en laboratorio para estos patógenos son relativamente altas (hasta 18°C en *Bd* y 15°C en *Bsa*; Piotrowski *et al.*, 2004; Martel *et al.*, 2013), las bajas temperaturas ralentizan el sistema inmune de los anfibios y favorecen la infección por *Bd* (Rollins-Smith, 2020). Así, por ejemplo, en larvas de *A. obstetricans* existe una relación negativa altamente significativa entre temperatura del agua y carga de infección por *Bd* (Fernández-Beaskoetxea *et al.*, 2015). Además, las cargas de infección elevadas en las larvas de los anuros pueden producir la pérdida de denticulos del disco oral (Berger *et al.*, 1998; Fellers *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2018), por lo que puede resultar un indicio válido de incidencia de *Bd*. Sin embargo, en ningún caso puede atribuirse, de inmediato, la pérdida de denticulos a la quitridiomycosis, dado que existen otros factores posibles, como la contaminación, que provocan también este efecto (Navarro-Lozano *et al.*, 2018).

Al contrario, la mayor incidencia de *Rv* se produce a altas temperaturas, cuando el metabolismo de los ejemplares es más elevado y el virus puede replicarse más rápido. Además, el aumento extraordinario de la temperatura por el calentamiento global, supone una ventaja adicional para el patógeno dadas las peculiaridades de la dinámica

patógeno-hospedador (Price *et al.*, 2019). Por lo tanto, las mortalidades masivas por ranaviriosis suelen tener lugar durante el verano (Price *et al.*, 2019), por lo que el seguimiento de poblaciones debería incluir, además, una visita durante el mes más cálido del año.

Lugares de muestreo

Los hábitats más favorables para detectar la presencia de *Bd/Bsal/Rv* son, en general, las zonas de montaña, bien por sus bajas temperaturas que favorecen la infección por *Bd/Bsal*, como por el alto grado de aislamiento genético de sus poblaciones que hace aumentar su susceptibilidad a los patógenos (Pearman y Garner, 2005). Dado que *Bd* no presenta formas de resistencia a la sequedad, las masas de agua temporales presentan menor incidencia (p.ej. Medina *et al.*, 2015), siendo más indicado concentrar los seguimientos en aguas permanentes. Por otro lado, las aguas lénticas favorecen la acumulación de zoosporas y viriones que no son arrastrados por la corriente (p.ej. Medina *et al.*, 2015) y, en general, los medios con altas concentraciones de larvas, como las charcas de montaña que acumulan varias cohortes de larvas invernantes, son medios altamente favorables para el desarrollo de enfermedades infecciosas y deberían ser objeto de monitoreo. Además, y especialmente para el caso de *Rv*, los anfibios de zonas agrícolas y ganaderas pueden presentar elevadas incidencias relacionadas con los altos niveles de estrés e inmunodepresión producidos por concentraciones elevadas de pesticidas, fertilizantes y antibióticos (Hua *et al.*, 2017; Cusaac *et al.*, 2021).

Por último, conviene recordar que las especies introducidas son, muchas veces, vectores de transmisión de patógenos a grandes distancias (p.ej. Weldon *et al.*, 2004; Fisher y Garner, 2007; Solís *et al.*, 2010; Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2017; Martel *et al.*, 2020). Por lo tanto, siempre es necesario incluir medios altamente antropizados en los programas de seguimiento de enfermedades emergentes, como zonas de recreo habituales y áreas en núcleos urbanos, pero también espacios protegidos con alto número de visitantes (p.ej. von Essen *et al.*, 2020).

Especies y estadios de desarrollo

La elección de la especie, o especies, y las etapas de desarrollo para detectar la presencia de patógenos y estimar su incidencia, resulta extremadamente importante dada la gran variabilidad que existe en su susceptibilidad. Si el objetivo es sólo detectar lo antes posible la presencia de patógenos en poblaciones sanas, lógicamente debemos centrarnos en las etapas de desarrollo y en las especies con mayor probabilidad de resultar infectadas. En la tabla 1 aparecen los géneros ibéricos, las etapas de desarrollo, las épocas del año y los hábitats recomendados para detectar, con mayor probabilidad, la presencia de *Bd/Bsal/Rv*. Todas las especies de la familia Alytidae son especialmente sensibles a *Bd*, al igual que los géneros *Salamandra*, *Bufo* y *Pelophylax*, si bien, como indicamos antes, en las especies fundamentalmente terrestres (*Alytes* spp., *Bufo spinosus* y *Salamandra salamandra*) los adultos

Patógeno	Género	Estadio de desarrollo	Época del año	Características ambientales
<i>Bd</i>	<i>Alytes</i>	larvas invernantes	meses fríos	elevada altitud, aguas permanentes y quietas
	<i>Bufo</i>	recién metamorfoseados	final del verano	elevada altitud
	<i>Discoglossus</i>	adultos	primavera	indiferente
	<i>Pelophylax</i>	adultos	primavera	elevada altitud, aguas permanentes y quietas
	<i>Salamandra</i>	larvas invernantes	meses fríos	elevada altitud, aguas permanentes y quietas
<i>Bsal</i>	<i>Triturus</i>	adultos	primavera	elevada altitud, aguas permanentes y quietas
	<i>Chioglossa</i>	adultos	primavera, otoño	indiferente
	<i>Ichthyosaura</i>	adultos	primavera, otoño	indiferente
	<i>Pleurodeles</i>	adultos	primavera, otoño	indiferente
	<i>Lissotriton</i>	adultos	primavera, otoño	indiferente
	<i>Salamandra</i>	adultos	primavera, otoño	indiferente
	<i>Triturus</i>	adultos	primavera, otoño	indiferente
<i>Ranavirus</i>	indiferente	indiferente	meses cálidos	poblaciones de montaña aisladas, áreas degradadas con abundante carga ganadera o actividad agrícola

Tabla 1. - Géneros, estadios de desarrollo, épocas del año y características ambientales más indicadas para el seguimiento de la incidencia de enfermedades emergentes en los anfibios Ibéricos.

raramente están infectados, o presentan prevalencias bajas (p.ej. Medina *et al.*, 2015). De forma similar, las ranas verdes suelen ser portadoras de *Bd*, aunque sus hábitos diurnos y la exposición al sol hacen que no desarrollen la enfermedad (Bosch *et al.*, 2018). Por lo tanto, son las larvas de las especies europeas más susceptibles a *Bd* las ideales para detectar su presencia, si bien, en el caso de los anuros, y dado que la infección sólo se encuentra presente en el disco oral, si no es posible introducir la punta de la torunda en la boca es necesario sacrificar al ejemplar y analizar el disco oral completo, incluso mediante histología. Por el contrario, las larvas de urodelo presentan queratina en todo el cuerpo, facilitando la toma de muestras para detección de infección. En ambos casos, cuanto mayor sea la etapa de desarrollo larvario, mayor probabilidad de encontrar infección, siendo especialmente útiles las larvas invernantes, que concentran las cargas más elevadas (Medina *et al.*, 2015; Fernández-Beaskoetxea *et al.*, 2016). En el caso de *Bsal*, todas las especies son susceptibles de presentar infección, aunque algunas de ellas, como *Calotriton asper* y *Lissotriton helveticus*, presentan baja susceptibilidad y no son recomendables para programas de alerta temprana. Hay que recordar que los anuros también pueden ser susceptibles a la infección por *Bsal*, aunque no desarrollen la enfermedad, y especialmente *A. obstetricans* es un buen candidato para ser objeto de seguimiento de este patógeno. En el caso de *Rv*, cualquier especie es susceptible de presentar infección, si bien *Alytes* es, nuevamente, el género más susceptible y, por tanto, más recomendado para el seguimiento de este patógeno.

Por otro lado, y dado que *Bd* se haya ampliamente distribuido en todo el mundo desde hace décadas (Fisher *et al.*, 2009; Olson *et al.*, 2013), en aquellas zonas donde climatológicamente puede desarrollarse fácilmente debe considerarse casi endémico (Fisher *et al.*, 2009; Lips, 2016). Por lo tanto, si queremos entender la dinámica de la infección y la probabilidad de que la enfermedad aparezca en poblaciones sanas, los seguimientos a realizar en

dichas zonas deberían incluir, en la práctica, a todas las especies de la comunidad, y no sólo a las especies más susceptibles. De hecho, en comunidades de anfibios ricas, los efectos de la quitridiomycosis a largo plazo serán, previsiblemente, complejos, y su dinámica difícil de entender. Por ejemplo, Bosch y Rincón (2008) documentan la expansión inicial de *Bufo spinosus* tras la casi completa desaparición de *A. obstetricans* en el macizo de Peñalara. Sin embargo, esa rápida expansión de *B. spinosus* fue seguida, años más tarde, de su lento, pero inexorable declive (Bosch *et al.* 2014; 2018), ilustrando cómo los estudios a corto plazo y centrados sólo en las especies más sensibles no son suficientes para entender correctamente los efectos de las enfermedades emergentes en las comunidades de anfibios.

PROTOCOLOS DE BIOSEGURIDAD DURANTE LAS LABORES DE SEGUIMIENTO

Conviene recordar, en primer lugar, que cualquier actividad de seguimiento de poblaciones de anfibios debe realizarse bajo condiciones estrictas de bioseguridad, tanto en aquellas donde aún no se ha detectado la presencia de patógenos, como en aquellas con presencia confirmada. En el primer caso es fundamental evitar la entrada de patógenos no presentes, mientras que en el segundo se trata de evitar la dispersión de los ya presentes a otras zonas libres de estos. En ambos casos, sin embargo, las medidas de bioseguridad a aplicar son parecidas. Todo el material que entre en contacto con el medio (botas de campo, mangas de muestreo, recipientes para retener animales, etc.) debe desinfectarse con lejía doméstica sin diluir o, preferentemente con soluciones comerciales desinfectantes como Virkon® (Phillott *et al.*, 2010). La aplicación de estas sustancias debe realizarse antes y después del muestreo y, preferentemente, en el laboratorio para evitar que acaben en el medio natural, sumergiendo totalmente el material en el líquido desinfectante durante el mayor tiempo posible (y siempre superior a 5 minutos). Al concluir los trabajos en un punto de muestreo, y sin abandonar

éste, es muy importante eliminar primero la materia orgánica de todo el material de muestreo (incluyendo las botas de campo) mediante un cepillo de cerdas duras. Después, se debe aplicar alguna de estas sustancias desinfectantes mediante un pulverizador, y almacenar todo el material en bolsas de plástico cerradas hasta llegar al laboratorio, donde deberá ser sumergido completamente en líquido desinfectante. El uso de recipientes no desechables para retener a los animales está desaconsejado y, obviamente, todos los ejemplares deben manejarse con guantes desechables de nitrilo.

SEGUIMIENTO DE POBLACIONES SIN INCIDENCIA CONOCIDA DE PATÓGENOS EMERGENTES

Muestras de infección en ejemplares de anfibios

Para detectar la presencia de patógenos y, a la vez y mucho más relevante, para conocer su incidencia en los anfibios, se pueden emplear técnicas histológicas o bien técnicas moleculares (PCR). En el caso de la histología, su baja capacidad de detección durante las primeras etapas de la infección, y la casi siempre necesidad de analizar órganos internos en el caso de *Rv*, desaconsejan su uso para la mera detección de patógenos, quedando reservada normalmente para la confirmación de un diagnóstico previo mediante PCR. Por el contrario, la histología permite la diferenciación entre animales verdaderamente enfermos y animales infectados o portadores, dado que las lesiones cutáneas son determinantes de la enfermedad: alteración de la estructura epidérmica y dérmica (en el caso de *Bd* y *Bsal*), y lesiones hepáticas, renales, gástricas, cutáneas e incluso en médula ósea en animales afectados por *Rv* (Miller *et al.*, 2015).

La alta sensibilidad de la PCR hace que esta sea la técnica estrella para la detección de patógenos en anfibios, sobre todo cuando la enfermedad aún no ha cursado y no pueden observarse signos externos. Las muestras para PCR suelen ser tejidos fijados en etanol en campo, y que también pueden emplearse para su análisis histológico (fundamentalmente, falanges de ejemplares ya metamorfoseados, el extremo de la cola de larvas, o el extremo de la cola de urodelos adultos), pero también torundas estériles de algodón. En el último caso, la ventaja de no ocasionar ningún daño al animal, y no favorecer posibles infecciones posteriores, es evidente. La toma de muestras en torunda se realiza pasando el algodón por toda la superficie del animal, aunque con especial incidencia en la zona ventral y posterior del mismo, hasta completar, al menos, 25 barridos extensos (Hyatt *et al.*, 2007). Estos deben realizarse, además, con firmeza para arrastrar las posibles zoosporas y viriones presentes en la piel y, en el caso de las larvas de anuro, la punta de la torunda debe también introducirse en el disco oral del ejemplar (lo que es posible, solo, en las especies de mayor tamaño). Inmediatamente tras la toma de muestras, las torundas deben conservarse en frío o congeladas y, cuando esto no sea posible, fijadas añadiendo 2-3 gotas de etanol al 70% o superior. Es importante que los ejemplares a muestrear estén húmedos, pero sin un exceso de agua y, sobre todo, limpios de barro

o cualquier otra sustancia para evitar posibles inhibiciones de la PCR. Posteriormente, la detección del posible ADN de los patógenos, así como su cuantificación precisa, se realiza mediante una PCR de punto final, o una qPCR (PCR cuantitativa o también llamada en tiempo real). Para ello, se emplean cebadores específicos del patógeno correspondiente y, en el caso de la qPCR, una sonda Taqman específica del ADN diana marcada con fluorescencia. De esta forma, el grado de especificidad es aún más alto, reduciéndose la probabilidad de obtener falsos positivos. Los protocolos de qPCR más empleados para *Bd*, *Bsal* y *Rv* son, respectivamente, los de Boyle *et al.* (2004), Blooi *et al.* (2013) y Leung *et al.* (2017).

En el caso de la histología se emplea la tinción general de hematoxilina/eosina, si bien se pueden usar tinciones específicas de hongos como la de Grocott-Gomori, o incluso la de rojo Congo (Berger *et al.*, 1999; Briggs y Burgin, 2004; Kriger *et al.*, 2006). Estas tinciones permiten detectar perfectamente todas las formas del ciclo vital de los hongos quitridios en la piel de los animales afectados, y también los cuerpos de inclusión víricos generados por *Rv* en el interior del citoplasma de las células hepáticas o de otros órganos diana del virus. Existen tinciones inmunohistoquímicas específicas para *Bsal* y para *Rv* que permiten destacar, colorimétricamente, estos agentes en un tejido afectado, si bien su uso es todavía experimental (Saucedo *et al.*, 2016; Thomas *et al.*, 2017). Pueden realizarse también técnicas de citología mediante improntas cutáneas de animales vivos afectados con cargas altas y mediante el uso de tinciones citológicas generales (Diff Quick) o específicas para hongos, como el azul de lactofenol (Pessier, 2007).

El número de muestras necesario para detectar, con un grado aceptable de fiabilidad, la presencia de *Bd/Bsal/Rv* dependerá, evidentemente, del valor de prevalencia existente en la población estudiada. Así, una prevalencia, por ejemplo, del 10% en la especie y etapa de desarrollo estudiada, implica que será necesario tomar, al menos, 10 muestras para detectar la presencia del patógeno, y siempre y cuando utilicemos técnicas de análisis altamente fiables, como la qPCR. Por lo tanto, resulta complicado establecer, a priori, tamaños muestrales para zonas donde no existan datos previos de infección, pero, en general, tamaños muestrales inferiores a 20 estarían desaconsejados dado que prevalencias de infección en torno al 5% son habituales. En cualquier caso, y dado nuestro alto grado de conocimiento actual sobre la biología de *Bd/Bsal/Rv*, y como hemos señalado antes, la elección correcta de las especies, estadios de desarrollo, épocas del año y hábitats, reducirá enormemente el tamaño muestral necesario para detectar su presencia y estudiar su incidencia (Gray *et al.*, 2017).

Muestras de ADN ambiental

Para detectar la presencia de *Bd*, *Bsal* o *Rv* en las poblaciones de anfibios pueden emplearse además técnicas de ADN ambiental (eDNA en sus siglas en inglés). Desde 2007 existen métodos probados en laboratorio y en campo para *Bd* (p.ej. Walker *et al.*, 2007), y más recientemente para *Rv* (Hall *et al.*, 2015) y *Bsal* (Spitzen-van der Sluijs *et*

al., 2020). En todos ellos el funcionamiento es similar. Se trata de filtrar volúmenes de agua razonables, bien sea con jeringuillas o ayudados con bombas mecánicas, mediante membranas de filtrado con un tamaño de poro suficientemente pequeño para retener las zoosporas de *Bd/Bsal* o los viriones de *Rv* (normalmente, 0,45 µm y 0,2 µm, respectivamente). En la mayoría de los casos, y siempre que se trate de un medio léntico con abundantes partículas en suspensión, es conveniente realizar primero un prefiltrado para no saturar la membrana prematuramente. Una vez realizado el filtrado, la membrana debe almacenarse congelada, o bien conservada en un buffer específico. Ya en el laboratorio, la extracción del ADN presente en la membrana de filtrado se realiza, normalmente, mediante kits de extracción comerciales para muestras de suelo (p.ej. el kit PowerSoil DNA Isolation Kit de Laboratorios MO Bio). Finalmente, con la extracción obtenida se realiza una PCR de punto final para detectar o, mejor aún, una qPCR para cuantificar el ADN de los patógenos presentes. Evidentemente, todo el proceso debe realizarse bajo condiciones muy estrictas para evitar la contaminación cruzada. Todo el proceso debe realizarse con guantes, y las membranas de filtrado deben esterilizarse con radiación de UV antes de ser utilizadas en el campo y manejarse siempre con pinzas estériles. El portafiltro, las jeringuillas, los tubos del filtro mecánico y cualquier recipiente o utensilio que entre en contacto con el medio deben ser previamente tratados con hipoclorito sódico (lejía doméstica), para destruir cualquier resto de ADN presente, y enjuagados con agua destilada o doblemente purificada de laboratorio, antes de usarse. Evidentemente, todo el material debe volver a ser esterilizado antes de ser usado en otra masa de agua, por lo que el proceso puede resultar algo tedioso si el muestreo incluye varias masas de agua en la misma jornada de campo. El punto exacto para la toma de la muestra en cada masa de agua debe elegirse con cuidado, dada la esperada variabilidad ambiental en la abundancia de zoosporas y viriones o, mejor aún, debe realizarse en múltiples localizaciones dentro de la masa de agua en función de su tamaño, para obtener un valor medio. Si esto no es posible, la toma de la muestra debería realizarse en los microhábitats más frecuentados por los anfibios, o en la salida del agua de la charca asumiendo que allí estamos recogiendo gran parte del material existente en ella. En el caso de *Rv*, también es posible extraer ADN de muestras de suelo, dado que los viriones son altamente resistentes a la desecación (Hall *et al.*, 2015), aunque en ese caso, y dado el limitado volumen de muestra que es posible extraer con los kits comerciales, la detección puede ser más complicada.

La ventaja del uso de ADN ambiental para la detección y cuantificación de los patógenos es evidente: ni siquiera es necesaria la presencia de los anfibios para la toma de muestras, por lo que es un método muy indicado cuando no sea posible capturar a los animales (por ejemplo, durante el día, fuera de la época de reproducción, etc.). Sin embargo, esta ventaja es también su gran inconveniente: si la abundancia de anfibios hospedadores es baja, la abundancia de sus patógenos también será baja, por lo que necesitaremos filtrar volúmenes grandes de agua para encontrar zoosporas o viriones. Además, y fundamentalmente en el

caso de *Bd* y *Bsal*, la existencia de centenares de especies de hongos quitridios en todo el mundo aumenta la posibilidad de obtener falsos positivos para *Bd* o *Bsal*. Además, este problema se agudiza si, como ocurre muchas veces, el método de ADN ambiental se basa en la detección de regiones de ADN más cortas de las empleadas con otro tipo de muestras, para lidiar así con la mayor fracturación del ADN ambiental. Igualmente arriesgado es el uso de SYBER Green, en lugar de sondas Taqman específicas para los patógenos estudiados, dado que así reducimos la especificidad del diagnóstico y aumentamos la probabilidad de obtención de falsos positivos.

En cualquier caso, conviene recordar que la Organización Internacional de Salud Animal (OIE, por sus siglas en francés) considera obligatoria la declaración de infección por *Bd/Bsal/Rv* (p.ej. Schloegel *et al.*, 2010) y, si no ha sido previamente diagnosticada correctamente en una zona concreta son necesarios, al menos, dos métodos diagnósticos distintos. Por lo tanto, la existencia de infección en una zona geográfica no puede establecerse únicamente mediante PCR (incluso en muestras de tejido), y un análisis histológico de tejido de anfibios infectados es totalmente necesario.

Registro de signos compatibles con quitridiomycosis y ranaviriosis

Mientras que la quitridiomycosis por *Bd* no produce lesiones macroscópicas evidentes en la piel, tanto *Bsal* como *Rv* producen signos claros en ejemplares enfermos. En el caso de *Bsal* es posible observar pequeñas úlceras en la piel, mientras que *Rv* puede producir úlceras muchos más evidentes y necrosis en extremidades, ojos, boca, etc. Evidentemente, se deben tomar muestras para la detección de infección de cualquier ejemplar con signos compatibles con estas enfermedades y ser analizadas inmediatamente.

Muestras de infección en ejemplares encontrados muertos

Cualquier ejemplar encontrado muerto durante las labores de seguimiento debería ser recogido para su necropsia posterior en laboratorio (Fig. 1). La necropsia debe realizarse siguiendo protocolos establecidos para anfibios, de un modo sistemático (revisando los sistemas corporales), ordenado (siempre siguiendo un protocolo no improvisado) y completo (no descuidando ningún órgano) (Pessier y Pinkerton, 2003). Debería incluir, al menos, la inspección macroscópica de la piel en busca de lesiones compatibles con la quitridiomycosis y la ranaviriosis, y la de los órganos internos antes especificados (básicamente hígado y riñón) para esta última. Posteriormente, debería realizarse un análisis por PCR a partir de muestras de piel e hígado, y complementado con un análisis histológico.

Las necropsias deben realizarse también en los ejemplares encontrados muertos por causas evidentes como atropellos, episodios de congelación o sequía prematura, depredación, etc., ya que permiten la obtención de muestras valiosas de tejido (sobre todo interno) para detectar la posible presencia desconocida de patógenos sin ocasionar daños a ejemplares vivos.

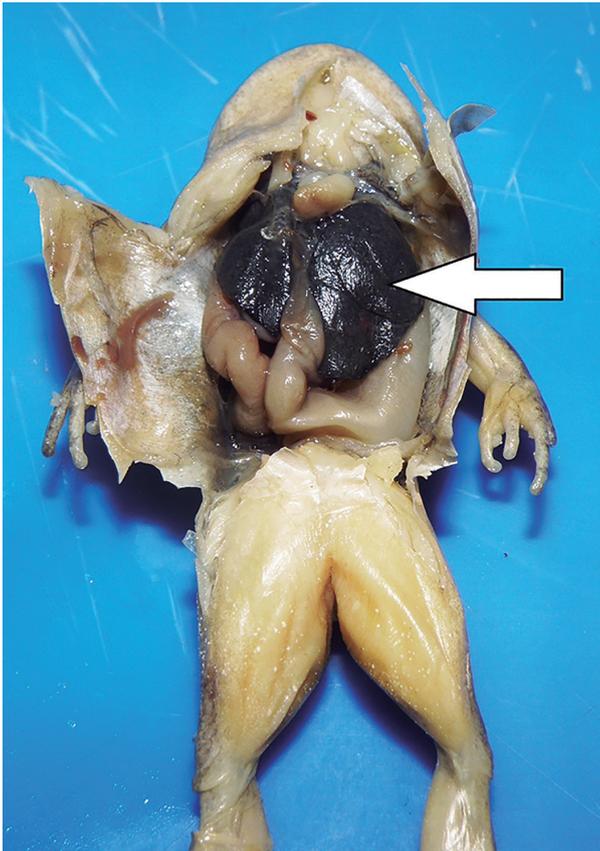


Fig. 1. - Necropsia de un ejemplar de *Rana pyrenaica* muerto por ranavirrosis. Se destaca la disposición del aparato digestivo, y con la flecha se indica el lóbulo izquierdo hepático donde tomar muestras para la detección de *Ranavirus*.

SEGUIMIENTO DE POBLACIONES CON INCIDENCIA CONOCIDA DE ENFERMEDADES EMERGENTES

Las poblaciones con presencia confirmada de patógenos emergentes deberían ser objeto, cuanto antes, de seguimiento para conocer con precisión los cambios en los niveles de infección y los efectos de la enfermedad sobre la tendencia poblacional. En este caso, las medidas de bioseguridad durante los muestreos deben ser aún más extremas que en el caso anterior. Así, por ejemplo, los guantes deben cambiarse para manipular distintos ejemplares o, alternativamente, rociarse con etanol absoluto antes de manipular un nuevo ejemplar, pero asegurándose que el etanol se ha evaporado completamente. Evidentemente, la toma de muestras de infección resulta fundamental en este caso, y debería abarcar todas las especies y estadios de desarrollo presentes, y no sólo aquellos más susceptibles. También los muestreos de ADN ambiental están recomendados en este caso para evaluar los cambios en los niveles de infección en el medio, más aún porque los niveles de zoosporas y viriones serán elevados en este caso.

Además, y dado que previsiblemente los patógenos emergentes provocarán cambios en las abundancias de las especies, el cálculo del tamaño poblacional debería ser

lo más exacto posible. Idealmente, se deberían emplear técnicas de marcaje y recaptura, aunque las estimaciones visuales pueden ser suficientes para calcular las trayectorias poblacionales con relativa precisión.

Conteo de ejemplares enfermos y retirada de cadáveres

En este caso, todos los ejemplares con signos de enfermedad deben ser contabilizados, y se debe tomar una muestra de infección suficiente de cada una de las especies y estadios de desarrollo implicados con objeto de calcular su prevalencia de infección.

Todos los ejemplares encontrados muertos deben ser contabilizados y retirarse del medio con objeto de ser analizados en laboratorio y, además, de reducir la carga ambiental de infección y evitar futuros contagios de ejemplares sanos. El conteo y la retirada de ejemplares muertos deben realizarse, preferentemente, durante el día, buscando en un amplio margen de terreno alrededor de la masa de agua y dentro de esta, pero también levantando piedras y cualquier objeto presente en el medio. Evidentemente, los cadáveres deben manipularse con extremo cuidado para no dispersar los agentes patógenos, aunque estos estén ya totalmente secos. Para ello, la mejor opción es fijar los más frescos directamente en el campo, en etanol al 70% o superior, y en formol al 4% para análisis histológicos de calidad una muestra más pequeña de cada especie y estadio de desarrollo. Los cadáveres más deteriorados (no aptos ni para histología ni para análisis de PCR) deben recogerse en bolsas de plástico a las que se añadirá Virkon o lejía, cerradas con bridas de plástico en el campo, y destruidas lo antes posible en dependencias especializadas mediante incineración.

ESTIMACIÓN DE LA ABUNDANCIA Y CÁLCULO DE TENDENCIAS POBLACIONALES

Como hemos indicado antes, además de la obtención de datos de presencia y/o incidencia de patógenos, resulta fundamental realizar estimaciones, lo más precisas posibles, de la abundancia de las poblaciones, antes incluso de la llegada de un patógeno emergente y, sobre todo, antes de que se produzcan las primeras mortalidades masivas. Evidentemente, sólo conociendo los valores de abundancia antes de los brotes de enfermedad seremos capaces de evaluar los efectos de la misma sobre las poblaciones.

Las técnicas de marcaje y recaptura, tanto de larvas como de adultos, y tanto con marcajes no individuales (Fig. 2a) como con marcajes con microchip (Fig. 2b), son, sin duda, las más recomendadas para la obtención de estimaciones de abundancia precisas en poblaciones de anfibios. Sin embargo, en el contexto de las enfermedades emergentes, es altamente recomendable evitar, en la medida de lo posible, la captura y el manejo de ejemplares con objeto de reducir los riesgos de contagio. Así, el programa de seguimiento de poblaciones de la Asociación Herpetológica Española (SARE) realizado por voluntarios, por ejemplo, se basa en muestreos de encuentros visuales sin captura de ejemplares. Lógicamente, los datos de abundancia

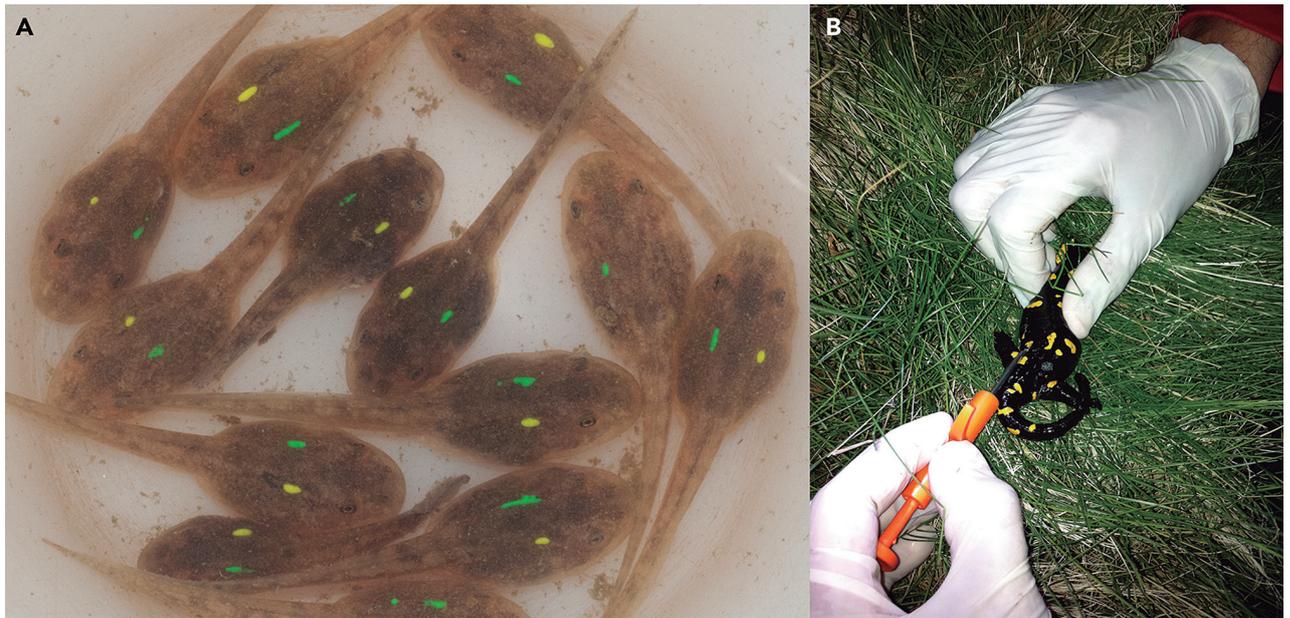


Fig. 2. - Marcaje no individual con elastómeros de colores de larvas de *Alytes obstetricans* (A) y marcaje individual con microchip de un ejemplar de *Salamandra salamandra* (B).

obtenidos con este método son mucho menos precisos, y siempre relativos a la especie y a la estación de muestreo. No obstante, esta metodología es suficiente para establecer tendencias y, en su caso, declives poblacionales (p.ej. Bosch y Carabias, 2014).

Por ejemplo, el estudio a largo plazo de la comunidad de anfibios del macizo de Peñalara, en el corazón del Parque Nacional de Guadarrama, tras el brote de quitridiomycosis severo aportó datos interesantes basándose, simplemente, en el conteo visual de puestas y larvas (Bosch *et al.*, 2018). Como puede apreciarse en la Fig. 3, las tra-

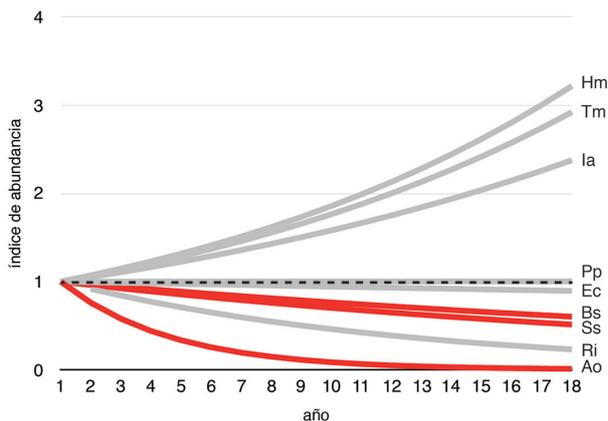


Fig. 3. - Índices de abundancia modelizados de 9 especies de anfibios en el macizo de Peñalara durante un período de 18 años consecutivos tras tres desde las primeras mortalidades registradas por *Bd*. En rojo aparecen las especies para las que se han detectado mortalidades masivas, mientras que en gris se muestran las especies para las que nunca se han encontrado ejemplares muertos. La línea de puntos indica el índice 0 de ausencia de crecimiento/declive. Hm, *Hyla molleri*; Tm, *Triturus marmoratus*; la, *Ichthyosaura alpestris*; Pp, *Pelophylax perezi*; Ec, *Epidalea calamita*; Bs, *Bufo spinosus*; Ss, *Salamandra salamandra*; Ri, *Rana iberica*; Ao, *Alytes obstetricans*.

yectorias poblacionales durante los 18 años de estudio de las especies sensibles a *Bd* y que sufrieron, por tanto, mortalidades masivas, fueron claramente negativas, mientras que el resto de las especies (a excepción de *Rana iberica*) mostraron tendencias positivas o neutras durante el período de estudio (Bosch *et al.*, 2018). En este caso, todas las especies eran portadoras de *Bd*, pero la enorme diferencia de susceptibilidad entre ellas pone de manifiesto la necesidad de elegir la especie adecuada si no se aborda el estudio completo de la comunidad. Además, este estudio demostró una correlación negativa estadísticamente significativa entre niveles de infección y abundancia de larvas y puestas, así como la existencia de un esperado retraso entre ambas variables como consecuencia de los períodos necesarios para alcanzar la madurez sexual. Por último, este estudio demostró que los efectos devastadores en las especies sensibles podrían ser permanentes y provocar, en sólo algunas décadas, su extinción local.

En el caso de la ranavirrosis, un estudio de 14 años, también basado en conteos visuales, puso de manifiesto los efectos severos y persistentes de *Rv* sobre las especies más sensibles (Bosch *et al.*, 2021b). Los conteos visuales incluyeron estadios adultos en algunas especies, como por ejemplo *S. salamandra* y varias especies de tritones, y cubrieron gran variedad de medios. Como puede apreciarse en la Fig. 4, las trayectorias de aquellas poblaciones donde se registraron mortalidades asociadas a *Rv* fueron mayoritariamente negativas, mientras que el resto de las poblaciones presentaron trayectorias planas o, incluso, positivas. Este estudio demuestra el importante papel que *Rv* puede desempeñar en los declives de anfibios, y la urgente necesidad de considerar a este patógeno como una de las mayores amenazas para su conservación.

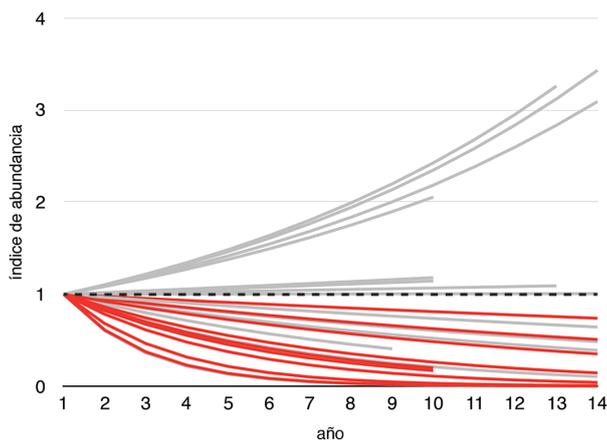


Fig. 4. - Índices de abundancia modelizados para 24 poblaciones de anfibios del Parque Nacional de Picos de Europa durante un período de 14 años comenzando tres años después de que registrásemos las primeras mortalidades por Rv. En rojo aparecen las poblaciones para las que se han detectado mortalidades masivas, mientras que en gris se muestran las poblaciones en las que nunca se han encontrado ejemplares muertos. La línea de puntos indica el índice 0 de ausencia de crecimiento/declive.

Por el contrario, los seguimientos de poblaciones afectadas por enfermedades emergentes mediante el marcaje individual con microchip proporcionan datos, no solo de sus tendencias poblacionales, sino también de la dinámica de infección de los patógenos. Por ejemplo, en el caso de *Bufo spinosus*, el marcaje de casi 2.000 ejemplares en Guadarrama durante más de 15 años nos ha permitido, no solo demostrar la tendencia negativa de las poblaciones más afectadas (Bosch *et al.* 2014), sino documentar los cambios anuales que se dan en el estatus de infección de los ejemplares adultos, o los momentos del año cuando se produce, probablemente, la pérdida y la ganancia de infección (Daversa *et al.*, 2018).

Por último, los estudios de genética de poblaciones pueden resultar eficaces para analizar los efectos de las enfermedades emergentes a largo plazo. Por ejemplo, Albert *et al.* (2015) encontraron una importante reducción de la diversidad genética en la población de *A. obstetricans* del macizo de Peñalara como resultado del cuello de botella demográfico experimentado por el brote severo de quitridiomycosis. De esta forma, es posible inferir de forma indirecta el efecto de las enfermedades a largo plazo, incluso sin tener información previa al brote de mortalidad.

SEGUIMIENTO DE POBLACIONES TRAS AC-TUACIONES DE MITIGACIÓN DE ENFERMEDADES EMERGENTES

El seguimiento continuo de las poblaciones afectadas por patógenos emergentes no sólo es necesario para evaluar la tendencia poblacional, sino también para recabar datos valiosos para intentar mitigar los impactos de las enfermedades. Además, una vez que se ha puesto en marcha algún intento de mitigación, el seguimiento de la población es totalmente necesario para analizar el resultado de esta. Por ejemplo, Fernández-Loras *et al.* (2020) realizaron un intento de eliminación de *Bd* en un sistema de pilones de ga-

nado de la provincia de Teruel que alberga poblaciones de *A. obstetricans*. Tras retirar las larvas infectadas de todos los pilones experimentales, en algunos de ellos no se realizaron medidas de control posteriores, en otros se impidió la entrada de ejemplares adultos durante toda la estación mediante su vallado y, finalmente, otro grupo de pilones fueron completamente desecados. Todos los pilones experimentales, y los del grupo control, fueron seguidos durante tres años tras las intervenciones, y se recogieron muestras de infección cuando se encontraron nuevas larvas invernantes en ellos. Como cabría esperar, la infección no desapareció del grupo control durante el período de seguimiento posterior, ni tampoco lo hizo del grupo de pilones donde sólo se retiraron las larvas infectadas, ni en los que además habían sido vallados. En el caso de los pilones que fueron desecados completamente, la infección desapareció durante los dos años posteriores a la intervención, aunque volvió a aparecer tres años después. Por lo tanto, este experimento demostró que, incluso intervenciones severas del medio acuático en poblaciones de estructura simple, no serían efectivas a largo plazo si no se aborda el hábitat al completo, incluyendo el medio terrestre circundante.

En otro experimento más exitoso en la Sierra de Tramontana de Mallorca (Bosch *et al.*, 2015) con *A. muletensis*, procedimos al vaciado completo de todas las pozas existentes en dos torrentes infectados con *Bd* durante el período de mayor sequía. Como puede verse en la Fig. 5 para el caso del Torrent des Ferrerets, la abundancia larvaria había caído a niveles insostenibles cuando decidimos realizar la intervención severa, también considerando el riesgo extremo de dispersión del patógeno al vecino torrente que alberga la inmensa mayoría de ejemplares de la especie. Las larvas existentes y los adultos que pudieron ser capturados de las inmediaciones de las pozas de los torrentes intervenidos fueron trasladados al laboratorio y tratados con fungicidas antes de ser liberados el año siguiente en sus localidades exactas de captura. Por último, las paredes de las pozas, y sus alrededores que mantenían cierto grado de humedad, fueron tratados con Virkon tras el vaciado con objeto de eliminar cualquier vestigio de *Bd*. Como se aprecia en la figura, tras la intervención la abundancia de larvas comenzó a recuperarse, mientras que desapareció la carga de infección. El seguimiento de esta actuación continúa ocho años después de la intervención hasta la actualidad, sin que se haya vuelto a registrar infección nuevamente.

CONCLUSIONES

Los programas de vigilancia epidemiológica en poblaciones de anfibios son esenciales dado el importante papel de los patógenos emergentes en el declive de este grupo animal. Estos programas, destinados al estudio de la ocurrencia de los patógenos y la detección de enfermedad y mortalidad, deben ir de la mano de programas de seguimiento de poblaciones para poder establecer los efectos de las enfermedades sobre las tendencias poblacionales de los anfibios. Por desgracia, ambos tipos de programas tienen requerimientos específicos distintos, y no siempre es posible obtener datos epidemiológicos y estimaciones de abundancia durante las mismas jornadas de trabajo de

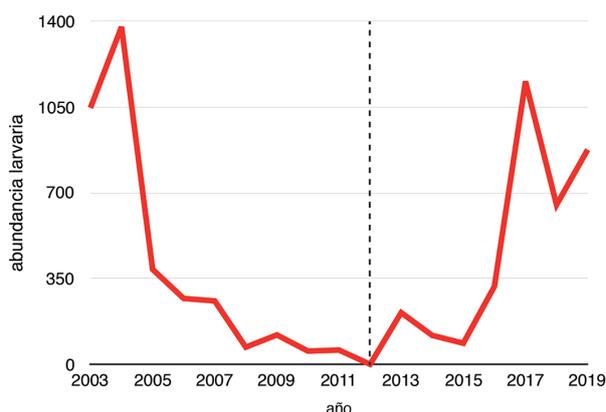


Fig. 5. - Número de larvas de *Alytes muletensis* contabilizadas en el Torrent des Ferrerets antes y después de la erradicación de *Bd* realizada en 2012 (Bosch *et al.*, 2015).

campo. El avance en el conocimiento de la dinámica de las enfermedades de anfibios realizado en las últimas dos décadas permite acotar, hasta cierto punto, los trabajos de los programas de vigilancia, e intentar compatibilizarlos con las tareas de seguimiento de poblaciones. Lamentablemente, el elevado coste económico del análisis de muestras de infección mediante métodos moleculares (no inferior a 5-10 € por muestra), o el elevado tiempo de análisis que requieren las técnicas histológicas, complican enormemente la obtención de datos epidemiológicos.

AGRADECIMIENTOS

El personal de la Consejería de Medio Ambiente de las Islas Baleares y, especialmente, Xavier Manzano, Eva Moragues, Irene Garnería y Samuel Pinya, colaboraron en los trabajos de desinfección realizados en Mallorca y realizan las labores de seguimiento de las poblaciones de ferreret. Gonçalo M. Rosa contribuyó a mejorar el texto aportando información relevante.

BIBLIOGRAFÍA

Albert, E.M., Fernández-Beaskoetxea, S., Godoy, J.A., Tobler, U., Schmidt, B.R., Bosch, J., 2015. Genetic management of an amphibian population after a chytridiomycosis outbreak. *Conserv. Genet.* 16, 103-111.

Anderson, R.M., May, R.M., 1979. Population biology of infectious diseases: Part I. *Nature* 280, 361-367.

Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocumbe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K.R., Marantelli, G., Parkes, H., 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Nat. Acad. Sci. United States of America* 95, 9031-9036.

Berger, L., Speare, R., Kent, A., 1999. Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histologic examination. <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chhisto.htm>.

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.

Bosch, J., Carabias, J., 2014. Primeros resultados del Programa SARE en anfibios. *Bol. Asoc. Herpet. Esp.* 25, 13-21.

Bosch, J., Fernández-Beaskoetxea, S., Garner, T.W.J., Carrascal, L.M., 2018. Long-term monitoring of an amphibian community after a climate change- and infectious disease-driven species extirpation. *Global Change Biol.* 24, 2622-2632.

Bosch, J., Fernández-Beaskoetxea, S., Scherer, R.D., Amburgey, S.M., Muths, E., 2014. Demography of common toads after local extirpation of co-occurring Midwife Toads. *Amphibia-Reptilia* 35, 293-303.

Bosch, J., Martel, A., Sopniewski, J., Thumsová, B., Ayres, C., Scheele, B.C., Velo-Antón, G., Pasmans, F., 2021a. *Batrachochytrium salamandrivorans* threat to the Iberian urodele hotspot. *J. Fungi* 7, 644.

Bosch, J., Martínez-Solano, I., García-París, M., 2001. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of Central Spain. *Biol. Cons.* 97, 331-337.

Bosch, J., Mora-Cabello de Alba, A., Marquinez, S., Price, S.J., Thumsová, B., Bielby, J., 2021b. Long-term monitoring of amphibian populations of a national park in northern Spain reveals negative persisting effects of *Ranavirus*, but not *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Front. Vet. Sci.* <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.645491>.

Bosch, J., Rincón, P.A., 2008. Chytridiomycosis-mediated expansion of *Bufo bufo* in a montane area of Central Spain: an indirect effect of the disease. *Divers. & Distrib.* 14, 637-643.

Bosch, J., Sánchez-Tomé, E., Fernández-Loras, A., Oliver, J.A., Fisher, M.C., Garner, T.W.J., 2015. Successful elimination of a lethal wildlife infectious disease in nature. *Biol. Lett.* 11, 20150874.

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. *Diseas. Aquat. Organ.* 60, 141-148.

Briggs, C., Burgin, S., 2004. Congo Red, an effective stain for revealing the chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, in epidermal skin scrapings from frogs. *Mycologist* 18, 98-104.

Castro-Monzón, F., Rödel, M.O., Jeschke, J.M., 2020. Tracking *Batrachochytrium dendrobatidis* infection across the globe. *EcoHealth* 17, 270-279.

Ceballos, G., Ehrlich, P.R., Barnosky, A.D., García, A., Pringle, R.M., Palmer, T.M., 2015. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Sci. Adv.* 1, e1400253.

Clare, F.C., Halder, J.B., Daniel, O., Bielby, J., Semenov, M.A., Jombart, T., Loyau, A., Schmeller, D.S., Cunningham, A.A., Rowcliffe, M., Garner, T.W.J., Bosch, J., Fisher, M.C., 2016. Climate forcing of an emerging pathogenic fungus across a montane multihost community. *Phil. Trans. Roy. Soc. B* 371, 20150454.

Cox, N., Chanson, J., Stuart, S., 2006. The Status and Distribution of Reptiles and Amphibians of the Mediterranean Basin. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge.

Cusaac, J.P.W., Carter, E.D., Woodhams, D.C., Robert, J., Spatz, J.A., Howard, J.L., Lillard, C., Graham, A.W., Hill, R.D.,

- Reinsch, S., McGinnity, D., Reeves, B., Bemis, D., Wilkes, R.P., Sutton, W.B., Waltzek, T.B., Hardman, R.H., Miller, D.L., Gray, M.J., 2021. Emerging pathogens and a current-use pesticide: potential impacts on eastern hellbenders. *J. Aquat. An. Health* 33, 24–32.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., 2000. Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health. *Science* 287, 443–449.
- Daversa, D.R., Monsalve-Carcaño, C., Carrascal, L.M., Bosch, J., 2018. Seasonal migrations, body temperature fluctuations, and infection dynamics in adult amphibians. *PeerJ* 6, e4698.
- Davidson, C., Shaffer, H.B., Jennings, M.R., 2002. Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. *Cons. Biol.* 16, 1588–1601.
- Duffus, A.L.J., Waltzek, T.B., Stöhr, A.C., Allender, M.C., Gotesman, M., Whittington, R.J., Hick, P., Hines, M.K., Marschang, R.E., 2015. Distribution and host range of ranaviruses. In: Gray, M.J., Chinchar, V.G. (Eds.), *Ranaviruses*. Springer International Publishing, 9–57.
- Faruk, A., Belabut, D., Ahmad, N., Knell, R.J., Garner, T.W.J., 2013. Effects of oil-palm plantations on diversity of tropical anurans. *Cons. Biol.* 27, 615–624.
- Fellers, G.M., Green D.E., Longcore J.E., 2001. Oral chytridiomycosis in the mountain yellow legged frog (*Rana muscosa*). *Copeia* 4: 945–953.
- Fernández-Beaskoetxea, S., Bosch, J., Bielby, J., 2016. Infection and transmission heterogeneity of a multi-host pathogen (*Batrachochytrium dendrobatidis*) within an amphibian community. *Dis. Aquat. Organ.* 118, 11–20.
- Fernández-Beaskoetxea, S., Carrascal, L.M., Fernández-Loras, A., Fisher, M.C., Bosch, J., 2015. Short term minimum water temperatures determine levels of infection by the amphibian chytrid fungus in *Alytes obstetricans* tadpoles. *PLoS ONE* 10, e0120237.
- Fernández-Loras, A., Boyero, L., Bosch, J., 2020. In-situ severe breeding habitat intervention only achieves temporary success in reducing *Batrachochytrium dendrobatidis* infection. *Amphibia-Reptilia* 41, 261–267.
- Finlay, J.C., Vredenberg, V.T., 2007. Introduced trout sever trophic connections in watersheds: consequences for a declining amphibian. *Ecology* 88, 2187–2198.
- Fisher, M.C., Garner, T.W.J., 2007. The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biol. Rev.* 21, 2–9.
- Fisher, M.C., Garner, T.W.J., Walker, S.F., 2009. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Ann. Rev. Microbiol.* 63, 291–310.
- Fisher, M.C., Ghosh, P., Shelton, J.M.G., Bates, K., Brookes, L., Wierzbicki, C., Rosa, G.M., Farrer R.A., Aanensen, D.M., Alvarado-Rybak, M., Bataille, A., Berger, L., Böll, S., Bosch, J., Clare, F.C., Courtois, E.A., Crottini, A., Cunningham, A.A., Doherty-Bone, T.M., Gebresenbet, F., Gower, D.J., Höglund, J., James, T.Y., Jenkinson, T.S., Kosch, T.A., Lambertini, C., Laurila, A., Lin, C., Loyau, A., Martel, A., Meurling, S., Miaud, C., Mingting, P., Ndriantsoa, S., O'Hanlon, S.J., Pasmans, F., Rakotonanahary, T., Rabemananjara, F.C.E., Ribeiro, L.P., Schmeller, D.S., Schmidt, B.R., Skerratt, L., Smith, F., Soto-Azat, C., Tessa, G., Toledo, L.F., Valenzuela-Sánchez, A., Verster, R., Vörös, J., Waldman, B., Webb, R.J., Weldon, C., Wombwell, E., Zamudio, K.R., Longcore, J.E., Garner, T.W.J., 2018. Development and worldwide use of non-lethal, and minimal population-level impact, protocols for the isolation of amphibian chytrid fungi. *Scient. Rep.* 8, 7772. DOI:10.1038/s41598-018-24472-2.
- Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., Gurr, S.J., 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484, 186–194.
- Garner, T.W.J., Walker, S., Bosch, J., Leech, S., Rowcliffe, J.M., Cunningham, A.A., Fisher, M.C., 2009. Life history trade-offs influence mortality associated with the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Oikos* 118, 783–791.
- Gray, M.J., Duffus, A.L.J., Haman, K.H., Harris, R.N., Allender, M.C., Thompson, T.A., Christman, M.R., Sacerdote-Velat, A., Sprague, L.A., Williams, J.M., Miller, D.L., 2017. Pathogen surveillance in herpetofaunal populations: guidance on study design, sample collection, biosecurity, and intervention strategies. *Herp. Rev.* 48, 334–351.
- Green, D.E., Converse, K.A., Schrader, A.K., 2002. Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996–2001. *Ann. New York Acad. Sci.* 969, 323–339.
- Hall, E.M., Crespi, E.J., Goldberg, C.S., Brunner, J.L., 2015. Evaluating environmental DNA-based quantification of ranavirus infection in wood frog populations. *Mol. Ecol. Res.* 16, 423–433.
- Harnos, K., Bosch, J., Thumsová, B., Martínez-Silvestre, A., Velarde, R., Vörös, J., 2021. Evidence of amphibian mortality caused by chytridiomycosis in Central Europe. *Herp. Notes* 12, 1213–1218.
- Hua, J., Wuerthner, V.P., Jones, D.K., Mattes, B., Cothran, R.D., Relyea, R.A., Hoverman, J.T., 2017. Evolved pesticide tolerance influences susceptibility to parasites in amphibians. *Evol. Applic.* 10, 802–812.
- Hughes, A.C., Marshall, B.M., Strine, C.T., 2021. Gaps in global wildlife trade monitoring leave amphibians vulnerable. *eLife* 10, e70086.
- Hyatt, A.D., Boyle, D.G., Olsen, V., Boyle, D.B., Berger, L., Obendorf, D., *et al.* 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Organ.* 73, 175–92.
- Johnson, P.T.J., McKenzie, V.J., Peterson, A.C., Kerby, J.L., Brown, J., Blaustein, A.R., Jackson, T., 2011. Regional Decline of an Iconic Amphibian Associated with Elevation, Land-Use Change, and Invasive Species. *Cons. Biol.* 25, 556–566.
- Knapp, R.A., Fellers, G.M., Kleeman, P.M., Miller, D.A.W., Vredenburg, V.T., Bree, E., Briggs, C.J., 2016. Large-scale recovery of an endangered amphibian despite ongoing exposure to multiple stressors. *Proc. Nat. Acad. Sci. United States of America* 113, 11889–11894.
- Kruger, K.M., Hines, H.B., Hyatt, A.D., Boyle, D.G., Hero, J.M., 2006. Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. *Dis. Aquat. Organ.* 71, 141–148.
- Lambert, M.R., Womack, M.C., Byrne, A.Q., Hernández-Gómez, O., Noss, C.F., Rothstein, A.P., Blackburn, D.C., Collins, J.P., Crump, M.L., Koo, M.S., Nanjappa, P., Rollins-Smith, L., Vredenburg, V.T., Rosenblum, E.B., 2020. Comment on "Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity". *Science* 367, eaay1838.
- Leung, W.T.M., Thomas-Walters, L., Garner, T.W.J., Balloux, F., Durrant, C., Price, S.J., 2017. A quantitative-PCR based me-

- thod to estimate ranavirus viral load following normalisation by reference to an ultraconserved vertebrate target. *J. Vir. Meth.* 249, 147–155.
- Lips, K.R., 2016. Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. *Phil. Trans. Royal Soc. B* 371, 20150465.
- Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., Alford, R.A., Voles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A.P., Collins, J.P., 2006. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proc. Nat. Acad. Sci. United States of America* 103, 3165–3170.
- Lips, K.R., Diffendorfer, J., Mendelson, J.R., Sears, M.W., 2008. Riding the wave: Reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biol.* 6, 0441–0454.
- López-López, P., Maiorano, L., Falcucci, A., Barba, E., Boitani, L., 2011. Hotspots of species richness, threat and endemism for terrestrial vertebrates in SW Europe. *Acta Oecol.* 37, 399–412.
- 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., Mulet, C., Zamudio, K., Bosch, J., Lötters, S., Wombwell, E., Garner, T.W.J., Spitzen-van der Sluijs, A., Salvadio, S., Ducatelle, R., Nishikawa, K., Nguyen, T.T., Van Bocklaer, I., Bossuyt, F., Pasmans, F., 2014. Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science* 346, 630–631.
- 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. Nat. Acad. Sci. United States of America* 110, 15325–15329.
- Martel, A., Vila-Escale, M., Fernández-Guiberteau, D., Martínez-Silvestre, A., Canessa, S., Van Praet, S., Pannon, P., Chiers, K., Ferran, A., Kelly, M., Picart, M., Piulats, D., Li, Z., Pagone, V., Pérez-Sorribes, L., Molina, C., Tarragó-Guarro, A., Velarde-Nieto, R., Carbonell, F., Obón, E., Martínez-Martínez, D., Guinart, D., Casanovas, R., Carranza, S., Pasmans, F., 2020. Integral chain management of wildlife diseases. *Conservation Letters* 13, 1–6.
- McMenamin, S.K., Hadly, E.A., Wright, C.K., 2008. Climatic change and wetland desiccation cause amphibian decline in Yellowstone National Park. *Proc. Nat. Acad. Sci. United States of America* 105, 16988–16993.
- Medina, D., Garner, T.W.J., Carrascal, L.M., Bosch, J., 2015. Delayed metamorphosis of amphibian larvae facilitates *Batrachochytrium dendrobatidis* transmission and persistence. *Dis. Aquat. Organ.* 117, 85–92.
- Miller, D., Pessier, A., Hick, P., Whittington, J.K., 2015. Comparative Pathology of Ranaviruses and Diagnostic Techniques. 171–208. In: Gray, M.J., Chinchar, V.G. (eds.), *Ranaviruses. Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates*. Springer Open.
- Mörner, T., Obendorf, D.L., Artois, M., Woodford, M.H., 2002. Surveillance monitoring of wildlife diseases. *OIE Rev. Scient. Tech.* 21, 67–76.
- Murray, K., Retallick, R., McDonald, K.R., Mendez, D., Aplin, K., Kirkpatrick, P., Berger, L., Hunter, D., Hines, H.B., Campbell, R., Pauza, M., Driessen, M., Speare, R., Richards, S.J., Mahony, M., Freeman, A., Phillott, A.D., Hero, J.-M., Driscoll, D., Puschendorf, R., Skerratt, L.F., 2010. The distribution and host range of the pandemic disease chytridiomycosis in Australia spanning surveys from 1956 to 2007. *Ecology* 91, 1557.
- 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, e0190955.
- O'Hanlon, S.J., Rieux, A., Farrer, R.A., Rosa, G.M., Waldman, B., Bataille, A., Kosch, T.A., Murray, K., Brankovics, B., Fumagalli, M., Martin, M.D., Wales, N., Alvarado-Rybak, M., Bates, K.A., Berger, L., Böll, S., Brookes, L., Clare, F.C., 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., 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., Gilbert, M.T.P., 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* 360, 621–627.
- Olson, D.H., Aanensen, D.M., Ronnenberg, K.L., Powell, C.I., Walker, S.F., Bielby, J., Garner, T.W.J., Weaver, G., Fisher, M.C., 2013. Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. *PLoS ONE* 8, e56802.
- Pearman, P.B., Garner, T.W.J., 2005. Susceptibility of Italian agile frog populations to an emerging strain of *Ranavirus* parallels population genetic diversity. *Ecol. Lett.* 8, 401–408.
- Pessier, A., 2007. Cytologic diagnosis of disease in amphibians. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 10, 187–206.
- Pessier, A.P., Pinkerton, M., 2003. Practical gross necropsy of amphibians. *Sem. Avian Exotic Pet Med.*, 12, 81–88.
- Phillips, B.L., Puschendorf, R., 2013. Do pathogens become more virulent as they spread? Evidence from the amphibian declines in Central America. *Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci.* 280, 20131290.
- Phillott, A.D., Speare, R., Hines, H.B., Skerratt, L.F., Meyer, E., McDonald, K.R., Cashins, S.D., Mendez, D., Berger, L., 2010. Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies. *Dis. Aquat. Organ.* 92, 175–185.
- Piotrowski, J.S., Annis, S.L., Longcore, J.E., 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96, 9–15.
- Price, S.J., Ariel, E., Maclaine, A., Rosa, G.M., Gray, M.J., Brunner, J.L., Garner, T.W.J., 2017. From fish to frogs and beyond: Impact and host range of emergent ranaviruses. *Virology* 511, 272–279.
- Price, S.J., Garner, T.W.J., Nichols, R.A., Balloux, F., Ayres, C., Mora-Cabello de Alba, A., Bosch, J., 2014. Collapse of amphibian communities due to an introduced ranavirus. *Curr. Biol.* 24, 2586–2591.
- Price, S.J., Leung, W.T.M., Owen, C.J., Puschendorf, R., Sergeant, C., Cunningham, A.A., Balloux, F., Garner, T.W.J., Nichols, R.A., 2019. Effects of historic and projected climate change on the range and impacts of an emerging wildlife disease. *Global Ch. Biol.* 25, 2648–2660.
- Rollins-Smith, L.A., 2020. Global amphibian declines, disease, and the ongoing battle between *Batrachochytrium* fungi and the immune system. *Herpetologica* 76, 178–188.
- Rosa, G.M., Sabino-Pinto, J., Laurentino, T.G., Martel, A., Pasmans, F., Rebelo, R., Griffiths, R.A., Stöhr, A.C., Marschang, R.E., Price S.J., Garner, T.W.J., Bosch, J., 2017. Impact of asynchronous emergence of two lethal pathogens on amphibian assemblages. *Scient. Rep.* 7, 43260.

- Saucedo, B., Rijks, J., Spitzen-Van Der Sluijs, A., Wilkie, G., Hughes, J., Van Asten, A., Van den Broek, J., Kik, M., Van Beurden, S., Gröne, A., 2016. Ranaviruses in wild amphibians in the Netherlands: the 2015 update. Conference of the European Wildlife Disease Association 12, 187-188.
- Scheele, B.C., Pasmans, F., Skerratt, L.F., Berger, L., Martel, A., Beukema, W., Acevedo, A.A., Burrowes, P.A., Carvalho, T., Catenazzi, A., De la Riva, I., Fisher, M.C., Flechas, S.V., Foster, C.N., Frías-Álvarez, P., Garner, T.W.J., Gratwicke, B., Guayasamin, J.M., Hirschfeld, M., Kolby, J.E., Kosch, T.A., La Marca, E., Lindenmayer, D.B., Lips, K.R., Longo, A.V., Maneyro, R., McDonald, C.A., Mendelson III, J., Palacios-Rodriguez, P., Parra-Olea, G., Richards-Zawacki, C. L., Rödel, M.O., Rovito, S.M., Soto-Azat, C., Toledo, L.F., Voyles, J., Weldon, C., Whitfield, S.M., Wilkinson, M., Zamudio, K.R., Canessa, S., 2019. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science* 363, 1459–1463.
- Scheele, B.C., Skerratt, L.F., Grogan, L.F., Hunter, D.A., Cleemann, 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. Cons.* 206, 37–46.
- Schloegel, L.M., Daszak, P., Cunningham, A.A., Speare, R., Hill, B., 2010. Two amphibian diseases, chytridiomycosis and ranaviral disease, are now globally notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE): an assessment. *Dis. Aquat. Organ.* 92, 101-108.
- Skerratt, L.F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K.R., Phillott, A.D., Hines, H.B., Kenyon, N., 2007. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth* 4, 125–134.
- Solís, R., Lobos, G., Walker, S.F., Fisher, M.C., Bosch, J., 2010. Presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in feral populations of *Xenopus laevis* in Chile. *Biol. Inv.* 12, 1641-1646.
- Spitzen-van der Sluijs, A., Stark, T., DeJean, T., Verbrugghe, E., Herder, J., Gilbert, M., Janse, J., Martel, A., Pasmans, F., Valentini, A., 2020. Using environmental DNA for detection of *Batrachochytrium salamandrivorans* in natural water. *Environ. DNA* 2, 565–571.
- 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.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W., 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306, 1783-1786.
- Stuart, S.N., Hoffmann, M., Chanson, J.S., Cox, N.A., Berridge, R.J., Ramani, P., Young, B.E. (eds.), 2008. *Threatened Amphibians of the World*. Lynx Edicions, Barcelona.
- Thomas, V., Blooi, M., Van Rooij, P., Van Praet, S., Verbrugghe, E., Grassell, E., Lukac, M., Smith, S., Pasmans, F., Martel, A., 2017. Recommendations on diagnostic tools for *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Transb. Emerg. Dis.* 66, e478-e488.
- Valenzuela-Sánchez, A., O'Hanlon, S.J., Alvarado-Rybak, M., Uribe-Rivera, D.E., Cunningham, A.A., Fisher, M.C., Soto-Azat, C., 2018. Genomic epidemiology of the emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* from native and invasive amphibian species in Chile. *Transb. Emerg. Dis.* 65, 309–314.
- Van Rooij, P., Martel, A., Haesebrouck, F., Pasmans, F., 2015. Amphibian chytridiomycosis: A review with focus on fungus-host interactions. *Vet. Res.* 46, 1–22.
- von Essen, M., Leung, W.T.M., Bosch, J., Pooley, S., Ayres, C., Price, S.J., 2020. High pathogen prevalence in an amphibian and reptile assemblage at a site with risk factors for dispersal in Galicia, Spain. *PLoS ONE* 15, e0236803.
- Vredenburg, V.T., Knapp, R.A., Tunstall, T.S., Briggs, C.J., 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proc. Nat. Acad. Sci. United States of America* 107, 9689–9694.
- Walker, S.F., Baldi, M., Jenkins, D., Garner, T.W.J., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Bosch, J., Fisher, M.C., 2007. Environmental detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in a temperate climate. *Dis. Aquat. Organ.* 77, 105-112.
- Weldon, C., Du Preez, L.H., Hyatt, A.D., Muller, R., Speare, R., 2004. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2100–2105.