

De chytrideschimmel *Batrachochytrium dendrobatidis* in Nederland

Een overzicht van tien jaar onderzoek

Annemarieke Spitzen

Ziekteverwekkers zijn een onderdeel van het natuurlijk systeem. Echter, de introductie van een nieuwe, onbekende ziekteverwekker kan de stabiliteit en het evenwicht van een systeem verstoren.



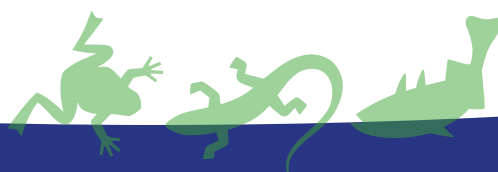
Vroedmeesterpad. (Foto: Annemarieke Spitzen)

De aandacht voor invasieve ziekteverwekkers bij amfibieën is relatief recent. In de jaren vijftig van de vorige eeuw viel het wetenschappers op dat op verschillende plekken populaties en soorten achteruitgingen, maar het duurde tot het eerste Herpetologische Wereldcongres in 1989 dat men zich realiseerde dat het een wereldwijd probleem was (Moore, 2014). Eind jaren negentig van de vorige eeuw werd de schimmel *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) geïsoleerd van besmette gifkikkers (Dendrobatidae) uit een dierentuin in Washington (USA). Infectie met Bd kan leiden tot de ziekte chytridiomycose. Er zijn veel factoren die bijdragen aan de wereldwijde achteruitgang van amfibieën zoals de vernietiging van het leefgebied, verdroging, vervuiling en invasieve exoten. Deze factoren vormen op zichzelf al bedreigingen, maar versterken elkaar ook. De schimmel Bd is echter de 'smoking gun' van de achteruitgang:

Bd is de overkoepelende factor die de extreem snelle achteruitgang van soorten en populaties over de hele wereld verklaart.

Bd wereldwijd

Lang bleef onbekend waar de schimmel vandaan komt en hoe deze de hele wereld heeft kunnen overgaan om in een relatief korte tijd ook in afgelegen, ongerepte gebieden toe te slaan. Gespeculeerd is dat de schimmel afkomstig is uit Azië, Afrika, Noord- of Zuid-Amerika, maar pas in 2018 werd duidelijk dat op het Koreaanse schiereiland een hyperdiverse Bd-stam/lineage bestaat (Bd-ASIA1) (O'Hanlon *et al.*, 2018). De genetische kenmerken van deze Bd-ASIA1 tonen aan dat het de voorouder is van de huidige wereldwijde epidemie. Ongeveer 120-50 jaar geleden is uit deze voorouderlijke lijn Bd-GPL (Global Panzootic Lineage) ontstaan. Deze zeer virulente Bd-stam heeft zich





Vrijwilliger Wim van den Heuvel tijdens het Bd-onderzoek. (Foto: Jelger Herder)



Swab *Dendrobates auratus*. (Foto: A. Spitzen)

door de wereldwijde handel in amfibieën en het totale gebrek aan biosecurity over de wereld weten te verspreiden.

De verspreiding van Bd over de wereld heeft geleid tot massale sterfte en de extreme achteruitgang of zelfs het uitsterven van wel 200 soorten. De problemen met Bd zijn het grootst in Australië, Midden- en Zuid-Amerika, Zuid-Europa en West-Amerika.

Bd als ziekteverwekker

Als Bd de huid van een amfibie succesvol weet binnen te dringen, verdikt de huid wat de osmoregulatie (uitwisseling van stoffen met het externe milieu) beperkt, waardoor het transport van elektrolyten (bepaalde ionen in bloed, cellen en extracellulaire vloeistof) verslechterd met als gevolg een hartaanval en de dood van het dier. De hele levenscyclus van Bd (van infectieuze vrij levende

zoöspore die zich hecht aan de huid tot het vormen van een zoösporangium (een “doosje” met zoösporen) in de huid duurt bij 22°C vier tot vijf dagen. Sommige amfibiesoorten zijn resistent voor Bd. Bij deze soorten hecht de schimmel zich niet aan de huid. Ook wanneer een dier een infectie oploopt, leidt dat niet altijd tot ziekte. Als Bd de huid infecteert, zijn de klinische symptomen variabel binnen en tussen soorten. De gevoeligheid van een soort voor Bd is sterk contextafhankelijk, de gevoeligheid kan ook variëren per levensfase van een soort en is afhankelijk van het type Bd waarmee het dier wordt geïnfecteerd (Blaustein *et al.*, 2018). Het blootstellen van jonge kikkervisjes aan pesticiden kan bijvoorbeeld een uitgesteld negatief effect hebben als deze dieren later in hun leven worden blootgesteld aan Bd (Rumschlag & Rohr, 2018).



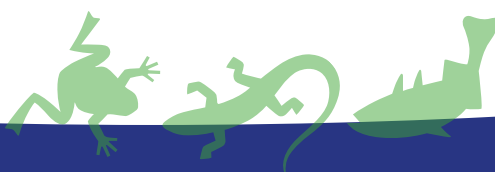


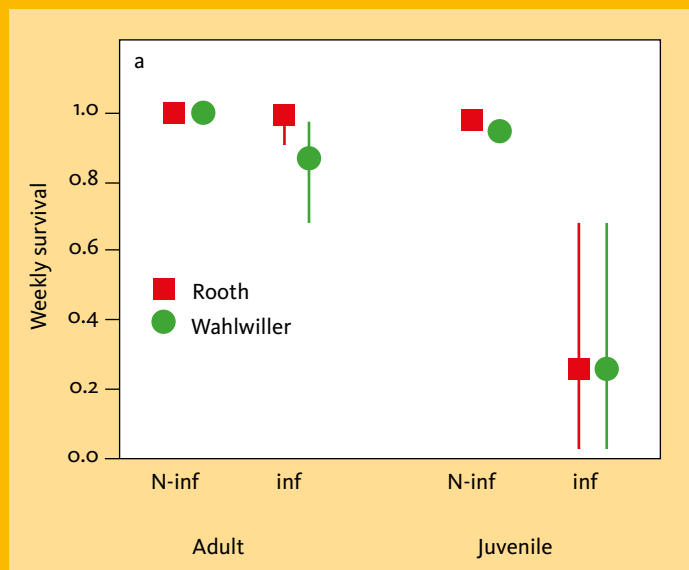
Buikpatroon van een geelbuikvuurpad. (Foto: Annemarieke Spitzen)

Bd in Nederland

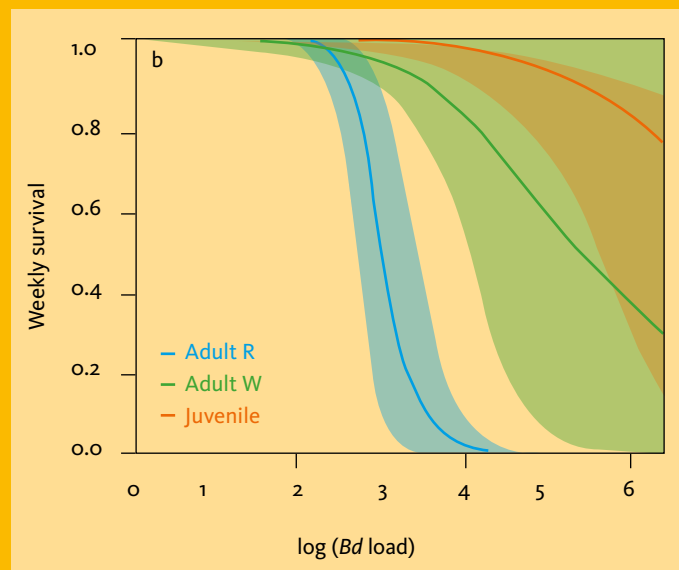
Totdat we in 2008 actief begonnen met het zoeken naar Bd in Nederland en België, wisten we niet of het in deze landen aanwezig was en ook niet of en zo ja, in welke mate, 'onze' soorten er gevoelig voor waren. In 2008 hebben we populaties Amerikaanse stierkikkers in Vlaanderen bemonsterd op aanwezigheid van Bd. In de periode 2008-2010 hebben we met veel vrijwilligers wilde en gehouden amfibieën bemonsterd op aanwezigheid van Bd. Tegelijkertijd zijn we in twee natuurhistorische musea de collecties gaan bemonsteren om te kijken of we historische samples konden vinden. Dit heeft ertoe geleid dat we Bd bij tien van de 18 onderzochte, in de Nederlandse en Belgische natuur voorkomende amfibiesoorten hebben aangetroffen. Bd bleek verspreid over beide landen voor te komen. De gemiddelde prevalentie (het besmette gedeelte van de populatie) was 5%, maar de prevalentie bij de Amerikaanse stierkikker was 20,5%. Opvallend was dat de prevalentie tussen jaren voor sommige soorten sterk fluctueerde. Zo was de prevalentie voor vroedmeesterpad en geelbuikvuurpad in 2010 respectievelijk 93% en 72% lager dan in 2009 (Spitzen-van der Sluijs *et al.*, 2014).

Een opvallend resultaat uit deze studie was dat de vroedmeesterpad – een gekend zeer gevoelige soort voor Bd met grote sterfte in Spaanse en Portugese populaties – in Nederland relatief weinig hinder lijkt te ondervinden. Ook in Nederland sterven echter vroedmeesterpadden door besmetting met Bd. In 2010 zijn twee dode juveniele vroedmeesterpadden in Limburg gevonden, en in 2018 vier dode vroedmeesterpadden in een uitgezette populatie in Den Haag. De autopsies wezen uit dat deze dieren door chytridiomycose waren doodgegaan. Wat hiervan belangrijk is, is dat in Nederland een potentieel dodelijke schimmel (Bd-GPL) aanwezig is, maar met een relatief beperkte prevalentie en infectie-intensiteit. Tegelijkertijd leeft in Nederland een sterk gevoelige soort (de vroedmeesterpad), maar zien we niet het zo massale instorten van de populaties, zoals we die uit Spanje kennen. Het is waarschijnlijk een gevoelig evenwicht tussen de omgevingsfactoren, de hypervirulente Bd-stam en de gastheersoorten, waardoor het niet tot een massale uitbraak komt. Dit betekent wel dat dit evenwicht verstoord kan worden door bijvoorbeeld klimatologische veranderingen, verslechtering van het leefgebied of de introductie van andere Bd-stammen of andere ziekteverwekkers (Spitzen – van der Sluijs *et al.*, 2011; 2014).





Figuur 1a: De kans op overleven naar de volgende week daalt aanzienlijk voor met name juveniele geelbuikvuurpadden. Op de horizontale x-as staat 'N-inf' (not infected/niet besmet) en 'Inf' (infected/besmet) voor zowel de adulte (links) als de juveniele (rechts) dieren. Op de verticale as (y-as) staat de kans dat een individueel dier overleeft tot de volgende week. Een overlevingskans van 1.0 betekent dat het dier 100% kans heeft dat het volgende week nog leeft. Een overlevingskans van 0.6 betekent dat het dier 60% kans heeft om volgende week nog te leven. De beide onderzoeksgebieden zijn aangegeven met een vierkantje (Groeve 't Rooth) en een rondje (Wahlwiller). Duidelijk is te zien dat zowel de niet-besmette volwassen als de juveniele dieren in beide gebieden een hoge kans op overleving hebben, maar dat deze kans met name voor de besmette juveniele dieren in de twee onderzoeksgebieden sterk daalt.



Figuur 1b: Deze figuur geeft de relatie weer tussen de intensiteit van een besmetting (horizontale as, Bd-load) en de kans op overleving (verticale as, van 0 (0%) tot 1 (100%)) voor juveniele dieren (beide onderzoeksgebieden samen genomen) en de volwassen dieren in groeve 't Rooth (adults R) en de volwassen dieren in het gebied Wahlwiller (adults W). Te zien is dat met name voor de juveniele dieren de kans op overleven bij een hogere infectie-intensiteit met Bd sterk daalt. Voor de volwassen dieren is de curve minder steil en is er ook meer onzekerheid te zien in de voorspelling (het grijs gemarkeerde gebied rondom de lijnen). De grotere onzekerheid bij de volwassen dieren komt doordat we relatief weinig volwassen geelbuikvuurpadden hebben gevonden mét een hoge besmettingsintensiteit.

In 2008 en 2009 zijn 44 collecties (in terraria) van bijna 900 dieren getest op aanwezigheid van de schimmel. De schimmel Bd was in 13,6% van de collecties gehouden amfibieën aanwezig en tijdens het bemonsteren op een beurs bleken 7 van de 78 geteste dieren met Bd besmet. Geen enkel dier vertoonde symptomen van ziekte en alle dieren leken gezond. Gehouden dieren kunnen de schimmel dus subklinisch bij zich dragen en de eigenaren moeten zich hiervan bewust zijn. Het is goed als er veel aandacht is voor het preventief screenen van collecties, voor het plaatsen van nieuw aangeschafte dieren in quarantaine en voor het voorkomen van verspreiding van de schimmel door hygiënisch te werken.

Co-existentie

Vervolgens wilden we weten hoe het kan dat een potentieel dodelijke schimmel en een in principe gevoelige gastheer, in co-existentie leven. Om dit uit te pluizen hebben we zeven jaar lang (2010–2016) onderzoek gedaan bij twee populaties geelbuikvuurpadden in Limburg. Geelbuikvuurpadden hebben een uniek buikpatroon en via het herkenningsprogramma AmphIdent konden we alle individuen uit elkaar houden. Elk jaar gingen we maandelijks naar de twee onderzoeksgebieden toe om dieren te vangen, te fotograferen en met

een wattenstaafje over de huid van de dieren te strijken. Op deze manier kun je, wanneer het dier besmet is, het DNA van Bd detecteren.

Individueel effect

Het bleek dat alle dieren een willekeurige kans hebben om besmet te raken, en ook een random kans hebben om deze besmetting weer te verliezen, ongeacht de lichaamsconditie. Stijgende minimumtemperaturen vergroten wél voor volwassen geelbuikvuurpadden de kans op een Bd-besmetting. Wanneer een dier besmet blijft, daalt de kans op overleving significant (figuur 1a). De kans op overleving van een Bd-besmette gastheer is duidelijk lager dan die van een niet-besmette gastheer. Dit geldt zowel voor de juvenielen als de subadulte en volwassen dieren. Hoe sterker de besmetting, hoe lager de overlevingskans (figuur 1b). Dat deze verlaagde kans op overleven echt door de besmetting met Bd kwam, bleek ook doordat er geen effect was van lichaamsconditie en omgevingstemperatuur op de overleving van geelbuikvuurpadden.

Populatie-effect

Een heel bijzonder resultaat was dat beide studiepoblaties – die niet met elkaar in verbinding staan – dezelfde patronen laten zien in de



fluctuatie van Bd-prevalentie over de jaren. In beide onderzoeksgebieden is de maximale Bd-prevalentie het hoogst in de jaren met de hoogste dichtheid aan juveniele geelbuikvuurpadden. Mogelijk dat deze levensfase als Bd-reservoir fungeert. Jaren met een hogere Bd-prevalentie corresponderen met de jaren met een verlaagde overleving van de volwassen dieren. Dat deze lage overleving niet zichtbaar is in de populatietrends komt doordat de soort in die jaren een compensatie-mechanisme heeft: er worden meer dieren volwassen (Spitzen – van der Sluijs *et al.*, 2017).

Relevantie van het onderzoek

Wat hebben deze jaren aan onderzoek nu opgeleverd en wat is het belang voor beleid, het beheer van natuurgebieden en amfibieliefhebbers? In Nederland is Bd aanwezig, maar door de omgevingsfactoren en de mogelijkheid van in elk geval de geelbuikvuurpad om verhoogde sterfte door extra reproductie te compenseren, blijven de gevolgen voor onze inheemse soorten beperkt. Maar, door veranderende externe omstandigheden (zoals verhoogde temperaturen, verslechterd habitat, de introductie van een andere Bd-stam) kan dit precaire evenwicht worden verstoord en moeten we vrezen voor massalere sterfte (o.a. Fernández-Loras *et al.*, 2019).

Dit betekent dat we alert moeten blijven op opvallende sterfte, dat we de kwaliteit van amfibieënleefgebieden moeten waarborgen (voldoende mogelijkheden voor compenserende voortplanting), dat we maatregelen moeten nemen om opwarming (volwassen dieren hebben een verhoogde kans op Bd-besmetting bij hogere temperaturen) en verdroging tegen te gaan en dat desinfectiemaatregelen essentieel zijn om de verdere verspreiding van ziekteverwekkers én de introductie van nieuwe ziekteverwekkers te voorkomen.

Al enige jaren investeert RAVON in een 'Early Warning System' (EWS) voor amfibieziektes. Dit blijkt een zeer waardevol instrument om in een vroegtijdig stadium problemen te signaleren. Het behoud van dit specifieke EWS dat zich ook richt op gehouden amfibieën, heeft een zeer hoge preventieve waarde. Helaas staat het onder druk door afnemende financiële steun. We vragen iedereen onverminderd alert te blijven in het veld en bijzondere situaties aan ons te melden. Het nemen van desinfectiemaatregelen in het veld, en bij het afvoeren van materialen uit terraria is en blijft essentieel. Ook al lijkt Bd een brede verspreiding te hebben en lijken er geen grote uitbraken te zijn als gevolg van deze schimmel, het verplaatsen van dieren – ook al is het over kleine afstanden – het niet schoonmaken van emmers, schepnetten en laarzen is een onacceptabel risico voor de verspreiding van meer besmettelijke stammen, of van nieuwe ziekteverwekkers. Terreinbeheerders, overheden, onderzoekers en groene bureaus zouden deze verantwoordelijkheid gezamenlijk moeten nemen. Voorkómen van problemen blijft beter en efficiënter dan het oplossen ervan.

Al in 1998 werd voorspeld dat Bd "one of the most challenging threats to herpetological conservation in particular and wildlife conservation in general" zou worden (Moore, 2014). Nu, ruim 20 jaar later wordt Bd nog steeds gezien als één van de grootste bedreigingen die gewervelden ooit hebben meegemaakt (Gascon *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2012). Alle reden dit probleem hoog op de

agenda van elke terreinbeheerder, onderzoeker en overheid te houden.

Summary

The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Netherlands: an overview of ten years study

The fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* [Bd] has been, and remains, one of the most challenging threats to herpetological conservation in particular, and wildlife conservation in general. In our country the global panzootic lineage (Bd-GPL) which emerged around 120-50 years ago from the Korean Peninsula occurs. Due to poor biosecurity and the scale of amphibian trade, this devastating fungus has been able to quickly spread over the world. In the Netherlands the fungus is endemic and is widespread. The interaction between host and pathogen is strongly context dependent. In the Netherlands, yellow-bellied toads have a random chance of becoming infected, but once infected the probability of survival of the individual host significantly decreases. A high Bd prevalence coincides with increased adult mortality. A compensatory mechanism of increased recruitment prevails the collapse of populations, but this balance is fragile. Habitat deterioration (poor management), increasing temperatures and the introduction of novel Bd-strains all threaten to disturb this balance, hence vigilance remains important. The prevention of novel introductions is essential and therefore the implementation of disinfection protocols is of utmost importance. Additionally proper habitat management and a strong reservation towards restocking and repopulation projects is recommended.

Literatuur

- Blaustein, A., J. Urbina, P. Snyder, E. Reynolds, T. Dang, J. Hoverman *et al.*, 2018. Effects of emerging infectious diseases on amphibians: A review of experimental studies. *Diversity* 10(3): 81.
- Fernández-Loras, A., L. Boyero, F. Correa-Araneda, M. Tejedo, A. Hettyey & J. Bosch, 2019. Infection with *Batrachochytrium dendrobatidis* lowers heat tolerance of tadpole hosts and cannot be cleared by brief exposure to CTmax. *PLOS ONE* 14: e0216090.
- Fisher, M.C., D.A. Henk, C.J. Briggs, J.S. Brownstein, L.C. Madoff, S.L. McCraw *et al.*, 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484: 186-194.
- Gascon, C., J.P. Collins, R.D. Moore, D.R. Church, J.E. McKay & Mendelson III, J.R. (eds), 2007. Amphibian Conservation Action Plan. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 64pp.
- Moore, R. 2014. In search of lost frogs. The quest to find the world's rarest amphibians. Bloomsbury, London (UK).
- O'Hanlon, S.J., A. Rieux, R.A. Farrer, G.M. Rosa, B. Waldman, A. Bataille *et al.*, 2018. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science* 360: 621-627.
- Rumschlag, S.L. & J.R. Rohr, 2018. The influence of pesticide use on amphibian chytrid fungal infections varies with host life stage across broad spatial scales. *Global Ecology and Biogeography* 2018: 1-11.
- Spitzen-van der Sluijs, A.M., S. Canessa, A. Martel & F. Pasmans, 2017. Fragile coexistence of a global chytrid pathogen with amphibian populations is mediated by environment and demography. *Proceedings of the Royal Society B* 284: 20171444.
- Spitzen-van der Sluijs, A.M., A. Martel, C. Hallmann, W. Bosman, T.W.J. Garner, P. van Rooij *et al.*, 2014. Environmental determinants of recent endemism of *Batrachochytrium dendrobatidis* infections in amphibian assemblages in the absence of disease outbreaks. *Conservation Biology* 28: 1302-1311.
- Spitzen - van der Sluijs, A.M., A. Martel, E. Wombwell, P.V. Rooij, R. Zollinger, T. Woeltjes *et al.*, 2011. Clinically healthy amphibians in captive collections and at pet fairs: A reservoir of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Amphibia Reptilia* 32: 419-423.

Annemarieke Spitzen, RAVON

a.spitzen@ravon.nl

