

Detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios asintomáticos en Cataluña

Ferran Bargalló¹, Albert Martínez–Silvestre² & Daniel Fernández^{1,3}

¹ Societat Catalana d'Herpetologia. Plaça Leonardo da Vinci, 4-5. 08019 Barcelona. España. C.e.: ferran.bargallo@gmail.com

² CRARC. Centre de Recuperació d'Amfibis i Rèptils de Catalunya. 08783 Masquefa. Barcelona. España

³ Escola de la Natura de Parets del Vallès. Cl. Galende, 12. 08150 Parets del Vallès. Barcelona. España

Fecha de aceptación: 13 de noviembre de 2016.

Key words: *Batrachochytrium dendrobatidis*, amphibian, Catalonia, *Pelophylax* sp.

Batrachochytrium dendrobatidis es un hongo perteneciente al phylum Chytridiomycota, con muchas especies ecológicamente muy diversas. Este hongo se dispersa en el agua mediante zoosporas, parasitando a vertebrados, infectando la epidermis queratinizada de los anfibios, incluyendo las partes bucales de las larvas de los anuros, donde se desarrolla generando los esporangios. La capacidad de propagación de *B. dendrobatidis* entre las poblaciones de anfibios está bien reconocida (Lips *et al.*, 2006; Skerratt *et al.*, 2007).

Batrachochytrium dendrobatidis se describió por primera vez en 1998 y 1999 (Berger *et al.*, 1998; Longcore *et al.*, 1999), y causa la enfermedad en anfibios denominada quitridiomycosis. Una enfermedad que ha causado mortalidades masivas de anfibios (Lips *et al.*, 2006; Skerratt *et al.*, 2007), ocasionando grandes reducciones de sus poblaciones, así como extinciones de poblaciones y especies en todo el mundo (Fisher *et al.*, 2009). Actualmente ha sido identificado en todos los continentes donde existen poblaciones nativas de anfibios.

En la península ibérica se detectó por primera vez en el Parque Natural de Peñalara en 1997 en *Alytes obstetricans* (Bosch *et al.*, 2001). Desde entonces se han hecho estudios de distribución a una gran parte de la península ibérica, donde se ha demostrado que este hongo está ampliamente distribuido (véase

Walker, 2004), localizándose frecuentemente en Aragón, País Vasco, Comunidad de Madrid, Extremadura, Andalucía y Comunidad Valenciana. Hasta la fecha, la presencia del hongo en Cataluña se había citado sólo en dos ejemplares de *Pelophylax perezi* en la localidad de Riudarenes (Walker, 2004). En esta descripción se pretende contribuir a un mejor conocimiento de la presencia del hongo en el territorio catalán, una zona hasta el momento poco investigada, en las especies *P. perezi* y *Pelophylax kl. grafi*.

El hallazgo se ha realizado debido a un estudio enmarcado dentro del Proyecto GRAFI durante el año 2015. Este proyecto de la Societat Catalana d'Herpetologia y la Escola de la Natura de Parets del Valles pretende profundizar en el conocimiento de la distribución, características morfológicas, biología larvaria y reproductiva de *Pelophylax kl. grafi* (Crochet, Dubois, Ohler & Tuner, 1995) y compararlos con *P. perezi* (Seoane, 1885) en el ámbito geográfico de Cataluña.

Para realizar el estudio de biología reproductiva fueron capturados 16 ejemplares (ocho *P. perezi* y ocho *P. kl. grafi*) de diferentes localidades, intentando abarcar una muestra genéticamente variada. Durante la cuarentena, para el control sanitario de los animales, se realizó un examen físico de todos los ejemplares y se tomaron muestras cutáneas mediante



Figura 1: Mapa con los puntos de captura de los individuos que han dado resultados positivos para *B. dendrobatidis*.

hisopo estéril de la zona interdigital, inguinal y axilar según el protocolo descrito por Hyatt *et al.* (2007), para la detección de *B. dendrobatidis*, *Batrachochytrium salamandrivorans* y *Ranavirus* spp. Las muestras fueron enviadas al laboratorio de referencia (LABOKLIN GmbH & Co.KG) donde se aplicaron técnicas moleculares de PCR dirigidas a detectar la presencia de ADN de estos patógenos.

De las 16 muestras se obtuvieron un total de seis resultados positivos para *B. dendrobatidis*.

En la Tabla 1 se muestran los resultados según la especie y localidad. Se obtuvieron resultados positivos sólo en el caso de *P. kl. grafi*. La distribución geográfica de los resultados positivos incluyen cuatro comarcas diferentes: Vallès Oriental, Moianès, Montsià i Ribera d'Ebre (Figura 1).

Dos de los animales con resultados positivos, que murieron durante la cuarentena, no mostraron lesiones significativas en las necropsias llevadas a cabo. El estudio histológico de todas las muestras de tejidos recogidas, realizándose una fijación en formol al 10% y un procesamiento mediante técnicas de histología

general con la tinción de hematoxilina/eosina, no revelaron lesiones histológicas, estando todos los tejidos dentro de la normalidad.

La presencia *B. dendrobatidis* en Cataluña no ha sido publicada hasta la fecha, aunque existe un precedente de su detección en la localidad de Riudarenes, precisamente sobre dos individuos de *P. perezi* (Walker, 2004). La gran distancia geográfica, observada entre algunos de los puntos donde se han registrado positivos, sugiere que la distribución del hongo en Cataluña es amplia.

La amplia presencia de este hongo en el territorio podría poner en peligro a las poblaciones de anfibios, y en especial a las endémicas o amenazadas como la del tritón del Montseny (*Calotriton arnoldi*), si bien los análisis realizados hasta la fecha en esta especie han resultado negativos (Obón *et al.* 2013).

La detección de ejemplares positivos a este agente implica un riesgo biológico importante, ya que puede estar relacionado con futuros brotes de la enfermedad, aunque por el momento no se tenga constancia de individuos con síntomas, considerándose a los mismos como simples portadores. La resistencia a *B. dendrobatidis* varía en función de la especie (Woodhams *et al.*, 2007), resultando el género *Pelophylax* bastante tolerante al mismo (Garner *et al.* 2005). Sin embargo, cambios en las condiciones ecológicas pueden modificar el sistema inmunitario de los anfibios (Belden & Harris, 2007), alterando la microflora cutánea y debilitándola para desencadenar la infección por *B. dendrobatidis* (Woodhams *et al.*, 2012).

Si bien se ha descrito un posible tratamiento en torrentes de Mallorca (Bosch *et al.*, 2015), las condiciones en las que se encuentran los anfibios del presente estudio no permiten pensar en la aplicación de dicho tratamiento de modo preventivo en Cataluña.

Tabla 1: Resultados obtenidos según la especie y localidad.

| | Taxón | Localidad | Comarca | UTM | Resultados B.d |
|----|-----------------------------|-------------------------|-----------------|--------------------------------|-----------------|
| 1 | <i>Pelophylax perezi</i> | Sant Feliu de Codines 1 | Valles Oriental | 427817.94 m E ; 4614185.02 m N | Negativo |
| 2 | <i>Pelophylax perezi</i> | Sant Feliu de Codines 1 | Valles Oriental | 427817.94 m E ; 4614185.02 m N | Negativo |
| 3 | <i>Pelophylax perezi</i> | Sant Feliu de Codines 1 | Valles Oriental | 427817.94 m E ; 4614185.02 m N | Negativo |
| 4 | <i>Pelophylax perezi</i> | Pals | Baix Emporda | 515590.17 m E ; 4649779.75 m N | Negativo |
| 5 | <i>Pelophylax perezi</i> | Pals | Baix Emporda | 515590.17 m E ; 4649779.75 m N | Negativo |
| 6 | <i>Pelophylax perezi</i> | Castellterçol 2 | Moianes | 425826.28 m E ; 4622030.15 m N | Negativo |
| 7 | <i>Pelophylax perezi</i> | Castellterçol 2 | Moianes | 425826.28 m E ; 4622030.15 m N | Negativo |
| 8 | <i>Pelophylax perezi</i> | Castellterçol 2 | Moianes | 425826.28 m E ; 4622030.15 m N | Negativo |
| 9 | <i>Pelophylax kl. grafi</i> | Sant Feliu de Codines 2 | Valles Oriental | 430205.53 m E ; 4614216.64 m N | Positivo |
| 10 | <i>Pelophylax kl. grafi</i> | Sant Feliu de Codines 3 | Valles Oriental | 429961.22 m E ; 4614653.72 m N | Negativo |
| 11 | <i>Pelophylax kl. grafi</i> | Sant Feliu de Codines 3 | Valles Oriental | 429961.22 m E ; 4614653.72 m N | Negativo |
| 12 | <i>Pelophylax kl. grafi</i> | Mas de barberans | Montsia | 278314.47 m E ; 4513092.46 m N | Positivo |
| 13 | <i>Pelophylax kl. grafi</i> | Mas de barberans | Montsia | 278314.47 m E ; 4513092.46 m N | Positivo |
| 14 | <i>Pelophylax kl. grafi</i> | Garcia | Ribera d'ebre | 302602.72 m E ; 4555917.33 m N | Positivo |
| 15 | <i>Pelophylax kl. grafi</i> | Castellterçol 1 | Moianes | 425503.36 m E ; 4619444.34 m N | Positivo |
| 16 | <i>Pelophylax kl. grafi</i> | Castellterçol 1 | Moianes | 425503.36 m E ; 4619444.34 m N | Positivo |

Se requieren más estudios de campo para conocer las zonas bioclimáticas que ocupa este hongo en Cataluña, así como la detección de ejemplares con síntomas, y así poder conocer la gravedad y las medidas de control que se deben establecer.

AGRADECIMIENTOS: A D. Perpiñán y T. Costa por el estudio histopatológico de las muestras. A J. Soler (CRARC), J. Grífols (Zoològic Badalona Veterinària) y Escola de la Natura de Parets del Vallès por la gestión y mantenimiento de los ejemplares muestreados.

REFERENCIAS

- Belden, L.K. & Harris, R.N. 2007. Infectious diseases in wildlife: the community ecology context. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5: 533-539.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocombe, 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 rainforests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 9031-6.
- 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. *Biological Conservation*, 97: 331-7.
- Bosch, J., Sanchez-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. *Biology Letters*, 11: 20150874
- Fisher, M.C., Garner, T.W.J. & Walker, S.F. 2009. Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. *Annual Review of Microbiology*, 63: 291-310.
- Garner, T.W.J., Walker, S., Bosch, J., Hyatt, A.D. & Cunningham, A.A. 2005. Chytridiomycosis in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 11:1639-1641.
- Hyatt, A.D., Boyle, D.G., Olsen, V., Boyle, D.B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F. & Colling, A. 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73: 175-192.
- Obon, E., Carbonell, F., Valbuena-Ureña, E., Alonso, M., Larios, R., Fernandez-Beaskoetxea, S., Fisher, M.C. & Bosch, J. 2013. Chytridiomycosis surveillance in the critically endangered Montseny brook newt, *Calotriton arnoldi*, northeastern Spain. *Herpetological Journal*, 23: 237-240.
- Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., Alford, R.A., Voyles, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103: 3165–3170.
- Longcore, J.E., Pessier, A.P., Nichols, D.K. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91: 219-227
- 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.
- Walker, S. 2004. *d*-Mapping Project – *Bd*-Maps <www.bd-maps.net> [Consulta: 3 febrero 2016].
- Woodhams, D.C., Ardipradja, K., Alford, R.A., Marantelli, G., Reinert, L.K. & Rollins-Smith, L.A. 2007. Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defences. *Animal Conservation*, 10: 409-508.
- Woodhams, D.C., Bigler, L. & Marschang, R. 2012. Tolerance of fungal infection in European water frogs exposed to *Batrachochytrium dendrobatidis* after experimental reduction of innate immune defenses. *BMC Veterinary Research*, 8:197.