

Detecció del fong patògen *Batrachochytrium dendrobatidis* en els amfibis del Montseny: període 2015-2019

ALBERT MARTÍNEZ-SILVESTRE¹, BARBORA THUMSOVÁ², ELENA OBÓN LOSADA³, FRANCESC CARBONELL BUIRA³
i JAIME BOSCH⁴

¹Centre de Recuperació d'Amfibis i Rèptils de Catalunya (CRARC)

²Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC. Asociación Herpetológica Española (AHE)

³Centre de Recuperació de Fauna de Torreferrussa

⁴CSIC

Resum

Entre 2015 i 2019 es van analitzar 357 mostres d'amfibis salvatges de la zona de sis espècies: *Calotriton arnoldi* (326), *Bufo spinosus* (6), *Lissotriton boscai* (20), *Hyla meridionalis* (1), *Rana temporaria* (3) i *Triturus marmoratus* (1). Les mostres preses amb hisops es van analitzar per dos fongs, mentre que les mostres de teixit també es van analitzar per *Ranavirus*. Totes les mostres van resultar negatives per als 3 patògens, tret de dos exemplars de *L. boscai*, un d'*H. meridionalis* del pla de la Calma i un exemplar de *R. temporaria* de Santa Fe del Montseny que van resultar positius per al fong *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), tot i que amb càrregues baixes d'infecció. Els resultats mostren que *Bd* és present al Parc Natural, només associat a mortalitat en el cas de la *R. temporaria*, i aconsellen continuar amb la vigilància per si pot afectar el *C. arnoldi*.

Paraules clau

Batrachochytrium dendrobatidis, amfibi, PCR, *Calotriton arnoldi*, quitridiomicosi

Resumen

DetECCIÓN del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* en los anfibios del Montseny: período 2015-2019

Entre 2015 y 2019 se analizaron 357 muestras de anfibios salvajes de la zona de seis especies: *Calotriton arnoldi* (326), *Bufo spinosus* (6), *Lissotriton boscai* (20), *Hyla meridionalis* (1), *Rana temporaria* (3) y *Triturus marmoratus* (1). Las muestras tomadas con hisopos fueron analizadas para dos hongos, mientras que las muestras de tejido fueron también analizadas para *Ranavirus*. Todas las muestras resultaron negativas para los tres patógenos, excepto dos ejemplares de *L. boscai*, uno de *H. meridionalis* del Pla de la Calma y un ejemplar de *R. temporaria* de Santa Fe del Montseny que resultaron positivos para el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), aunque con cargas bajas de infección. Los resultados muestran que *Bd* está presente en el Parque Natural, solo asociado a mortalidad en el caso de la *R. temporaria*, y aconsejan continuar con la vigilancia por si pudiera afectar a *C. arnoldi*.

Palabras clave

Batrachochytrium dendrobatidis, anfibio, PCR, *Calotriton arnoldi*, quitridiomycosis

Abstract

Detection of the Pathogenic Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Montseny Amphibians: period 2015-2019

Between 2015 and 2019, 357 samples of wild amphibians in the area were analysed from six species: *Calotriton arnoldi* (326), *Bufo spinosus* (6), *Lissotriton boscai* (20), *Hyla meridionalis* (1), *Rana temporaria* (3) and *Triturus marmoratus* (1). Swab samples were tested for two fungi while tissue samples were also tested for *Ranavirus*. All samples were negative for the three pathogens, except two specimens of *L. boscai*, one of *H. meridionalis* from Pla de la Calma and one specimen of *R. temporaria* from Santa Fe del Montseny which were positive for the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), albeit with low viral loads. The results show that *Bd* is present in the Nature Park, only associated with mortality in the case of *R. temporaria*, and we recommend continuing with the observation in case it might affect *C. arnoldi*.

Key words

Batrachochytrium dendrobatidis, amphibian, PCR, *Calotriton arnoldi*, chytridiomycosis

Introducció

Entre els anys 2015 i 2019, es va dur a terme un programa de seguiment sanitari dels amfibis del Montseny per tal de conèixer la distribució dels tres patògens causants de malalties emergents. Aquests patògens són les úniques malalties de declaració obligatòria per l'OIE en rèptils i amfibis. Aquests són dos fongs: *Batrachochytrium dendrobatidis* (en endavant *Bd*), *Batrachochytrium salamandrivorans* (en endavant *Bsal*) i un virus, *Ranavirus* (en endavant *RV*). Tot i que el principal objectiu de la recerca era conèixer l'estat sanitari del tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*), altres espècies de l'entorn també es van analitzar com a sentinelles de l'estat de salut general dels amfibis al parc natural.

Material i mètodes

Com a vigilància activa, entre 2015 i 2019 es van analitzar un total de 357 mostres d'amfibis salvatges de la zona de sis espècies: *Calotriton arnoldi* (326), *Bufo spinosus* (6), *Lissotriton boscai* (20), *Hyla meridionalis* (1), *Rana temporaria* (3) i *Triturus marmoratus* (1) en diferents localitats dins del Parc del Montseny (taula 1).

En relació amb la vigilància passiva, una granota (*Rana temporaria*) adulta recentment morta va ser trobada el 29 d'abril de 2019 al pantà de Santa Fe del Montseny (Parc Natural del Montseny, Barcelona; 41,768309°N, 2,470195°O) per membres de la Societat Catalana d'Herpetologia. L'animal va ser immediatament fixat en etanol al 70 % i enviat al CRARC. Va ser analitzat mitjançant una necròpsia sistemàtica i es van prendre hisops de pell i mostres de teixit per a la histologia (pell, pulmó, tracte gastrointestinal, fetge, melsa, gònades, intestí i ronyons).

Per prevenir la transmissió de patògens i contaminació creuada entre mostres, o fins i tot transmissió de patògens entre els llocs de mostreig, es van seguir directrius estrictes de bioseguretat: tots els animals vius eren manipulats amb guants de nitril. A més, es va desinfectar mitjançant un esprai amb VirkonTM 1 % el material entre llocs de mostreig.

Les anàlisis de PCR dels animals vius es van practicar en hisops de pell. En els animals vius, les mostres d'hisop es van emmagatzemar a -20 °C fins que van ser processats al laboratori, i l'individu trobat mort es va emmagatzemar en etanol al 70 %. Per a la detecció de *RV* es van utilitzar, a més, mostres de fetge en l'animal mort. Per avaluar la presència de *Bd*, *Bsal* o *RV*, es va utilitzar un qPCR per quantificar la càrrega d'infecció. Per a la detecció de *Bd* i *Bsal*, l'ADN es va extreure mitjançant el reactiu Prep-manTM Ultra i les extraccions van ser en dilució 1:10 en aigua sense DNAsa. Per a la detecció de *RV* a partir de teixit, es va utilitzar el kit Qiagen DNeasy Tissue sense diluir. Les anàlisis de qPCR es van

realitzar segons BOYLE *et al.* (2004) per a *Bd*, un Singleplex modificat de BLOOI *et al.* (2013) per a *Bsal*, i LEUNG *et al.* (2017) per a RV. En cada mostreig es van utilitzar controls negatius i estàndards amb concentracions conegudes del patogen corresponent. Es va considerar una mostra com a positiva quan la càrrega d'infecció era igual o superior a 0,1 equivalents genòmics (GE) de zoòspores per *Bd* i *Bsal*, o 3 GE de virions per RV, i quan la corba d'amplificació presentava una forma sigmoïdal robusta. Per a la histologia, les mostres de teixit es van fixar en formol tamponat al 4 % abans de ser processada per a l'exploració histològica. Es va examinar una secció per teixit (fetge, os, intestí, múscul i pell de tres llocs diferents, inclòs l'interdigital, el ventral i el tegument dorsal). Les seccions de 4 µm es van tenyir amb hematoxilina i eosina (H/E) i es van examinar per microscòpia òptica.

Resultats

Totes les mostres van resultar negatives per als tres patògens, excepte dos exemplars de *L. boscai*, un d'*H. meridionalis* del pla de la Calma i l'exemplar mort de *R. temporaria* de Santa Fe del Montseny que van resultar positius per al fong *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), tot i que amb càrregues baixes d'infecció.

En el cas de la granota morta, la necròpsia va revelar un enrogiment moderat de la pell a la zona de l'engonal i a la part proximal de les extremitats posteriors. També s'hi van detectar hematomes interns, corresponents a hemorràgies que afecten la cavitat celòmica. La PCR va ser positiva per a *Bd*, tot i que la presència d'algun material contaminant ambiental va provocar la inhibició parcial de la reacció qPCR, fet que va dificultar el càlcul de la càrrega d'infecció. A la histologia es va detectar una zoòspora a l'estrat corni, amb bacteris secundaris contaminants. Com que els canvis histològics no podien confirmar la mort d'aquest animal a causa de la quitridiomicosi, vam concloure que les hemorràgies internes observades van ser la causa final probable de la mort causada per un incident traumàtic.

Taula 1. Espècies d'amfibis, localitats, data de recollida i resultats del qPCR fet per a la detecció de *Bd*, *Bsal* i RV al Parc del Montseny. Cal destacar-ne els resultats positius

Espècie	Localitat	Exemplars	Data de col·lecta	<i>Bd</i>	Ranavirus	<i>Bsal</i>
<i>Bufo spinosus</i>	El Sot dels Arços, Bascona, el Sot Ample i el Sot Cingles	4	Juny 2017	negatiu	–	negatiu
<i>Bufo spinosus</i>	El Sot dels Arços	1	04/07/2018	negatiu	negatiu	negatiu

Espècie	Localitat	Exemplars	Data de col·lecta	Bd	Ranavirus	Bsal
<i>Bufo spinosus</i>	El Sot Ample	1	05/07/2018	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot de l'Infern	1	25/05/2015	negatiu	negatiu	–
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot de l'Infern, el Sot Ample, el Sot dels Arços, el Sot Cingles, Bascona i el Sot Ample	16	Maig-juny de 2017	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot de la Font Fresca	2	06/04/2017	–	–	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	Viscaires	4	Primavera 2017	–	–	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot de la Font Fresca	3	09/05/2017	–	–	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot de la Font Fresca	1	22/05/2017	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot Major	5	25/05/2017	negatiu	negatiu	–
<i>Calotriton arnoldi</i>	Bascona	8	Setembre-octubre 2017	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot de la Font Fresca	2	01/ 11/2017	negatiu	–	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot dels Arços, Font Freda, Pica dels Ocells, Riera Bascona, el Sot del Cafè/Bassau, el Sot Cingles Racó, el Sot de l'Infern	80	Gener 2018	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	Font Freda	2	Gener 2018	negatiu	–	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	Pont de Suert	10	Juny 2018	–	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot de l'Infern	3	30/05/2018	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot dels Arços	6	13/06/2018	negatiu	negatiu	negatiu

Espècie	Localitat	Exemplars	Data de col·lecta	Bd	Ranavirus	Bsal
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot de l'Infern	2	19/06/2018	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot Major	14	20/06/2018	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot dels Arços	4	20/06/2018	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot Ample	2	26/06/2018	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot Cingles Racó	7	27/06/2018	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot dels Arços	5	27/06/2018	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot Cingles Racó	5	04/07/2018	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot Cingles Racó	1	04/07/2018	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot dels Arços	5	04/07/2018	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot dels Arços	3	11/07/2018	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot Major, Pica dels Ocells, Viscaires	116	20/02/2020	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Calotriton arnoldi</i>	El Sot Major	19	17/05/2016	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Lissotriton boscai</i>	El Pla de la Calma	20	15/06/2018	positiu	negatiu	negatiu
<i>Hyla meridionalis</i>	El Pla de la Calma	1	15/06/2018	positiu	negatiu	negatiu
<i>Rana temporaria</i>	El Sot dels Arços	2	Juny 2017	negatiu	–	negatiu
<i>Rana temporaria</i>	Santa Fe del Montseny	1	29/04/2019	positiu	negatiu	negatiu
<i>Triturus marmoratus</i>	Santa Susanna	1	25/04/2017	negatiu	negatiu	negatiu

Discussió

Un estudi integral elaborat entre 2007 i 2011 en tota l'àrea del massís del Montseny va revelar un absència aparent de *Bd* (OBÓN *et al.*, 2013). Els nostres resultats mostren, doncs, els primers casos descrits de portadors confirmats del patogen per a l'àrea del Montseny.

La *Rana temporaria* és normalment molt resistent a la malaltia, i és infectada amb freqüència però no presenta mortalitat associada (MARTÍNEZ-SILVESTRE *et al.*, 2021). Per aquest motiu, l'animal pot resistir fins que els canvis conductuals provocats per la infecció (fugida de l'aigua, deambulació per llocs inusuals, fer-se més visible per als depredadors...) el deixen vulnerable fins a morir finalment per causes traumàtiques. Els resultats mostren que *Bd* és present al Parc Natural, tot i que amb càrregues baixes d'infecció, i només s'associa a mortalitat en el cas de la *R. temporaria*. Pel que fa a *Bsal*, de moment no és present al Parc del Montseny, però cal esmentar aquí la proximitat del focus descobert al 2018 al Montnegre que afecta tritons marbreus i salamandres (MARTÍNEZ-SILVESTRE *et al.*, 2020). Cal mantenir la vigilància activa de control d'aquestes malalties emergents i d'altres que puguin sorgir en brots inesperats. Tot això és molt important atesa la proximitat del cas detectat de mortalitat amb l'àrea de distribució del tritó endèmic del Montseny.

És imprescindible, doncs, la implementació d'un bon pla de vigilància activa als anys posteriors a aquest estudi (2020, en endavant) que permeti tenir controlada aquesta malaltia dins de la demarcació del Parc del Montseny.

Agraïments

A Iago Pérez-Novó (Societat Catalana d'Herpetologia), Rachel Marschang (Laboratori Laboklin, Alemanya) per l'ajuda en la recollida o anàlisi de mostres. Al programa SOS-ANFIBIOS de l'Asociación Herpetológica Española (AHE). Aquest estudi ha estat cofinançat pel programa Life Tritó del Montseny (LIFE15 / NAT/ES/000757) i Forestal Catalana (Generalitat de Catalunya).

Bibliografia

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». *Journal of Clinical Microbiology*, núm 51; p. 4173-4177.

- 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». *Diseases of Aquatic Organisms*, núm. 60; p. 141-148.
- LEUNG, W. T. M.; THOMAS-WALTERS, L.; GARNER, T. W. J.; BALLOUX, F.; DURRANT, C.; PRICE, S. J. (2017): «A quantitative-PCR based method to estimate ranavirus viral load following normalisation by reference to an ultraconserved vertebrate target». *Journal of Virological Methods*, núm. 249; p. 147-155.
- MARTÍNEZ-SILVESTRE, A.; BOSCH, J.; MARSCHANG, R. E.; VELARDE, R. (2019): «Health Survey of Amphibians in Catalonia: Ascertaining the Real Distribution of the Pathogenic Fungus *Batrachochytrium salamandrivorans*». *IV Trobada d'Estudiosos de la Serralada Litoral Central i VII del Montnegre i el Corredor*, p. 247-253.
- MARTÍNEZ-SILVESTRE, A.; VELARDE, R.; MARSCHANG, R. E.; PEREZ-NOVO, I.; BISBAL-CHINESTA, J. F.; THUMSOVA, B.; BOSCH, J. (2021): «First record of amphibian mortality associated with the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Catalonia (NE Spain)». *Basic and Applied Herpetology*, núm. 35; p. 7-15.
- OBÓN, E.; CARBONELL, F.; VALBUENA-UREÑA, E.; ALONSO, M.; LARIOS, R.; FERNÁNDEZ-BEASKOETXEA, S.; FISHER, M. C.; BOSCH, J. (2013): «Chytridiomycosis surveillance in the critically endangered Montseny brook newt, *Calotriton arnoldi*, northeastern Spain». *Journal of Herpetology*, núm. 23; p. 237-240.