

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Quitridiomycosis en anfibios: Inmunidad, tratamiento y  
mitigación en el medio natural**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Andrés Fernández Loras**

Director

**Jaime Bosch Pérez**

Madrid, 2021

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



Quitridiomicosis en anfibios: Inmunidad, tratamiento y mitigación en  
el medio natural



ANDRÉS FERNÁNDEZ LORAS

TESIS DOCTORAL, 2021

DIRIGIDA POR: JAIME BOSCH PÉREZ



**Director:**

**Dr. JAIME BOSCH PÉREZ**

Dpto. de Biogeografía y Cambio Global  
Museo Nacional de Ciencias Naturales,  
(MNCN, CSIC)  
C/ José Gutiérrez Abascal, 2  
28006, Madrid (España)  
[bosch@mncn.csic.es](mailto:bosch@mncn.csic.es)

**Tutora:**

**Dra. ELENA ARRIERO HIGUERAS**

Dpto. de Biodiversidad, Ecología y Evolución  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid  
C/ José Antonio Novais, 12  
28040, Madrid (España)  
[elena.arriero@bio.ucm.es](mailto:elena.arriero@bio.ucm.es)

## ACERCA DEL IDIOMA

La presente tesis doctoral ha sido redactada en dos idiomas: castellano e inglés. Mientras que la *Introducción*, los *Objetivos Principales*, y la *Discusión Integradora* han sido redactados en castellano, los *Capítulos 2-6* están redactados en inglés puesto que ese fue el idioma en el que se escribieron originalmente para su posterior publicación en revistas científicas internacionales. No obstante, se incluye un breve resumen en castellano al inicio de cada capítulo. Tanto el *Resumen/Abstract* como las *Conclusiones/Conclusions*, han sido redactadas en ambos idiomas.

## FUENTES DE FINANCIACIÓN

Los estudios contenidos en esta tesis doctoral han sido en su mayoría financiados por la Fundación General CSIC y el Banco Santander (Zero Projects, IP: Jaime Bosch). Otras fuentes de financiación incluyen a la Fundación BBVA, el Proyecto BiodivERsA “*Risk Assessment of Chytridiomycosis to European Amphibian Biodiversity*” RACE (Ministerio de Ciencia e Innovación de España – EU12008-03637, IP: Jaime Bosch), los Fondos del Gobierno Vasco (IT951-16), el Leverhulme Trust RPG 2014-273, y la NERC Standard Grant NE/N009967/1.

## PERMISOS

Los permisos para la realización de los trabajos de campo han sido otorgados por la Consejería de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente de Aragón, por la Consejería de Fomento y Medio Ambiente de Castilla y León, por la Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio y Sostenibilidad de Madrid (permisos: 10/032921.9/12 y 10/071126.9/13), y por la Conselleria de Medi Ambient i Territori de Mallorca (permiso: CEP 43/2015).

## AGRADECIMIENTOS

“Ten siempre a Ítaca en tu mente. Llegar allí es tu destino. Mas no apresures nunca el viaje. Mejor que dure muchos años y atracar, viejo ya, en la isla, enriquecido de cuanto ganaste en el camino”. Estos versos del poema “Ítaca” de Konstantinos Kavafis, bien pueden servir para ilustrar en parte este largo y azaroso, pero sin duda enriquecedor viaje, que ha representado para mí la realización de este proyecto de tesis doctoral.

Y todo viaje, por largo que éste sea, ha de comenzar por un primer paso. En mi caso, creo que tendría que remontarme a una experiencia que tuve la suerte de poder vivir mientras realizaba una estancia en la Durrell Wildlife Conservation Trust, importante institución dedicada a la conservación de especies animales de todo el mundo. El director del departamento de herpetología, el Dr. Gerardo García, me invitó a hacer una visita nocturna guiada a las instalaciones en las que se mantenían a los anfibios y reptiles. El poder ver y disfrutar de la belleza de esos animales de manera tan cercana me impactó profundamente, y despertó en mí una admiración por ellos que me acompañaría ya siempre. Posteriormente llegaron el trabajo fin de Máster acerca de parásitos y quitridiomycosis en sapo común en el que estuvieron implicados tanto Gerardo como Javier López, mi estancia en la Estación Biológica de Doñana y los trabajos con distintas especies de anfibios que allí desarrollé bajo la supervisión de Carmen Díaz e Iván Gómez, o el proyecto de conservación y lucha frente a la quitridiomycosis en Montserrat con una especie de anfibio en peligro crítico de extinción, la Mountain Chicken (*Leptodactylus fallax*). A todas y todos aquellos con los que coincidí en este tiempo previo al comienzo de la tesis les doy las gracias. Seguramente no hubiese llegado hasta este punto sin su ayuda, sus enseñanzas y su apoyo.



Toda esa experiencia y conocimientos adquiridos me brindaron la oportunidad de poder trabajar como parte del equipo del Dr. Jaime Bosch en una de las más relevantes, sino la más, instituciones de investigación que existen en España, el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y al mismo tiempo, me abrieron la puerta para que pudiera desarrollar este proyecto de tesis doctoral trabajando en el Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN). Algo que para mí, ha significado un auténtico orgullo.

Jaime, eres sin duda alguna el principal artífice de que esto haya finalmente podido salir adelante. Es complicado plasmar en tan sólo unas pocas palabras todo lo que he podido aprender de ti. Han sido años de una ingente cantidad de trabajo, de guía, implicación y supervisión por tu parte, de incontables correos para corregir y mejorar los manuscritos que se han convertido después en publicaciones, de momentos compartidos, de disfrutar del frío aunque siempre precioso Maestrazgo turolense y de la agreste Serra de Tramuntana mallorquina, de llamadas de atención cuando eran necesarias, y de ofrecerme un soporte y respaldo cruciales que han hecho que sintiese la confianza necesaria para terminar este gran proyecto. Tienes toda mi admiración a nivel académico y para mí, ha sido todo un lujo trabajar a tu lado. Pero también y sobre todo, a lo largo de todo este tiempo me has demostrado tu enorme calidad a nivel personal. Creo que nunca podré agradecerte lo suficiente el haber podido contar con todo tu apoyo y tu comprensión cuando la vida, que desgraciadamente tiene estas cosas, me hizo pasar por momentos tremendamente duros y complicados. Gracias, de corazón.

Gracias también a Elena, por tu trabajo como tutora, por tus enseñanzas en el campo de la inmunología, y por tu inestimable colaboración en uno de los estudios que componen esta tesis doctoral.



Al gran Equipo J, muchas gracias Saio y Püppy por todo lo compartido, por vuestra acogida y por hacerme sentir siempre como en casa, por todas esas horas de trabajo en el Centro de Cría, en el campo o en el laboratorio, por tantos buenos momentos dentro y fuera del trabajo, por la compañía, por vuestro apoyo y ayuda, por vuestra amistad, por las risas y por el buen ambiente. Ha sido un verdadero privilegio haberos tenido como compañeras de viaje. Tenéis gran parte de culpa de que haya llegado hasta aquí. Muchísimas gracias Saio también, porque tu tesis ha sido una gran fuente de inspiración y una gran ayuda a la hora de maquetar este trabajo.

Del mismo modo, “las aportaciones internacionales” al Equipo J han contribuido en gran medida a ensanchar mis horizontes y aprender de otras experiencias en el mundo de la ciencia y de la investigación. Gracias Dave, Leyla, Dani y Jessica.

Gracias también a todas y todos los “pestuzos” con quien he tenido la suerte de coincidir en el Museo. Gemma, Chechu, Rigo, Marcos, Ramón, Dani, Jaime, Melinda, Diego, Laura, Octavio, Rafa, Jimena, Roger, Paloma, Roberto, Marga, Carolina, Juan, Alex, Sergio, Miriam, Jose, Ponce, Chío, Mireia, Raúl, Jorge. Cuánto he aprendido de todas vosotras y vosotros. Comunidad que ha sido también fuente inagotable de inspiración, conocimiento y recursos. Todos esos ratos compartidos en Jaquete, El Asador o entre pipetas, termocicladores y análisis de laboratorio han merecido mucho la pena. El camino hubiera sido muy distinto, más gris y aburrido, de no haber contado con vuestra compañía.

Me gustaría también darles las gracias a otras personas con las que he coincidido a lo largo de todo este tiempo, que han conseguido gracias a su trabajo y a la ayuda que me han prestado, que este proyecto de tesis doctoral se convierta en una realidad. Gracias Annie, Iván y Yolanda por vuestra ayuda y vuestros consejos técnicos en el laboratorio de Biología Molecular del MNCN.



Gracias también a Goyo y Michel, por hacer de ese laboratorio un lugar de trabajo ameno y con buen ambiente. Aquí me gustaría hacer una mención especial y darle las gracias a la que creo sinceramente es el alma de ese laboratorio. Infatigable, incansable y, “siempre en la lucha” entre muestras, placas y reactivos. Gracias Pilar. A todas y todos, perdón por “amenizaros” las mañanas y las tardes con el “sutil susurro” del beadbeater.

Muchas gracias también al personal del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama, y a todas las personas que trabajan en el Centro de Cría en Cautividad de Anfibios Amenazados de la Sierra de Guadarrama. En especial a Ana, Desi, Carmen, Jose y Virginia. Han sido muchas horas pudiendo disfrutar de esos preciosos paisajes y de vuestra compañía, cuidando y estudiando a los anfibios.

De igual manera, me gustaria agradecer a todas y todos los coautores de las distintas publicaciones que conforman esta tesis doctoral, así como a Belén Patiño de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) por su ayuda en el cultivo de *Batrachochytrium dendrobatidis*, y a María Carmen Aceña de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza (UZ), por permitirme utilizar las instalaciones de su departamento a la hora de realizar los recuentos leucocitarios diferenciales. La colaboración y las valiosas aportaciones de todas y todos ellos han sido imprescindibles para poder avanzar y concluir los estudios de esta tesis doctoral.

Dentro de esta parte de los agradecimientos, me gustaría también mencionar y agradecer a todos los Agentes para la Protección de la Naturaleza del Servicio Provincial de Medio Ambiente de Teruel y muy especialmente a Miguel Ángel, Jaime, Óscar, Fran y Antonio. Vuestro trabajo y vuestro grado de implicación con el desarrollo y la implementación del estudio han sido cruciales para que éste pudiese salir adelante. Muchas gracias por todo.



En este viaje no hubiera sido posible llevar la embarcación de vuelta a Ítaca estando solo. Para llegar al destino ha sido indispensable poder contar con una tripulación curtida y experimentada, capaz de sacar indemne al más pequeño de los botes de la más temible de las tormentas. Y yo me siento tremendamente afortunado por saber que he contado y cuento con la mejor tripulación que pueda existir:

A mis amigos. Por fin después de todo este tiempo, creo que la próxima vez que me preguntéis por el tema mi respuesta va a poder ser diferente. Pedro, Miguel, Carlos, Fernando, Íñigo. Mi pequeño-gran cónclave. Sergio, Rubén, Gerardo, gracias por esos raticos juntos, y por enseñarme esos rinconcicos especiales de Madrid. A todos, gracias por estar siempre ahí, por vuestra paciencia, vuestro interés y vuestro apoyo incondicional. Sin vosotros como inseparables compañeros de viaje, sé que esto no hubiese sido posible.

A mi Familia. Unas pocas líneas no van a ser capaces de transmitir lo agradecido que me siento ni todo el cariño que os tengo. Le dais sentido a mi vida. Papá, mi admiración, respeto y amor hacia tí son inabarcables. Gracias por inculcarme estos valores y por hacerme mejor persona. Honestidad, inteligencia y espíritu de trabajo infinitos. Un espejo en el que mirarse. Trataré de seguir tu senda y de estar a la altura. Pablo, te quiero hermanito. Gracias por estar siempre ahí y por ayudarme con la portada. Todo un artista del diseño gráfico. MaÁngeles, gracias por cuidarme tanto y tan bien, y por desvivirte para que yo pudiese tener ese ambiente ideal de tranquilidad y sosiego que me permitiese centrarme en escribir esta tesis durante el tramo final. Victor, Carlota, María, Raquel, Jesús, Lucky, cuántas cosas por celebrar y compartir juntos. Carlota, Cristina, Nico, Javi y Iara. Ojalá algún o alguna futura veterinaria o biólogo en la familia con quien seguir disfrutando de “los bichos”. Tíos Adela y Javier. Diego, Ricardo, Celia, Asli, Marga, Guillermo, Javier, Daniel y Adrián. Tíos Jesús, Ana, Marisa, Gloria, Vicen, Tim, Iñako. A todas y todos, mil gracias por hacerme sentir siempre tan bien arropado. Sois la mejor familia que cualquier persona podría tener.



A mi madre, la estrella que me ha guiado a lo largo de todo este gran viaje



“Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos”

(Aristóteles, 384 AC – 322 AC. Filósofo griego)



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN / ABSTRACT.....	16
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	27
CONSIDERACIONES ACERCA DE LA EPIDEMIOLOGÍA, LA INMUNIDAD, LOS TRATAMIENTOS Y LA MITIGACIÓN DE LA ENFERMEDAD	
OBJETIVOS PRINCIPALES.....	74
CAPÍTULO 2.....	78
LA EXPOSICIÓN TEMPRANA A <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> CAUSA UNA PROFUNDA INMUNOSUPRESIÓN EN ANFIBIOS	
EARLY EXPOSURE TO <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> CAUSES PROFOUND IMMUNOSUPPRESSION IN AMPHIBIANS	
CAPÍTULO 3.....	96
EL ITRACONAZOL Y EL METIL TIOFANATO NO CONSIGUEN LIMPIAR LARVAS NATURALMENTE INFECTADAS CON LA CEPA HIPERVIRULENTE DE <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	
ITRACONAZOLE AND THIOPHANATE-METHYL FAIL TO CLEAR TADPOLES NATURALLY INFECTED WITH THE HYPERVIRULENT LINEAGE OF <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	

<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>113</b>
LA INFECCIÓN POR <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> DISMINUYE LA TOLERANCIA TÉRMICA DE LOS HOSPEDADORES LARVARIOS, Y NO PUEDE SER ELIMINADA CON UNA BREVE EXPOSICIÓN AL CTMAX	
INFECTION WITH <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> LOWERS HEAT TOLERANCE OF TADPOLE HOSTS AND CANNOT BE CLEARED BY BRIEF EXPOSURE TO CTMAX	
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>142</b>
LA INTERVENCIÓN SEVERA IN SITU EN EL HÁBITAT DE CRÍA SÓLO CONSIGUE UN ÉXITO TEMPORAL EN REDUCIR LA INFECCIÓN POR <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	
<i>IN SITU</i> SEVERE BREEDING HABITAT INTERVENTION ONLY ACHIEVES TEMPORARY SUCCESS IN REDUCING <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> INFECTION	
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>164</b>
ELIMINACIÓN EXITOSA EN LA NATURALEZA DE UNA ENFERMEDAD INFECCIOSA LETAL PARA LA VIDA SILVESTRE	
SUCCESSFUL ELIMINATION OF A LETHAL WILDLIFE INFECTIOUS DISEASE IN NATURE	
<b>CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN INTEGRADORA.....</b>	<b>179</b>
<b>CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....</b>	<b>209</b>

## **RESUMEN / ABSTRACT**



## RESUMEN

La quitridiomycosis, una enfermedad causada por un agente patógeno fúngico, se ha convertido en la enfermedad infecciosa emergente responsable de la mayor pérdida de biodiversidad en la historia de nuestro planeta desde que se tienen registros históricos. Dicha enfermedad, ha afectado ya a más de 1000 especies de anfibios, ha jugado un papel principal en el declive de al menos 500 de esas especies, y ha convertido así a estos animales en la Clase de vertebrados más amenazada de la Tierra.

Esta patología que afecta a la piel de los anfibios, está originada por el hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* (de aquí en adelante, *Bd*) y afecta a multitud de especies principalmente de anuros. Hasta ahora *Bd* era el único miembro del Filo Chytridiomycota capaz de causar una enfermedad en vertebrados. No obstante, recientemente se ha descrito una nueva especie de hongo quitridio, *Batrachochytrium salamandrivorans* (de aquí en adelante, *Bsal*), que también muestra esta capacidad infectiva en vertebrados y que afecta más directamente a anfibios urodelos como las salamandras.

La quitridiomycosis no es una enfermedad que afecte a todas las especies de anfibios por igual. Existen marcadas diferencias entre especies respecto a la sensibilidad mostrada frente al hongo. Así, mientras la rana de uñas africanas (*Xenopus laevis*) presenta un nivel de resistencia o tolerancia elevado frente al agente patógeno, otras especies como las del género *Alytes* estudiadas dentro del presente trabajo, el sapo partero común (*Alytes obstetricans*) y el sapo partero balear (*Alytes muletensis*), han sufrido episodios de mortandad masiva entre sus poblaciones, declives o extinciones.

La capacidad de evasión de la respuesta inmune anfibia por parte de *Bd* ha sido puesta de manifiesto por diversos estudios. Las hipótesis que se manejan para explicar la diferente sensibilidad de las especies ante los efectos del hongo giran en torno a lo demostrado por estas investigaciones, que muestran que *Bd* podría inhibir la proliferación de linfocitos y provocar su muerte celular, y sería también capaz de alterar la regulación de ciertos genes necesarios para el buen funcionamiento del sistema inmune adquirido.

Muchos han sido los tratamientos que se han utilizado para tratar la quitridiomycosis en anfibios mantenidos bajo condiciones controladas en cautividad. Sin embargo, no todos ellos se han mostrado completamente eficaces, e incluso algunos de ellos presentan efectos secundarios que pueden poner en riesgo la salud tanto animal como humana. Todavía hoy en día se sigue buscando un protocolo de tratamiento que sea totalmente eficaz, seguro, y que pueda aplicarse fácilmente en todas las especies de anfibio y en todas las formas de desarrollo (larvas, juveniles y adultos). El producto antifúngico más extendido en su uso es el itraconazol, un triazol sistémico de primera generación, que se aplica a través de baños a distintas concentraciones y del que no obstante, se han detectado indicios de toxicidad cuando es utilizado para tratar la enfermedad en el estadio larvario de algunas especies de anfibio.

La temperatura es un factor ambiental decisivo en el desarrollo de la quitridiomycosis y en las dinámicas de transmisión de la enfermedad. Ejerce una influencia directa sobre los niveles de prevalencia e intensidad de la infección y sobre el resultado de las interacciones entre un patógeno como *Bd*, cuyo crecimiento y supervivencia dependen en gran medida de las condiciones ambientales, y un hospedador ectotermo como son los anfibios, cuya respuesta inmune está íntimamente ligada a la temperatura, exhibiendo una mayor eficacia conforme ésta aumenta. El actual escenario de cambio climático y aumento generalizado de las temperaturas lleva también aparejada la aparición cada vez más frecuente de eventos climáticos extremos, que se han

demostrado asociados al surgimiento de brotes de enfermedades infecciosas. Esto se fundamentaría en que las variaciones bruscas de las condiciones ambientales, en especial de la temperatura, hacen que los hospedadores tengan que readaptarse a temperaturas que están fuera de su rango térmico óptimo y en consecuencia, sufran un estrés térmico que los hace más susceptibles a padecer los efectos de agentes patógenos. Además, bajo este escenario de calentamiento global y de incremento de las temperaturas, los seres vivos tienen que adaptarse a temperaturas que están cada vez más próximas a su umbral térmico máximo (CTmax), punto en el que se produce un desequilibrio homeostático que de prolongarse en el tiempo puede tener consecuencias fatales.

El comercio ilegal de especies y la globalización han facilitado en gran medida la dispersión del patógeno a nivel global. Por esta razón, es perentoria la necesidad del diseño y el desarrollo de actuaciones destinadas a paliar los efectos de la epizootía sobre poblaciones de anfibios en la naturaleza. A pesar de todos los esfuerzos, existen todavía grandes carencias en nuestros conocimientos, consistiendo el gran reto en encontrar un método de mitigación de la enfermedad que sea seguro y sencillo en su aplicación, eficiente, fiable, y que pueda ser transferido para tratar distintas especies y poblaciones bajo condiciones ambientales diversas. En la presente tesis doctoral se describirán dos de esas técnicas de mitigación que sí han permitido obtener resultados esperanzadores. Una de ellas, se llevó a cabo en Mallorca y constituye el primer ejemplo a nivel mundial de erradicación del hongo en el medio natural.

Desde su descubrimiento, la comunidad científica internacional ha intentado desentrañar el origen de la enfermedad, los factores que influyen en su dinámica y su transmisión, la respuesta presentada por el hospedador frente al agente patógeno, o los posibles tratamientos que pudieran ser efectivos para tratar la infección. Así mismo, se han llevado a cabo estudios y

se han implementado sobre el terreno medidas destinadas a tratar de mitigar los efectos de la enfermedad en el medio natural.

La presente tesis doctoral evidencia que sólo con el estudio multidisciplinar y la comprensión de los muy heterogéneos factores que influyen en la dinámica de esta terrible enfermedad, que está poniendo en jaque la biodiversidad de nuestro planeta, lograremos combatirla eficazmente.



## ABSTRACT

Chytridiomycosis, a fungal driven disease, has become the emerging infectious disease responsible for the greatest loss of biodiversity attributable to a disease in recorded history. It has already affected more than 1000 amphibian species and played a key role in the decline of at least 500 of those species, leading amphibians into becoming the most threatened vertebrate Class of our planet.

This disease, which affects the amphibian skin mainly of Anuran species, is originated by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (here in after, *Bd*). Until now *Bd* was the only example of a chytrid infecting vertebrates. Recently though, a new chytrid fungus species has been described, *Batrachochytrium salamandrivorans* (here in after, *Bsal*), which also has this vertebrate infective capacity, mainly of Urodela species such as salamanders.

Chytridiomycosis is not however a disease that affects all the amphibian species in the same way. There are big differences among species regarding sensitivity to the fungus. Thus, whereas some species such as the African clawed frog (*Xenopus laevis*) show a high resistance level against the pathogen, others like the species belonging to the Genus *Alytes* studied here, the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) and the Mallorcan midwife toad (*Alytes muletensis*), have suffered from mass mortality events, declines and even extinctions.

Several studies have already demonstrated the strategy employed by *Bd* consisting of evading host immunity. Some researchers have hypothesized the different susceptibility to the fungus among the amphibian species lies in the immune system avoidance capacity showed by *Bd*. The chytrid fungus would

be able to inhibit lymphocyte proliferation, and even dysregulate the gene expression profiles of a number of genes involved in the acquired immune response.

Many treatments have been used to treat amphibians maintained under controlled captive conditions against chytridiomycosis. However, only a few of them appear to be completely efficient and some of those treatment regimes have been demonstrated to be toxic for both animal and human health. This is the reason why we are still looking for an efficient, reliable, safe and easy-to-use treatment protocol that could be applied to all the amphibian species and life-stages. Itraconazole, a first generation triazole, is the most commonly used antifungal drug. It is applied through baths in an itraconazole treatment solution. A major disadvantage of this drug is its toxicity to larval stages and some recently metamorphosed frogs.

Temperature is a paramount environmental factor that plays a crucial role in chytridiomycosis development, transmission and dynamics. Taking into account amphibians are ectothermic organisms with an immunity response intimately linked to temperature, that becomes more efficient with its increase, and *Bd* is a fungal pathogen which depends greatly on environmental conditions for its growth and survival, temperature is a key driver of infection that has a determinant influence on prevalence and infection intensity levels, as well as on the outcome of host-pathogen interactions. The current climate change scenario with steep increments of global temperatures, also increases temperature variability and causes extreme weather events to be more frequent, something which in turn is associated with the emergence of infectious diseases outbreaks due to the thermal stress the hosts suffer when they need to adapt themselves to temperatures out of their optimal thermal range every time these sharp and sheer variations of the environmental conditions take place. Moreover, under this global warming scenario all living organisms have to adapt themselves to these increasing temperatures getting

close to their critical thermal maximum (CT<sub>max</sub>), which represents the upper limit of the ability of animals to counterbalance temperature increases and also marks the loss of homeostasis.

Species illegal trade and globalization have intensified the chytrid fungus and chytridiomycosis intercontinental dispersal until reaching a point of no return where the disease is already globally widespread. That is the main reason why there is an urgent need for designing and implementing different field interventions able to mitigate the effects of the disease affecting wild amphibian populations. The great challenge now is to find a safe, simple, effective, reliable and transferable across host species and environments mitigation strategy. Two of those mitigation techniques, which have been tested and have provided a more hopeful outcome, will be described in this thesis. One of them was carried out in Mallorca, and represents the first successful attempt of the world to achieve eradication of *Bd* from a natural setting.

Since its discovery, the scientific community has tried to unveil the origins of this disease, unravel all the different factors that have an influence on its dynamics and transmission, determine the host response against the fungal pathogen, or design effective treatment regimes that could be used to clear infection. There have also been some initiatives attempting to mitigate the effects of the disease in the natural environment.

This thesis demonstrates that only through multidisciplinary research and a thorough understanding of the multiple factors involved in the dynamics of this catastrophic disease, which is posing a huge threat to global biodiversity, will we be able to successfully fight it.



# **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

CONSIDERACIONES ACERCA DE LA EPIDEMIOLOGÍA, LA INMUNIDAD, LOS TRATAMIENTOS Y LA MITIGACIÓN DE LA ENFERMEDAD



## INTRODUCCIÓN

### FACTORES EPIDEMIOLOGICOS DE LA ENFERMEDAD

En las últimas décadas estamos asistiendo a la aparición de un número sin precedentes de enfermedades fúngicas con un tremendo impacto en distintas especies tanto de plantas como de animales de vida silvestre. Sirvan como ejemplo, el “síndrome de la nariz blanca” causado por el hongo *Pseudogymnoascus destructans*, responsable de la muerte de millones de murciélagos en EEUU y Canadá en los últimos años. O también la conocida como “peste del cangrejo” o afanomicosis, patología causada por el hongo *Aphanomyces astaci*, que llegó a la península ibérica gracias a la introducción de una especie invasora como el cangrejo rojo (*Procambarus clarkii*) originario de Norteamérica y portador de la enfermedad, que está diezmando muy seriamente las poblaciones de cangrejo de río común (*Austropotamobius pallipes*), especie autóctona que a diferencia del cangrejo rojo, es muy sensible a los efectos del hongo (Fisher et al. 2012). Estas enfermedades demuestran que los hongos pueden llegar a ser altamente letales para hospedadores que no han estado antes en contacto con ellos, exhiben un amplio espectro de especies a las que pueden afectar y, tienen un elevado potencial reproductivo. Todas estas características hacen de los hongos unos patógenos capaces de llevar a la extinción a poblaciones enteras de animales silvestres, y a representar una seria amenaza para el conjunto de la biodiversidad (Fisher et al. 2012).

Dentro de estas enfermedades con origen fúngico, la quitridiomicosis, causada por el hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), descrito por Longcore et al. (1999), y que pertenece al Filo Chytridiomycota, la Clase Chytridiomycetes, y al Orden Chytridiales, ha sido señalada como la más

devastadora y como aquella que afecta a un mayor número de especies. La capacidad de *Bd* para causar declives severos en múltiples especies de anfibios reside en su alta patogenicidad, el amplio rango de especies a las que es capaz de afectar, en poseer una elevada transmisibilidad intra e interespecífica, y en su habilidad para persistir en el medio aún cuando el hospedador afectado haya desaparecido, o haya sufrido un fuerte declive con el consiguiente descenso en abundancia. Esta última capacidad de persistencia en el medio natural, que permite la aparición recurrente de reinfecciones en una misma localización, *Bd* la logra gracias a su pervivencia en especies animales no anfibias, o en larvas, postmetamorfos o adultos de otras especies de anfibios que actúan como reservorios (Daszak et al. 1999; Kilpatrick et al. 2010; Scheele et al. 2019; Bienentreu & Lesbarrères 2020).

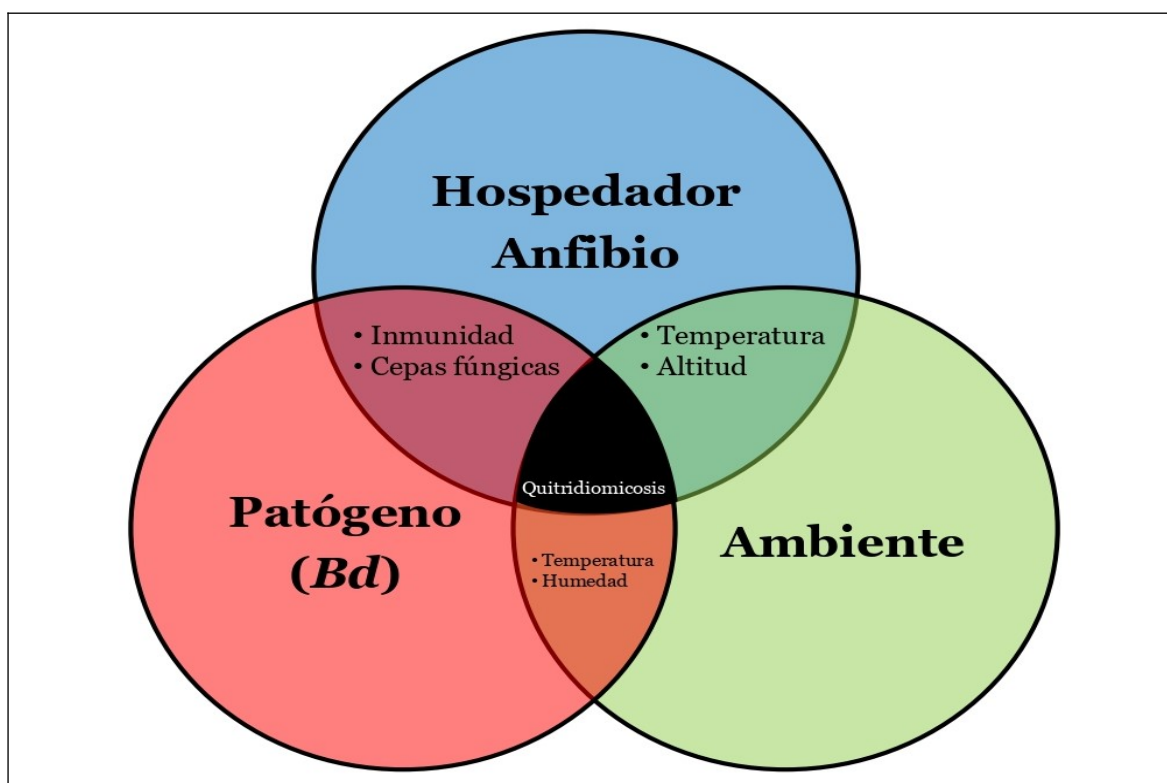
La quitridiomycosis es quizá la más relevante de las diferentes amenazas a las que tienen que enfrentarse las más de 7000 especies de anfibios descritas, pero no es ni mucho menos la única. Además de esta enfermedad infecciosa emergente de origen fúngico, existe otra enfermedad infecciosa, la ranaviriosis, causada por un virus perteneciente al género *Ranavirus* de la familia *Iridoviridae*, que es la responsable de distintos episodios de mortandad masiva que han afectado a poblaciones de anfibios de todo el planeta. Mas allá de las amenazas representadas por los mencionados agentes patógenos, los anfibios de todo el mundo deben también hacer frente a otras amenazas, todas ellas con el denominador común de su origen antropogénico, entre las que podemos enumerar: la pérdida de hábitat bien por su destrucción, bien por un cambio en el uso del mismo por parte de la especie humana, y la contaminación y el uso de pesticidas. Del mismo modo, pueden considerarse amenazas el comercio ilegal de especies y la introducción de especies invasoras, que compiten por los recursos con los anfibios, actúan como sus depredadores, o son portadores de enfermedades como la que es el objetivo de la presente tesis doctoral (Oficialdegui et al. 2019). Y por supuesto también el

## **Introducción**

cambio climático, que sobre todo en los últimos años se está revelando como una seria amenaza para el conjunto de la biodiversidad debido al calentamiento global y a la aparición cada vez más frecuente de eventos climáticos extremos (Daszak et al. 1999; Hof et al. 2011; Blaustein et al. 2012; Scheele et al. 2019).

En toda enfermedad infecciosa los efectos que se producen a nivel individual, poblacional o de comunidad, vienen determinados por las interacciones entre lo que podríamos describir como los tres vértices de un “triángulo epidemiológico” (Scholthof. 2007; Brannelly et al. 2020). En cada uno de esos vértices situaríamos por un lado al hospedador y por otro, al patógeno y al ambiente que rodea a ambos (Figura 1). De tal manera que en el caso concreto de la quitridiomycosis, si quisiéramos establecer un pronóstico respecto al desarrollo de la enfermedad en diferentes especies de anfibios, o buscar las razones por las cuales esta enfermedad no afecta de igual manera a todas las especies de anfibios, y encontramos diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad mostrada frente al patógeno, deberíamos tener en cuenta esas interacciones entre hospedador, patógeno y medioambiente (Scholthof. 2007). Factores como la respuesta inmune montada por el hospedador, su condición corporal, la riqueza de especies presente en determinada localización, o la capacidad de replicación y los mecanismos de evasión del sistema inmune que posea el patógeno, influyen de manera determinante en el resultado de la infección. Del mismo modo, y muy especialmente en el caso de los anfibios puesto que son organismos ectotérmicos, los factores ambientales juegan un rol preponderante en las dinámicas de transmisión y en el desarrollo de esta enfermedad fúngica. Factores como la altitud, la humedad y sobre todo la temperatura ambiental, tienen una influencia directa sobre rasgos del ciclo vital de los anfibios, sobre su comportamiento, y sobre la respuesta inmune que puedan montar los anfibios frente al patógeno. También ejercen esa influencia sobre el

crecimiento, el desarrollo y la abundancia del patógeno en el medio (Walker et al. 2010; Searle et al. 2011; Blaustein et al. 2012; Fernández-Beaskoetxea et al. 2015; LaBumbard et al. 2020; Lambertini et al. 2020).



**Figura 1.** Triángulo Epidemiológico formado por el hospedador, el patógeno y el ambiente.

Pasemos ahora a describir brevemente alguno de los factores más importantes que compondrían el citado “triángulo epidemiológico” en el caso de la quitridiomycosis. Diversos estudios han probado ya que los efectos de *Bd* en las poblaciones silvestres de anfibios varían según las diferentes cepas existentes del hongo, o según las especies anfibias afectadas y al mismo tiempo, se ven influenciados por las condiciones ambientales o distintos

## **Introducción**

factores abióticos como la altitud, la temperatura, la humedad, y la presencia o ausencia de puntos permanentes de agua (Skerratt et al. 2007; Fisher et al. 2009; Kilpatrick et al. 2010; Searle et al. 2011; Fernández-Beaskoetxea et al. 2015; LaBumbard et al. 2020; Lambertini et al. 2020). Así, vemos como las especies que se han visto más seriamente afectadas y que han sufrido los más significativos declives entre sus poblaciones, son aquellas cuyo hábitat se encuentra a una altitud elevada y no tienen un rango de distribución especialmente amplio que les permita adaptarse a otros entornos (Skerratt et al. 2007; Searle et al. 2011). Walker et al. (2010) demostró que hay una relación directa entre la altitud y la enfermedad. Altitudes elevadas se corresponden con la aparición de la versión más letal de la enfermedad y los declives más acusados. Las especies de anfibios sensibles a la enfermedad presentes en zonas de montaña, tanto en regiones templadas como tropicales, y asociadas de alguna manera a masas de agua permanentes, han visto sus poblaciones esquiladas y reducidas drásticamente. Esto es así, puesto que la intensidad de la infección y la prevalencia del hongo son mayores en zonas elevadas (Fisher et al. 2009; Kilpatrick et al. 2010). Además de la altitud, otro factor con un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad en el medio natural es la temperatura. Y en este caso, estaríamos hablando de un doble efecto ya que al tratarse de una enfermedad que afecta a vertebrados poiquilotermos, la temperatura afecta al patógeno, pero también influye en el hospedador. Investigaciones como las de Fernández-Beaskoetxea et al. (2015) han comprobado que la quitridiomycosis es una enfermedad altamente estacional, influenciada por los cambios de temperatura, e inversamente asociada a la temperatura del agua. *Bd* es un patógeno asociado a las bajas temperaturas, cuyo desarrollo y crecimiento depende de la temperatura ambiental (Searle et al. 2011). Esto tiene como resultado, que las mayores cargas fúngicas en el medio las podemos encontrar durante los meses más fríos del año (Raffel et al. 2010; Fernández-Beaskoetxea et al. 2015), y dado que las regiones templadas del planeta son las que están sujetas a una mayor

estacionalidad y a unas mayores diferencias de temperatura entre los meses cálidos y fríos del año, podemos concluir que los anfibios presentes en las zonas templadas del planeta, estarían expuestos a un gran riesgo de sufrir brotes letales de la enfermedad con episodios de mortalidades masivas entre sus poblaciones (Cohen et al. 2020). Vemos así, como temperaturas por debajo del rango óptimo de crecimiento y desarrollo del hongo, son las que conllevan una mayor presencia del hongo en el medio, lo que se traduce en mayores cargas infectivas soportadas por el hospedador. Esto se produce, porque esas bajas temperaturas comprometen también de manera importante el desempeño del sistema inmune de los anfibios, tanto de su sistema inmune innato como del adquirido o adaptativo (Cooper et al. 1992; Fisher et al. 2009; Ribas et al. 2009). Esta casi inhibición del sistema inmunitario anfibio durante los meses fríos del año, deja a estos animales más vulnerables y expuestos, y limita su capacidad de respuesta frente al hongo, que aún estando fuera de su rango óptimo de temperatura, puede desarrollarse sin tener que enfrentarse a las defensas del hospedador (Rollins-Smith. 2020).

A parte de factores abióticos como la altitud y la temperatura, que como hemos visto, juegan un papel fundamental en la dinámica de la enfermedad, ésta se ve también modulada por factores exclusivamente referidos bien al patógeno, bien al hospedador. Son los llamados factores bióticos. Si nos centramos en el hongo, veremos como la existencia de distintas cepas con diferencias acusadas en cuanto a su virulencia y su capacidad patógena determina, como no podía ser de otra manera, el resultado de la infección dependiendo de la cepa fúngica que actúe (Berger et al. 2005b; Farrer et al. 2011). Además del origen asiático del patógeno fúngico que algunos estudios sitúan en la península de Corea (O’Hanlon et al. 2018), actualmente se han identificado cinco grandes linajes de *Bd*, siendo el hipervirulento Linaje Panzoótico Global (*Bd*GPL por sus siglas en inglés) el que está más extendido y el que, gracias a la globalización y al comercio ilegal de especies, ha conseguido

## **Introducción**

llegar a cinco continentes y afectar a los anfibios que en ellos habitan (Farrer et al. 2011; Byrne et al. 2019). Este linaje hipervirulento y muy resistente es el que desgraciadamente podemos encontrar tanto en la península ibérica, como en el resto de Europa, donde también se ha detectado la presencia de otros linajes como *BdCAPE* y *BdAsia1*. La existencia de distintos linajes en una misma área abre la posibilidad a que se produzcan hibridaciones entre linajes que den lugar a cepas recombinantes, que pueden llegar incluso a ser más virulentas que sus antecesores (Byrne et al. 2019; Castro Monzon et al. 2020). En lo referente al hospedador, dentro de estos factores bióticos, además de la condición corporal, la estructura poblacional, los rasgos del ciclo vital de cada especie, la presencia de una microbiota en la piel de los anfibios capaz de producir sustancias que inhiben el crecimiento del hongo, la producción por parte de glándulas existentes en la piel de los anfibios de un abanico de péptidos antimicrobianos con efectos fungicidas, o los distintos elementos que componen el sistema inmune innato y adquirido, aparece también otro factor adicional que condiciona la evolución de la infección y es, la variabilidad en cuanto a sensibilidad frente al patógeno que existe entre las distintas especies de anfibios. Ha quedado ya probado por la comunidad científica, que no todas las especies de anfibios responden de igual manera ante la infección por parte del agente fúngico (Woodhams et al. 2007; Briggs et al. 2010; Tobler & Schmidt 2010). Así, mientras especies como la rana toro americana (*Lithobates catesbeianus*) o la rana de uñas africana (*Xenopus laevis*), aún siendo infectadas por *Bd* se muestran completamente asintomáticas, y son capaces de soportar cargas fúngicas muy elevadas sin que éstas tengan consecuencias negativas para sus organismos (Garner et al. 2006; Ramsey et al. 2010), otras especies como la rana de patas amarillas de montaña (*Rana muscosa*), o el sapo partero común (*Alytes obstetricans*), sí que se muestran especialmente sensibles (Figura 2) a los efectos del hongo (Bosch et al. 2001; Vredenburg et al. 2010).



**Figura 2.** Sapo partero común (*A. obstetricans*) muerto a causa de la quitridiomicosis. Foto: Jaime Bosch.

Estas diferencias en la sensibilidad las podemos encontrar ya no sólo entre especies, sino también entre los distintos estadios por los que transita un anfibio durante su desarrollo. La enfermedad no afecta de la misma manera a las larvas que a los recién metamorfoseados, los juveniles o los adultos. Debido a que el hongo restringe su distribución a las células queratinizadas de los anfibios, y en las larvas dichas células las podemos encontrar principalmente formando parte de la boca, las repercusiones de la infección por *Bd* en las larvas se basan en un crecimiento y una tasa de desarrollo reducidos, como consecuencia de una menor eficiencia forrajera y una menor cantidad de comida ingerida (Kilpatrick et al. 2010; Venesky et al. 2009). Estas afecciones del hongo en los estadios larvarios, aún siendo no letales por sí mismas, sí que

## **Introducción**

pueden acarrear consecuencias muy serias y severas que comprometan el adecuado desarrollo del sistema inmune del animal (Rollins-Smith. 1998), e incluso la vida del mismo durante o justo después de la metamorfosis, dada la importancia crítica que tiene el buen desarrollo larvario para la supervivencia en la mayoría de especies de anfibios conocidas (Garner et al. 2009b; Venesky et al. 2009). Los costes fisiológicos de la metamorfosis para los anfibios son ya de por sí elevados, por lo que si a esto le añadimos los costes de hacer frente durante el desarrollo larvario a una infección producida por un agente patógeno, que además está afectando negativamente la capacidad de crecimiento de las larvas y su capacidad de llegar con una condición corporal adecuada a la metamorfosis, tendremos como resultado un aumento en las tasas de mortalidad durante o posteriores a la metamorfosis, como se ha podido observar en el caso del sapo común (*Bufo spinosus*) (Garner et al. 2009b). Y esto puede ocurrir incluso en aquellos animales que hayan conseguido vencer a la infección y deshacerse de la presencia del hongo. En ocasiones, los costes de la lucha frente a la infección, incluso si esa infección fúngica no llega a ser letal, pueden acabar siendo muy altos y pueden conllevar un deterioro en el estado físico de los organismos afectados, al obligarles a detraer temporalmente recursos energéticos de procesos fisiológicos como la reproducción, para destinarlos a otros procesos de mayor prioridad como pueden ser los de tipo inmunitario, con el fin de poder hacer frente al patógeno (Garner et al. 2009b; Campbell et al. 2019).

Hay también otro factor a tener en cuenta cuando las infectadas por el hongo son aquellas larvas de determinadas especies de anfibios eminentemente terrestres en su fase adulta, pero con un desarrollo larvario muy largo, que incluso puede prolongarse durante varios años. Especies como *R. muscosa* o *A. obstetricans* tienen un desarrollo larvario que puede extenderse a lo largo de varios años en localizaciones de una elevada altitud, donde el agua se mantiene a una baja temperatura durante todo el año (Bosch

et al. 2001; Vredenburg et al. 2010). Precisamente como hemos visto, la elevada altitud y la baja temperatura son las condiciones ambientales más favorables para el desarrollo del hongo, y es en esas localizaciones en las que se pueden encontrar las cargas fúngicas más altas. Las larvas invernantes de estas especies pasan mucho tiempo desarrollándose en el agua en contacto con las zoosporas infectivas del hongo (Bosch et al. 2001; Bosch et al. 2006; Walker et al. 2010). Esto hace que en este tipo de larvas se puedan encontrar cargas de *Bd* muy elevadas, y convierte a las larvas de estas especies en “super-diseminadores” y en los grandes reservorios de la enfermedad, capaces de amplificar la transmisión y reinfectar año tras año a las larvas más pequeñas que comparten con ellas el punto de agua y también, a los anfibios adultos que entran en contacto con el agua en la época de cría (Briggs et al. 2010; Fisher et al. 2012; Fernández-Beaskoetxea et al. 2016).

Por otra parte, los efectos del hongo sobre el organismo son distintos cuando el agente fúngico infecta a un anfibio de una especie sensible que ya ha completado la metamorfosis. Como se ha mencionado con anterioridad, el hongo limita su rango de acción a las células queratinizadas. Durante la metamorfosis, esas células que en los estadios larvarios estaban presentes solamente en la boca, se extienden por toda la piel de los anfibios, con lo que también se aumenta de una manera significativa el rango de afección de *Bd*. Esto conlleva cambios fisiopatológicos en la estructura del estrato granuloso y del estrato córneo de la epidermis, los cuales se ven invadidos por las zoosporas infectivas que después se transforman en esporangios. La piel de los anfibios es única entre los vertebrados terrestres, ya que a través de ella se produce un intercambio de gases, agua y electrolitos, que consigue que el animal mantenga un equilibrio osmótico con el ambiente que le rodea. Las alteraciones producidas por el hongo a nivel de la epidermis causan un engrosamiento de la piel o hiperqueratosis, y ocasionan una disrupción de las funciones cutáneas con la consiguiente inhibición del transporte de

## ***Introducción***

electrolitos, que en el caso del sodio y del potasio puede llegar a alcanzar niveles de un 20% y de un 50% respectivamente (Voyles et al. 2009). Esto acaba comprometiendo de forma severa la osmorregulación y la falta de electrolitos, sobre todo de potasio, termina afectando a la función cardíaca. Finalmente, el fallo del corazón lleva, en última instancia, a la muerte del animal (Voyles et al. 2009). Nos encontramos así con la paradoja de que un agente patógeno que limita su rango de afección a los estratos más superficiales de la epidermis y no causa cambios patológicos en ningún órgano interno, acaba siendo letal para los anfibios al provocar un paro cardíaco (Voyles et al. 2009).


## **LA INMUNIDAD FRENTE AL PATÓGENO**

El sistema inmune anfibio es muy parecido en su estructura, sus componentes y su funcionamiento al que poseemos los mamíferos (Robert & Ohta 2009; Rollins-Smith et al. 2009). Consiste por una parte en un sistema inmune innato basado en una respuesta celular no específica, que al ser el primero en activarse, actúa como la primera barrera ante una infección. Este sistema inmune innato estaría compuesto eminentemente por macrófagos, granulocitos como los neutrófilos, basófilos y eosinófilos y también, por las células citolíticas naturales (células NK por sus siglas en inglés). Todos estos tipos de células, se encargarían de hacer frente a una agresión externa por medio de la fagocitosis, o directamente atacando a las células infectadas por citotoxicidad (Rollins-Smith. 2001; Robert & Ohta 2009; Rollins-Smith et al. 2009). Al sistema innato anfibio también pertenecerían el conjunto de bacterias simbiotas presentes en la piel de los anfibios, así como un amplio abanico de péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés), algunos de ellos con actividad antifúngica, que están producidos por las glándulas granulares de la piel, y varían en su composición y concentración según la

especie que los produzca (Rollins-Smith & Conlon 2005; Conlon et al. 2009; Grogan et al. 2018; Rollins-Smith. 2020). Finalmente, dentro del sistema inmune innato estarían las células dendríticas que son células presentadoras de antígenos, y los componentes del complemento. El sistema del complemento inmunitario está formado por una serie de proteínas cuya activación a través de tres diferentes vías lleva a la mejora de la respuesta inflamatoria, a una opsonización del patógeno, y a una lisis celular a través de la formación del complejo de ataque de membrana (Rodriguez & Voyles 2020). El complemento es por lo tanto un elemento importante en la respuesta inmune temprana, ya que hace que esa respuesta sea más robusta y eficiente, y también actúa como un nexo de unión entre el sistema inmune innato y el adquirido (Robert & Ohta 2009; Rollins-Smith et al. 2009; Rodriguez & Voyles 2020). La otra parte del sistema inmune anfibio sería el sistema inmune adquirido o adaptativo, compuesto principalmente por un tipo de leucocitos, los linfocitos tipo B y tipo T. Aunque los anfibios carecen del equivalente a lo que en los mamíferos son los nódulos linfáticos, sí que poseen un timo, que es el órgano donde se diferencian los linfocitos T y un bazo, que también actúa como órgano linfoide en el que se acumulan los linfocitos T y B. Este sistema adquirido está también formado por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés), del cual hay dos clases. El MHC Clase-I se encarga de presentar principalmente antígenos de origen intracelular, mientras que el MHC Clase-II hace lo mismo con los antígenos de origen extracelular (Rollins-Smith. 2001; Robert & Ohta 2009; Rollins-Smith et al. 2009). Su funcionamiento se basa en la competencia que poseen los péptidos que forman el MHC para unirse a los antígenos y posteriormente presentárselos a los linfocitos, que son entonces capaces de destruir las células infectadas y de montar una respuesta humoral consistente en la producción de inmunoglobulinas o anticuerpos específicos para esos antígenos (Figura 3). Este proceso de presentación de antígenos y de respuesta humoral específica es lo que hace que el sistema inmune adaptativo sea más lento y en teoría, lo

## Introducción

convierte también en más eficiente, aunque como veremos ya hay diversos estudios que cuestionan por su aparente ineficacia el papel que juega el sistema inmune adquirido anfibio en la defensa contra la quitridiomycosis (Savage et al. 2020). Conviene reseñar que la división que hacemos del sistema inmune en estas dos partes es más académica que real, ya que cuando el organismo se enfrenta a una infección, tanto el sistema innato como el adquirido no funcionan como compartimentos estancos. Muy al contrario, están en permanente contacto, se entrecruzan señales, y comparten componentes para hacer frente de manera coordinada a cualquier amenaza (Richmond et al. 2009).

<b>Sistema Inmune Innato Anfibio</b>	<b>Sistema Inmune Adquirido Anfibio</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>· Monocitos / Macrófagos</li><li>· Neutrófilos</li><li>· Basófilos y Eosinófilos</li><li>· Células Dendríticas</li><li>· Complemento</li><li>· Bacterias simbiotes de la piel</li><li>· Células Citolíticas Naturales (NK)</li><li>· Péptidos Antimicrobianos (AMPs)</li></ul>	 <ul style="list-style-type: none"><li>· Linfocitos Tipo B</li><li>· Linfocitos Tipo T</li><li>· MHC Clase-I</li><li>· MHC Clase-II</li><li>· Inmunoglobulinas IgM</li><li>· Inmunoglobulinas IgY</li><li>· Inmunoglobulinas IgX</li></ul>

**Figura 3.** Componentes del Sistema Inmune Innato y Sistema Inmune Adquirido de los anfibios.

A pesar del parecido que guarda el sistema inmune anfibio con el del resto de vertebrados, hay sin embargo un proceso que atraviesan los anfibios

en algún momento a lo largo de su ciclo vital, que los hace únicos y los diferencia del resto de vertebrados del planeta. Es la metamorfosis. Este proceso de transformación que supone un tránsito desde los estadios larvarios a la etapa adulta, tiene también un efecto muy importante en el sistema inmune anfibio, ya que conlleva un profundo y radical cambio en la expresión de proteínas, la población de linfocitos y por lo tanto, en el repertorio de los anticuerpos que éstos producen (Hsu & DuPasquier 1992). Durante la metamorfosis hay una reorganización total del sistema inmune. A lo largo del desarrollo larvario, la población de linfocitos va expandiéndose. Las larvas, al igual que los adultos, poseen inmunoglobulinas IgM y también IgY, aunque éstas últimas en bastante menor cantidad que los adultos. Algo que también diferencia el sistema inmune adulto del larvario, es la ausencia en este último de MHC Clase-I (Du Pasquier et al. 1989; Rollins-Smith. 1998). La metamorfosis acarrea grandes cambios a nivel tisular en todo el organismo y por supuesto, estos cambios afectan también a los linfocitos que ven su población disminuida drásticamente (Hsu & DuPasquier 1992). Durante el clímax metamórfico, el número de linfocitos larvarios decrece hasta en un 40%. Este acusado descenso está ocasionado por un aumento en la producción de hormona liberadora de corticotropina (CRH por sus siglas en inglés) por parte del hipotálamo. La CRH provoca a su vez, una elevación en la producción por parte de la hipófisis de hormona adrenocorticotropa (ACTH) y de hormona estimulante del tiroides (TSH). Finalmente, la cascada hormonal se completa con un acusado incremento en los niveles de las hormonas tiroideas y en los corticoesteroides circulantes en sangre. Estas hormonas ayudan a acelerar la metamorfosis, pero los corticoesteroides, que se producen también bajo situaciones de estrés, inducen además la muerte celular o apoptosis de los linfocitos. Esta destrucción fisiológica de los linfocitos larvarios se produce durante la metamorfosis para evitar que esos mismos linfocitos reaccionen y ataquen al nuevo repertorio proteico y linfocitario específico de los anfibios adultos, que se forma tras la metamorfosis. Después

## **Introducción**

de este proceso, la población de linfocitos, que formarán parte ya de los linfocitos adultos, comienza a aumentar hasta alcanzar los niveles habituales entre los 4-8 meses post-metamorfosis. No obstante, algunos linfocitos Tipo B de memoria persisten a través de la metamorfosis, y contribuyen a construir el repertorio de los anticuerpos adultos. Esta renovación y la consiguiente pérdida temporal de linfocitos, deja a los anfibios durante la metamorfosis más expuestos a la acción de agentes patógenos externos como puede ser *Bd*, y provoca que, al menos temporalmente, los anfibios sufran un mayor riesgo de contraer una infección causada por un agente patógeno (Rollins-Smith. 1998). Nos encontramos así con un periodo, el que sigue inmediatamente después de la metamorfosis, en el que los anfibios experimentan un descenso drástico de sus defensas debido a la reducción linfocitaria precipitada por estos cambios hormonales, que los hace especialmente vulnerables a los ataques por parte de agentes patógenos. Este periodo coincide además, como ya se ha reseñado, con el momento en el que las células queratinizadas, a las que afecta el hongo quitridio, pasan de estar solamente localizadas en la boca de las larvas, a extenderse por toda la piel del anfibio. Esto explicaría en parte el porqué los efectos más devastadores de la enfermedad los sufren los animales recién metamorfoseados, y los episodios de mortandad masiva producidos por *Bd* se concentran principalmente en esta fase del ciclo vital anfibio.

Los organismos ectotermos están sujetos a que los cambios estacionales de temperatura que se dan en zonas templadas, afecten su respuesta inmune a varios niveles. En los anfibios, esta dependencia térmica de su sistema inmunitario, hace que cuando la temperatura desciende por debajo del rango térmico óptimo, el tiempo necesario para montar una respuesta inmune aumenta, mientras que los niveles de linfocitos y de eosinófilos circulantes en sangre, así como de anticuerpos producidos descienden (Wright & Cooper 1981; Raffel et al. 2006). También la actividad del complemento inmunitario se ve afectada negativamente por las bajas temperaturas. La falta de

proliferación de los linfocitos a bajas temperaturas, limita la capacidad del animal de reconocer y responder a un antígeno, con lo que el sistema inmune en general pierde robustez y eficiencia (Maniero & Carey 1997). Siendo animales hibernantes, los anfibios de zonas templadas atraviesan este proceso fisiológico de inmunosupresión invernal anualmente, durante el cual su metabolismo basal se ve reducido con el fin de preservar energía mientras están en ayuno (Rollins-Smith. 2020). No obstante, no se quedan completamente desprotegidos durante este periodo, ya que ese descenso fisiológico y estacional de la actividad del sistema inmune, no afecta al número de neutrófilos ni a la actividad fagocítica, que aunque también descienden inicialmente con la bajada de las temperaturas, vuelven a aumentar cuando el anfibio se aclimata a las nuevas condiciones ambientales (Maniero & Carey 1997; Raffel et al. 2006). Esta adaptación evolutiva ha permitido a los anfibios de zonas templadas como *A. obstetricans*, optimizar recursos y mantener un nivel de defensa adecuado durante los meses invernales, con el fin de poder hacer frente a los escasos patógenos que estaban adaptados a las bajas temperaturas que se dan durante ese tiempo. Actualmente sin embargo, los anfibios tienen que hacer frente a un patógeno como el hongo quitridio, que sí es capaz de sobrevivir a esas bajas temperaturas, e incluso como ya hemos visto, se ve favorecido e incrementa su prevalencia y su intensidad infectiva durante ese periodo en el que los anfibios sufren de un aumento en su susceptibilidad hacia agresiones externas (Raffel et al. 2006). Todo esto ocasiona que los efectos más devastadores de *Bd*, se dejen notar en zonas templadas especialmente durante los meses de invierno y primavera, cuando los anfibios que logran sobrevivir a la hibernación están en un proceso de aclimatación estacional, y sus niveles leucocitarios y de efectividad de la respuesta inmune todavía no están desarrollados por completo, con lo que no pueden hacer frente al patógeno fúngico.

Pero la temperatura también puede influir de manera positiva en la evolución de la enfermedad. Al contrario de lo que sucede con el frío, el

## **Introducción**

sistema inmune anfibio se ve potenciado en su capacidad de respuesta y de contención de la infección cuando las condiciones ambientales le son más favorables y las temperaturas son más cálidas. Se ha demostrado que los hospedadores resisten mejor la infección por *Bd* a temperaturas elevadas, aunque éstas se encuentren dentro del teórico rango óptimo de crecimiento del hongo en condiciones de laboratorio (17-25°C) (Andre et al. 2008). Algunas especies de anfibio son incluso capaces de acabar con la infección por *Bd* si se encuentran en unas condiciones de temperatura adecuadas. Y lo consiguen más rápidamente si esas condiciones térmicas son óptimas para el hospedador. Bajo esas condiciones óptimas, se produce una regulación genética positiva, y un aumento en la capacidad de respuesta del sistema inmune innato, en concreto en la producción de péptidos antimicrobianos (AMPs) (Ribas et al. 2009). Este aumento de la tasa de supervivencia a temperaturas elevadas, es debido principalmente a una mayor eficiencia de su respuesta inmune (Murphy et al. 2011). Vemos así como, la temperatura se convierte en un factor ambiental que juega un papel decisivo y crucial en el desarrollo de la quitridiomycosis, ya que ejerce una influencia directa sobre la respuesta inmune que los anfibios pueden desplegar para hacer frente al hongo quitridio, *Bd*.

Ante cualquier infección, un organismo puede intentar defenderse utilizando dos estrategias: O bien limita la carga infectiva del patógeno, ofreciendo así resistencia a la infección, o bien limita el daño que dicho patógeno le puede ocasionar, mostrando así tolerancia hacia la infección (Searle et al. 2011; Brannelly et al. 2020). En el caso de la quitridiomycosis, los anfibios ponen en marcha distintos mecanismos de defensa para intentar hacer frente al patógeno. Entre ellos encontramos a las defensas de la piel, formadas por péptidos antimicrobianos (AMPs), inmunoglobulinas presentes en las secreciones dérmicas, así como también metabolitos antifúngicos producidos por bacterias simbiotes localizadas en la superficie de la piel

anfibia (Rollins-Smith et al. 2011; Grogan et al. 2018). Los AMPs son normalmente de naturaleza catiónica e hidrofóbicos, y tienen una importante capacidad de disrupción de las membranas celulares, lo que les confiere la facultad de proteger a la piel de agresiones causadas por bacterias, virus, protozoos y también hongos. Estos AMPs jugarían un papel crítico en la prevención de la colonización de la piel por parte de *Bd*, limitando el grado de infección. Se ha comprobado además que estos péptidos actúan sinérgicamente para inhibir el crecimiento de las zoosporas y los esporangios del hongo. Serían así una pieza fundamental en la resistencia contra los efectos del patógeno (Rollins-Smith et al. 2009; Ramsey et al. 2010; Gervasi et al. 2014). Diversos estudios han evidenciado también su importancia a la hora de luchar frente al hongo quitridio, ya que se ha demostrado que algunas especies sensibles a *Bd* como el sapo boreal (*Anaxyrus boreas*) no poseen una mezcla peptídica efectiva contra el patógeno (Rollins-Smith et al. 2009). Y viceversa, aquellas especies de anfibios más resistentes a la enfermedad y que no han sufrido declives, son aquellas capaces de secretar un abanico de péptidos que sí muestran un alto grado de efectividad *in vitro* frente al hongo (Woodhams et al. 2007). Existen así evidencias cada vez más sólidas, que nos llevan a pensar que se podría predecir la supervivencia o el declive de una especie de anfibio al enfrentarse a una infección por *Bd* en la naturaleza, según la clase y la cantidad de péptidos antimicrobianos que dicha especie sea capaz de producir (Rollins-Smith et al. 2011). Además de estas defensas dérmicas, otro tipo de defensas, conformadas por el sistema inmune innato y el adquirido, son movilizadas para tratar de contener la infección si el hongo tiene éxito a la hora de colonizar la piel del anfibio. Entran en juego entonces las defensas celulares y las humorales. Dentro de la respuesta celular, es de gran importancia la actividad de los linfocitos T. De hecho, durante mucho tiempo se ha otorgado a las células T un rol preponderante en la defensa frente a las infecciones fúngicas (Blanco & García 2008). En el caso de la infección por el hongo quitridio, se ha observado una proliferación de linfocitos T muy débil,

## **Introducción**

incluso en animales que habían sido previamente inmunizados, lo que sugiere como veremos más adelante, que *Bd* puede tener algún mecanismo que inhiba la protección de la respuesta celular (Rollins-Smith et al. 2009). Otra característica de la infección por este patógeno fúngico, es el aumento que se observa en algunas especies infectadas de la ratio entre neutrófilos y linfocitos. Signo éste que indica que los animales infectados por *Bd* sufren de un estrés inducido por dicha infección (Gervasi et al. 2014). Finalmente en cuanto a la respuesta humoral, algunos estudios han demostrado que en especies tolerantes a la infección como la rana de uñas africana (*Xenopus laevis*), sí existe un aumento en la producción de anticuerpos específicos (inmunoglobulinas IgM e IgY) para enfrentarse a *Bd* (Rollins-Smith et al. 2009). Sin embargo, no hay todavía una evidencia probada del papel que juegan los anticuerpos en la protección frente a las infecciones fúngicas dérmicas, también llamadas dermatomicosis. Se especula con que su acción podría estar relacionada con la activación del complemento inmunitario y con la opsonización, o destrucción de las células infectadas (Blanco & García 2008). Con todo lo anteriormente expuesto, comprobamos que las defensas desplegadas por los anfibios frente al hongo quitridio, aunque varían según la especie de anfibio implicada, consisten en una combinación entre el sistema inmune innato y el adquirido. Ambos sistemas actúan de manera coordinada para hacer frente a la infección. No obstante, parece que el hecho de que no se produzca una adecuada proliferación de linfocitos, y que la eficiencia de los anticuerpos producidos frente a *Bd* tampoco esté probada, otorga al sistema inmune innato y sobre todo a la actividad de los péptidos antimicrobianos secretados en la piel, un papel destacado en la lucha contra la infección.

Un último elemento que es importante reseñar es la aparentemente escasa reacción inflamatoria en la piel que se ha detectado en respuesta a una infección fúngica que afecta de manera intensa y casi exclusiva a este área vital del organismo anfibio (Berger et al. 2005a; Grogan et al. 2018). Las últimas

hipótesis para intentar explicar este sorprendente hecho, apuntan a que *Bd* lleva coevolucionando desde su origen junto con sus hospedadores anfibios asiáticos al menos durante el último siglo (Fu & Waldman 2019). Fruto de esta carrera evolutiva en la que tanto el patógeno como sus hospedadores han ido desarrollando diferentes mecanismos de ataque, evasión o defensa, se cree que el hongo quitridio habría sido capaz de evolucionar como un organismo comensal de la piel anfibia e inducir la inmunosupresión local de la respuesta celular inflamatoria, beneficiando así al hospedador al evitarle los perjudiciales efectos que esa inflamación podría tener en un órgano vital para la supervivencia anfibia como puede ser su piel (Rollins-Smith. 2020).

Sin duda, a pesar de todos los esfuerzos e investigaciones que se han llevado a cabo para comprender en profundidad en qué consiste la respuesta inmune anfibia frente a la quitridiomycosis, y los mecanismos de que dispone el patógeno para evadirla, todavía nos falta mucho para llegar a encajar todos los elementos y entender completamente cómo funcionan las interacciones entre el hospedador anfibio y el agente patógeno fúngico.

## **TRATAMIENTO DE LA QUITRIDIOMICOSIS**

Múltiples estudios a lo largo de los últimos años han ido dirigidos a encontrar un protocolo de tratamiento que fuese efectivo y eficiente a bajas dosis, con un amplio rango terapéutico, es decir, un amplio margen entre la concentración mínima efectiva y la concentración mínima tóxica en el caso de los productos antifúngicos, un tratamiento fiable, no costoso en la parte económica, práctico, sin efectos secundarios contraproducentes, y aplicable tanto en los diversos estadios anfibios (larvas, metamorfos y adultos), como en diferentes condiciones de cautividad o incluso en la naturaleza. Por desgracia a

## **Introducción**

día de hoy, a pesar de los muchos avances, todavía no se ha encontrado un tratamiento que cumpla todos y cada uno de estos requisitos.

Sin duda, el fármaco que se usa de una forma más generalizada y el que mejores resultados ha dado hasta el momento, sobre todo al tratar anfibios juveniles y adultos infectados con *Bd*, es el itraconazol (Nichols & Lamirande 2001). Este triazol sistémico de primera generación, altera la permeabilidad de membrana y las funciones del hongo (Loyau et al. 2016), y ha sido utilizado con éxito en distintos centros de investigación y en programas de cría en cautividad (Forzán et al. 2008; Garner et al. 2009a; Jones et al. 2012).

Pero no sólo se ha utilizado este triazol, el itraconazol, para tratar la enfermedad. Desde que se describió la quitridiomycosis y se supo el agente fúngico que la causaba, son varios los fármacos que se han probado con diferentes resultados. Uno de ellos es el verde de malaquita, que ha sido usado con éxito en combinación con el formaldehído para tratar a individuos adultos de *S. tropicalis* infectados con *Bd* (Parker et al. 2002). No obstante, el uso de este fármaco está completamente desaconsejado debido a sus efectos potencialmente teratogénicos, mutagénicos y carcinogénicos, su capacidad para afectar directamente al ADN, y la citotoxicidad que manifiesta en mamíferos (Culp & Beland 1996; Sudova et al. 2007; Pessier & Mendelson 2010). Otro producto que ha demostrado tener actividad antifúngica frente a *Bd*, y que también se ha utilizado con éxito para tratar la enfermedad es el cloranfenicol. Este antibiótico bacteriostático de amplio espectro actúa interfiriendo en la síntesis proteica del patógeno. Se ha conseguido usar satisfactoriamente contra la enfermedad en individuos adultos de la rana de Archey (*Leiopelma archeyi*) y de la rana arborícola verde australiana (*Litoria caerulea*), sin que se haya observado efecto secundario alguno (Bishop et al. 2009; Young et al. 2012). Sin embargo tampoco se aconseja su uso, debido a que se ha asociado a la aparición de una anemia aplásica con afección de la médula ósea en humanos (Smick et al. 1964). Se ha documentado también,

que el uso de cloranfenicol causa un amplio impacto a nivel hematopoyético en adultos del sapo africano común (*Sclerophrys regularis*), llegando a producir cambios ultraestructurales en los leucocitos que se corresponderían con los observados en procesos leucémicos (El-Mofty et al. 2000). Por último el cloranfenicol, por su acción bacteriostática, tendría también efectos inhibitorios significativos en las bacterias simbiotas de la piel anfibia si se administra por vía tópica. Un estudio demostró su capacidad para alterar dramáticamente el microbioma protector existente de forma natural en la piel de la rana leopardo sureña (*Lithobates sphenoccephalus*), afectando así a las defensas innatas dérmicas de esta especie (Holden et al. 2014). Otro producto que se ha utilizado en el tratamiento de la quitridiomycosis es el cloruro de benzalconio. Este desinfectante de amplio espectro se utilizó con aparente éxito en forma de solución acuosa para tratar una infección por *Bd* en individuos de la rana de junco pintada (*Hyperolius marmoratus*) (Barrows et al. 2010). Sin embargo, también ha habido algún caso en el que no se obtuvieron unos resultados satisfactorios utilizándolo. A pesar de que el tratamiento con cloruro de benzalconio que se aplicó prolongó significativamente la vida de los anfibios, no evitó que la mortalidad en juveniles de *L. caerulea* infectados experimentalmente con *Bd* alcanzara el 100% (Berger et al. 2009).

La urgencia de encontrar un tratamiento efectivo, adecuado, y tolerado por todas las especies y los distintos estadios anfibios, ha hecho que recientemente se hayan acometido avances en el estudio de otros fármacos, como por ejemplo la nikomicina Z. Este antibiótico actúa inhibiendo la síntesis de quitina, sustancia fundamental para la estructura y la estabilidad de la pared celular de *Bd* y que por lo tanto, es vital para la supervivencia del hongo. Adicionalmente, la nikomicina Z no tendría ningún efecto pernicioso sobre la producción o la acción de los péptidos antimicrobianos (AMPs). Muy al contrario, se ha demostrado que podría cooperar con las defensas naturales presentes en la piel de los anfibios, al interferir con la síntesis de la pared

## ***Introducción***

celular fúngica y hacer que el hongo pase a ser más susceptible a las propiedades disruptivas de los péptidos (Holden et al. 2014).

El escenario de cambio climático que estamos viviendo hoy en día, trae consigo múltiples consecuencias que afectan de diversas maneras a todos los organismos vivos que habitamos el planeta. Por un lado, las temperaturas han ido en aumento durante las últimas décadas, y siguen incrementándose de forma generalizada por causas que principalmente tienen un origen antropogénico. Este calentamiento global es capaz de provocar cambios significativos en la distribución de las especies, en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas, y en el ritmo al que se producen distintos procesos o ciclos biológicos (Duarte et al. 2012). Por otro lado, el cambio climático ocasionará cambios en la incidencia, transmisión, estacionalidad, y áreas de impacto geográfico de distintas enfermedades infecciosas, sobre todo de aquellas transmitidas por vectores, como la malaria, el dengue, la fiebre amarilla, o la borreliosis, entre otras (McMichael et al. 2006). Y por supuesto, también afectará a las dinámicas infectivas y de transmisión de la quitridiomycosis, al estar ésta y el patógeno fúngico que la produce, enormemente influenciados por la temperatura y las condiciones ambientales (Murray et al. 2013). Por último, el cambio climático es el principal causante del aumento de la variabilidad térmica, de exacerbar la fuerza de fenómenos climáticos como El Niño, y de la aparición cada vez con una mayor frecuencia de eventos climáticos extremos como lluvias torrenciales, inundaciones, largos periodos de sequía o intensas tormentas (McMichael et al. 2006; Rohr & Raffel 2010). Todo esto dibuja un panorama nada halagüeño para la biodiversidad del planeta, los seres vivos en general y los anfibios en particular, ya que algunas de las que previsiblemente serán las regiones más afectadas por el cambio climático, coinciden en muchas ocasiones con zonas en las que los anfibios se enfrentan a otras amenazas como la destrucción de su hábitat o las enfermedades infecciosas y son a su vez, “puntos calientes” en lo que a

diversidad anfibia se refiere (Hof et al. 2011). Los eventos climáticos extremos y la variabilidad térmica, serán los causantes de que múltiples especies del planeta sufran de un estrés térmico al sacar a los organismos fuera de su zona térmica de confort, lo que llevará a un aumento de las tasas de mortalidad (McMichael et al. 2006). Estos cambios bruscos y rápidos pueden hacer también que aquellas especies anfibias que evolutivamente ya habían optimizado su sistema inmune para enfrentarse a patógenos bajo unas condiciones ambientales específicas, vean afectada su capacidad para desplegar una respuesta inmune robusta o adecuada al cambiar dichas condiciones (Fisher et al. 2007). Vemos así como la variabilidad térmica podría afectar a las defensas de los hospedadores ectotérmicos (Rohr & Raffel 2010; Cohen et al. 2020). La hipótesis del desequilibrio térmico (Cohen et al. 2017), se basa en que los rangos fisiológicos térmicos son diferentes entre patógenos y hospedadores. Normalmente los patógenos tienen rangos más amplios, lo que les permite aclimatarse mejor y de una forma más rápida que sus hospedadores a la variabilidad térmica y a las condiciones ambientales cambiantes (Cohen et al. 2020). Nos encontraremos así con que los hospedadores serán más vulnerables a los efectos de los patógenos cuanto más difieran las temperaturas de aquellas a las que están adaptados (Cohen et al. 2017; Neely et al. 2020). Para cualquier organismo además, montar una respuesta inmune eficaz es costoso a nivel energético. Así, las especies de anfibios amenazadas por patógenos como *Bd* y sujetas a unas condiciones ambientales que les exigen optimizar muy bien sus recursos, haciéndoles funcionar habitualmente manteniendo un delicado equilibrio muy cerca de sus límites fisiológicos, como aquellas que habitan en zonas de montaña, pueden encontrarse con que estos cambios bruscos en las condiciones ambientales les fuercen, con el fin de hacer frente al patógeno fúngico, a destinar recursos a su sistema inmune de los que quizá carezcan o, que tengan que detraer de otras funciones orgánicas (Fisher et al. 2009). El hecho de que hospedadores que habitan zonas de montaña sean por lo tanto menos capaces que aquellos que

## **Introducción**

pueblan zonas poco elevadas de hacer frente al mismo tiempo a la infección fúngica y a cambios térmicos, unido a la vulnerabilidad que según la hipótesis del desequilibrio térmico causa la variabilidad térmica en los hospedadores, explicaría en parte el porqué los anfibios de zonas de montaña están más expuestos a los efectos de la quitridiomycosis que otras especies que habitan regiones más bajas (Cohen et al. 2019).

El calentamiento global consecuencia del cambio climático pondrá a prueba la capacidad de adaptación de los organismos. Aquellos organismos que carezcan de la habilidad para adaptarse a los nuevos regímenes térmicos sufrirán un estrés causado por este incremento térmico, lo que podrá provocarles una depresión metabólica, y colocarles en una situación de riesgo con una mayor tendencia a la desaparición (Bernardo & Spotila 2006). Se prevé que este aumento de las temperaturas sea más acusado en zonas de interior de las regiones templadas del planeta (McMichael et al. 2006; Rohr & Raffel 2010). Esto último situaría a los anfibios que habitan zonas de montaña en esas regiones templadas en una posición de susceptibilidad a sufrir brotes de enfermedades infecciosas, y de vulnerabilidad frente a los efectos de patógenos como *Bd*, ya que las temperaturas fluctuarían hacia el rango térmico óptimo del hongo quitridio en el que su tasa de crecimiento y reproducción es mayor y además, es más complicada la adaptación a climas cálidos por parte de animales ya especializados a microclimas fríos que viceversa (Bernardo & Spotila 2006; Pounds et al. 2006; Cohen et al. 2017). La hipótesis de la variabilidad climática postulada recientemente podría corroborar esto último. Según esta hipótesis, mientras que cambios de temperatura que impliquen un tránsito desde temperaturas frías a otras más cálidas aumentarían la sensibilidad anfibia frente a los patógenos, los cambios de temperatura que impliquen pasar desde temperaturas cálidas a otras más frías, harían que esa sensibilidad descendiese. Esto se produciría porque las defensas del hospedador anfibio siempre tardarían más que el hongo quitridio en

aclimatarse y en alcanzar su óptimo (Bradley et al. 2019). Este estudio llevado a cabo con larvas de la rana nortea de patas rojas (*Rana aurora*), y del sapo boreal (*Anaxyrus boreas*) también confirma que, ante la ausencia de cambios térmicos, las temperaturas bajas constantes favorecen tanto el crecimiento de *Bd* como el incremento en la mortalidad que el hongo produce (Bradley et al. 2019).

En definitiva, podemos comprobar como el cambio climático está ya afectando de múltiples formas a todos los seres vivos que habitan el planeta. Su influencia directa sobre hospedadores, patógenos y dinámicas infectivas de las enfermedades, continuará dejándose notar en el futuro y constituye una importante amenaza capaz de ejercer un efecto erosivo sobre la biodiversidad.

## MITIGACIÓN EN EL MEDIO NATURAL

A pesar de los importantes avances que se han hecho en el estudio y tratamiento de la quitridiomycosis, hoy en día carecemos aún de las herramientas adecuadas que nos permitan frenar el avance o mitigar los efectos de la enfermedad en la naturaleza. Se van dando sin embargo pequeños pasos, para intentar encontrar una solución con la que abordar con éxito el manejo sanitario de las poblaciones de anfibios afectadas por el hongo quitridio en condiciones naturales. Algunas de las estrategias que se han puesto en práctica hasta el momento se basan en la translocación o en la cría en cautividad y reintroducción de individuos (Fellers et al. 2007), en la bioaumentación del microbioma presente en la piel de los anfibios con probióticos (Bletz et al. 2013), en el tratamiento con antifúngicos siguiendo la técnica de captura-tratamiento-liberación (Geiger et al. 2017), o en una combinación entre tratamientos antifúngicos y la aplicación de desinfectantes químicos en el medio natural (Bosch et al. 2015). Los resultados sin embargo,

## **Introducción**

no han sido todo lo satisfactorios que cabía esperar, obteniendo en el mejor de los casos un éxito parcial. Esto parece indicar que solamente a través de una combinación de diferentes métodos de mitigación, será posible conseguir el objetivo de alcanzar la erradicación completa y definitiva del patógeno del medio (Garner et al. 2016).

Las condiciones ambientales y los cambios en el hábitat serían dos de los factores que tienen una influencia directa en las dinámicas de la patología, así como también importantes efectos sobre las interacciones hospedador-patógeno. Algo que hace que haya que tomarlos en consideración a la hora de diseñar cualquier estrategia de mitigación de la enfermedad (Daskin et al. 2011; Becker et al. 2012). Como hemos visto, la temperatura del agua tiene un efecto inversamente proporcional en la probabilidad y la intensidad de la infección por *Bd*. Por lo que un método de mitigación de la enfermedad podría ser intentar aumentar la temperatura del agua (Heard et al. 2014). Hay claramente una relación directa y significativa entre las condiciones climáticas locales, y más concretamente entre la temperatura y la aparición o el resultado de la infección (Bosch et al. 2006). Asimismo, un incremento de los regímenes térmicos, favorece el funcionamiento del sistema inmune anfibio al mismo tiempo que dificulta el desarrollo y el crecimiento del hongo quitridio, posibilitando así una reducción en la prevalencia y la intensidad de la infección (Daskin et al. 2011; Forrest & Schlaepfer 2011). Para lograr ese aumento de la temperatura ambiental, algunos autores han propuesto la implementación de medidas en el medio que supongan una modificación del hábitat con la cual poder influir en el desarrollo de la enfermedad (Scheele et al. 2014). Defienden estos autores que la manipulación y modificación del entorno puede ayudar a reducir las tasas y las cargas de infección y por lo tanto, a mejorar la supervivencia del hospedador, sin la necesidad de utilizar desinfectantes químicos en el medio que podrían tener algún tipo de repercusión sobre la flora y la fauna del hábitat en el que se actúe (Scheele et al. 2014). Argumentan que una de las actuaciones sobre el hábitat más plausibles y con mayores

posibilidades de deparar unos buenos resultados, sería la reducción de la densidad del dosel arbóreo para aumentar la insolación, y proporcionar a los anfibios refugios térmicos frente a la enfermedad (Raffel et al. 2010; Puschendorf et al. 2011; Becker et al. 2012; Scheele et al. 2014). Siendo animales ectotérmicos, los anfibios dependen de su entorno para termoregularse. Se ha observado que en situaciones en las que su salud está comprometida, los anfibios permanecen más tiempo soleándose o buscan lugares más expuestos al sol, más cálidos, con el fin de aumentar su temperatura corporal y optimizar así el funcionamiento de sus defensas. Este comportamiento se denomina fiebre comportamental (Richards-Zawacki. 2010; Daskin et al. 2011; Forrest & Schlaepfer 2011; Murphy et al. 2011; Becker et al. 2012; Evans et al. 2015). La fiebre en sí es un mecanismo de defensa que proporciona ciertas ventajas al hospedador frente al patógeno, como estimular el sistema inmune e incrementar la susceptibilidad y la capacidad de detección del patógeno, que ve reducida su facultad de replicación (Evans et al. 2015). De esta manera, al disminuir la densidad del dosel arbóreo, estaríamos facilitando el uso por parte de los anfibios de estos “puntos cálidos”, y estaríamos ayudando a potenciar sus defensas para hacer frente a *Bd*.

Pero sin duda, para encontrar un método de mitigación efectivo, seguro, y con una capacidad de transferencia que permita su aplicación en distintas especies, en diversos hábitats y bajo diferentes condiciones ambientales, es absolutamente necesario entender previamente la manera en la que los diferentes factores afectan a la ecología de la enfermedad y a las dinámicas infectivas del patógeno, conocer los rasgos del ciclo vital de la especie o especies de anfibio con las que se va a trabajar, así como comprender las interacciones que se dan entre estos elementos (Fisher et al. 2012; Scheele et al. 2014). En este sentido, en el caso de las especies del género *Alytes*, habría que tener especialmente en cuenta que su desarrollo larvario puede llegar a ser extremadamente prolongado, lo que convierte a las larvas invernantes de estas

## **Introducción**

especies en amplificadores naturales de la infección al ser capaces de producir, en ocasiones durante años, un elevado número de zoosporas (Briggs et al. 2010; Fisher et al. 2012; Fernández-Beaskoetxea et al. 2016; Hite et al. 2016). Hecho éste, que coloca a estas larvas como objetivo prioritario sobre el que dirigir cualquier acción de mitigación que tenga como fin controlar la diseminación de la quitridiomycosis en estas especies (Garner et al. 2016).

En definitiva, ante el reciente auge de las enfermedades infecciosas de origen fúngico en general, y de la quitridiomycosis en particular, es prioritario el diseño y la implementación sobre el terreno de mecanismos de mitigación. Dentro de las escasas, hasta el momento, estrategias de mitigación que se han puesto en marcha, encontramos dos que se desarrollarán en el presente trabajo, y cuyos resultados podremos ver y analizar. La primera de ellas, consistente en disminuir la densidad poblacional del hospedador y modificar el hábitat para intentar así eliminar al hongo del medio (Capítulo 5). Y la segunda, basada en una combinación de tratamientos antifúngicos de los anfibios junto con la aplicación de desinfectantes en el medio natural (Capítulo 6). Los métodos de mitigación mencionados son un signo de que, aunque lentamente, se van produciendo avances, pero todavía queda mucho por recorrer hasta alcanzar nuestro objetivo y conseguir paliar los devastadores efectos que esta otra pandemia está teniendo en las poblaciones de anfibios de todo el planeta.

A lo largo de los años 1997, 1998 y 1999 se detectaron en el Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama (Madrid-Segovia. España), episodios de mortandad masiva que afectaron a *A. obstetricans*, y que llevaron a su desaparición en más de un 80% de las localizaciones en las que estaba presente dentro del citado Parque Nacional. Se trataba del primer brote de la enfermedad descrito en Europa (Bosch et al. 2001). A lo largo de estos años, se han puesto en marcha diferentes iniciativas para intentar paliar los efectos que *Bd* tiene sobre las poblaciones de *A. obstetricans* tanto de la Sierra de

Guadarrama, como del resto de la península ibérica. Programas de cría en cautividad y reintroducción, análisis acerca de la estructura genética de las poblaciones de sapo partero común y otras, como los trabajos que componen esta tesis doctoral, consistentes en estudiar su respuesta inmune frente al agente patógeno, la eficacia de distintos productos antifúngicos con los que tratar la enfermedad, o la viabilidad de actuaciones de mitigación sobre el terreno.

## **INTRODUCCIÓN: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Andre SE, Parker J, Briggs CJ. (2008). Effect of temperature on host response to *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*). *Journal of Wildlife Diseases*, 44 (3): 716-720.

Barrows M, Koeppel K, Drake G. (2010). The use of F10 as a treatment for bacterial and fungal disease in anurans. In: Proceedings: Association of Reptile and Amphibian Veterinarians, South Padre Island, TX, p: 20-21.

Becker CG, Rodriguez D, Longo AV, Talaba AL, Zamudio KR. (2012). Disease risk in temperate amphibian populations is higher at closed-canopy sites. *PLoS ONE*, 7 (10): e48205. doi: 10.1371/journal.pone.0048205

Berger L, Hyatt AD, Speare R, Longcore JE. (2005)a. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68: 51-63. doi: 10.3354/dao068051

Berger L, Marantelli G, Skerratt LF, Speare R. (2005)b. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68: 47-50.

Berger L, Speare R, Marantelli G, Skerratt LF. (2009). A zoospore inhibition technique to evaluate the activity of antifungal compounds against *Batrachochytrium dendrobatidis* and unsuccessful treatment of experimentally infected green tree frogs (*Litoria caerulea*) by fluconazole and benzalkonium chloride. *Research in Veterinary Science*, 87: 106-110. doi: 10.1016/j.rvsc.2008.11.005

Bernardo J, Spotila JR. (2006). Physiological constraints on organismal response to global warming: mechanistic insights from clinically varying populations and implications for assessing endangerment. *Biology Letters*, 2: 135-139. doi: 10.1098/rsbl.2005.0417

Bienentreu JF, Lesbarrères D. (2020). Amphibian disease ecology: Are we just scratching the surface? *Herpetologica*, 76 (2): 153-166. doi: 10.1655/0018-0831-76.2.153

Bishop PJ, Speare R, Poulter R, Butler M, Speare BJ, Hyatt A, Olsen V, Haigh A. (2009). Elimination of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* by Archey's frog *Leiopelma archeyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84: 9-15. doi: 10.3354/dao02028

Blanco JL, Garcia ME. (2008). Immune response to fungal infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 125: 47-70.

Blaustein AR, Gervasi SS, Johnson PTJ, Hoverman JT, Belden LK, Bradley PW, Xie GY. (2012). *Phil. Trans. R. Soc. B*, 367: 1688-1707. doi: 10.1098/rstb.2012.0011

Bletz MC, Loudon AH, Becker MH, Bell SC, Woodhams DC, Minbiole KPC, Harris RN. (2013). Mitigating amphibian chytridiomycosis with bioaugmentation: characteristics of effective probiotics and strategies for their selection and use. *Ecology Letters*, 16: 807-820. doi: 10.1111/ele.12099

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: 331-337.

Bosch J, Carrascal LM, Durán L, Walker S, Fisher MC. (2006). Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of central Spain; is there a link? *Proc. R. Soc. B*, 274: 253-260. doi: 10.1098/rspb.2006.3713

Bosch J, Sanchez-Tomé E, Fernández-Loras A, Oliver JA, Fisher MC, Garner TWJ. (2015). Successful elimination of a lethal wildlife infectious disease in nature. *Biology Letters*, 11: 20150874. doi: 10.1098/rsbl.2015.0874

## **Introducción**

Bradley PW, Brawner MD, Raffel TR, Rohr JR, Olson DH, Blaustein AR. (2019). Shifts in temperature influence how *Batrachochytrium dendrobatidis* infects amphibian larvae. *PLoS ONE*, 14 (9): e0222237. doi: 10.1371/journal.pone.0222237

Brannelly LA, McCallum HI, Grogan LF, Briggs CJ, Ribas MP, Hollanders M, Sasso T, López MF, Newell DA, Kilpatrick AM. (2020). Mechanisms underlying host persistence following amphibian disease emergence determine appropriate management strategies. *Ecology Letters*, 24 (1): 130-148. doi: 10.1111/ele.13621

Briggs CJ, Knapp RA, Vredenburg VT. (2010). Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 9695-9700. doi: 10.1073/pnas.0912886107

Byrne AQ, Vredenburg VT, Martel A, Pasmans F, Bell RC, Blackburn DC, Bletz MC, Bosch J, Briggs CJ, Brown RM, Catenazzi A, López MF, Figueroa-Valenzuela R, Ghose SL, Jaeger JR, Jani AJ, Jirku M, Knapp RA, Muñoz A, Portik DM, Richards-Zawacki CL, Rockney H, Rovito SM, Stark T, Sulaeman H, Tao NT, Voyles J, Waddle AW, Yuan Z, Rosenblum EB. (2019). Cryptic diversity of a widespread global pathogen reveals expanded threats to amphibian conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 116 (41): 20382-20387. doi: 10.1073/pnas.1908289116

Campbell L, Bower DS, Clulow S, Stockwell M, Clulow J, Mahoney M. (2019). Interaction between temperature and sublethal infection with the amphibian chytrid fungus impacts a susceptible frog species. *Scientific Reports*, 9: 83. doi: 10.1038/s41598-018-35874-7

Castro Monzon F, Rödel MO, Jeschke JM. (2020). Tracking *Batrachochytrium dendrobatidis* infection across the globe. *EcoHealth*, 17: 270-279. doi: 10.1007/s10393-020-01504-w

Cohen JM, Venesky MD, Sauer EL, Civitello DJ, McMahon TA, Roznik EA, Rohr JR. (2017). The thermal mismatch hypothesis explains host susceptibility to an emerging infectious disease. *Ecology Letters*, 20: 184-193. doi: 10.1111/ele.12720

Cohen JM, McMahon TA, Ramsay C, Roznik EA, Sauer EL, Bessier S, Civitello DJ, Delius BK, Halstead N, Knutie SA, Nguyen KH, Ortega N, Sears B, Venesky MD, Young S, Rohr JR. (2019). Impacts of thermal mismatches on chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* prevalence are moderated by life stage, body size, elevation and latitude. *Ecology Letters*, 22: 817-825. doi: 10.1111/ele.13239

Cohen JM, Sauer EL, Santiago O, Spencer S, Rohr JR. (2020). Divergent impacts of warming weather on wildlife disease risk across climates. *Science*, 370 (6519): eabb1702. doi: 10.1126/science.abb1702

Conlon JM, Iwamuro S, King JD. (2009). Dermal cytolytic peptides and the system of the innate immunity in anurans. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology*, 1163: 75-82. doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03618.x

Cooper EL, Wright RK, Klempau AE, Smith CT. (1992). Hibernation alters the frog's immune system. *Cryobiology*, 29: 616-631.

Culp SJ, Beland FA. (1996). Malachite green: a toxicological review. *Journal of the American College of Toxicology*, 15 (3): 219-238.

Daskin JH, Alford RA, Puschendorf R. (2011). Short-term exposure to warm microhabitats could explain amphibian persistence with *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE*, 6 (10): e26215. doi: 10.1371/journal.pone.0026215

Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE, Speare R. (1999). Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases*, 5 (6): 735-748.

Duarte H, Tejedo M, Katzenberger M, Marangoni F, Baldo D, Beltrán JF, Martí DA, Richter-Boix A, Gonzalez-Voyer A. (2012). Can amphibians take a heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities. *Global Change Biology*, 18: 412-421. doi: 10.1111/j.1365-2486.2011.02518.x

## **Introducción**

Du Pasquier L, Schwager J, Flajnik MF. (1989). The immune system of *Xenopus*. *Ann. Rev. Immunol*, 7: 251-275.

El-Mofty MM, Abdelmeguid NE, Sadek IA, Essawy AE, AbdelAleem EA. (2000). Induction of leukaemia in chloramphenicol-treated toads. *La Revue de Santé de la Méditerranée Orientale*, 6: 1026-1034.

Evans SS, Repasky EA, Fisher DT. (2015). Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat. Rev. Immunol*, 15 (6): 335-349. doi: 10.1038/nri3843

Farrer RA, Weinert LA, Bielby J, Garner TWJ, Balloux F, Clare F, Bosch J, Cunningham AA, Weldon C, du Preez LH, Anderson L, Pond SLK, Shahar-Golan R, Henk DA, Fisher MC. (2011). Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108 (46): 18732-18736. doi: 10.1073/pnas.1111915108

Fellers GM, Bradford DF, Pratt D, Wood LL. (2007). Demise of repatriated populations of mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) in the Sierra Nevada of California. *Herpetological Conservation and Biology*, 2 (1): 5-21.

Fernández-Beaskoetxea S, Carrascal LM, Fernández-Loras A, Fisher MC, Bosch J. (2015). Short term minimum water temperatures determine levels of infection by the amphibian chytrid fungus in *Alytes obstetricans* tadpoles. *PLoS ONE*, 10 (3): e0120237. doi: 10.1371/journal.pone.0120237

Fernández-Beaskoetxea S, Bosch J, Bielby J. (2016). Infection and transmission heterogeneity of a multi-host pathogen (*Batrachochytrium dendrobatidis*) within an amphibian community. *Diseases of Aquatic Organisms*, 118: 11-20. doi: 10.3354/dao02963

Fisher MC. (2007). Potential interactions between amphibian immunity, infectious disease and climate change. *Animal Conservation*, 10: 420-421.

Fisher MC, Garner TWJ, Walker SF. (2009). Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time and host. *Annu. Rev. Microbiol*, 63: 291-310.

Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484: 186-194. doi: 10.1038/nature10947

Forrest MJ, Schlaepfer MA. (2011). Nothing a hot bath won't cure: infection rates of amphibian chytrid fungus correlate negatively with water temperature under natural field settings. *PLoS ONE*, 6 (12): e28444. doi: 10.1371/journal.pone.0028444

Forzán MJ, Gunn H, Scott P. (2008). Chytridiomycosis in an aquarium collection of frogs: diagnosis, treatment, and control. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 39 (3): 406-411.

Fu M, Waldman B. (2019). Ancestral chytrid pathogen remains hypervirulent following its long coevolution with amphibian hosts. *Proc. R. Soc. B*, 286: 20190833. doi: 10.1098/rspb.2019.0833

Garner TWJ, Perkins MW, Govindarajulu P, Seglie D, Walker S, Cunningham AA, Fisher MC. (2006). The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters*, 2: 455-459. doi: 10.1098/rsbl.2006.0494

Garner TWJ, Garcia G, Carroll B, Fisher MC. (2009)a. Using itraconazole to treat *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83: 257-260. doi: 10.3354/dao02008

Garner TWJ, Walker S, Bosch J, Leech S, Rowcliffe JM, Cunningham AA, Fisher MC. (2009)b. Life history tradeoffs influence mortality associated with the amphibian pathogen

## **Introducción**

*Batrachochytrium dendrobatidis*. *Oikos*, 118 (5): 783-791. doi: 10.1111/j.1600-0706.2008.17202.x

Garner TWJ, Schmidt BR, Martel A, Pasmans F, Muths E, Cunningham AA, Weldon C, Fisher MC, Bosch J. (2016). Mitigating amphibian chytridiomycoses in nature. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 371: 20160207. doi: 10.1098/rstb.2016.0207

Geiger CC, Bregnard C, Maluenda E, Voordouw MJ, Schmidt BR. (2017). Antifungal treatment of wild amphibian populations caused a transient reduction in the prevalence of the fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Scientific Reports*, 7: 5956. doi: 10.1038/s41598-017-05798-9

Gervasi SS, Hunt EG, Lowry M, Blaustein AR. (2014). Temporal patterns in immunity, infection load and disease susceptibility: understanding the drivers of host responses in the amphibian-chytrid fungus system. *Functional Ecology*, 28: 569-578. doi: 10.1111/1365-2435.12194

Grogan LF, Robert J, Berger L, Skerratt LF, Scheele BC, Castley JG, Newell DA, McCallum HI. (2018). Review of the amphibian immune response to chytridiomycosis, and future directions. *Frontiers in Immunology*, 9: 2536. doi: 10.3389/fimmu.2018.02536

Heard GW, Scrooggie MP, Clemann N, Ramsey DSL. (2014). Wetland characteristics influence disease risk for a threatened amphibian. *Ecological Applications*, 24 (4): 650-662.

Hite JL, Bosch J, Fernández-Beaskoetxea S, Medina D, Hall SR. (2016). Joint effects of habitat, zooplankton, host stage structure and diversity on amphibian chytrid. *Proc. R. Soc. B*, 283: 20160832. doi: 10.1098/rspb.2016.0832

Hof C, Araújo MB, Jetz W, Rahbek C. (2011). Additive threats from pathogens, climate and land-use change for global amphibian diversity. *Nature*, 480: 516-519. doi: 10.1038/nature10650

Holden WM, Ebert AR, Canning PF, Rollins-Smith LA. (2014). Evaluation of amphotericin B and chloramphenicol as alternative drugs for treatment of chytridiomycosis and their impacts on innate skin defenses. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (13): 4034-4041. doi: 10.1128/AEM.04171-13

Holden WM, Fites JS, Reinert LK, Rollins-Smith LA. (2014). Nikkomycin Z is an effective inhibitor of the chytrid fungus linked to global amphibian declines. *Fungal Biology*, 118: 48-60. doi: 10.1016/j.funbio.2013.11.001

Hsu E, Du Pasquier L. (1992). Changes in amphibian antibody repertoire are correlated with metamorphosis and not with age or size. *Developmental Immunology*, 2: 1-6.

Jones MEB, Paddock D, Bender L, Allen JL, Schrenzel MD, Pessier AP. (2012). Treatment of chytridiomycosis with reduced-dose itraconazole. *Diseases of Aquatic Organisms*, 99: 243-249. doi: 10.3354/dao02475

Kilpatrick AM, Briggs CJ, Daszak P. (2010). The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and Evolution*, 25: 109-118.

LaBumbard BC, Shepack A, Catenazzi A. (2020). After the epizootic: Host-pathogen dynamics in montane tropical amphibian communities with high prevalence of chytridiomycosis. *Biotropica*, 52 (6): 1194-1205. doi: 10.1111/btp.12824

Lambertini C, Becker CG, Belasen AM, Valencia-Aguilar A, Nunes-de-Almeida CHL, Betancourt-Román CM, Rodriguez D, Leite DS, Oliveira IS, Gasparini JL, Ruggeri J, Mott T, Jenkinson TS, James TY, Zamudio KR, Toledo LF. (2020). Biotic and abiotic determinants of *Batrachochytrium dendrobatidis* infections in amphibians of the Brazilian Atlantic Forest. *Fungal Ecology*, 49: 100995. doi: 10.1016/j.funeco.2020.100995

Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91 (2): 219-227. doi: 10.1080/00275514.1999.12061011

## Introducción

Loyau A, Cornuau JH, Clare FC, Schmeller DS. (2016). Side effects of itraconazole on post-metamorphic *Alytes obstetricans* after a cold stress. *Amphibia-Reptilia*, 37: 345-357.

Maniero GD, Carey C. (1997). Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold. *J. Comp. Physiol. B*, 167: 256-263.

McMichael AJ, Woodruff RE, Hales S. (2006). Climate change and human health: present and future risks. *Lancet*, 367: 859-869. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68079-3

Murphy PJ, St-Hilaire S, Corn PS. (2011). Temperature, hydric environment, and prior pathogen exposure alter the experimental severity of chytridiomycosis in boreal toads. *Diseases of Aquatic Organisms*, 95: 31-42. doi: 10.3354/dao02336

Murray KA, Skerratt LF, Garland S, Kriticos D, McCallum H. (2013). Whether the weather drives patterns of endemic amphibian chytridiomycosis: a pathogen proliferation approach. *PLoS ONE*, 8 (4): e61061. doi: 10.1371/journal.pone.0061061

Neely WJ, Greenspan SE, Ribeiro LP, Carvalho T, Martins RA, Rodriguez D, Rohr JR, Haddad CFB, Toledo LF, Becker CG. (2020). Synergistic effects of warming and disease linked to high mortality in cool-adapted terrestrial frogs. *Biological Conservation*, 245: 108521. doi: 10.1016/j.biocon.2020.108521

Oficialdegui FJ, Sánchez MI, Monsalve-Carcaño C, Boyero L, Bosch J. (2019). The invasive red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) increases infection of the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *Biological Invasions*, 21: 3221-3231. doi: 10.1007/s10530-019-02041-6

O'Hanlon SJ, Rieux A, Farrer RA, Rosa GM, Waldman B, Bataille A, Kosch TA, Murray KA, Brankovics B, Fumagalli M, Martin MD, Wales N, Alvarado-Rybak M, Bates KA, Berger L, Böll S, Brookes L, Clare F, Courtois EA, Cunningham AA, Doherty-Bone TM, Ghosh P, Gower DJ, Hintz WE, Höglund J, Jenkinson TS, Lin CF, Laurila A, Loyau A, Martel A, Meurling S, Miaud

C, Minting P, Pasmans F, Schmeller DS, Schmidt BR, Shelton JMG, Skerratt LF, Smith F, Soto-Azat C, Spagnoletti M, Tessa G, Toledo LF, Valenzuela-Sánchez A, Verster R, Vörös J, Webb RJ, Wierzbick C, Wombwell E, Zamudio KR, Aanensen DM, James TY, Gilbert MTP, Weldon C, Bosch J, Balloux F, Garner TWJ, Fisher MC. (2018). Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science*, 360 (6389): 621-627. doi: 10.1126/science.aar1965

Parker JM, Mikaelian I, Hahn N, Diggs HE. (2002). Clinical diagnosis and treatment of epidermal chytridiomycosis in African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Comparative Medicine*, 52 (3): 265-268.

Pessier AP, Mendelson III JR. (2010). A manual for control of infectious diseases in amphibian survival assurance colonies and reintroduction programs. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, Minnesota, USA.

Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MPL, Foster PN, La Marca E, Masters KL, Merino-Viteri A, Puschendorf R, Ron SR, Sánchez-Azofeifa GA, Still CJ, Young BE. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439: 161-167. doi: 10.1038/nature04246

Puschendorf R, Hoskin CJ, Cashins SD, McDonald K, Skerratt LF, Vanderwal J, Alford AR. (2011). Environmental refuge from disease-driven amphibian extinction. *Conservation Biology*, 25 (5): 956-964. doi: 10.1111/j.1523-1739.2011.01728.x

Raffel TR, Rohr JR, Kiesecker JM, Hudson PJ. (2006). Negative effects of changing temperature on amphibian immunity under field conditions. *Functional Ecology*, 20: 819-828.

Raffel TR, Michel PJ, Sites EW, Rohr JR. (2010). What drives chytrid infections in newt populations? Associations with substrate, temperature and shade. *EcoHealth*, 7: 526-536. doi: 10.1007/s10393-010-0358-2

Ramsey JP, Reinert LK, Harper LK, Woodhams DC, Rollins-Smith LA. (2010). Immune defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus linked to global amphibian

## **Introducción**

declines, in the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Infection and Immunity*, 78 (9): 3981-3992. doi: 10.1128/IAI.00402-10

Ribas, L, Li MS, Doddington BJ, Robert J, Seidel JA, Kroll JS, Zimmerman LB, Grassly NC, Garner TWJ, Fisher MC. (2009). Expression profiling the temperature-dependent amphibian response to infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PloS ONE*, 4 (12): e8408. doi: 10.1371/journal.pone.0008408

Richards-Zawacki CL. (2010). Thermoregulatory behaviour affects prevalence of chytrid fungal infection in a wild population of Panamanian golden frogs. *Proc. R. Soc. B*, 277: 519-528. doi: 10.1098/rspb.2009.1656

Richmond JQ, Savage AE, Zamudio KR, Rosenblum EB. (2009). Toward immunogenetic studies of amphibian chytridiomycosis: linking innate and acquired immunity. *Bioscience*, 59 (4): 311-320.

Robert J, Ohta Y. (2009). Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus*. *Developmental Dynamics*, 238: 1249-1270.

Rodriguez KM, Voyles J. (2020). The amphibian complement system and chytridiomycosis. *Journal of Experimental Zoology Part A*, 333 (10): 706-719. doi: 10.1002/jez.2419

Rohr JR, Raffel TR. (2010). Linking global climate and temperature variability to widespread amphibian declines putatively caused by disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107 (18): 8269-8274. doi: 10.1073/pnas.0912883107

Rollins-Smith LA. (1998). Metamorphosis and the amphibian immune system. *Immunological Reviews*, 166: 221-230.

Rollins-Smith LA. (2001). Neuroendocrine-Immune system interactions in amphibians: Implications for understanding global amphibian declines. *Immunologic Research*, 23: 273-280.

Rollins-Smith LA, Conlon JM. (2005). Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. *Dev. Comp. Immunol*, 29: 589-598.

Rollins-Smith LA, Ramsey JP, Reinert LK, Woodhams DC, Livo LJ, Carey C. (2009). Immune defenses of *Xenopus laevis* against *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Frontiers in Bioscience*, 1: 68-91.

Rollins-Smith LA, Ramsey JP, Pask JD, Reinert LK, Woodhams DC. (2011). Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: Impacts of changing environments. *Integrative and Comparative Biology*, 51: 552-562. doi: 10.1093/icb/icr095

Rollins-Smith LA. (2020). Global amphibian declines, disease, and the ongoing battle between *Batrachochytrium* fungi and the immune system. *Herpetologica*, 76 (2): 178-188. doi: 10.1655/0018-0831-76.2.178

Scheele BC, Hunter DA, Grogan LF, Berger L, Kolby JE, McFadden MS, Marantelli G, Skerratt LF, Driscoll DA. (2014). Interventions for reducing extinction risk in disease-threatened amphibians. *Conservation Biology*, 28: 1195-1205.

Scheele BC, Pasmans F, Skerratt LF, Berger L, Martel A, Beukema W, Acevedo AA, Burrowes PA, Carvalho T, Catenazzi A, De la Riva I, Fisher MC, Flechas SV, Foster CN, Frías-Álvarez P, Garner TWJ, Gratwicke B, Guayasamin JM, Hirschfeld M, Kolby JE, Kosch TA, La Marca E, Lindenmayer DB, Lips KR, Longo AV, Maneyro R, McDonald CA, Mendelson III J, Palacios-Rodriguez P, Parra-Olea G, Richards-Zawacki CL, Rödel MO, Rovito SM, Soto-Azat C, Toledo LF, Voyles J, Weldon C, Whitfield SM, Wilkinson M, Zamudio KR, Canessa S. (2019). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 363: 1459-1463.

Savage AE, Gratwicke B, Hope K, Bronikowski E, Fleischer RC. (2020). Sustained immune activation is associated with susceptibility to the amphibian chytrid fungus. *Molecular Ecology*, 29 (15): 2889-2903. doi: 10.1111/mec.15533

## **Introducción**

Scholthof KBG. (2007). The disease triangle: pathogens, the environment and society. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 152-156. doi: 10.1038/nrmicro1596

Searle CL, Gervasi SS, Hua J, Hammond JI, Relyea RA, Olson DH, Blaustein AR. (2011). Differential host susceptibility to *Batrachochytrium dendrobatidis*, an emerging amphibian pathogen. *Conservation Biology*, 25 (5): 965-974. doi: 10.1111/j.1523-1739.2011.01708.x

Skerratt L, Berger L, Speare R, Cashins S, McDonald K, Phillott A, Hines H, Kenyon N. (2007). Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth*, 4: 125-134.

Smick KM, Condit PK, Proctor RL, Sutchter V. (1964). Fatal aplastic anemia: An epidemiological study of its relationship to the drug chloramphenicol. *Journal of Chronic Diseases*, 17 (10): 899-914.

Sudova E, Machova J, Svobodova Z, Vesely T. (2007). Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 52: 527-539.

Tobler U, Schmidt BR. (2010). Within-and among-population variation in chytridiomycosis-induced mortality in the toad *Alytes obstetricans*. *PLoS ONE*, 5 (6): e10927. doi: 10.1371/journal.pone.0010927

Venesky MD, Parris MJ, Storfer A. (2009). Impacts of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection on tadpole foraging performance. *EcoHealth*, 6: 565-575. doi: 10.1007/s10393-009-0272-7

Voyles J, Young S, Berger L, Campbell C, Voyles WF, Dinudom A, Cook D, Webb R, Alford RA, Skerratt LF, Speare R. (2009). Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*, 326: 582-585.

Vredenburg VT, Knapp RA, Tunstall TS, Briggs CJ. (2010). Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107 (21): 9689-9694. doi: 10.1073/pnas.0914111107

Walker SF, Bosch J, Gomez V, Cunningham AA, Schmeller DS, Ninyerola M, Henk D, Ginestet C, Arthur CP, Fisher MC. (2010). Factors driving pathogenicity vs prevalence of amphibian panzootic chytridiomycosis in Iberia. *Ecology Letters*, 13: 372-382. doi: 10.1111/j.1461-0248.2009.01434.x

Woodhams DC, Ardipradja K, Alford RA, Marantelli G, Reinert LK, Rollins-Smith LA. (2007). Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. *Animal Conservation*, 10: 409-417. doi: 10.1111/j.1469-1795.2007.00130.x

Wright RK, Cooper EL. (1981). Temperature effects on ectotherm immune responses. *Developmental and Comparative Immunology*, 5 (1): 117-122.

Young S, Speare R, Berger L, Skerratt LF. (2012). Chloramphenicol with fluid and electrolyte therapy cures terminally ill green tree frogs (*Litoria caerulea*) with chytridiomycosis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43 (2): 330-337.



## **OBJETIVOS PRINCIPALES**

## OBJETIVOS PRINCIPALES

La presente tesis doctoral se centra en examinar la respuesta inmune de la que dispone una especie sensible a los efectos del hongo, como es *A. obstetricans*, para hacer frente a la infección. Del mismo modo, entre los objetivos de la presente tesis está el analizar la eficacia de algunos de los tratamientos que se utilizan para tratar la enfermedad en condiciones de cautividad. En este sentido, se expondrán los resultados obtenidos con diferentes tratamientos experimentales basados en el uso de antifúngicos. De igual manera, se detallarán los efectos que un aumento de la temperatura hasta el umbral térmico máximo (CTmax) tolerado por *A. obstetricans* pudiese tener tanto sobre el hospedador, como sobre el patógeno. En la última parte de esta tesis se expondrán y se discutirá acerca de dos intervenciones diferentes, puestas en marcha directamente *in situ*, con el fin de hacer frente a la enfermedad y mitigar sus efectos sobre el terreno.

Expongo a continuación de una manera más concreta cuáles son **los objetivos principales** de la presente tesis doctoral:

1. Analizar las posibles razones que hacen de *A. obstetricans* la especie de anfibio más sensible de Europa a la enfermedad, a través del estudio de la respuesta inmune presentada por este hospedador cuando es infectado experimentalmente con el hongo durante su desarrollo larvario. Intentando determinar así, si hay algún tipo de alteración en el sistema inmune adquirido de *A. obstetricans* que pudiera estar relacionada con el elevado nivel de sensibilidad que presenta esta especie frente al patógeno.
2. Diseñar y desarrollar distintos protocolos de tratamiento experimentales frente a la enfermedad, utilizando diferentes concentraciones de itraconazol bien en

solitario, bien en combinación con otro producto antifúngico llamado metil tiofanato, para tratar larvas de *A. obstetricans* infectadas de forma natural con una cepa hipervirulenta y muy resistente de *Bd*. Evaluar el grado de eficacia de dichos tratamientos determinando su capacidad para limpiar completamente a las larvas de la infección, y si presentan efectos secundarios potencialmente peligrosos.

3. Valorar cómo influye la temperatura en la interacción hospedador-patógeno, midiendo los valores de CTmax alcanzados por larvas y juveniles de *A. obstetricans* infectados y no infectados con *Bd*. Analizar también si la exposición, aunque sea durante un muy breve espacio de tiempo a temperaturas en el límite máximo de tolerancia de la especie, es suficiente para eliminar la presencia del hongo y limpiar al hospedador de la infección.

4. Comprobar si la combinación de una reducción de la densidad poblacional del hospedador (*A. obstetricans*), junto con la implementación *in situ* de distintas estrategias de modificación del hábitat, es suficiente para afectar las dinámicas de la enfermedad en la naturaleza, reducir la carga fúngica en el entorno natural, e incluso eliminar a *Bd* del medio. Comparando al mismo tiempo diferentes estrategias de modificación del hábitat, para ver cuál de ellas obtiene mejores resultados a la hora de reducir la carga y la prevalencia del patógeno en el medio natural.

5. Implementar una estrategia de mitigación de la enfermedad sobre el terreno, consistente en combinar los tratamientos antifúngicos en las larvas con la aplicación de desinfectantes químicos en el medio, y verificar la eficacia de esta combinación a la hora de eliminar la infección por *Bd* de un sistema isleño habitado por un único hospedador anfibio (*A. muletensis*).



## CAPÍTULO 2

LA EXPOSICIÓN TEMPRANA A *Batrachochytrium dendrobatidis* CAUSA UNA PROFUNDA INMUNOSUPRESIÓN EN ANFIBIOS

EARLY EXPOSURE TO *Batrachochytrium dendrobatidis* CAUSES PROFOUND IMMUNOSUPPRESSION IN AMPHIBIANS

Andrés Fernández-Loras<sup>1</sup>, Saioa Fernández-Beaskoetxea<sup>1</sup>, Elena Arriero<sup>2</sup>, Matthew C. Fisher<sup>3</sup>, Jaime Bosch<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC, José Gutiérrez Abascal, 2, 28006 Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Department of Zoology and Physical Anthropology, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College, London W2 1PG, UK.

<sup>4</sup> Centro de Investigación, Seguimiento y Evaluación, Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama, Cta. M-604, Km. 27,6, 28740 Rascafría, Spain.

Fernández-Loras et al. (2017). European Journal of Wildlife Research.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s10344-017-1161-y>



**LA EXPOSICIÓN TEMPRANA A *Batrachochytrium dendrobatidis* CAUSA UNA PROFUNDA INMUNOSUPRESIÓN EN ANFIBIOS**

**RESUMEN**

Los patógenos fúngicos han desarrollado evolutivamente un amplio abanico de estrategias para evadir la respuesta inmune del hospedador. Anfibios de todo el planeta están infectados con el hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), y a pesar de que se ha podido ya documentar la acción de defensas inmunes de tipo innato contra el patógeno, las evidencias de la existencia de una respuesta inmune adquirida son bastante escasas. Se determina en este estudio la respuesta inmune desplegada por el sapo partero común al ser enfrentado a *Bd* durante su fase larvaria. Se describe la función inmunitaria de tipo celular y humoral cuando el anfibio es enfrentado al patógeno durante su desarrollo larvario. Mientras que no se encontraron diferencias significativas entre animales infectados y no infectados respecto a la ratio neutrófilos/linfocitos, la exposición temprana de las larvas a *Bd* disminuyó significativamente los niveles de inmunoglobulinas (IgM e IgY) circulantes en la sangre de los juveniles, una vez que las larvas infectadas completaron la metamorfosis. Estos resultados muestran la capacidad de *Bd* para inmunosuprimir a los anfibios cuando éstos son infectados durante su desarrollo larvario, algo que confiere al patógeno el potencial para remodelar el sistema inmune anfibio durante la metamorfosis.

# **EARLY EXPOSURE TO *Batrachochytrium dendrobatidis* CAUSES PROFOUND IMMUNOSUPPRESSION IN AMPHIBIANS**

## **ABSTRACT**

Fungal pathogens have evolved a broad suite of strategies aiming at evading the host immune response. Amphibians are globally infected by the panzootic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) and, while robust innate immune defences have been characterised, there is little evidence for the existence of effective adaptive immunity. We determine the immune response of the common midwife toad following challenge by *Bd* as larvae. Immune function was described for both the cell-mediated and antibody-mediated immune responses following infectious challenge as larval amphibians. While there were no significant differences in the ratio of neutrophils/lymphocytes between infected and uninfected individuals, early exposure of tadpoles to *Bd* significantly dampened the levels of circulating immunoglobulins (IgM and IgY) in the serum of juveniles after metamorphosis. Our results show that *Bd* immunosuppresses amphibians when infection occurs as larvae with potentially broad effects on the remodelling of immunity during metamorphosis.

## INTRODUCTION

The vertebrate immune system comprises both an innate and an adaptive component that interact with each other to protect organisms against infections. This functional division is found in amphibians which have an immune system similar to that of mammals (Rollins-Smith. 2001; Robert & Ohta 2009). The amphibian innate immune system consists of granulocytic leukocytes, phagocytic cells, natural killer cells, complement proteins, and antimicrobial peptides, and serves as the rapid first line of defence against challenge by pathogens (Robert & Ohta 2009; Rollins-Smith & Woodhams 2012). Conversely, the amphibian adaptive immune system consists of antigen-presenting cells, the major histocompatibility complex (MHC), T- and B-lymphocytes, and immunoglobulins, however is slower in its response to pathogen assault (Robert & Ohta 2009; Rollins-Smith & Woodhams 2012).

An important trait of the amphibian immune system is that it develops in two different phases that are separated by metamorphosis (Rollins-Smith. 1998, 2001). During metamorphosis, amphibian larvae undergo a series of physiological processes, which entail the complete remodelling of their immune system and of all its components (Rollins-Smith. 1998, 2001).

The main organ responsible for the immune changes during amphibian metamorphosis is the hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis that acts by increasing levels of plasma corticosteroids (Rollins-Smith. 1998, 2001; Gervasi & Foufopoulos 2008; Kindermann et al. 2012). This sharp increase in corticosteroid levels, however, results in a transient immune impairment during metamorphosis (Flajnik et al. 1987; Rollins-Smith 1998, 2001). While this is a physiological process, the lymphocyte breakdown and temporary immunosuppression that happens during the metamorphosis climax, leaves amphibians more prone to

infections caused by pathogens such as the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (hereafter, *Bd*) (Rollins-Smith. 2001; Gervasi & Foufopoulos 2008). Infection by *Bd* is also known to directly influence circulating levels of glucocorticoids and may reinforce temporary immunosuppression during metamorphosis. For instance, in some amphibians, levels of corticosteroids are dictated by the intensity of their infection (Kindermann et al. 2012, Gabor et al. 2013), suggesting that infection by *Bd* may indirectly immunosuppress amphibian hosts by stimulating the HPI axis. However, there are very few studies that examine the role of the adaptive (lymphocyte-mediated) components of the immune system on host resistance to *Bd*.

In this study, we determine the immune response of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) following challenge by *Bd* as larvae. Cell-mediated response mounted by *A. obstetricans* tadpoles and juveniles was described through differential white blood cells counts, and the humoral immune response was assessed by measuring circulating levels of immunoglobulins (IgM and IgY) present in the serum of juveniles after being exposed to *Bd* during their larval development.

## **MATERIALS AND METHODS**

Tadpoles were wild caught from infected and non-infected populations of the Provinces of Teruel and Zamora (north and central Spain). *A. obstetricans* is an amphibian species highly susceptible to *Bd* with an extremely long larval stage characterised by high prevalences and fungal loads upon metamorphic climax (Fernández-Beaskoetxea et al. 2015). To determine the leukocyte profiles, tadpoles were raised in captivity until metamorphosis and blood samples were obtained by heart puncture from tadpoles and juveniles prior to terminal anaesthesia. Animals were swabbed immediately after taking blood samples (the oral disc for larvae and

### ***Exposición temprana a Bd causa inmunosupresión en anfibios***

the lower ventral surface and hind-limbs of juveniles) with sterile rayon-tipped swabs (MW100-100; Medical Wire & Equipment Co., Corsham, UK), then DNA was extracted with PrepMan Ultra and quantitative PCR analyses were carried out following Boyle et al. (2004).

Standard blood smears were made on clean microscope slides that were air-dried, fixed with pure alcohol, and stained with the Diff-Quick staining technique. Haematological smears were read under  $\times 40$  magnification using a compound microscope. Cell counts were performed until at least 100 leukocytes were enumerated. White blood cells were identified and the proportion of each cell type was afterwards determined.

To determine humoral immune response to *Bd*, overwintering (OW) and non-overwintering (NOW) tadpoles were captured for performing the following experiment. A subsample of tadpoles ( $n = 20$ ) of every capture session was analysed by quantitative PCR as described before to determine their infection status. NOW tadpoles tested negative for *Bd* even when the whole oral disc was used for DNA extractions. One hundred eighty NOW experimental larvae were singly housed with either one OW *Bd*-negative or one OW *Bd*-positive tadpole (early contact phase). After 50 days, NOW experimental tadpoles were removed and treated with either the antifungal itraconazole (a first generation systemic triazole antifungal drug) at 0.01% for 7 days (Forzán et al. 2008) or with elevated temperature (30 °C) for 10 days (Geiger et al. 2011) (intermediate treatment phase). Finally, every NOW experimental tadpole was rehoused for 50 days with one *Bd*+ or *Bd*- OW tadpole (late contact phase). Not every possible combination of levels across temporal phases was used, resulting in nine different experimental groups with 20 replicates each (Figure 1). OW tadpoles were tested before each contact phase to confirm their infection status.

NOW tadpoles were allowed to complete metamorphosis. Singly housed and surviving animals ( $n = 77$ ) were sampled to obtain blood samples through heart puncture and then euthanized with an overdose of MS222 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Indirect enzyme-linked immunosorbent assays were carried out in order to determine circulating levels of immunoglobulins. *Bd* antigen-coated plates were prepared (96-well; Nunc Maxisorp, Rochester, NY) by adding  $5 \times 10^4$  cells at 50  $\mu\text{L}$ /well as *Bd* zoospores alone or as mixtures of zoospores and sporangia. These cells were fixed by the addition of a fixing solution (amphibian phosphate buffered saline (APBS) + 0.25% glutaraldehyde) then plates centrifuged ( $200 \times g$ ) and stored overnight at 4 °C. Following removal of the fixative, a blocking buffer was added and the plates were stored for 2 hours at 37 °C. Subsequently, the plates were washed with a washing solution (APBS + 0.05% Tween20) and the *A. obstetricans* serum samples diluted 1/1000 in ABT (APBS + 0.5% bovine serum albumin (BSA) + 0.1% Tween20) were added to the wells. *Bd*-specific antibodies were detected using anti*Xenopus* monoclonal antibodies specific for IgM(10A9) and for IgY (11D5), at a concentration of 1/1000, followed by horseradish peroxidase-conjugated goat antimouse antibodies (Invitrogen Corporation, Camarillo, California). The reactions were visualised with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate (Sigma). Reactions were stopped after 60 min by adding 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and plates were read at 450 nm (OD<sub>450</sub>).

We used a general linear model to determine whether there was an association between the ratio of neutrophils/lymphocytes and *Bd* infection load of tadpoles, with mass and Gosner stage included as covariates. Another general linear model was used to look for differences on IgM and IgY levels across groups of tadpoles in the experiment. For this second analysis, three different fixed factors were considered: early contact with *Bd* (yes/no), type of *Bd* treatment (none, itraconazole, elevated temperature), and late contact with *Bd* (yes/no). Days to metamorphosis was included into the model as a covariate to control for any biases related to differences in development rates among animals. Only the interaction

### ***Exposición temprana a Bd causa inmunosupresión en anfibios***

between the first and the third factor was considered because not every level of the *Bd* treatment factor was replicated across the other two factors. For statistical analyses, variables were transformed using Box-Cox or Johnson normalizing transformations, and residuals of general linear models did not deviate from the canonical assumptions.

All animal experiments were conducted in compliance of the Directive 2010/63/EU for the protection of animals used for scientific purposes in facilities of the regional government and under permit of the competent authorities (permits 10/032921.9/12 and 10/071126.9/13, Consejería de Medio Ambiente of Madrid).

## **RESULTS**

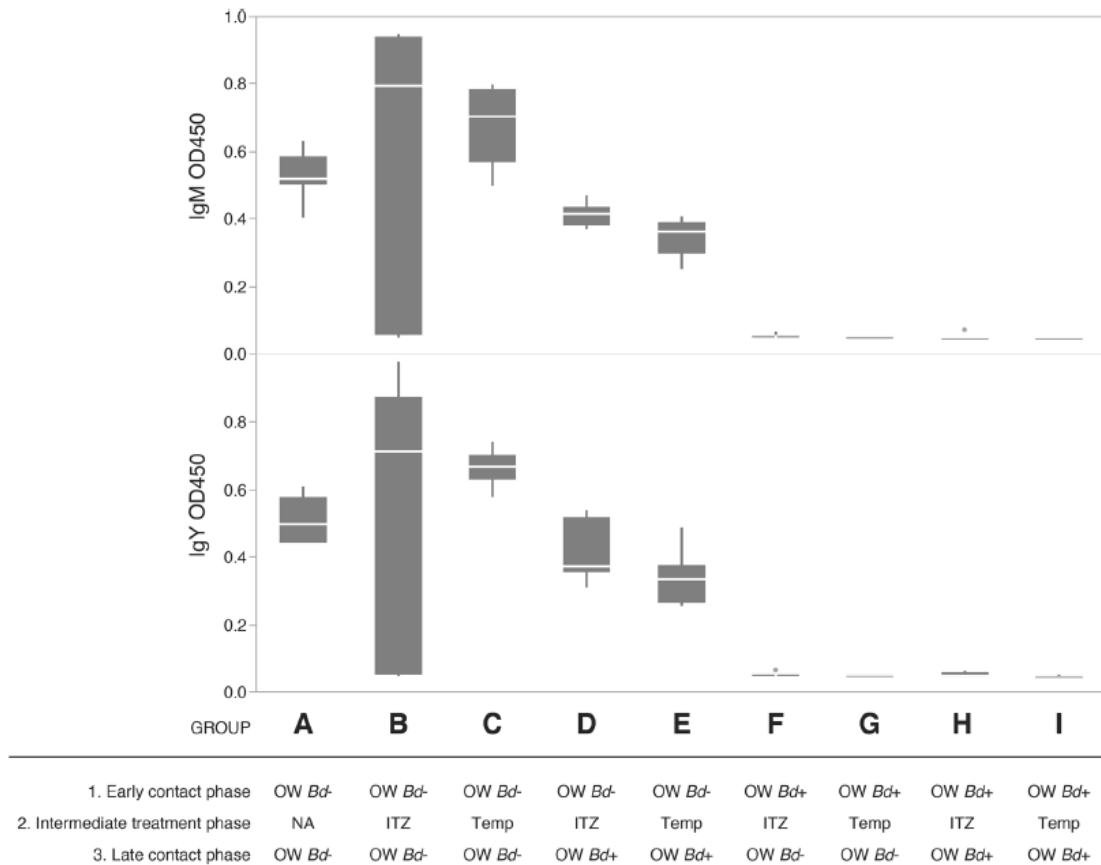
The ratio of neutrophils/lymphocytes was not related to *Bd* infection load in tadpoles after controlling for mass and Gosner stage ( $F_{3,29} = 0.6427$ ,  $p = 0.5945$ ). The infection intensity of tadpoles ranged between 270 and 8690 *Bd* genome equivalents, which is in accordance with values found in previous studies (Fernández-Beaskoetxea et al. 2015). Also, the proportion of monocytes, eosinophils, and basophils were very similar in infected and non-infected animals (Table 1), suggesting that prior infection by *Bd* does not observably impact cell populations that are involved in cell-mediated immunity.

Gosner stage	No.	Neutrophils	Lymphocytes	Monocytes	Eosinophils	Basophils
<i>Bd</i> -infected tadpoles						
26-30	16	23.2	74.8	1.8	0.1	0.1
31-34	6	17.0	79.7	3.3	0.0	0.0
35-40	1	8.0	92.0	0.0	0.0	0.0
41-42	3	17.7	79.3	2.3	0.7	0.0
-	Averaged	20.5	77.1	2.1	0.2	0.1
Non-infected tadpoles						
26-30	3	15.3	82.1	1.3	0.0	1.3
35-40	1	10.0	85.0	0.0	0.0	5.0
-	Averaged	14.0	82.7	1.0	0.0	2.3
Juveniles (non-infected)						
-	15	31.2	64.8	2.5	0.3	1.2

**Table 1.** Average percentages for each cell type in each development group

Levels of IgM did not differ across *Bd* treatments ( $F_{2,70} = 0.905$ ,  $p = 0.409$ ), among animals being in contact or not with *Bd* during the late contact phase of the experiment ( $F_{1,70} = 0.238$ ,  $p = 0.626$ ), nor of the interaction between *Bd* contact during the early and the late phases ( $F_{1,70} = 0.630$ ,  $p = 0.430$ ; Figure 1). On the other hand, there was a strong effect upon levels of IgM following contact with *Bd* during the first contact phase ( $F_{1,70} = 321.67$ ,  $p = 0.0001$ ). Similar results were obtained for IgY, showing a very significant effect of being in contact with *Bd* during the early contact phase of the experiment ( $F_{1,70} = 308.47$ ,  $p = 0.0001$ ).

## Exposición temprana a *Bd* causa inmunosupresión en anfibios



**Figure 1.** Humoral immune response (IgM and IgY OD levels) of experimental larvae on nine different experimental groups (A–I) belonging three consecutive phases. (1) Early contact phase: non overwintering (NOW) experimental larvae being in contact with *Bd*- (groups A–E) or *Bd*+ (groups F–I) overwintering larvae (OW); (2) intermediate treatment phase: NOW experimental larvae were treated with itraconazole (ITZ; groups B, D, F, and H), elevated temperature (temp; groups C, E, G, and I), or not treated (NA; group A); and (3) late contact phase: NOW experimental larvae being in contact again with *Bd*- (groups A–C and F–G) or *Bd*+ (groups D–E, and H–I) OW larvae. Sample size of each experimental group at the end of the experiment was, respectively, 8, 10, 6, 7, 10, 10, 8, 7, and 11.

## DISCUSSION

Our results show that humoral immunity of *Bd*-infected *A. obstetricans* tadpoles was highly affected, with levels of circulating IgM and IgY antibodies

being profoundly downregulated. Further, we found no significant effects on the cell-mediated immunity for leukocyte profiles or the neutrophil/lymphocyte ratio, although the small sample size of non-infected tadpoles ( $n = 4$ ) may compromise the strength of this observation. However, we caution that our work did not take into account the skin microbial community, which many authors have identified as part of the amphibian innate immune system (Harris et al. 2009) and may increase the effectiveness of the innate defences against *Bd* (Woodhams et al. 2007).

*Bd* appears to be capable of inhibiting the normal development of an adaptive immune response, and perhaps even evading the amphibian immune response (Rollins-Smith. 2001; Rosenblum et al. 2009). The work by Ribas et al. (2009) showed a generalised downregulation in spleen markers of adaptive immunity in *Silurana tropicalis* frogs infected with *Bd*, even when housed at host-optimal temperatures (26 °C). The mechanism by which *Bd* evades host immune response may include soluble toxic factors from cell wall components that inhibit lymphocyte proliferation and induce apoptosis, perhaps explaining in part why *Bd* can be lethal to species lacking a robust innate immune defence (Rollins-Smith et al. 2009; Fites et al. 2013). Thus, when it comes to amphibians fighting against challenge by *Bd*, it appears that survival of infected amphibians is more correlated with the host innate immune response rather than being associated with the adaptive immunity (Ribas et al. 2009; Stice & Briggs 2010; Savage et al. 2016).

Studies have attempted to determine how repeated exposures to *Bd* influence survival rates, immunity, or infection intensities. Wood frogs (*Osteopilus septentrionalis*) are able to increase cellular immunity (spleen lymphocytes) after a number of repeated cycles of exposure to *Bd* and clearance of their infection through heat (McMahon et al. 2014). In Shaw et al. (2010), a few individuals of Archey's frog (*Leiopelma archeyi*) showed low *Bd* infection intensities when

### ***Exposición temprana a Bd causa inmunosupresión en anfibios***

reinfected, with some animals eventually clearing their infection. Yet another study showed that boreal toads (*Anaxyrus boreas*) that were previously exposed to *Bd* lived for a longer period of time after reinfection and suffered from a lower infection intensity than *Bd*-naïve individuals (Murphy et al. 2011). Together, these studies may suggest the possible presence of a *Bd*-specific acquired immune response. On the other hand, effects of previous immunisation with heat-killed *Bd* have also been studied in the highly susceptible species *Rana muscosa* (Stice & Briggs 2010). In this case, no significant differences between control and immunised individuals in the infection's proportion, fungal loads, and mortality were observed. Cashins et al. (2013) also showed that prior infection and treatment was ineffective in increasing protective immunity in *Litoria booroolongensis*.

Clearly, these contradicting studies show that the relationship infection by *Bd* and the generation of adaptive immunity are not straightforward, and more research is needed to determine why amphibian species vary in their ability to generate a humoral immune response. Amphibian immunological memory is known to occur (Du Pasquier & Haimovich 1976; Rollins-Smith 1998), but we do not know how this persists through the metamorphic period when combined with an infectious challenge by *Bd*. Many aspects of the immunological response of amphibians when facing *Bd* remain unresolved, and further work on the levels of antibodies expressed by the larval stages, as well as the humoral immune response in adults previously exposed as tadpoles, is needed.

## REFERENCES

Boyle DG, Boyle DB, Olsen V, Morgan JAT, Hyatt AD. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis. Aquat. Org*, 60 (2): 141–148. <https://doi.org/10.3354/daoo60141>

Cashins SD, Grogan LF, McFadden M, Hunter D, Harlow PS, Berger L, Skerratt LS. (2013). Prior infection does not improve survival against the amphibian disease chytridiomycosis. *PLoS ONE*, 8 (2): e56747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056747>

Du Pasquier L, Haimovich J. (1976). The antibody response during amphibian ontogeny. *Immunogenetics*, 3 (1): 381–391. <https://doi.org/10.1007/BF01576969>

Fernández-Beaskoetxea S, Carrascal LM, Fernández-Loras A, Fisher MC, Bosch J. (2015). Short term minimum water temperatures determine levels of infection by the amphibian chytrid fungus in *Alytes obstetricans* tadpoles. *PLoS ONE*, 10 (3): e0120237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120237>

Fites JS, Ramsey JP, Holden WM, Collier SP, Sutherland DM, Reinert LK, Gayek AS, Dermody TS, Aune TM, Oswald-Richter K, Rollins-Smith LA. (2013). The invasive chytrid fungus of amphibians paralyzes lymphocyte responses. *Science*, 342 (6156): 366–369. <https://doi.org/10.1126/science.1243316>

Flajnik MF, Hsu E, Kaufman JF, DuPasquier L. (1987). Changes in the immune system during metamorphosis of *Xenopus*. *Immunol. Today*, 8 (2): 58–64. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(87\)90240-4](https://doi.org/10.1016/0167-5699(87)90240-4)

Forzán MJ, Gunn H, Scott P. (2008). Chytridiomycosis in an aquarium collection of frogs: diagnosis, treatment and control. *J. Zoo Wildl. Med*, 39 (3): 406–411. <https://doi.org/10.1638/2007-0091.1>

## **Exposición temprana a *Bd* causa inmunosupresión en anfibios**

Gabor CR, Fisher MC, Bosch J. (2013). A non-invasive stress assay shows that tadpole populations infected with *Batrachochytrium dendrobatidis* have elevated corticosterone levels. *PLoS ONE*, 8 (2): e56054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056054>

Geiger CC, Küpfer E, Schär S, Wolf S, Schmidt BR. (2011). Elevated temperature clears chytrid fungus infections from tadpoles of the midwife toad, *Alytes obstetricans*. *Amphibia-Reptilia*, 32 (2): 276–280. <https://doi.org/10.1163/017353711X556970>

Gervasi SS, Foufopoulos J. (2008). Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond breeding amphibian. *Funct. Ecol*, 22: 100–108.

Harris RN, Brucker RM, Walke JB, Becker MH, Schwantes CR, Flaherty DC, Lam BA, Woodhams DC, Briggs CJ, Vredenburg VT, Minbiole KPC. (2009). Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. *ISME J*, 3 (7): 818–824. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.27>

Kindermann C, Narayan EJ, Hero JM. (2012). Urinary corticosterone metabolites and chytridiomycosis disease prevalence in a free-living population of male stony creek frogs (*Litoria wilcoxii*). *Comp. Biochem. Physiol. Part. A*, 162 (3): 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.02.018>

McMahon TA, Sears BF, Venesky MD, Bessler SM, Brown JM, Deutsch K, Halstead NT, Lentz G, Tenouri N, Young S, Civitello DJ, Ortega N, Fites JS, Reinert LK, Rollins-Smith LA, Raffel TR, Rohr JR. (2014). Amphibians acquire resistance to live and dead fungus overcoming fungal immunosuppression. *Nature*, 511 (7508): 224–227. <https://doi.org/10.1038/nature13491>

Murphy PJ, St-Hilaire S, Corn PS. (2011). Temperature, hydric environment, and prior pathogen exposure alter the experimental severity of chytridiomycosis in boreal toads. *Dis. Aquat. Org*, 95 (1): 31–42. <https://doi.org/10.3354/daoo2336>

Ribas L, Li M-S, Doddington BJ, Robert J, Seidel JA, Kroll JS, Zimmerman LB, Grassly NC, Garner TWJ, Fisher MC. (2009). Expression profiling the temperature-dependent amphibian response to infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE*, 4 (12): e8408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008408>

Robert J, Ohta Y. (2009). Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus*. *Dev. Dynam*, 238 (6): 1249–1270. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21891>

Rollins-Smith LA. (1998). Metamorphosis and the amphibian immune system. *Immunol. Rev*, 166 (1): 221–230. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1998.tb01265.x>

Rollins-Smith LA. (2001). Neuroendocrine-immune system interactions in amphibians: implications for understanding global amphibian declines. *Immunol. Res*, 23 (2-3): 273–280. <https://doi.org/10.1385/IR:23:2-3:273>

Rollins-Smith LA, Woodhams DC. (2012). Amphibian immunity: staying in tune with the environment. In: Demas GE, Nelson RJ (Eds) *Ecoimmunology*. Oxford University Press, Oxford, pp 92–143.

Rollins-Smith LA, Ramsey JP, Reinert LK, Woodhams DC, Livo LJ, Carey C. (2009). Immune defenses of *Xenopus laevis* against *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Front. Biosci*, 1: 68–91.

Rosenblum EB, Poorten TJ, Settles M, Murdoch GK, Robert J, Maddox N, Eisen MB. (2009). Genome-wide transcriptional response of *Silurana (Xenopus) tropicalis* to infection with the deadly chytrid fungus. *PLoS ONE*, 4 (8): e6494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006494>

Savage AE, Terrell KA, Gratwicke B, Mattheus NM, Augustine L, Fleischer RC. (2016). Reduced immune function predicts disease susceptibility in frogs infected with a deadly fungal pathogen. *Conserv. Physiol*, 4 (1): cow011. <https://doi.org/10.1093/conphys/cow011>

Shaw SD, Bishop PJ, Berger L, Skerratt LF, Garland S, Gleeson DM, Haigh A, Herbert S, Speare R. (2010). Experimental infection of self-cured *Leiopelma archeyi* with the amphibian chytrid

### **Exposición temprana a *Bd* causa inmunosupresión en anfibios**

*Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Org.*, 92 (3): 159–163.  
<https://doi.org/10.3354/dao02227>

Stice MJ, Briggs CJ. (2010). Immunization is ineffective at preventing infection and mortality due to the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *J. Wildl. Dis.*, 46 (1): 70–77.  
<https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.1.70>

Woodhams DC, Vredenburg VT, Simon MA, Billheimer D, Shakhtour B, Shyr Y, Briggs CJ, Rollins-Smith LA, Harris RN. (2007). Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. *Biol. Conserv.*, 138 (3–4): 390–398.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2007.05.004>



## CAPÍTULO 3

EL ITRACONAZOL Y EL METIL TIOFANATO NO CONSIGUEN LIMPIAR LARVAS NATURALMENTE INFECTADAS CON LA CEPA HIPERVIRULENTE DE *Batrachochytrium dendrobatidis*

ITRACONAZOLE AND THIOPHANATE-METHYL FAIL TO CLEAR TADPOLES NATURALLY INFECTED WITH THE HYPERVIRULENT LINEAGE OF *Batrachochytrium dendrobatidis*

Andrés Fernández-Loras<sup>1</sup>, Bárbara Martín-Beyer<sup>1</sup>, Trenton W.J. Garner<sup>2,3</sup>, Jaime Bosch<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC, 28006 Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Institute of Zoology, Zoological Society of London, Regent's Park, London NW1 4RY, UK.

<sup>3</sup> Unit for Environmental Research and Management, North-West University, Potchefstroom 2520, South Africa.

<sup>4</sup> Centro de Investigación, Seguimiento y Evaluación, Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama, 28740 Rascafría, Spain.

Fernández-Loras et al. (2018). Diseases of Aquatic Organisms.

DOI: <https://doi.org/10.3354/dao03282>



**EL ITRACONAZOL Y EL METIL TIOFANATO NO  
CONSIGUEN LIMPIAR LARVAS NATURALMENTE  
INFECTADAS CON LA CEPA HIPERVIRULENTE DE  
*Batrachochytrium dendrobatidis***

**RESUMEN**

La quitridiomycosis, enfermedad infecciosa emergente causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, es una de las mayores responsables de llevar a muchas especies de anfibios al borde de su extinción. Gracias a sustanciales esfuerzos, se han alcanzado éxitos notables en el desarrollo de protocolos terapéuticos basados en el uso de productos antifúngicos. En este estudio se utilizan el itraconazol y el metil tiofanato, tanto individualmente como en combinación, para tratar larvas de sapo partero común (*Alytes obstetricans*) naturalmente infectadas con la cepa hipervirulenta de *B. dendrobatidis*. A pesar del exitoso uso del itraconazol en una especie de anfibio estrechamente relacionada (*Alytes muletensis*), nuestros resultados muestran que estos tratamientos antifúngicos no son siempre efectivos, y que la completa erradicación del patógeno no puede ser asegurada después de su aplicación.

**ITRACONAZOLE AND THIOPHANATE-METHYL FAIL TO  
CLEAR TADPOLES NATURALLY INFECTED WITH THE  
HYPERVIRULENT LINEAGE OF *Batrachochytrium*  
*dendrobatidis***

**ABSTRACT**

The emerging infectious disease chytridiomycosis, caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, is a major driver pushing many amphibian species to the brink of extinction. Substantial efforts to develop effective protocols that use antifungal drugs have had notable success. Here, we used the antifungal agents itraconazole and thiophanate-methyl, singly and in combination, in an attempt to treat common midwife toad (*Alytes obstetricans*) larvae naturally infected with the globalized hypervirulent lineage of *B. dendrobatidis*. Despite the successful use of itraconazole in a closely related species (*A. muletensis*), our results show that these anti-fungal treatments are not always effective and that full clearance of animals cannot be assumed following treatment.

## **INTRODUCTION**

Amphibians are the most threatened and rapidly declining vertebrate class, and the emerging infectious disease chytridiomycosis, caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), is responsible for globally widespread declines (Stuart et al. 2004). The widespread and hypervirulent global panzootic lineage (*Bd*GPL) is responsible for most cases of lethal chytridiomycosis (Farrer et al. 2011).

The link between the international trade in amphibians and transmission of chytridiomycosis has spurred efforts to develop methods for eliminating infections in captive settings, not all of which have involved the use of chemical substances. For example, *in vitro* *Bd* growth trials have illustrated how temperatures above 30°C can kill the cultured pathogen, and *in vivo* trials have extended this to viable infections (Woodhams et al. 2003). Unfortunately, most abiotic environments that are likely to be hostile to *Bd* are also likely to be hostile to the majority of host species and may compromise their health and welfare (Garner et al. 2016).

Parallel efforts to develop treatments for *Bd* infections have examined the efficacy of antifungal drugs already in use by the veterinary community. Successful applications of chloramphenicol and malachite green combined with formalin have been reported (Bishop et al. 2009; Young et al. 2012). However, their potential side effects, risks to human and animal health and legal restrictions likely preclude a more general, international application of these substances (Holden et al. 2014). Benzalkonium chloride (F10<sup>®</sup>) has also been used successfully (Barrows et al. 2010), but other studies have questioned both the efficacy and general applicability of this disinfectant (Berger et al. 2009; de Jong et al. 2018).

Several encouraging studies have focussed on 2 other substances: thiophanate-methyl (TM), predominantly applied environmentally as a pesticide, and itraconazole (ITZ), a common veterinary and medical antifungal. Hanlon et al. (2012) showed that TM cleared infection and increased amphibian growth metrics, suggesting its transferability to other host species and habitat settings. ITZ is a first-generation systemic triazole antifungal drug widely used in zoos and other *ex situ* captive breeding conservation programmes to treat chytridiomycosis. *In vivo* application of weak concentrations of ITZ have been used repeatedly and successfully to clear infections in several species (Forzán et al. 2008; Garner et al. 2009; Tobler & Schmidt 2010; Brannelly et al. 2012; Jones et al. 2012). These results are encouraging, not least because the only successful eradication of *Bd* in the wild to date (Bosch et al. 2015) applied a combination of ITZ and environmental disinfection, while other strategies have not had similar success (Berger et al. 2010; Woodhams et al. 2012; Baitchman & Pessier 2013). However, these findings need to be put into context. While ITZ can be used for short periods of time (7–11 d) on a daily basis (5–10 min baths) and is considered low risk to humans, the commercially available aqueous solution contains hydrochloric acid and is extremely acidic. A recent study has highlighted mortality effects associated with ITZ exposure experienced by toads subsequently subjected to cold stress (Loyau et al. 2016), and others have raised the possibility that ITZ may impair amphibian health (Garner et al. 2009). While no such data for amphibians exist for TM, it is classified as a moderate ecotoxicological risk to fish and invertebrates (pesticide properties database of the University of Hertfordshire).

Here we used different concentrations and durations of ITZ and TM to treat common midwife toad (*Alytes obstetricans*) tadpoles suffering from natural infections with *Bd*GPL. Ours aims were to test survival after the treatments as well as the effectiveness of the antifungals in reducing or completely clearing infections.

## **MATERIALS AND METHODS**

*A. obstetricans* larvae were collected from different locations throughout Spain (Teruel, Zamora, Peñalara Massif and Ibón Acherito) and housed individually in boxes containing 750 ml of water in a temperature-controlled room. Tadpoles were fed twice per week and water was changed every 3 d. Before treatments, oral swabs (MW 100–100, Medical Wire & Equipment) were taken and tadpoles were weighed.

We used different ITZ concentrations (Itrafungol, except for experiment ITZ.3, in which Canadiol was used; both from ESTEVE) in daily baths of 5 or 10 min (Table 1). For TM experiments, we also modified the number of days the treatment was given throughout the different experiments. In ITZ experiments, water was replaced every day after baths, while in TM experiments, water was replaced every 3 d and then the antifungal agent was re-applied. For each antifungal agent, treatments sharing a number code shared the same control group of 20 animals. After 15 d, surviving animals in each treatment group were euthanized with an overdose of tricaine methanesulfonate buffered with NaHCO<sub>3</sub>, and whole tadpoles' mouths were analysed. We used a CFX96 qPCR thermocycler (Bio-Rad) for *Bd* detection and DNA quantification. Each plate included samples, a negative control and 4 different standards ranging from 100 to 0.1 *Bd* genome equivalents in duplicate. Samples were scored as positives when both replicates were  $\geq 0.1$  and the amplification curves had a sigmoidal shape.

When possible, infection loads and prevalence of infection were compared between pre- and post-treatment stages in experimental animals using the Wilcoxon-Mann-Whitney and Pearson tests. We used Fisher's exact tests to test for differences in survival between control and treatment groups. All animal experiments were conducted in compliance with the Directive 2010/63/EU for the

protection of animals used for scientific purposes in facilities of the regional government and with permission from the relevant and competent authorities.

Experimental group ID	Temp.	Antifungal agent (concentration)	Days of treatment (exposure time)	n	Status	Gosner stage	Weight
ITZ.1	18						
ITZ.1A		ITZ (0.0001)	7 (5 min)	18	OW	30–36	na
ITZ.1B		ITZ (0.001)	7 (5 min)	18	OW	30–36	na
ITZ.1C		ITZ (0.01)	7 (5 min)	20	OW	30–36	na
ITZ.2	12.5						
ITZ.2A		ITZ (0.001)	7 (5 min)	15	OW	< 26	0.6
ITZ.2B		ITZ (0.01)	7 (5 min)	15	OW	< 26	0.6
ITZ.3	17						
ITZ.3A		ITZ (0.05)	7 (10 min)	30	NOW	< 26	0.2
ITZ.3B		ITZ (0.05)	7 (10 min)	30	NOW	< 26	0.2
ITZ.4	17	ITZ (0.03)	3 (10 min)	15	NOW	< 26	0.2
ITZ.5	17	ITZ (0.025)	7 (10 min)	15	NOW	< 26	0.2
ITZ.6	17	ITZ (0.025)	3d-3dNO-3d (10 min)	15	NOW	< 26	0.2
ITZ.7	7.7	ITZ (0.1)	7 (5 min)	20	NOW	< 26	0.48
ITZ.8	18.6						
ITZ.8A		ITZ (0.025)	3 (10 min)	40	OW	26–30	1.15
ITZ.8B		ITZ (0.015)	3 (10 min)	40	OW	26–30	1.18
TM.1	18.6	TM (0.6)	9 (9 d)	40	OW	26–30	0.92
TM.2	15.9	TM (1.2)	9 (9 d)	20	OW	26–30	1.59
TM.3	20.7	TM (6)	9 (9 d)	15	OW	26–37	1.66
TM.4	13.5	TM (6)	15 (15 d)	15	OW	26–34	0.95
TM.5	7.2						
TM.5A		TM (9)	15 (15 d)	15	OW	26–34	na
TM.5B		TM (12)	15 (15 d)	15	OW	26–34	na

## ITZ y MT no limpian larvas infectadas con *Bd*

TM-ITZ.1	7.8						
TM-ITZ.1A	TM (6) + ITZ (0.0001)	6dTM + 3d/10minITZ	15	OW	26–32		0.89
TM-ITZ.1B	TM (6) + ITZ (0.002)	7dTM + 7d/10minITZ	15	OW	28–35		1.00

**Table 1.** Average temperature (°C) during the experiments, Antifungal agent concentration (% for ITZ, mg l<sup>-1</sup> for TM), days of treatment and exposure time, number of replicates of experimental groups and overwintering status (NOW: non-overwintering; OW: overwintering), larval developmental (Gosner) stage and average weight (g) of *A. obstetricans* tadpoles for 14 different experiments with itraconazole (ITZ), thiophanate-methyl (TM) and a combination of both (TM + ITZ). ‘3d-3dNO-3d’ means treatment was applied over 3 consecutive days, was stopped for 3 d and resumed for 3 more consecutive days. na: not available.

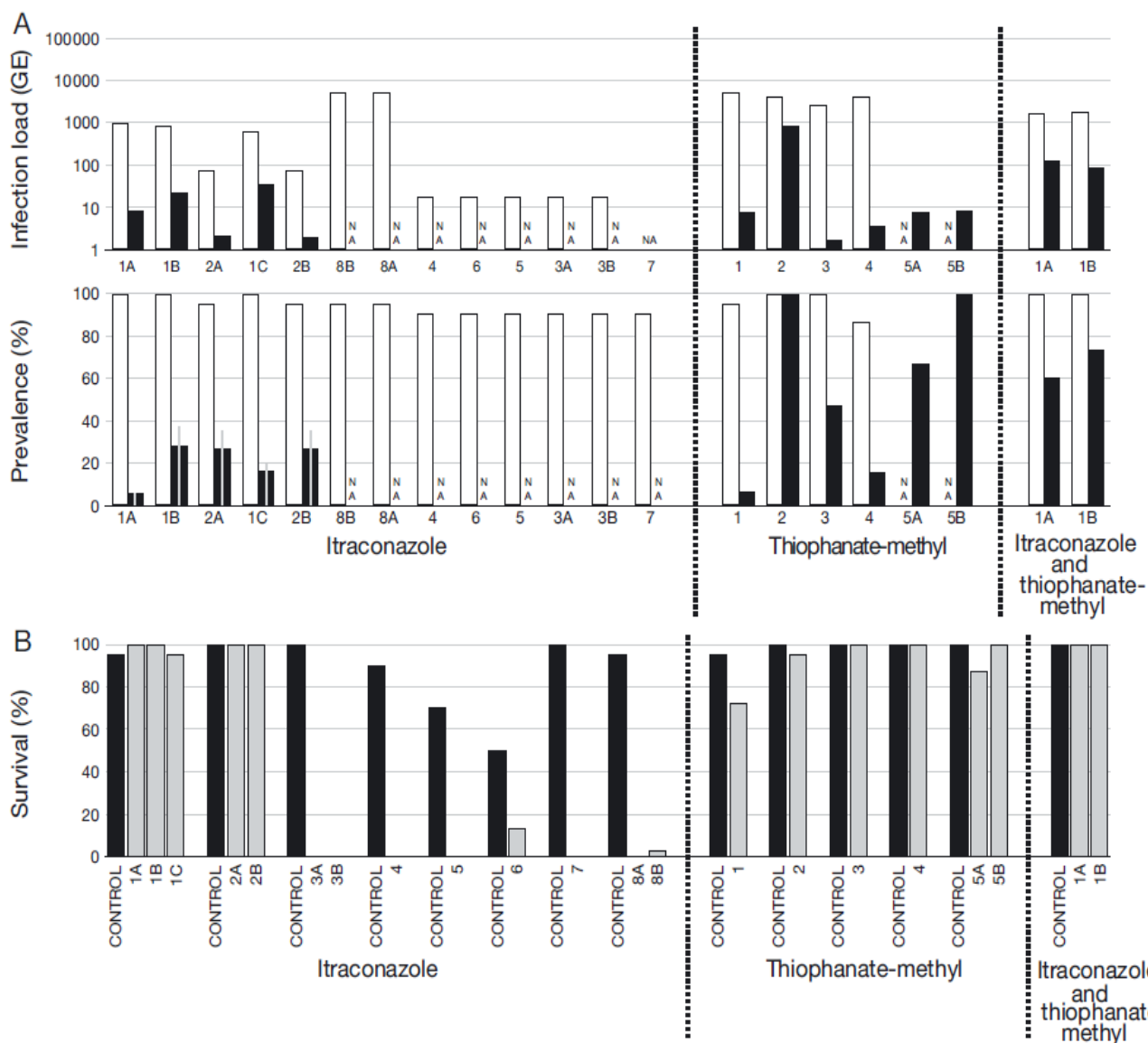
## RESULTS

No ITZ-only treatment achieved complete *Bd*-clearance (Figure 1). High tadpole survival rates were obtained in some, but not all of the experiments (ITZ.1–2), but full clearance combined with high survival was never achieved in any of the ITZ-only experiments (ITZ.1–6). However, statistically significant decreases in prevalence of infection and average infection loads after treatments were detected in several of the ITZ-only treatments (prevalence: ITZ.1A:  $\chi^2 = 32.211$ ,  $p < 0.0001$ ; ITZ.1B:  $\chi^2 = 13.298$ ,  $p = 0.0003$ ; ITZ.1C:  $\chi^2 = 28.558$ ,  $p < 0.0001$ ; ITZ.2A:  $\chi^2 = 9.642$ ,  $p = 0.0019$ ; ITZ.2B:  $\chi^2 = 9.642$ ,  $p = 0.0019$ ; ITZ.8B:  $\chi^2 = 9.975$ ,  $p = 0.0016$ ; infection load: ITZ.1A:  $Z = 5.401$ ,  $p < 0.0001$ ; ITZ.1B:  $Z = 4.516$ ,  $p < 0.0001$ ; ITZ.1C:  $Z = 5.518$ ,  $p < 0.0001$ ; ITZ.2A:  $Z = 3.646$ ,  $p = 0.0003$ ; ITZ.2B:  $Z = 3.677$ ,  $p = 0.0002$ ; ITZ.8B:  $Z = 1.488$ ,  $p = 0.1368$ ). TM on its own also failed to fully clear *Bd* infections. Nonetheless, we detected a statistically significant decrease in prevalence and average infection loads in almost all TM-only treatment trials (prevalence: TM.1:  $\chi^2 = 28.972$ ,  $p < 0.0001$ ; TM.3:  $\chi^2 = 10.909$ ,  $p = 0.0010$ ; TM.4:  $\chi^2 = 14.227$ ,  $p = 0.0002$ ; infection load: TM.1:  $Z = 5.396$ ,  $p < 0.0001$ ; TM.2:  $Z = 4.815$ ,  $p < 0.0001$ ; TM.3:  $Z = 4.690$ ,  $p < 0.001$ ; TM.4:  $Z = 3.787$ ,  $p = 0.0002$ ). Combined treatments reduced infection loads (TM-ITZ.1A:  $Z = 2.595$ ,  $p = 0.0095$ ; TM-

ITZ.1B:  $Z = 2.212$ ,  $p = 0.0269$ ) but without a concurrent reduction in prevalence (TM-ITZ.1A:  $\chi^2 = 1.667$ ,  $p = 0.1967$ ; TM-ITZ.1B:  $\chi^2 = 1.236$ ,  $p = 0.2662$ ).

Survival was inconsistent across experiments. In ITZ experiments where concentrations exceeded 0.01%, we detected significantly increased mortality (experiments ITZ.3-5, ITZ.7-8:  $p < 0.0001$ ; ITZ.6:  $p < 0.05$ ). This was not the case for experiments where we exposed animals to increasing concentrations of TM, although we did detect significantly decreased survival in the experiment involving the weakest solution of TM (TM.1:  $p < 0.05$ ). All significant tests remained significant after Bonferroni sequential correction except TM-ITZ.1B for infection load and ITZ.6 and TM.1 for survival.

**ITZ y MT no limpian larvas infectadas con Bd**



**Figure 1.** (A) Average infection loads (mean  $\pm$  95% by the bias-corrected and accelerated bootstrap interval method with 2000 bootstrap replications) and prevalence (mean  $\pm$  95% Clopper-Pearson CI) before (white columns) and after (black columns) treatments of *A. obstetricans* tadpoles with different concentrations and regimens of itraconazole (8 experiments), thiofanate-methyl (5 experiments) or a combination of both (1 experiment). Experimental groups are arranged according to the antifungal agent concentrations used, in ascending order (see Table 1 for details). (B) Survival (%) of control (black columns) and experimental (grey columns) animals for the same treatment groups. GE: genomic equivalents; na: data not available when there were no surviving animals at the end of the experiment.

## DISCUSSION

This study shows that serial treatments of naturally *Bd*GPL-infected *A. obstetricans* larvae with concentrations of antifungals comparable to those that cleared infections in other species were ineffective. ITZ appeared to be more effective at reducing loads in ITZ-only experiments but not in combined treatments (Figure 1). Further, concentrations of ITZ previously used to comprehensively eliminate infections in a congener were ineffective at achieving clearance in wild-captured common midwife toads (Garner et al. 2009, Bosch et al. 2015). We cannot say why this is so, but failure to clear infections is unlikely related to developmental stage, as a previous study of ITZ using post-metamorphic *A. obstetricans* also failed to achieve comprehensive clearance (Loyau et al. 2016). Irrespective of the antifungal agent and species of *Alytes*, *ex situ* application of antifungals offers transient effects at best in this genus (Geiger et al. 2017), which is mirrored in field trials of ITZ in other species (Hudson et al. 2016). More importantly, while ITZ has sometimes proven to be an effective clinical treatment in captive settings (Forzán et al. 2008, Garner et al. 2009, Tobler & Schmidt 2010, Brannelly et al. 2012, Jones et al. 2012), our study illustrates how efficacy in some cases does not always transfer to others.

The failure of TM and mixed treatments to clear infection further highlights this lack of transferability, although Hanlon et al. (2012) press-applied TM continuously for up to 60 d, at least 4 times longer than our treatments. Increasing the length of application may yield better results than the limited reduction of prevalence and load we observed in our shorter exposure periods (Figure 1).

We did observe a significant effect with increased concentration of ITZ on post-treatment survival, and once concentrations exceeded 0.01%, tadpole survival dropped to zero. The short-term and low concentration impacts we report here likely represent one of the most severe outcomes for the application of ITZ, but we cannot attribute

### ***ITZ y MT no limpian larvas infectadas con Bd***

impacts to the drug, as the commercial solution also contains other potentially hazardous components that increased in concentration along with the ITZ. Furthermore, the impacts may be cumulative rather than direct: exposure to *Bd* can immunosuppress common midwife tadpoles and otherwise compromise their health (Fernández-Loras et al. 2017). These types of costs can result in increased mortality in their own right, and may very well increase the likelihood of mortality associated with exposure to any further stressor like treatment with an antifungal or exposure to an acidic solution. Whatever the mechanism behind the effect on survival, our results do indicate that application of ITZ solutions exceeding 0.01% should be avoided for treatment of *Bd* infections in larval amphibians.

Our study adds to the growing literature examining field and captive applications of chemical treatments to control the impacts of *Bd* in amphibians (e.g. Martel et al. 2011). Unfortunately, our findings do more to illustrate the limitations of these approaches rather than provide more tools that can be applied toward mitigation of chytridiomycosis. While this message appears to be anything but optimistic, it does draw much needed attention to the fact that any approach developed for combating chytridiomycosis is unlikely to be widely transferable across amphibian species, and possibly across populations of the same species (Garner et al. 2016). Unfortunately, research on approaches for controlling the disease lags far behind the efforts to understand the ecology and evolution of the pathogen and how it interacts with hosts. This has to change.

## REFERENCES

- Baitchman EJ, Pessier AP. (2013). Pathogenesis, diagnosis, and treatment of amphibian chytridiomycosis. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 16: 669–685.
- Barrows M, Koepfel K, Drake G. (2010). The use of F10 as a treatment for bacterial and fungal disease in anurans. In: Proceedings: Association of Reptile and Amphibian Veterinarians, South Padre Island, TX, p: 20–21.
- Berger L, Speare R, Marantelli G, Skerratt LF. (2009). A zoospore inhibition technique to evaluate the activity of antifungal compounds against *Batrachochytrium dendrobatidis* and unsuccessful treatment of experimentally infected green tree frogs (*Litoria caerulea*) by fluconazole and benzalkonium chloride. *Res. Vet. Sci.* 87: 106–110.
- Berger L, Speare R, Pessier A, Voyles J, Skerratt LF. (2010). Treatment of chytridiomycosis requires urgent clinical trials. *Dis. Aquat. Org.* 92: 165–174.
- Bishop PJ, Speare R, Poulter R, Butler M, Speare BJ, Hyatt A, Olsen V, Haigh A. (2009). Elimination of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* by Archey's frog *Leiopelma archeyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84: 9-15.
- Bosch J, Sanchez-Tomé E, Fernández-Loras A, Oliver JA, Fisher MC, Garner TW. (2015). Successful elimination of a lethal wildlife infectious disease in nature. *Biol. Lett.* 11: 20150874.
- Brannelly LA, Richards-Zawacki CL, Pessier AP. (2012). Clinical trials with itraconazole as a treatment for chytrid fungal infections in amphibians. *Dis. Aquat. Org.* 101: 95–104.
- de Jong MS, van Dyk R, Weldon C. (2018). Antifungal efficacy of F10SC veterinary disinfectant against *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Med. Mycol.* 56: 60–68.

## **ITZ y MT no limpian larvas infectadas con Bd**

Farrer RA, Weinert LA, Bielby J, Garner TWJ, Balloux F, Clare F, Bosch J, Cunningham AA, Weldon C, du Preez LH, Anderson L, Pond SLK, Shahar-Golan R, Henk DA, Fisher MC. (2011). Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108 (46): 18732-18736.

Fernández-Loras A, Fernández-Beaskoetxea S, Arriero E, Fisher MC, Bosch J. (2017). Early exposure to *Batrachochytrium dendrobatidis* causes profound immunosuppression in amphibians. *Eur. J. Wildl. Res*, 63 (6): 99. doi: 10.1007/s10344-017-1161-y

Forzán MJ, Gunn H, Scott P. (2008). Chytridiomycosis in an aquarium collection of frogs: diagnosis, treatment and control. *J. Zoo Wildl. Med*, 39: 406–411.

Garner TWJ, Garcia G, Carroll B, Fisher MC. (2009). Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Dis. Aquat. Org*, 83: 257–260.

Garner TWJ, Schmidt BR, Martel A, Pasmans F, Muths E, Cunningham AA, Weldon C, Fisher MC, Bosch J. (2016). Mitigating amphibian chytridiomycoses in nature. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 371: 20160207.

Geiger CC, Bregnard C, Maluenda E, Voordouw MJ, Schmidt BR. (2017). Antifungal treatment of wild amphibian populations caused a transient reduction in the prevalence of the fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Sci. Rep*, 7: 5956.

Hanlon SM, Kerby JL, Parris MJ. (2012). Unlikely remedy: fungicide clears infection from pathogenic fungus in larval southern leopard frogs (*Lithobates sphenoccephalus*). *PLoS ONE*, 7: e43573.

Holden WM, Ebert AR, Canning PF, Rollins-Smith LA. (2014). Evaluation of amphotericin B and chloramphenicol as alternative drugs for treatment of chytridiomycosis and their impacts on innate skin defenses. *Appl. Environ. Microbiol*, 80: 4034–4041.

Hudson MA, Young RP, Lopez J, Martin L, Fenton C, McCrea R, Griffiths RA, Adams SL, Gray G, Garcia G, Cunningham AA. (2016). In-situ itraconazole treatment improves survival rate during an amphibian chytridiomycosis epidemic. *Biol. Cons*, 195: 37-45.

Jones MEB, Paddock D, Bender L, Allen JL, Schrenzel MD, Pessier AP. (2012). Treatment of chytridiomycosis with reduced-dose itraconazole. *Dis. Aquat. Org*, 99: 243-249.

Loyau A, Cornuau JH, Clare FC, Schmeller DS. (2016). Side effects of itraconazole on post-metamorphic *Alytes obstetricans* after a cold stress. *Amphibia-Reptilia*, 37: 345-357.

Martel A, Van Rooij P, Vercauteren G, Baert K, Van Waeyenberghe L, Debacker P, Garner TWJ, Woeltjes T, Ducatelle R, Haesebrouck F, Pasmans F. (2011). Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Medical Mycology*, 49: 143-149.

Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues AS, Fischman DL, Waller RW. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306: 1783-1786.

Tobler U, Schmidt BR. (2010). Within- and among-population variation in chytridiomycosis-induced mortality in the toad *Alytes obstetricans*. *PLoS ONE*, 5: e10927.

Woodhams DC, Alford RA, Marantelli G. (2003). Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Dis. Aquat. Org*, 55: 65-67.

Woodhams DC, Geiger CC, Reinert LK, Rollins-Smith LA, Lam B, Harris RN, Briggs CJ, Vredenburg VT, Voyles J. (2012). Treatment of amphibians infected with chytrid fungus: learning from failed trials with itraconazole, antimicrobial peptides, bacteria, and heat therapy. *Dis. Aquat. Org*, 98: 11-25.

Young S, Speare R, Berger L, Skerratt LF. (2012). Chloramphenicol with fluid and electrolyte therapy cures terminally ill green tree frogs (*Litoria caerulea*) with chytridiomycosis. *J. Zoo Wildl. Med*, 43: 330-337.



## CAPÍTULO 4

LA INFECCIÓN POR *Batrachochytrium dendrobatidis* DISMINUYE LA TOLERANCIA TÉRMICA DE LOS HOSPEDADORES LARVARIOS, Y NO PUEDE SER ELIMINADA CON UNA BREVE EXPOSICIÓN AL  $CT_{MAX}$

INFECTION WITH *Batrachochytrium dendrobatidis* LOWERS HEAT TOLERANCE OF TADPOLE HOSTS AND CANNOT BE CLEARED BY BRIEF EXPOSURE TO  $CT_{MAX}$

Andrés Fernández-Loras<sup>1</sup>, Luz Boyero<sup>2,3</sup>, Francisco Correa-Araneda<sup>4,5</sup>, Miguel Tejedo<sup>6</sup>, Attila Hettyey<sup>7,8</sup>, Jaime Bosch<sup>1,9,10</sup>

<sup>1</sup> Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC, Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Department of Plant Biology and Ecology, Faculty of Science and Technology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Leioa, Spain.

<sup>3</sup> IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain.

<sup>4</sup> Unidad de Cambio Climático y Medio Ambiente, Instituto de Estudios del Hábitat (IEH), Universidad Autónoma de Chile, Temuco, Chile.

<sup>5</sup> Núcleo del Estudio en Ciencias Ambientales (NEA) y Departamento de Ciencias Ambientales, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile.

<sup>6</sup> Department of Evolutionary Ecology, Estación Biológica de Doñana-CSIC, Américo Vespucio s/n, Sevilla, Spain.

<sup>7</sup> Lendület Evolutionary Ecology Research Group, Plant Protection Institute, Centre for Agricultural Research, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary.

<sup>8</sup> Department of Ecology, Institute for Biology, University of Veterinary Medicine, Budapest, Hungary.

<sup>9</sup> Centro de Investigación, Seguimiento y Evaluación, Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama, Rascafría. Spain.

<sup>10</sup> Research Unit of Biodiversity (CSIC, UO, PA), Oviedo University-Campus Mieres, Spain.

Fernández-Loras et al. (2019). PLoS ONE.

DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216090>



**LA INFECCIÓN POR *Batrachochytrium dendrobatidis*  
DISMINUYE LA TOLERANCIA TÉRMICA DE LOS  
HOSPEDADORES LARVARIOS, Y NO PUEDE SER  
ELIMINADA CON UNA BREVE EXPOSICIÓN AL CT<sub>MAX</sub>**

**RESUMEN**

El cambio climático y la enfermedad infecciosa producida por el hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) están llevando a la extinción de los anfibios, pero las interacciones existentes entre estos dos factores todavía no se entienden en su totalidad. Se sabe que la temperatura tiene influencia sobre (1) la infectividad, patogenicidad y virulencia de *Bd*; (2) las dinámicas hospedador-patógeno, especialmente cuando ambos son organismos ectotérmicos que comparten o no, las mismas sensibilidades térmicas y (3), la vulnerabilidad anfibia frente a la extinción dependiente de una tolerancia térmica que puede disminuir con la infección. De esta manera, en un escenario de calentamiento global, con aumento de las temperaturas y eventos climáticos extremos más frecuentes, podría esperarse que los anfibios infectados por *Bd* estuviesen sujetos a una mayor vulnerabilidad conforme las temperaturas se acerquen a su umbral térmico máximo (CT<sub>max</sub>). Sin embargo, es también posible que las altas temperaturas ayuden a los anfibios a eliminar la infección, favoreciendo así su supervivencia. Comprobamos la verosimilitud de estas hipótesis, midiendo los valores de CT<sub>max</sub> tanto en larvas infectadas y no infectadas por *Bd*, como en juveniles del sapo partero común (*Alytes obstetricans*), y analizando también si la exposición a temperaturas dentro de ese CT<sub>max</sub> es capaz de limpiar a los anfibios de la infección. Se demuestra que (1) *Bd* tiene un amplio rango de tolerancia termal;

(2) *Bd* es capaz de alterar la fisiología térmica de *A. obstetricans*, que depende del estadio en el que éste se encuentre, disminuyendo los valores de CTmax en larvas aunque no en juveniles y (3), la infección por *Bd* no puede ser eliminada sometiendo a las larvas o juveniles a su umbral térmico máximo (CTmax). El escenario actual de cambio climático y aumento generalizado de las temperaturas, los efectos de la infección fúngica pueden acabar por desnivelar la balanza y llevar a unas comunidades anfibias, ya de por sí amenazadas, a su extinción.

**INFECTION WITH *Batrachochytrium dendrobatidis*  
LOWERS HEAT TOLERANCE OF TADPOLE HOSTS AND  
CANNOT BE CLEARED BY BRIEF EXPOSURE TO CT<sub>MAX</sub>**

**ABSTRACT**

Climate change and infectious disease by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) are major drivers of amphibian extinctions, but the potential interactions of these two factors are not fully understood. Temperature is known to influence (1) the infectivity, pathogenicity and virulence of *Bd*; (2) host-parasite dynamics, especially when both hosts and parasites are ectothermic organisms exhibiting thermal sensitivities that may or may not differ; and (3) amphibian vulnerability to extinction depending on their heat tolerance, which may decrease with infection. Thus, in a global warming scenario, with rising temperatures and more frequent and extreme weather events, amphibians infected by *Bd* could be expected to be more vulnerable if temperatures approach their critical thermal maximum (CT<sub>max</sub>). However, it is also possible that predicted high temperatures could clear the *Bd* infection, thus enhancing amphibian survival. We tested these hypotheses by measuring CT<sub>max</sub> values of *Bd*-infected and *Bd*-free aquatic tadpoles and terrestrial toadlets/juveniles of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) and examining whether exposure of *A. obstetricans* individuals to peak temperatures reaching their CT<sub>max</sub> clears them from *Bd* infection. We show that (1) *Bd* has a wide thermal tolerance range; (2) *Bd* is capable of altering the thermal physiology of *A. obstetricans*, which is stage-dependent, lowering CT<sub>max</sub> in tadpoles but not in toadlets; and (3) *Bd* infection is not cleared after exposure of tadpoles or toadlets to CT<sub>max</sub>. Living under climatic change with rising

temperatures, the effect of *Bd* infection might tip the balance and lead some already threatened amphibian communities towards extinction.

## INTRODUCTION

*Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), a pathogenic chytrid fungus causing chytridiomycosis in many amphibians, is considered the most deadly invasive species on the planet (Rohr et al. 2008) and a main driver behind amphibian species extinctions globally (Stuart et al. 2004; Kilpatrick et al. 2010), with profound effects on communities and ecosystems (Fisher et al. 2009). Environmental conditions can have a large influence on *Bd* host-parasite dynamics (Altizer et al. 2006; Forrest & Schlaepfer 2011), temperature being a major factor influencing its prevalence (i.e., the proportion of infected animals) and virulence (Woodhams et al. 2008). Growth and reproductive characteristics of *Bd* are known to highly depend on temperature (Piotrowski et al. 2004; Stevenson et al. 2013; Cohen et al. 2017), and there is a negative correlation between temperature and *Bd* prevalence or pathogen load, chytrid infections often being more severe in winter or in colder areas (Forrest & Schlaepfer 2011; Fernández-Beaskoetxea et al. 2015; Sonn et al. 2017).

Temperature can influence amphibian population dynamics through its effects on physiology of both the host and the fungal pathogen (Doddington et al. 2013). Amphibians being ectothermic, their immune system and its responses against pathogens are influenced by environmental temperature (Lin & Rowlands 1973; Wright & Cooper 1981; Maniero & Carey 1997; Raffel et al. 2006). Fever, a crucial response to infection that has evolved both in endotherms and ectotherms, can confer a survival advantage upon infection by stimulating the immune system (Evans et al. 2015). Infected ectotherms have been shown to raise their body temperature by seeking warmer sites and spending more time in those sites than uninfected individuals, a phenomenon called behavioral fever (Kluger. 1977; Sherman. 2008; Rakus et al. 2017). Also, several studies have reported on the

utility of using elevated temperatures as a method of *Bd* elimination (Woodhams et al. 2003; Chatfield & Richards-Zawacki 2011; Geiger et al. 2011).

The recently proposed thermal mismatch hypothesis suggests that infection risk will decrease as the difference in thermal tolerance of host and pathogen (tolerance mismatch) increases (Nowakowski et al. 2016). A refinement of the hypothesis suggests that infectious disease outbreaks are most likely to occur at temperatures where the performance gap between pathogen and host is greatest in favor of the pathogen (Cohen et al. 2017). Because parasites are thermal generalists, which often have broader thermal performance breadths than their hosts, and assuming that both hosts and parasites are locally adapted to climatic conditions in their ranges, this hypothesis posits that hosts adapted to cooler climates should be especially susceptible to disease under unusually warm conditions, whereas warm adapted hosts are more prone to infection under cooler conditions (Figure 1 in Cohen et al. 2017).

Extreme weather events have increased in intensity, frequency and unpredictability (Coumou & Rahmstorf 2012; Field et al. 2012; Du et al. 2013; Stocker et al. 2013; Loikith & Broccoli 2014), and temperature extremes have undergone systematic and significant changes over the last decades (Alexander et al. 2006). These forms of global climate change are predicted to be more severe at higher latitudes and altitudes and over land, where they are especially likely to cause a series of malign effects, including thermal stress in many species (McMichael et al. 2006) and an increase in the frequency of infectious disease outbreaks (Cohen et al. 2017), leading to profound changes in ecosystem structure and function (Smith. 2011), and ultimately threatening the integrity of ecosystems (García et al. 2018). Ectotherms are considered especially vulnerable to climate change due to the direct dependence of their fitness on temperature (Hoffmann. 2010; Somero. 2010), and because new daily, seasonal, or intermittent

### ***Infección por Bd disminuye tolerancia térmica en larvas***

temperature cycles will most likely be shifted away from their optimum and closer to lethal extremes (Bernardo & Spotila 2006; Fisher 2007).

Estimating potential risks of species and populations posed by climate change includes the assessment of the heat tolerance, such as the critical thermal maximum (CT<sub>max</sub>). CT<sub>max</sub> is usually quantified under controlled conditions using the Hutchison's dynamic method, (Luttershmidt & Hutchison 1997) in which organisms are exposed to a constant heating rate until an end-point is attained. This end-point represents the upper limit of the ability of animals to counterbalance temperature increase and marks the loss of homeostasis. According to Huey et al. (2012), vulnerability of a species to rising environmental temperature depends on several factors including the species' sensitivity to temperature change, its capacity to adapt to such change, its resilience, and its exposure level. Some studies have proposed that tropical ectotherms will be more susceptible to warming-induced extinctions than their temperate counterparts, since their CT<sub>max</sub> is only slightly higher than the highest ambient temperatures they already experience, which leaves these species with an extremely low warming tolerance (Duarte et al. 2012; Huey et al. 2012). Importantly, infection with *Bd* may result in reduced CT<sub>max</sub>, as shown for the tropical anuran *Litoria spenceri* at the adult stage (Greenspan et al. 2017). Previous studies indicated that *Bd* infection correlates with cooler temperatures in the field (Fernández-Beaskoetxea et al. 2015), and laboratory experiments have demonstrated that *Bd* ceases growth at temperatures above 28°C (Piotrowski et al. 2004). Then, the predicted increase in temperatures may indirectly determine a protection of amphibians from *Bd* and an experimental heating of hosts may clear themselves of the pathogen.

Within this context, we conducted a thermal ramping experiment (Terblanche et al. 2007) in both aquatic tadpoles and recently metamorphosed, terrestrial toadlets of two contrasting altitude populations of *Alytes obstetricans*,

an anuran species from temperate Europe which has been hit hard by chytridiomycosis (Bosch et al. 2001; Walker et al. 2010). Our goals were (1) to determine if gradually and briefly elevating environmental temperature close to the CT<sub>max</sub> of individuals can be used to clear *Bd* infection from both host stages—an experimental heating procedure similar to heating pulses employed to trigger cleaning *Bd* from amphibian hosts (Greenspan et al. 2017)—and (2) to assess whether infection with *Bd* lowers upper thermal tolerance limits of tadpoles or toadlets in this species (as suggested by Greenspan et al. 2017).

## MATERIALS AND METHODS

We collected a total of 121 *A. obstetricans* specimens, both larval (80) and recently metamorphosed, toadlets (41) from two localities: Toro, at mid-altitude population (Zamora, Central Spain, geographic coordinates: 41.37 N, 5.44 W; altitude: 740 m above sea level; 80 tadpoles and 21 toadlets collected) and Acherito, a montane population (Huesca, Northern Spain, geographic coordinates: 42.88 N, 0.71 W; altitude: 1875 m above sea level; 18 tadpoles and 20 toadlets collected). Prevalence of *Bd* infection in larval stages is known to approach 100% during colder months at both localities (Walker et al. 2010; Fernández-Beaskoetxea et al. 2015). Animals were collected in November 2012 and May 2013 at Toro and in August 2013 at Acherito.

Prior to the heating experiment, we assessed the developmental stage of tadpoles and measured body mass of tadpoles and toadlets. Tadpoles originating from Toro were between developmental stage 26 and 37 (Gosner. 1960) and weighed  $1.05 \pm 0.03$  g (mean  $\pm$  SE), while those originating from Acherito were between stage 34 and 40 and weighed  $1.56 \pm 0.07$  g. Toadlets collected from Toro weighed  $0.65 \pm 0.03$  g and those collected from Acherito weighed  $1.96 \pm 0.07$  g. We acclimated animals for 2 days in 1-L individual containers at 18°C and a

### ***Infección por *Bd* disminuye tolerancia térmica en larvas***

light:dark cycle of 12:12. Containers were filled with dechlorinated tap water in the case of tadpoles, while containers with toadlets were lined with sterilized paper towels moistened with dechlorinated tap water. Every 72 hours we changed water and replaced the wet paper towels, and subsequently fed tadpoles and toadlets ad libitum with commercial food for amphibian tadpoles or with baby crickets, respectively.

In order to determine the CTmax (°C) of tadpoles and toadlets, we individually placed animals within a new plastic container and subjected them to a thermostated bath (HUBER K15-cc-NR). Initial temperature was 20°C in the case of tadpoles and 19.8°C for toadlets. Following Hutchinson's dynamic method for determination of CTmax (Hutchinson. 1961), we increased water temperature at a constant rate of 0.8°C min<sup>-1</sup> and observed tadpoles and toadlets continuously until they reached the endpoint. We defined the endpoint as the point at which tested individuals become motionless and fail to respond to external stimuli by prodding 10 consecutive hits applied each 2 s with a wooden stick (Gutiérrez-Pesquera et al. 2016). We established a humane endpoint when animals did not recover motion after 30 min of reaching their CTmax. If so, animals should be euthanized with an overdose of tricaine methanesulfonate (MS222, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) buffered with NaHCO<sub>3</sub> (no animal reached the humane endpoint criteria). Twenty tadpoles and five toadlets were assigned to the control groups and were subjected to the bath but not to heating.

In order to examine whether heating to CTmax of the host promotes a cleaning of *Bd* infection, immediately before assays, the keratinized mouthparts of tadpoles and the lower ventral surface and hind limbs of toadlets were swabbed using sterile cotton-tipped swabs (MW100-100; Medical Wire & Equipment Co, Corsham, UK). After heating experiments, tadpoles and toadlets were individually kept for an additional 15-day period in new 1-L containers with dechlorinated tap

water or sterilized moistened paper lining, respectively, to allow enough time for *Bd* DNA from dead chytrid cells to degrade. Tadpoles were then euthanized with an overdose of tricaine methanesulfonate buffered with  $\text{NaHCO}_3$ , and whole tadpole mouthparts were collected and fixed. Surviving toadlets were swabbed on day 15 and released at the exact point of capture, whereas animals found dead upon daily screenings were toe-clipped immediately. Tissue samples were stored in 70% ethanol and swabs were stored dry at 4 °C until processing.

The experiments here performed were carried out in accordance with all current European directives and Spanish laws, and approved by the competent authorities of the Consejería de Medio Ambiente from Junta de Andalucía (Ref. 12\_44). Procedures conformed to the recommended guidelines or use of live amphibians and reptiles in laboratory research (ASIH 2004). All experimental protocols were approved by the 'Comité de Ética de Experimentación Animal CEEA-EBD'. All researchers implied in the experiments (AFL, JB, MT) have the competent accreditation (Category C) according to the EU Directive 2010/63/EU Article 23.2 accredited by the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA).

We extracted *Bd*-DNA using PrepMan Ultra Reagent Protocol as described by Boyle et al. (2004). Extracted DNA was stored at -20 °C until further processing. We assessed the burden of infection using the quantitative PCR (qPCR) protocol described by Boyle et al. (2004) with a CFX96 thermocycler (Bio-Rad). Each plate included samples, a negative control and four standards ranging in concentration from 100 to 0.1 *Bd* zoospores  $\text{ml}^{-1}$  genome equivalents (GE), all in duplicate (isolate IA042 from Acherito). Samples were scored positive when both replicates received GE-estimates  $\geq 0.1$  and amplification curves had the typical sigmoidal shape.

## ***Infección por *Bd* disminuye tolerancia térmica en larvas***

Infection loads for tadpoles and toadlets before and after thermal treatments were compared using linear mixed models, with individuals as a random factor, and time (before/after), population, treatment (control/heated), and the interactions time x population and time x treatment as fixed factors. Infection load was transformed ( $\log_{10}$ ) to reach normality but also to reduce differences between values obtained by swabbing the oral discs (initial) and by using the whole oral disc (final). We analysed variation in Box-Cox transformed values of CTmax of tadpoles and toadlets separately using general linear models (GLM) because all tadpoles collected from Acherito and no toadlets collected from Toro were infected. We entered population origin as a fixed factor and *Bd* infection load and body mass as covariates. JMP Pro 12 (SAS Institute Inc., NC, USA) was used for all statistical analyses.

## **RESULTS**

### **Initial prevalence and infection load**

Initial prevalence of infection in tadpoles originating from Toro was 50% (n = 80) whereas it was 100% (n = 18) in tadpoles taken from the Acherito population. Similarly, none of the 21 toadlets collected at Toro were infected, while most toadlets collected at Acherito were infected (prevalence: 90%, n = 20). *Bd* loads of infected tadpoles from Toro assigned to the experimental group ranged from 960 to 12970 GE (average 3846 GE), whereas infected tadpoles assigned to the control group ranged from 930 to 1440 GE (average 4419 GE). Tadpoles from Acherito presented an averaged *Bd* load of 511 GE, ranging from 6 to 2330 GE. Infected toadlets from Acherito assigned to the experimental group ranged from 1 to 2690 GE (average 472 GE), while infected ones assigned to the control group ranged from 7 to 71 GE (average 115 GE).

## Effect of host heating to CTmax on *Bd* prevalence and infection load

All tested tadpoles (78) and toadlets (36) recovered after reaching their CTmax. Averaged CTmax values were very high and extremely similar for both tadpoles (37.3°C) and toadlets (37.7°C; Figure 1). Heating to CTmax did not clear *Bd* infection. None of the 20 tadpoles collected from Toro, neither the 18 tadpoles from Acherito that tested positive for *Bd* at the start, changed their infection score. Similarly, all 20 control tadpoles maintained their infection status after completing the experiment.

Larval populations differed in *Bd* loads ( $F_{1,103} = 23.699$ ,  $p < 0.001$ ), which were higher in Acherito. Although no significant differences were found between initial and final larval *Bd* loads ( $F_{1,80} = 0.970$ ,  $p = 0.328$ ) or between control and heated tadpoles ( $F_{1,80} = 0.001$ ,  $p = 0.973$ ), the interaction between these two factors was significant ( $F_{1,80} = 8.837$ ,  $p = 0.004$ ), indicating that heated tadpoles, but not control tadpoles, increased their infection load after the experiment (Figure 2).

All toadlets from Toro survived until completion of the experiment, 15 days after exposure to CTmax. On the other hand, only four of the 20 toadlets collected at Acherito survived until the end of the experiment. From those four toadlets, two were *Bd*-free and the other two had low *Bd* loads (9 and 27 *Bd* zoospore GE, respectively) at the beginning of the experiment. Most toadlets died 6 days (13 animals) after the beginning of the experiment, the rest died on day 9 (3 animals). Toadlets that died on days 6 and 9 did not differ in *Bd* loads at the beginning of the experiment or on the day of death (Student's t-tests;  $t < 0.8$ ,  $p < 0.43$  in both cases).

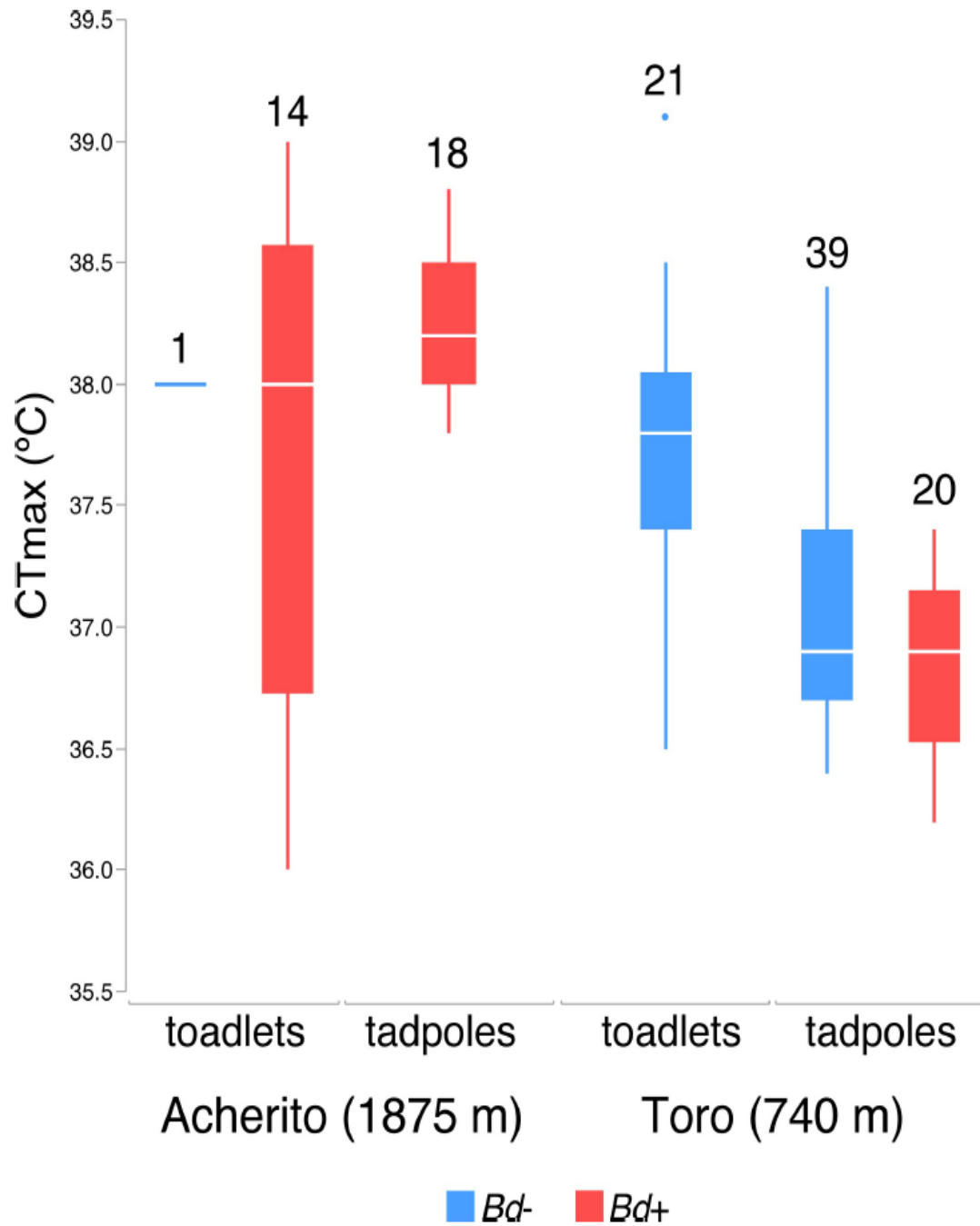
### ***Infección por Bd disminuye tolerancia térmica en larvas***

None of the 14 Acherito toadlets that were initially *Bd*-infected lost their infection after going through the CTmax experiment.

Toadlets showed no significant differences between initial and final *Bd* loads ( $F_{1,15} = 0.454$ ,  $p = 0.511$ ) or between heated and control animals ( $F_{1,15} = 1.764$ ,  $p = 0.204$ ), and the interaction between these two factors was not significant ( $F_{1,15} = 0.004$ ,  $p = 0.951$ ).

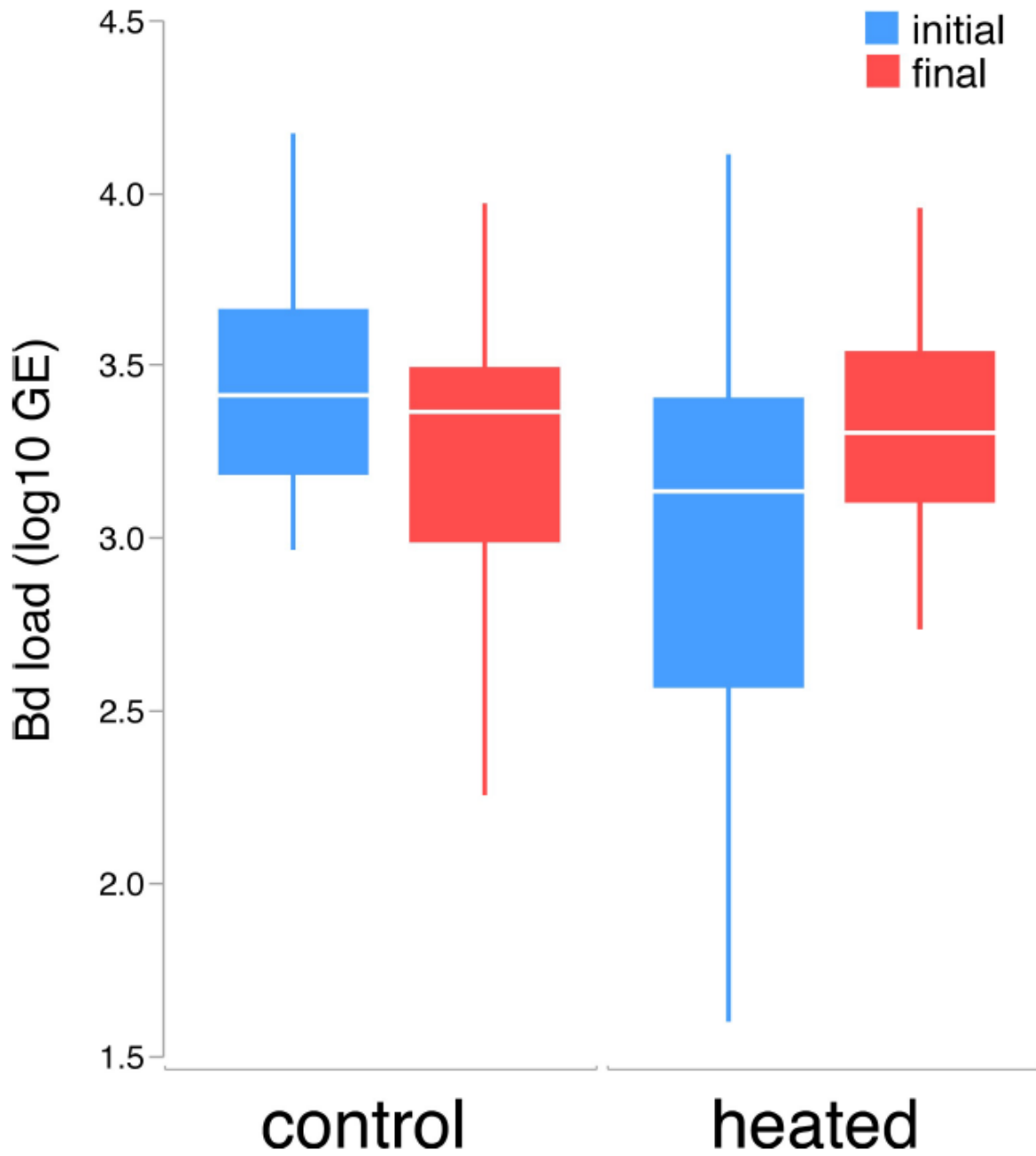
### **Effect of *Bd* infection load on thermal tolerance limits**

The linear model used to analyse differences in CTmax of tadpoles was highly significant ( $R^2 = 0.63$ ,  $F_{3,76} = 41.359$ ,  $p < 0.001$ ). We observed a significant difference in CTmax between the two studied populations ( $F_{1,76} = 61.28$ ,  $p < 0.0001$ ), with CTmax being higher in tadpoles collected from Acherito than those obtained from Toro (mean  $\pm$  SE:  $38.238 \pm 0.075$  vs.  $36.975 \pm 0.061^\circ\text{C}$ ). Most importantly, a significant negative relationship between *Bd* infection load and CTmax was found ( $F_{1,76} = 5.77$ ,  $p = 0.0189$ ), with a slightly lower CTmax in infected ( $37.046 \pm 0.083^\circ\text{C}$ ) than non-infected tadpoles ( $37.500 \pm 0.127^\circ\text{C}$ ). The effect of larval body mass had a marginally non-significant influence on CTmax ( $F_{1,76} = 3.45$ ,  $p = 0.0673$ ). In the case of toadlets, neither population origin nor body mass or *Bd* infection status had a significant effect on CTmax values ( $R^2 = 0.03$ ,  $F_{3,35} = 0.3238$ ,  $p = 0.8081$ ).



**Figure 1.** CTmax (°C) in both tadpoles and toadlets from the two studied localities, Acherito and Toro. Uninfected animals appear in blue and *Bd*-infected animals are in red. Numbers above each box-plot are sample sizes. Horizontal lines depict medians, boxes represent interquartile ranges, whiskers extend to minima-maxima, dots show potential outliers.

*Infección por Bd disminuye tolerancia térmica en larvas*



**Figure 2.** *Bd* loads (GE, log<sub>10</sub> transformed) in both groups of tadpoles (control and heated) at the initial and final time. Horizontal lines depict medians, boxes represent interquartile ranges, whiskers extend to minima-maxima.

## DISCUSSION

Our main observation that CTmax values obtained for *Bd*-infected tadpoles were significantly lower than those of uninfected ones supports similar results reported for the adult stage of the Australian frog *Litoria spenceri* (Greenspan et al. 2017). Therefore, this fungal pathogen may be capable of altering the thermal physiology of the hosts it infects, or, in a narrower sense, to lower their ability to withstand high temperatures. In a global warming scenario this could have serious conservation implications for many amphibian species, especially for tropical species, which often live close to their thermal limits (Duarte et al. 2012; Gutiérrez-Pesquera et al. 2016). On the other hand, temperate amphibian species may be relatively secure from similar impacts of warming, since their warming tolerance (the difference between their CTmax and environmental temperatures) is higher in most cases (Duarte et al. 2012). Because permanent ponds are in general deeper and cooler than shallow ephemeral water bodies, *A. obstetricans* and many other species using permanent ponds as their larval habitat could be on the safe side in this respect, while species spawning and developing in temporary water bodies may be exposed to higher risk. Nonetheless, amphibians of the temperate zone may also be highly vulnerable to climate change, because temperatures are predicted to rise more steeply in these regions (Williams et al. 2007), and, coupled with the observation of *Bd*-infection lowering CTmax, the presence of the chytrid fungus may push local populations towards extinction. However, we have to note that the decrease in CTmax accountable to *Bd*-infection was less than 0.5°C for tadpoles and a similar effect could not be detected in toadlets, while CTmax was still higher than 37°C in infected tadpoles and even higher in toadlets. Thus, our results indicate that *Bd*-infection may lower upper thermal tolerance limits of amphibians, but this decrease is minimal in *A.*

### ***Infección por Bd disminuye tolerancia térmica en larvas***

*obstetricans* and will have to be assessed in a variety of other species before we can determine the importance of this effect.

It is generally believed that temperature tolerance of *Bd* ranges from 4 to 25°C, with its thermal optimum for growth and reproduction falling between 17–25°C (Piotrowski et al. 2004; Stevenson et al. 2013; Cohen et al. 2017). However, *A. obstetricans* optimum thermal breadth (TB80) for larval growth was much warmer, ranging between 21–28°C (M. Tejedo, P. Pintanel, unpublished results), thus suggesting the prediction of thermal mismatch hypothesis (Cohen et al. 2017). In our experiment, where we exposed infected tadpoles and toadlets to elevated temperatures, we did not observe clearance of infection even though the CTmax, and thereby the highest ambient temperatures reached around 37.5°C, which is almost 10°C higher than the CTmax of *Bd*. An *in vitro* study (Johnson & Speare 2003) showed *Bd*-wipeout in all cultures after only 4 hours of exposure to 37°C. We know of only two studies that exposed amphibians to similarly high temperatures in order to clear *Bd*-infection: Woodhams and colleagues (Woodhams et al. 2003) exposed juvenile frogs to 37°C for 8 hours on two consecutive days, which resulted in clearance of infection in all individuals; in the other study, exposure to 35°C for one day, preceded by 30°C for 12 hours, was ineffective in clearing *Bd* from adult frogs (Woodhams et al. 2012). In our experiment, we elevated temperature from 20°C to around 37.5°C at a rate of 0.8°C min<sup>-1</sup>, meaning that infected animals spent ca. 12 min at temperatures beyond 28°C, the upper thermal limit of *Bd*, and 4 min at temperatures beyond 35°C, which is likely too brief to kill *Bd* or alternatively, triggering host immunity (Berger et al. 2004). From these studies it appears that even temperatures close to the thermal maximum that amphibians can withstand without lasting damage have to be maintained for more than just a few minutes. The effective combinations of elevated temperatures and duration of application/exposure of thermal stress in order to clear *Bd*-infection or at least to largely suppress infection loads remain to be determined.

To conclude, our study shows that besides other malign effects on its amphibian hosts, *Bd* can also reduce their critical thermal maximum (CT<sub>max</sub>), at least for tadpoles. A reduction in thermal tolerance can have serious consequences for the persistence of amphibian populations at many localities worldwide, especially under the ongoing process of global climate change. At the same time, our results and those of previous studies suggest that short spikes in peak temperatures are unlikely to clear *Bd*-infection from amphibian hosts. Finally, our study draws attention to the importance of determining effective combinations of time and temperature parameters in order to deploy optimized and safely applicable disinfection treatments against this deadly disease.

## REFERENCES

Alexander LV, Zhang X, Peterson TC, Caesar J, Gleason B, Klein Tank AMG, Haylock M, Collins D, Trewin B, Rahimzadeh F, Tagipour A, Rupa Kumar K, Revadekar J, Griffiths G, Vincent L, Stephenson DB, Burn J, Aguilar E, Brunet M, Taylor M, New M, Zhai P, Rusticucci M, Vazquez-Aguirre JL. (2006). Global observed changes in daily climate extremes of temperature and precipitation. *J. Geophys. Res. Atmos*, 111 (D05109), 1042e1063.

Altizer S, Dobson A, Hosseini P, Hudson P, Pascual M, Rohani P. (2006). Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecol. Lett*, 9: 467–484. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00879.x>

Berger L, Speare R, Hines HB, Marantelli G, Hyatt AD, McDonald KR, Skerratt LF, Olsen V, Clarke JM, Gillespie G, Mahony M, Sheppard N, Williams C, Tyler MJ. (2004). Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Aust. Vet. J*, 82: 31–36.

Bernardo J, Spotila JR. (2006). Physiological constraints on organismal response to global warming: mechanistic insights from clinically varying populations and implications for assessing endangerment. *Biology Letters*, 2: 135-139. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0417>

Bosch J, Martinez-Solano I, Garcia-Paris 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. Conserv*, 97: 331–337.

Boyle DGD, Boyle DBD, Olsen VV, Morgan JATJ, Hyatt ADA. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis. Aquat. Organ*, 60: 141–148. <https://doi.org/10.3354/dao060141>

Chatfield M, Richards-Zawacki C. (2011). Elevated temperature as a treatment for *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in captive frogs. *Dis. Aquat. Organ*, 94: 235–238. <https://doi.org/10.3354/dao02337>

Cohen JM, Venesky MD, Sauer EL, Civitello DJ, McMahon TA, Roznik EA, Rohr JR. (2017). The thermal mismatch hypothesis explains host susceptibility to an emerging infectious disease. *Ecol. Lett*, 20: 184–193. <https://doi.org/10.1111/ele.12720>

Coumou D, Rahmstorf S. (2012). A decade of weather extremes. *Nat. Clim. Chang*, 2: 491–496.

Doddington BJ, Bosch J, Oliver JA, Grassly NC, Garcia G, Schmidt BR, Garner TWJ, Fisher MC. (2013). Context-dependent amphibian host population response to an invading pathogen. *Ecology*, 94: 1795–1804.

Du H, Wu Z, Li M, Jin Y, Zong S, Meng X. (2013). Characteristics of extreme daily minimum and maximum temperature over Northeast China, 1961–2009. *Theor. Appl. Climatol*, 111: 161–171.

Duarte H, Tejedo M, Katzenberger M, Marangoni F, Baldo D, Beltrán JF, Martí DA, Richter-Boix A, Gonzalez-Voyer A. (2012). Can amphibians take a heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities. *Global Change Biology*, 18: 412–421.

Evans SS, Repasky EA, Fisher DT. (2015). Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat. Rev. Immunol*, 15: 335–349. <https://doi.org/10.1038/nri3843>

Fernández-Beaskoetxea S, Carrascal LM, Fernández-Loras A, Fisher MC, Bosch J. (2015). Short term minimum water temperatures determine levels of infection by the amphibian chytrid fungus in *Alytes obstetricans* tadpoles. *PLoS ONE*, 10 (3): e0120237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120237>

Field CB, Barros V, Stocker TF, Dahe Q, Eds. (2012). Managing the risks of extreme events and disasters to advance climate change adaptation. A special report of working groups I and II of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge University Press: Cambridge, UK and New York, USA, 582 pp.

## ***Infección por Bd disminuye tolerancia térmica en larvas***

Fisher MC. (2007). Potential interactions between amphibian immunity, infectious diseases and climate change. *Anim Conserv*, 10: 420–421.

Fisher MC, Garner TWJ, Walker SF. (2009). Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annu. Rev. Microbiol*, 63: 291–310. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073435>

Forrest MJ, Schlaepfer MA. (2011). Nothing a hot bath won't cure: infection rates of amphibian chytrid fungus correlate negatively with water temperature under natural field settings. *PLoS ONE*, 6; e28444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028444>

García FC, Bestion E, Warfield R, Yvon-Durocher G. (2018). Changes in temperature alter the relationship between biodiversity and ecosystem functioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115: 10989–10994. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805518115>

Geiger CC, Küpfer E, Schär S, Wolf S, Schmidt BR. (2011). Elevated temperature clears chytrid fungus infections from tadpoles of the midwife toad, *Alytes obstetricans*. *Amphibia-Reptilia*, 32: 276–280.

Gosner KL. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16: 183–190.

Greenspan SE, Bower DS, Roznik EA, Pike DA, Marantelli G, Alford RA, Schwarzkopf L, Scheffers BR. (2017). Infection increases vulnerability to climate change via effects on host thermal tolerance. *Sci. Rep*, 7: 9349. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09950-3>

Gutiérrez-Pesquera LM, Tejedo M, Olalla-Tarraga MA, Duarte H, Nicieza A, Sole M. (2016). Testing the climate variability hypothesis in thermal tolerance limits of tropical and temperate tadpoles. *J. Biogeography*, 43: 1166–1178.

Hoffmann AA. (2010). Physiological climatic limits in *Drosophila*: Patterns and implications. *J. Exp. Biology*, 213: 870–880.

Huey RB, Kearney MR, Krockenberger A, Holtum JAM, Jess M, Williams SE. (2012). Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behaviour, physiology and adaptation. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 367: 1665–1679. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0005>

Hutchinson VH. (1961). Critical thermal maxima in salamanders. *Physiol. Zool*, 34: 92–125.

Johnson ML, Speare R. (2003). Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: Quarantine and disease control implications. *Emerg. Infect. Dis*, 9: 922–925. <https://doi.org/10.3201/eid0908.030145>

Kilpatrick AM, Briggs CJ, Daszak P. (2010). The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends Ecol. Evolut*, 25: 109–118.

Kluger MJ. (1977). Fever in the frog *Hyla cinerea*. *J. Therm. Biol*, 2: 79–81.

Lin HH, Rowlands DT. (1973). Thermal regulation of the immune response in South American toads (*Bufo marinus*). *Immunology*, 24: 129–133.

Loikith PC, Broccoli AJ. (2014). The influence of recurrent modes of climate variability on the occurrence of winter and summer extreme temperatures over North America. *J. Clim*, 17: 1600–1618.

Luttershmidt WI, Hutchison VH. (1997). The critical thermal maximum: history and critique. *Can. J. Zool*, 75: 1561–1574.

Maniero GD, Carey C. (1997). Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold. *J. Comp. Physiol. B*, 167: 256–263.

## ***Infección por Bd disminuye tolerancia térmica en larvas***

McMichael AJ, Woodruff RE, Hales S. (2006). Climate change and human health: present and future risks. *Lancet*, 367: 859–869. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68079-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68079-3)

Nowakowski AJ, Whitfield SM, Eskew EA, Thompson ME, Rose JP, Caraballo BL, Kerby JL, Donnelly MA, Todd BD. (2016). Infection risk decreases with increasing mismatch in host and pathogen environmental tolerances. *Ecol. Lett*, 19: 1051–1061 <https://doi.org/10.1111/ele.12641>

Piotrowski JS, Annis SL, Longcore JE. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96: 9–15.

Raffel TR, Rohr JR, Kiesecker JM, Hudson PJ. (2006). Negative effects of changing temperature on amphibian immunity under field conditions. *Funct. Ecol*, 20: 819–828.

Rakus K, Ronsmans M, Vanderplasschen A. (2017). Behavioral fever in ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol*, 66: 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.027>

Rohr JR, Raffel TR, Romansic JM, McCallum H, Hudson PJ. (2008). Evaluating the links between climate, disease spread, and amphibian declines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 17436–17441. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806368105>

Sherman E. (2008). Thermal biology of newts (*Notophthalmus viridescens*) chronically infected with a naturally occurring pathogen. *J. Therm. Biol*, 33: 27–31.

Smith MD. (2011). An ecological perspective on extreme climatic events: a synthetic definition and framework to guide future research. *J. Ecol*, 99: 656–663.

Somero GN. (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine ‘winners’ and ‘losers’. *J. Exp. Biology*, 213: 912–920.

Sonn JS, Berman S, Richards-Zawacki CL. (2017). The influence of temperature on chytridiomycosis *in vivo*. *EcoHealth*, 14: 762–770. <https://doi.org/10.1007/s10393-017-1269-2>

Stevenson LA, Alford RA, Bell SC, Roznik EA, Berger L, Pike DA. (2013). Variation in thermal performance of a widespread pathogen, the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE*, 8: e73830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073830>

Stocker TF, Dahe Q, Plattner GK, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM, Eds. (2013). *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)*. Cambridge University Press: Cambridge, UK and New York, USA, 1535 pp.

Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306: 1783–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>

Terblanche JS, Deere JA, Clusella-Trullas S, Janion C, Chown SL. (2007). Critical thermal limits depend on methodological context. *Proc. R. Soc. London. B*, 274: 2935–2942.

Walker SF, Bosch J, Gomez V, Cunningham AA, Schmeller DS, Ninyerola M, Henk D, Ginestet C, Arthur CP, Fisher MC. (2010). Factors driving pathogenicity vs prevalence of amphibian panzootic chytridiomycosis in Iberia. *Ecology Letters*, 13: 372–382. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01434.x>

Williams JW, Jackson ST, Kutzbach JE (2007). Projected distributions of novel and disappearing climates by 2100 AD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 5738–5742. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606292104>

Woodhams DC, Alford RA, Marantelli G. (2003). Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Dis. Aquat. Organ*, 55: 65–67. <https://doi.org/10.3354/dao055065>

Woodhams DC, Alford RA, Briggs CJ, Johnson M, Rollins-Smith LA. (2008). Life-history trade-offs influence disease in changing climates: strategies of an amphibian pathogen. *Ecology*, 89: 1627–1639.

## ***Infección por Bd disminuye tolerancia térmica en larvas***

Woodhams DC, Geiger CC, Reinert LK, Rollins-Smith LA, Lam B, Harris RN, Briggs CJ, Vredenburg VT, Voyles J. (2012). Treatment of amphibians infected with chytrid fungus: learning from failed trials with itraconazole, antimicrobial peptides, bacteria, and heat therapy. *Dis. Aquat. Org*, 98: 11–25. <https://doi.org/10.3354/dao02429>

Wright RK, Cooper EL. (1981). Temperature effects on ectotherm immune responses. *Dev. Comp. Immunol*, 5: 117–122.



## CAPÍTULO 5

LA INTERVENCIÓN SEVERA *IN SITU* EN EL HÁBITAT DE CRÍA SÓLO CONSIGUE UN ÉXITO TEMPORAL EN REDUCIR LA INFECCIÓN POR *Batrachochytrium dendrobatidis*

*IN SITU* SEVERE BREEDING HABITAT INTERVENTION ONLY ACHIEVES TEMPORARY SUCCESS IN REDUCING *Batrachochytrium dendrobatidis* INFECTION

Andrés Fernández-Loras<sup>1</sup>, Luz Boyero<sup>2,3</sup>, Jaime Bosch<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC, José Gutiérrez Abascal, 2, 28006 Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Faculty of Science and Technology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Vizcaya, Spain.

<sup>3</sup> IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain.

<sup>4</sup> Research Unit of Biodiversity (CSIC, UO, PA), Oviedo University, Mieres, Spain.

Fernández-Loras et al. (2020). *Amphibia-Reptilia*.

DOI: <https://doi.org/10.1163/15685381-20191270>



# LA INTERVENCIÓN SEVERA IN SITU EN EL HÁBITAT DE CRÍA SÓLO CONSIGUE UN ÉXITO TEMPORAL EN REDUCIR LA INFECCIÓN POR *Batrachochytrium* *dendrobatidis*

## RESUMEN

La quitridiomycosis, una enfermedad infecciosa causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), está causando acusados declives en poblaciones de anfibios de todo el planeta. Se ha llevado a cabo un considerable esfuerzo investigador para estudiar la enfermedad, incluyendo los tratamientos frente a *Bd*, pero la mayoría de los protocolos terapéuticos que se han diseñado se han aplicado solamente en cautividad. El objetivo de este estudio es eliminar del medio una cepa de *Bd* que afecta a varias poblaciones de sapo partero común (*Alytes obstetricans*). Para ello se sacaron de sus localizaciones de cría naturales (abrevaderos de ganado) a todas las larvas de dichas poblaciones, y se llevaron a cabo dos tipos diferentes de manipulación severa del hábitat de cría, como son el secado completo o el vallado de los puntos de agua durante la época de cría. Los resultados obtenidos a través del secado completo fueron parcialmente satisfactorios, puesto que se consiguió eliminar el hongo del medio aunque sólo temporalmente. Puesto que los adultos de *A. obstetricans* son eminentemente terrestres, viven lejos del agua y por ello rara vez están infectados, nuestros resultados sugieren que aún en hábitats sencillos y fácilmente manipulables, en los que es posible implementar medidas de manipulación del hábitat extremas, la eliminación total de *Bd* no es posible sin controlar otros reservorios potenciales del hongo en los alrededores de los lugares de cría.

***IN SITU* SEVERE BREEDING HABITAT INTERVENTION  
ONLY ACHIEVES TEMPORARY SUCCESS IN REDUCING  
*Batrachochytrium dendrobatidis* INFECTION**

**ABSTRACT**

Chytridiomycosis, an emerging infectious disease caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), is causing sharp declines in amphibian populations around the globe. A substantial research effort has been made to study the disease, including treatments against *Bd*, but most treatments have been applied to captive amphibians only. We report a study aimed at clearing wild populations of the Common Midwife toad (*Alytes obstetricans*). We removed all larvae from natural breeding sites (cattle troughs) and conducted two types of severe breeding habitat manipulation (complete drying and fencing for the whole breeding season). While larval removal followed by drying was a successful method of *Bd* elimination, the effect was only temporary. Since terrestrial habits of adult *A. obstetricans* prevent them from infection, our findings suggest that, even in simple breeding habitats where all aquatic amphibian stages can be handled and extreme habitat intervention is possible, *Bd* cannot be eliminated without controlling other potential *Bd* reservoirs in the surroundings of breeding sites.

## INTRODUCTION

Emerging infectious diseases represent a major threat to global biodiversity, as they can cause severe declines or extinctions of local populations (Daszak et al. 1999; Kilpatrick et al. 2009). Some well-known examples in animals are the White Nose Syndrome in bats, caused by the fungus *Geomyces destructans*; the highly deleterious crayfish plague driven by the fungus *Aphanomyces astaci*; and the Chytridiomycosis, caused by the pathogenic chytridiomycete fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (hereafter *Bd*), which has been linked to extinctions and dramatic declines of hundreds of amphibian species worldwide (Scheele et al. 2019). *Batrachochytrium dendrobatidis* is listed as one of the top 100 world's worst invasive alien species and has been identified as the main culprit of the greatest loss of vertebrate biodiversity attributable to disease in recorded history (Skerratt et al. 2007).

Disease ecology depends on interactions between hosts, pathogens and their environment, the three elements being key determinants of disease transmission and persistence, host susceptibility and pathological effects. Thus, besides direct interventions towards the pathogen, the vector or the host, environmental management could also be potentially used to control disease, even if results may take longer to be measurable (Delahay et al. 2009). For example, habitat manipulation has been used to decrease infection rates and influence of water-borne disease development (Wobeser. 1994). Some studies suggest that air temperature, water temperature, soil moisture and even the action of microscopic aquatic predators, could be important extrinsic risk factors driving *Bd* infection dynamics (Raffel et al. 2010; Forrest & Schlaepfer 2011; Heard et al. 2014; Schmeller et al. 2014; Fernández-Beaskoetxea et al. 2015), and others advocate for habitat manipulation as a possible strategy to minimize the impact of the disease on amphibian populations (Raffel et al. 2010; Daskin et al. 2011; Geiger et al. 2011;

Puschendorf et al. 2011; Becker et al. 2012; Heard et al. 2014; Scheele et al. 2014). Given that *Bd* growth, reproduction and infection prevalence and intensity are negatively affected by high air and water temperature (Piotrowski et al. 2004; Stevenson et al. 2013), some studies propose reducing canopy cover to increase solar insolation and thus warm patches where temperature would be above *Bd* upper optimal threshold, acting as amphibian thermal refuges in the water (Raffel et al. 2010; Geiger et al. 2011; Becker et al. 2012; Heard et al. 2014) or ground (Daskin et al. 2011; Puschendorf et al. 2011).

There has been great investment in studying the biology and dynamics of chytridiomycosis and implementing treatments to clear amphibian populations from the pathogen. However, the vast majority of treatments have consisted of applying high temperatures (Woodhams et al. 2003; Chatfield & Richards-Zawacki 2011; Geiger et al. 2011) or antifungal products, such as itraconazole (Garner et al. 2009; Tobler & Schmidt 2010; Brannelly et al. 2012; Jones et al. 2012), chloramphenicol (Bishop et al. 2009), thiophanate-methyl (Hanlon et al. 2012) or voriconazole (Martel et al. 2011), to captive amphibian collections under monitored conditions. While the treatment of captive amphibians has been successful, translating this knowledge into safe, reliable, transferable, cost-effective and long-term solutions to manage chytridiomycosis in the wild remains a challenge.

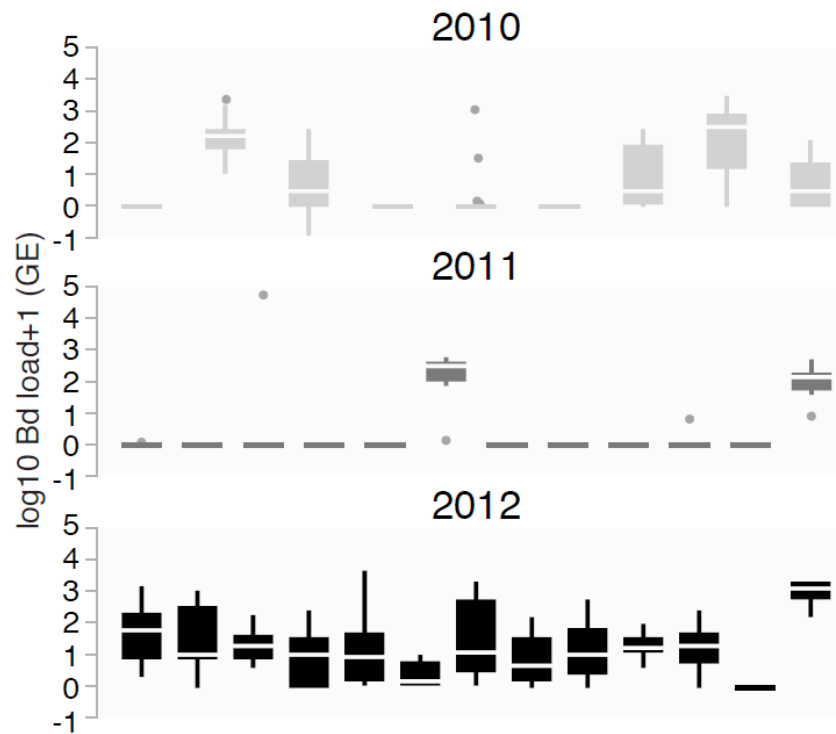
Four different strategies have been used to try mitigate the impacts of the disease in natural habitats (Garner et al. 2016), with no or partial success: (1) translocations or reintroductions; (2) bioaugmentation of the host microbiome; (3) treatment of individuals with antifungals; and (4) the combination of antifungal treatments with environmental disinfection using chemicals. Other potential mitigation strategies, such as obtaining resistant amphibians through genetic manipulation and selective breeding, remain untested. Here we report a

### ***Intervención en hábitat consigue éxito temporal reduciendo niveles de Bd***

management study aimed at mitigating the effects of chytridiomycosis on a wild population of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*). A distinctive natural history trait of this species is its extremely long larval stage (up to several years), which is associated with the persistence and transmission of the disease (Bosch et al. 2001). We used a combination of two methods, avoiding the use of chemicals in the environment: (1) the removal of overwintering larvae, which are responsible for maintaining and producing large amounts of fungal infective zoospores (Fernández-Beaskoetxea et al. 2016); and (2) habitat intervention, which consisted of either drying or fencing the breeding sites to avoid the entrance of metamorphosed individuals.

## **MATERIALS AND METHODS**

We conducted the study in twelve cattle troughs located in a forested mountain area (mean altitude of 1550 m.a.s.l.) in the Teruel province (Aragón, Spain). These cattle troughs, which are used as natural breeding sites by *A. obstetricans*, were selected following three years of sample collection (2010-2012) from a wide range of breeding sites, which showed high variation in *Bd* loads (Figure 1).



**Figure 1.** Box plots of *Bd* load ( $\log_{10} x+1$  transformed) of overwintering *A. obstetricans* larvae at different breeding sites sampled in 2010, 2011 and 2012 before habitat intervention.

Each site was randomly assigned to one of the following experimental groups, comprised of three sites each: control (Blanca, Juan and Milano sites); removal only (Jorcas, Reguero and Torreta sites); removal and fencing (Blandina, Cuerda and Molino sites); and removal and drying (Abrevador, Cebo and Gil sites). All larvae were removed from the sites in all cases; in the control group, larvae were immediately returned to their original sites; in the fencing group, larvae were removed and then the site was isolated using a fence that was left there during the whole breeding season (45 days), to avoid the entrance of metamorphosed individuals; in the drying group, larvae were removed and then the site was completely dried out and kept it dry for at least 20 days, during which no rain occurred and no other persisting sources of moisture were present. Habitat

### ***Intervención en hábitat consigue éxito temporal reduciendo niveles de Bd***

interventions were conducted in May 2012, immediately after the collection of larvae, which were taken to a close captive facility and used in other studies, except for larvae from the control group.

We collected twenty samples per site before habitat intervention and ten samples per site annually for three consecutive years after intervention. We took samples from the mouthparts of overwintering (OW) larvae using cotton swabs (MW100-100; Medical Wire & Equipment Co., Corsham, UK), extracted the DNA with PrepMan Ultra, and amplified the DNA using a BIO-RAD CFX96 Real-Time PCR Detection System following Boyle et al. (2004). Each 96-well assay plate included a negative control and four different standards containing DNA from 100, 10, 1 and 0.1 *Bd* genome equivalents (GE). We tested all the samples, as well as the negative control and the standards, in duplicate. We considered samples with greater than 0.1 GE in both replicates, and the expected sigmoidal shaped curve, positive for *Bd*. We transformed *Bd* loads to the  $\log_{10}(x+1)$  to reach normality and used a general linear model to analyse variation before and after intervention. We considered treatment and year as fixed factors and site as fixed factor nested within treatment, and used post-hoc Tukey's honest significance tests to compare pairs of *Bd* load means for the treatment by year interaction (Table 1).

Level		Least Sq Mean
REMOVAL, 2015	A	3.764
REMOVAL, 2013	A B	3.314
FENCING, 2015	B C	2.309
FENCING, 2014	C D	1.905
DRYING, 2012	C D E	1.523
CONTROL, 2012	C D E	1.395
REMOVAL, 2012	C D E F	1.296
CONTROL, 2014	C D E F G	1.161
CONTROL, 2015	A B C D E F G H	
DRYING, 2015	D E F G	1.116
REMOVAL, 2014	C D E F G	1.107
FENCING, 2012	E F G	0.915
CONTROL, 2013	F G H	0.429
FENCING, 2013	G H	0.2876
DRYING, 2014	H	3.442e-15
DRYING, 2013	H	-5.898e-16

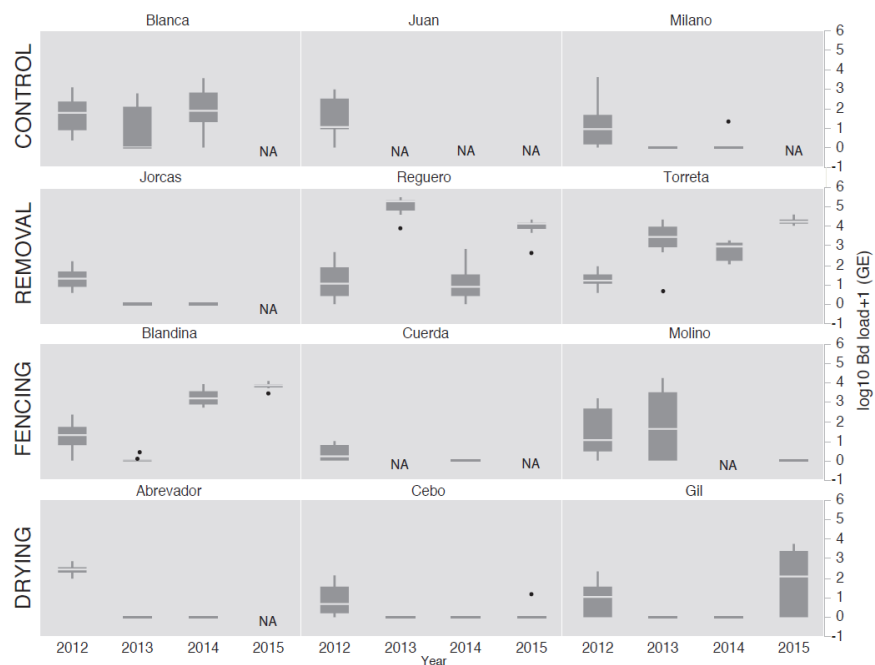
**Table 1.** Tukey's post-hoc tests comparing pairs of means of *Bd* loads for the treatment by year interaction. Letters not connected by the same letter are significantly different.

## RESULTS

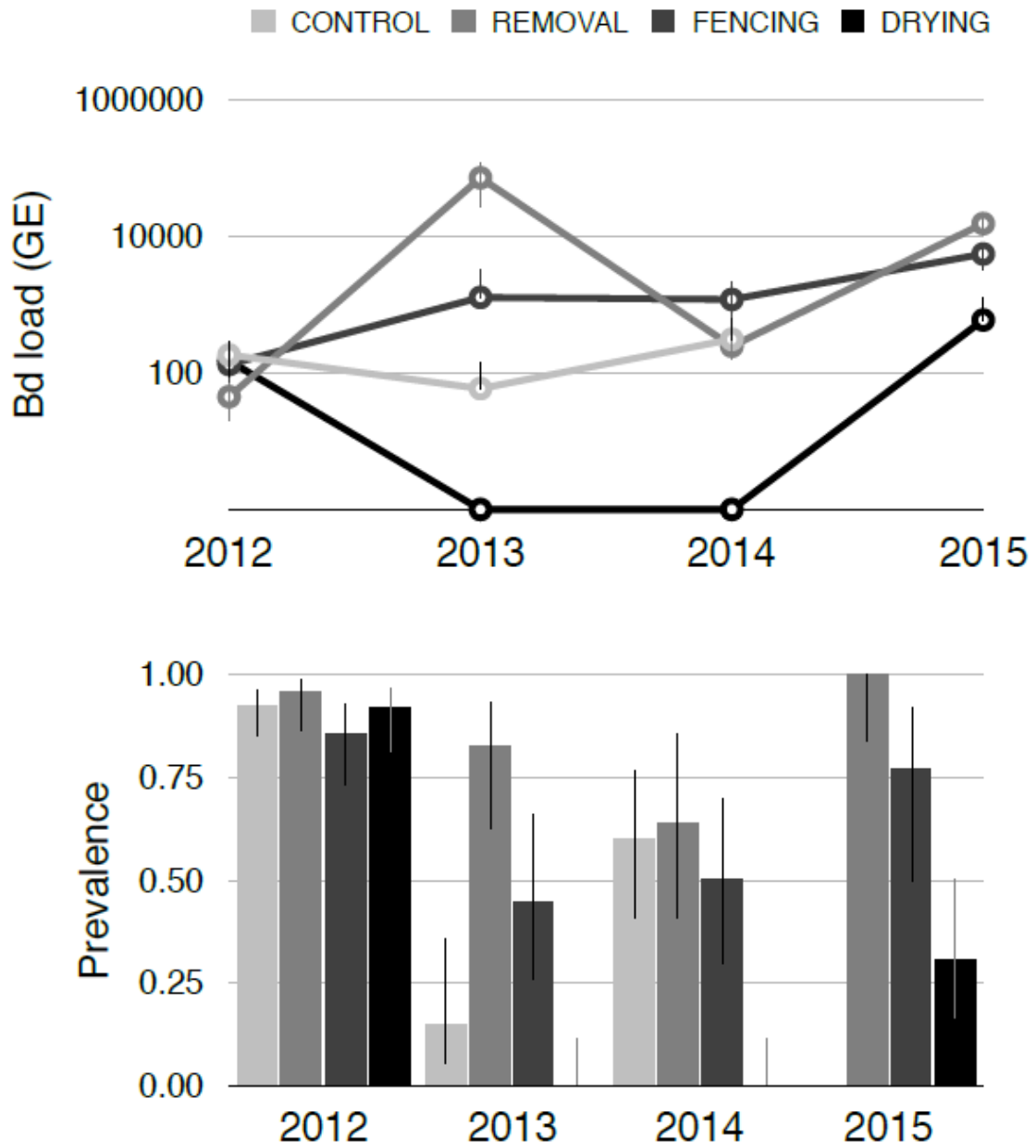
The *Bd* loads varied across treatments, sites within treatments and years (Figures 2, 3), and the treatment by year interaction was also significant ( $p < 0.05$  in all cases), explaining the model 54% of the observed variation. While complete

**Intervención en hábitat consigue éxito temporal reduciendo niveles de *Bd***

clearance of *Bd* was not achieved in any of the experimental groups (Figures 2, 3), the drying group remained *Bd*-clean for two years. In the control group, infection levels remained constant at Blanca and decreased at Milano in 2013 and 2104; we found no larvae at Juan in 2013 and 2014, or in any control site in 2015. In the removal group, we found less than 10 larvae in 2013 and 2014, and no larvae in 2015 at Jorcas (which prevented comparisons), and *Bd* loads remained similar or increased after habitat intervention at Reguero and Torreta. Similar results were found in the fencing group, with increased *Bd* loads at Blandina in 2014 and 2015, and no larvae in 2013 and 2015 at Cuerda and in 2014 at Molino. In contrast, *Bd* loads were null at all sites in the drying group for two years (2013 and 2014), although infected larvae were collected again in 2015 at Cebo (with extremely low *Bd* loads) and Gil; Abrevador did not present overwintering larvae in 2015, but ten non-overwintering larvae resulted *Bd*-negative (data not shown).



**Figure 2.** Box plots of *Bd* load ( $\log_{10} x+1$  transformed) of overwintering *A. obstetricans* larvae at the twelve study sites immediately before (2012) and after habitat intervention (2013-2015). NA: no overwintering larvae present.



**Figure 3.** *Bd* load (logarithmic scale) and prevalence of infection (mean  $\pm$  95% CI) across the four experimental groups (control, before (2012) and after habitat intervention (2013-2105)). There is no data from the control group in 2015 because no overwintering larvae were found.

## DISCUSSION

This study shows how some types of habitat intervention, but not others, are able to affect the dynamics of chytridiomycosis in natural habitats by reducing *Bd* loads. In particular, we achieved the elimination of *Bd* after removing larvae of *A. obstetricans* from their natural breeding sites, and then completely drying out the sites and keeping them dry for at least 20 days. As a result of this intervention, *Bd* remained absent for at least two years (three in one site), which contrasted with other interventions (i.e., larval removal only, or larval removal plus site fencing), which rendered no significant or consistent effects on *Bd* loads. Other authors had suggested that drying out the natural habitat could be a viable way of suppressing *Bd* in the wild, given the high sensitivity of *Bd* zoospores to desiccation as shown in laboratory conditions (Woodhams et al. 2011). However, Bosch et al. (2015) failed to eradicate *Bd* in wild populations of *Alytes muletensis* populations after completely drying out the aquatic habitat until a chemical was applied. Our study supports those results and emphasizes the need of using chemicals to completely and permanently eradicate *Bd* from the environment.

Mitigation strategies (including direct mitigation actions) have proven ineffective in order to obtain long-term control of chytridiomycosis in the wild. The only exception is Bosch et al. (2015), who successfully eradicate *Bd* in 2013, with no reappearance to date (JB, unpublished results). For example, the use of antifungals for *in situ* treatment of amphibian adults (Hudson et al. 2016) or larvae, using a capture-treat-release approach (Geiger et al. 2017), has only obtained short-term success, similar to the one described here. Still, *in situ* antifungal treatments have been shown to reduce disease prevalence, infection loads and mortality of post-metamorphic juveniles, which is helpful when coping with an epidemic wave of chytridiomycosis (Garner et al. 2016; Hudson et al. 2016; Geiger et al. 2017) but not for critically endangered species with reduced

distributions. Reducing *Bd* loads and preventing critical infection thresholds can avoid mass mortality episodes and extinctions (Vredenburg et al. 2010), allowing some individuals to persist and populations to overcome the epidemic (Briggs et al. 2010). Drastic population reductions are never desirable for amphibians, which are critically affected by many other anthropogenic factors. Even when some studies have shown that *Bd* has no negative effects on populations of vulnerable species when it reaches an enzootic stage (Tobler et al. 2012; Spitzen-van der Sluij et al. 2014; Kieran et al. 2018), long surveying programs have indicated that other populations are not able to recover even decades after the outbreak disease (Bosch et al. 2018). Within this context, our results demonstrate that even drastic habitat interventions (i.e., drying out natural breeding sites) can reduce *Bd* infection loads but cannot be considered an eradication method.

There are two possible ways of reinfection of dried habitats that may have occurred in our study, namely the arrival of infected amphibians and the existence of potential reservoirs in the surroundings of breeding sites. Data are insufficient to completely discard the arrival of infected individuals, even when *A. obstetricans* is the only amphibian species present in the area. The persistence of infection in postmetamorphic *A. obstetricans* could explain why water bodies were reinfected after two complete years being utterly cleared of *Bd*. However, this explanation could also be deemed unlikely, since *A. obstetricans* adults are fully terrestrial and generally live far away from the water, being rarely infected by the chytrid fungus (Allain & Goodman 2018; JB, unpublished results; but see Spitzen-van der Sluij et al. 2014). Thus the existence of terrestrial *Bd* reservoirs in the surroundings of breeding sites could be considered as a more plausible explanation for habitat reinfection. If such environmental reservoirs of *Bd* were confirmed by field studies, then the use of chemicals in the surroundings of water bodies could be one of the best methods, already proved as efficient, in order to remove the chytrid fungus from the environment (Bosch et al. 2015). Obviously, environmental disinfectant application would need to be coupled with appropriate management of adult

***Intervención en hábitat consigue éxito temporal reduciendo niveles de Bd***

recolonization for those species with aquatic or semiaquatic adults. The use of chemicals in natural habitats has been criticized for its potential damage to aquatic organisms and ecosystems, but this mostly applies to the massive use of pesticides in agriculture (Köhler & Tribskorn 2013). In contrast, using biocides for specific conservation purposes often has more advantages than disadvantages (Martín-Sánchez et al. 2012; Peay et al. 2019), and should be considered as a viable option to eradicate the chytrid fungus from natural habitats.

## REFERENCES

- Allain SJR, Goodman MJ. (2018). The absence of the amphibian chytrid fungi in the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) from an introduced population in Cambridge, UK. *Herpetol. Notes*, 11: 451-454.
- Becker CG, Rodriguez D, Longo AV, Talaba AL, Zamudio KR. (2012). Disease risk in temperate amphibian populations is higher at closed-canopy sites. *PLoS ONE*, 7: e48205.
- Bishop PJ, Speare R, Poulter R, Butler M, Speare BJ, Hyatt A, Olsen V, Haigh A. (2009). Elimination of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* by Archey's frog *Leiopelma archeyi*. *Dis. Aquat. Organ*, 84: 9–15.
- 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. Conserv*, 97: 331–337.
- Bosch J, Sanchez-Tomé E, Fernández-Loras A, Oliver JA, Fisher MC, Garner TWJ. (2015). Successful elimination of a lethal wildlife infectious disease in nature. *Biol. Lett*, 11: 20150874.
- Bosch J, Fernández-Beaskoetxea S, Garner TWJ, Carrascal LM. (2018). Long-term monitoring of an amphibian community after a climate change- and infectious disease-driven species extirpation. *Glob. Change Biol*, 24: 2622-2632.
- Brannelly LA, Richards-Zawacki CL, Pessier AP. (2012). Clinical trials with itraconazole as a treatment for chytrid fungal infections in amphibians. *Dis. Aquat. Org*, 101: 95–104.
- Briggs CJ, Knapp RA, Vredenburg VT. (2010). Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 9695-9700.

### ***Intervención en hábitat consigue éxito temporal reduciendo niveles de Bd***

Chatfield MWH, Richards-Zawacki CL. (2011). Elevated temperature as a treatment for *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in captive frogs. *Dis. Aquat. Org*, 94: 235–238.

Daskin JH, Alford RA, Puschendorf R. (2011). Short-term exposure to warm microhabitats could explain amphibian persistence with *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE*, 6: e26215.

Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE, Speare R. (1999). Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerg. Infect. Dis*, 5: 735-748.

Delahay RJ, Smith GC, Hutchings MR. (2009). Management of disease in wild mammals. Delahay RJ, Smith GC, Hutchings MR. Editors. Springer. 284 pp.

Fernández-Beaskoetxea S, Carrascal LM, Fernández-Loras A, Fisher MC, 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-Beaskoetxea S, Bosch J, Bielby J. (2016). Infection and transmission heterogeneity of a multi-host pathogen (*Batrachochytrium dendrobatidis*) within an amphibian community. *Dis. Aquat. Org*, 118: 11-20.

Forrest MJ, Schlaepfer MA. (2011). Nothing a hot bath won't cure: infection rates of amphibian chytrid fungus correlate negatively with water temperature under natural field settings. *PLoS ONE*, 6: 1–9.

Garner TWJ, Garcia G, Carroll B, Fisher MC. (2009). Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Dis. Aquat. Org*, 83: 257–260.

Garner TWJ, Schmidt BR, Martel A, Pasmans F, Muths E, Cunningham AA, Weldon C, Fisher MC, Bosch J. (2016). Mitigating amphibian chytridiomycoses in nature. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 371: 20160207.

Geiger CC, Küpfer E, Schär S, Wolf S, Schmidt BR. (2011). Elevated temperature clears chytrid fungus infections from tadpoles of the midwife toad, *Alytes obstetricans*. *Amphibia-Reptilia*, 32: 276-280.

Geiger CC, Bregnard C, Maluenda E, Voordouw MJ, Schmidt BR. (2017). Antifungal treatment of wild amphibian populations caused a transient reduction in the prevalence of the fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Sci. Rep*, 7: 5956.

Hanlon SM, Kerby JL, Parris MJ. (2012). Unlikely remedy: fungicide clears infection from pathogenic fungus in larval southern leopard frogs (*Lithobates sphenoccephalus*). *PLoS ONE*, 7: 1–8.

Heard GW, Scroggie MP, Clemann N, Ramsey DSL. (2014). Wetland characteristics influence disease risk for a threatened amphibian. *Ecol. Appl*, 24: 650–662.

Hudson MA, Young RP, Lopez J, Martin L, Fenton C, McCrea R, Griffiths RA, Adams S-L, Gray G, Garcia G, Cunningham AA. (2016). In-situ itraconazole treatment improves survival rate during an amphibian chytridiomycosis epidemic. *Biol. Conserv*, 195: 37-45.

Jones MEB, Paddock D, Bender L, Allen JL, Schrenzel MD, Pessier AP. (2012). Treatment of chytridiomycosis with reduced-dose itraconazole. *Dis. Aquat. Org*, 99: 243–249.

Kieran AB, Clare FC, O’Hanlon S, Bosch J, Brookes L, Hopkins K, Mclaughlin E, Daniel O, Garner TWJ, Fisher MC, Harrison XA. (2018). Amphibian chytridiomycosis outbreak dynamics are linked with host skin bacterial community structure. *Nat. Commun*, 9: 693.

Kilpatrick AM, Briggs CJ, Daszak P. (2009). The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends Ecol. Evol*, 25: 109-118.

Köhler HR, Triebkorn R. (2013). Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science*, 341: 759-765.

### ***Intervención en hábitat consigue éxito temporal reduciendo niveles de Bd***

Martel A, Van Rooij P, Vercauteren G, Baert K, Van Waeyenberghe L, Debacker P, Garner TWJ, Woeltjes T, Ducatelle R, Haesebrouck F, Pasmans F. (2011). Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Med. Mycol*, 49: 143–149.

Martín-Sánchez PM, Nováková A, Bastian F, Alabouvette C, Saíz-Jiménez, C. (2012). Use of biocides for the control of fungal outbreaks in subterranean environments: the case of the Lascaux cave in France. *Environ. Sci. Technol*, 46: 3762–3770.

Peay S, Johnse SI, Bean CW, Edsman L. (2019). Biocide treatment of invasive signal crayfish: successes, failures and lessons learned. *Diversity*, 11: 29.

Piotrowski JS, Annis SL, Longcore JE. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96: 9–15.

Puschendorf R, Hoskin CJ, Cashins SD, McDonald K, Skerratt LF, Vanderwal J, Alford RA. (2011). Environmental refuge from disease-driven amphibian extinction. *Conserv. Biol*, 25: 956–964.

Raffel TR, Michel PJ, Sites EW, Rohr JR. (2010). What drives chytrid infections in newt populations? associations with substrate, temperature, and shade. *Ecohealth*, 7: 526–536.

Scheele BC, Hunter DA, Grogan LF, Berger L, Kolby JE, McFadden MS, Marantelli G, Skerratt LF, Driscoll DA. (2014). Interventions for reducing extinction risk in chytridiomycosis-threatened amphibians. *Conserv. Biol*, 28: 1195–1205.

Scheele BC, Pasmans F, Skerratt LF, Berger L, Martel A, Beukema W, Acevedo AA, Burrowes PA, Carvalho T, Catenazzi A, De la Riva I, Fisher MC, Flechas SV, Foster CN, Frías-Álvarez P, Garner TWJ, Gratwicke B, Guayasamin JM, Hirschfeld M, Kolby JE, Kosch TA, La Marca E, Lindenmayer DB, Lips KR, Longo AV, Maneyro R, McDonald CA, Mendelson III J, Palacios-Rodriguez P, Parra-Olea G, Richards-Zawacki CL, Rödel MO, Rovito SM, Soto-Azat C, Toledo LF, Voyles J, Weldon C, Whitfield SM, Wilkinson M, Zamudio KR, Canessa S. (2019). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 363: 1459-1463.

Schmeller DS, Blooi M, Martel A, Garner TWJ, Fisher MC, Azemar F, Clare FC, Leclerc C, Jäger L, Guevara-Nieto M, Loyau A, Pasmans F. (2014). Microscopic aquatic predators strongly affect infection dynamics of a globally emerged pathogen. *Current Biol.*, 24: 176-180.

Skerratt LF, Berger L, Speare R, Cashins S, McDonald KR, Phillott AD, Hines HB, Kenyon N. (2007). Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *Ecohealth*, 4: 125-134.

Spitzen-van der Sluijs A, Martel A, Hallmann CA, Bosman W, Garner TWJ, Van Rooij P, Jooris R, Haesebrouck F, Pasmans F. (2014). Environmental determinants of recent endemism of *Batrachochytrium dendrobatidis* infections in amphibian assemblages in the absence of disease outbreaks. *Conserv. Biol.*, 28: 1302-1311.

Stegen G, Pasmans F, Schmidt BR, Rouffaer LO, 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.

Stevenson LA, Alford RA, Bell SC, Roznik EA, Berger L, Pike DA. (2013). Variation in thermal performance of a widespread pathogen, the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE*, 8: e73830.

Tobler U, Schmidt BR. (2010). Within- and among-population variation in chytridiomycosis-induced mortality in the toad *Alytes obstetricans*. *PLoS ONE*, 5: e10927.

Tobler U, Borgula A, Schmidt BR. (2012). Populations of a susceptible amphibian species can grow despite the presence of a pathogenic chytrid fungus. *PLoS ONE*, 7: e34667.

Vredenburg VT, Knapp RA, Tunstall TS, Briggs CJ. (2010). Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 9689–9694.

***Intervención en hábitat consigue éxito temporal reduciendo niveles de Bd***

Wobeser GA. (1994). Investigation and management of disease in wild animals. Plenum Press, New York. 265 pp.

Woodhams DC, Alford RA, Marantelli G. (2003). Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Dis. Aquat. Org*, 55: 65–67.

Woodhams DC, Bosch J, Briggs CJ, Cashins S, Davis LR, Lauer A, Muths E, Puschendorf R, Schmidt BR, Sheafor B, Voyles J. (2011). Mitigating amphibian disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. *Front. Zool*, 8: 1–23.



## CAPÍTULO 6

ELIMINACIÓN EXITOSA EN LA NATURALEZA DE UNA  
ENFERMEDAD INFECCIOSA LETAL PARA LA VIDA  
SILVESTRE

SUCCESSFUL ELIMINATION OF A LETHAL WILDLIFE  
INFECTIOUS DISEASE IN NATURE

Jaime Bosch<sup>1</sup>, Eva Sanchez-Tomé<sup>1</sup>, Andrés Fernández-Loras<sup>1</sup>, Joan A. Oliver<sup>2</sup>,  
Matthew C. Fisher<sup>3</sup>, Trenton W.J. Garner<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC, José Gutiérrez Abascal, 2, 28006 Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Conselleria de Medi Ambient i Mobilitat, Govern de les Illes Balears, Gremi Corredors, 10, Polígon Son Rossinyol, 07009 Palma, Spain.

<sup>3</sup> Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College London, St Mary's Hospital, Norfolk Place, London W2 1PG, UK.

<sup>4</sup> Institute of Zoology, Regent's Park, London NW1 4RY, UK.

Bosch et al. (2015). *Biology Letters*.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2015.0874>



# ELIMINACIÓN EXITOSA EN LA NATURALEZA DE UNA ENFERMEDAD INFECCIOSA LETAL PARA LA VIDA SILVESTRE

## RESUMEN

Se necesitan urgentemente métodos que puedan mitigar los impactos de las enfermedades infecciosas emergentes que están afectando a la vida silvestre y combatir la pérdida de biodiversidad. Sin embargo, raramente se ha llevado a cabo de manera exitosa una mitigación *in situ* de algún patógeno que afecte a la vida silvestre. De hecho, muchas de las estrategias existentes para combatir este tipo de enfermedades permanecen en el plano teórico, a pesar de la gran cantidad de información disponible para luchar frente a las infecciones del ganado o los cultivos. En este estudio, mostramos el resultado de un esfuerzo de cinco años de duración para eliminar la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) de un sistema isleño habitado por un único hospedador anfibio. Nuestros esfuerzos iniciales para eliminar la infección de los reservorios larvarios, a través de la aplicación directa de un tratamiento antifúngico *ex situ* obtuvieron resultados positivos, aunque la infección retornó a sus niveles previos cuando las larvas libres de la infección fueron devueltas a sus localizaciones de origen. En consecuencia, se combinaron los tratamientos antifúngicos en las larvas con la aplicación de desinfectantes químicos en el medio. En cuatro de los cinco puntos de agua en los que se había detectado previamente, la infección fue erradicada. Y permaneció así durante los dos años siguientes a la intervención.

## **SUCCESSFUL ELIMINATION OF A LETHAL WILDLIFE INFECTIOUS DISEASE IN NATURE**

### **ABSTRACT**

Methods to mitigate the impacts of emerging infectious diseases affecting wildlife are urgently needed to combat loss of biodiversity. However, the successful mitigation of wildlife pathogens *in situ* has rarely occurred. Indeed, most strategies for combating wildlife diseases remain theoretical, despite the wealth of information available for combating infections in livestock and crops. Here, we report the outcome of a 5-year effort to eliminate infection with *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) affecting an island system with a single amphibian host. Our initial efforts to eliminate infection in the larval reservoir using a direct application of an antifungal were successful *ex situ* but infection returned to previous levels when tadpoles with cleared infections were returned to their natal sites. We subsequently combined antifungal treatment of tadpoles with environmental chemical disinfection. Infection at four of the five pools where infection had previously been recorded was eradicated, and remained so for 2 years post-application.

## INTRODUCTION

Emerging infections are on the increase, incurring extraordinary economic and health costs and globally degrading our natural capital. In response, several efforts to eradicate animal pathogens are underway, however with few successes reported (Wobeser. 2002; Mariner et al. 2012). Research on livestock pathogens predominates and provides insight as to how pure wildlife pathogens may be combated for host conservation purposes (Wobeser. 2002; Mariner et al. 2012). Delivery of an efficient and practical intervention is a cornerstone of any scheme to eliminate infectious diseases, and the direct application of antimicrobials to infected hosts or immunization can be used effectively to control pathogen replication within a host and to reduce the likelihood of transmission to susceptible individuals (Rosatte et al. 1992). However, for these types of interventions to be effective, control of environmental reservoirs of (re)infection must also be achieved. Local control of pathogens through the use of environmental chemical treatments has been effectively used to disinfect areas where environmental transmission of parasites can occur, but the impact of chemical treatment on transmission and maintenance of infection in concert with antimicrobial treatments has rarely been examined (Skrjabin. 1970).

Amphibian chytridiomycosis, a disease predominantly caused by the aquatic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) has driven population declines, local extirpations and species extinctions across five continents (Fisher et al. 2009). The pathogen is an extreme generalist, infecting over 700 amphibian species (<http://www.bdmmaps.net>). Strategies developed to ameliorate the impacts of chytridiomycosis are predominantly geared towards disease-free maintenance of captive assurance colonies, and multiple methods have been developed to treat captive amphibians against infection with *Bd* (Garner et al. 2009; Martel et al. 2011; Scheele et al. 2014); however, most attempts at immunization have failed

(Stice & Briggs 2010). The remaining approaches that hold promise for *in situ* control include bioaugmentation with bacteria, direct application of antifungal drugs and environmental application of anti-*Bd* chemicals. Although not without promise, research on the application of bioaugmentation so far describes complex interactions between host, beneficial bacteria, the broader microbiota and pathogen that are strongly dependent upon environmental context and amphibian community structure (Kueneman et al. 2014; Michaels et al. 2014). For this reason, bioaugmentation strategies are unlikely to converge on an intervention that can be generalized across amphibian communities and ecosystems. The immediacy of the epizootic of chytridiomycosis calls for an intervention that can be applied across systems, so we chose to explore direct application of antifungal drugs to infected hosts and environmental application of chemicals as strategies to eliminate *Bd* from a simple, single host system (Walker et al. 2008).

## MATERIALS AND METHODS

Biannual surveys at five permanent ponds (3 x Torrent des Ferrerets, 2 x Cocó de sa Bova; Mallorca, Spain) were undertaken from 2008 and are ongoing. We sampled Mallorcan midwife toad (*Alytes muletensis*) tadpoles, as terrestrial stages are rarely captured as they take refuge in inaccessible locations. Tadpoles of this and other *Alytes* sp. are recognized as reservoirs of infection (Walker et al. 2010; Baláz et al. 2014). To sample, we swabbed tadpole mouthparts following established protocols (Walker et al. 2008; Walker et al. 2010). All ponds affected by chytridiomycosis on the island were included in the study and none was left as untreated controls owing to conservation requirements. However, chemical disinfection efforts at Torrent de Ferrerets preceded those at Cocó de sa Bova, affording us the opportunity to compare across sites.

### ***Eliminación exitosa de Bd en la naturaleza***

Swabs were processed according to standard extraction and quantitative PCR (qPCR) methods (Boyle et al. 2004) in duplicate and run against negative controls and positive controls (0.1, 1, 10 and 100 zoospore genomic equivalents, GE).

For antifungal treatments, tadpoles were collected and transported in plastic bottles containing pond water. We used air pumps and tubes with aeration stones to ensure tadpole survival during the outward hikes. Tadpoles were then transported to the laboratory and kept in several cooled, glass aquaria. All tadpoles were bathed daily for 7 days in aged tapwater containing 1.0 mg l<sup>-1</sup> itraconazole (Sporanox, Janssen-Cilag Inc.) and returned to aquaria after each treatment. Aquaria water was replaced every day during the 7 days treatment. After treatment, tadpoles were returned to the collection sites by helicopter, either immediately if ponds were not drained or after ponds were refilled by autumn rain. In these cases, subsets of 40 tadpoles from each aquarium were swab-sampled 15 days post-treatment.

Environmental disinfection was done using Virkon S (DuPont Inc.) at 1% final concentration and a single application applied ad libitum to the environment. The disinfectant was liberally applied to all rock, gravel, crevice and vegetated areas that surrounded the immediate environs of each breeding site.

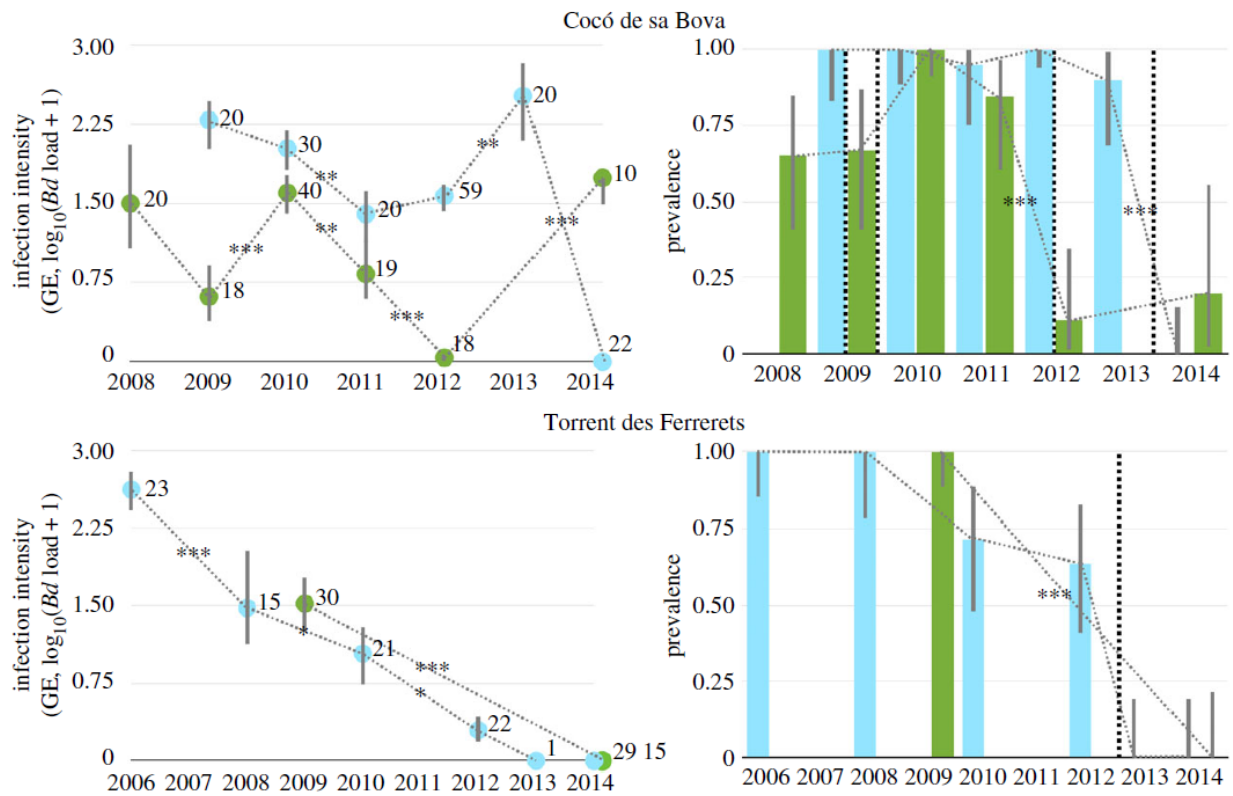
## **RESULTS**

We initially attempted mitigation by treating in 2009 *A. muletensis* tadpoles inhabiting two permanent pond sites in one of the two infected drainages, Cócó de sa Bova, with the antifungal itraconazole. We used a treatment protocol previously shown to eliminate infection in tadpoles (Garner et al. 2009). Treatments were applied *ex situ*, and prior to post-treatment release the two ponds were completely

drained of water and naturally dried by the arid environment that typifies Mallorca. We had previously determined that *Bd* is absent from the other two ephemeral water bodies in this drainage, and environmental *Bd* is not thought to persist during periods of drying (Johnson et al. 2003). The two ponds naturally refilled during the autumn rainy season. At no point during this prolonged period of captivity did we detect any evidence of infection in the treated tadpoles. The following spring, qPCR analysis showed that all treated animals had contracted infections not significantly different from what had been recorded at the location before treatment (Lubick. 2010) (Figure 1). Repeating the protocol in the spring of 2012, this time without draining the breeding sites, and with tadpole release only 7 days after treatment, was again not associated with reduction in the prevalence of infection or reduced burdens of infection in the following spring (Figure 1).

In contrast, at three breeding sites used by the species in the second drainage, Torrent des Ferrerets, we could not detect infection in any animals sampled in 2013 after treatment of tadpoles and whatever terrestrial *A. muletensis* life stages we could capture with itraconazole, draining the sites and then treating the environment with Virkon S. Replication of this protocol at Cocó de sa Bova in 2013 and application of Virkon S solution to the rock crevices located around the ponds where metamorphosed *A. muletensis* reside again cleared infection in the larger population of tadpoles resident in the larger pond at this location. Residual infection was detected in tadpoles occupying the smaller permanent pond site. Data from samples taken at Torrent des Ferrerets 2 years after chemical disinfection showed that the effect of environmental application of Virkon S twinned with itraconazole treatment of tadpoles carried over across years, as again no evidence of infection was detected in 2014 (Figure 1).

## Eliminación exitosa de *Bd* en la naturaleza



**Figure 1.** Infection intensity (left panels; mean  $\pm$  95% CI by the bias-corrected and accelerated BCa method with 2000 bootstrap replications) and prevalence (on the right; mean  $\pm$  95% Clopper–Pearson CI) over two pond sites at the Cocó de sa Bova (combined in top panels) and three at the Torrent des Ferrerets (combined in bottom panels), over the course of the study. Blue (light colour) shows values derived from spring sampling, green (darker colour) for summer. Pairwise comparisons (Wilcoxon signed-rank tests for infection intensities and Fisher exact tests for prevalence) are represented by dashed lines and significant differences represented with asterisks (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ ) after a sequential Bonferroni adjustment. Sample sizes are shown in left panels. Dashed vertical lines in right panels indicate when treatments were implemented.

## DISCUSSION

We cannot say with certainty why direct treatment of tadpoles with antifungals without environmental disinfection failed to resolve infection at Cocó

de sa Bova, but the most likely explanation is that infection reinvaded tadpoles from post-metamorphic animals that we could not access in their terrestrial refuges. We do occasionally discover corpses of juveniles exhibiting a strong molecular signal of infection. Like other amphibian species, *Alytes* spp. tadpoles scavenge from corpses, and this process is presumed to be a factor in transmission of *Bd* from corpses to tadpoles in another species (Peaman et al. 2004; Bielby et al. 2009). Irrespective of this, our application of Virkon S at Torrent des Ferrerets provided proof-of-principle that environmental application of fungicides and other chemical treatments may be a better approach when combined with antimicrobial treatment of infected hosts. This initial conclusion was reinforced when we recapitulated our result by clearing infection in Cocó de sa Bova the following year. In our case, combining chemical disinfection twinned with antifungal treatment of tadpoles proved the better strategy, eliminating infection and preventing spill-back over the short term at four of the five pools where we attempted mitigation.

The development of disinfection strategies alone cannot eliminate the threat of chytridiomycosis, as evidence continues to accumulate that lethal amphibian-associated chytrid fungi are frequently being introduced into Europe and beyond (Walker et al. 2008; Martel et al. 2014). Clearing site-level infection is no guarantee against pathogen reintroduction or the introduction of novel pathogens. However, to cope with the existing, recurring and future threats of chytridiomycosis, rapid response strategies require cheap, simple and transferable methods for mitigating infection that can be employed as soon as the threat has been identified. We acknowledge that Virkon S is a controversial chemical to use environmentally and our use of it was driven by the urgency of midwife decline on Mallorca (Doddington et al. 2013). Virkon S is only one of several chemical treatments known to have antifungal properties against chytrid fungi (Schmidt et al. 2009; Hanlon et al. 2012) and antifungal treatments do not require extensive investment in time and effort. We argue that research informing efforts to combat chytridiomycosis should include in-depth investigations of the impact of

### ***Eliminación exitosa de Bd en la naturaleza***

antifungals and anti-*Bd* chemicals on amphibian health without discarding attempts to develop immunization and other methods of disease control. Research on the application of these chemicals for control of wildlife diseases must also include investigation of the potential impacts of chemical application to other biodiversity, the environment and associated ecosystem services.

## REFERENCES

Baláz V, Vörös J, Civis P, Vojar J, Hettyey A, Sos E, Dankovics R, Jehle R, Christiansen DG, Clare F, Fisher MC, Garner TWJ, Bielby J. (2014). Assessing risk and guidance on monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Europe through identification of taxonomic selectivity of infection. *Conserv. Biol*, 28: 213–223. doi: 10.1111/cobi.12128

Bielby J, Bovero S, Sotgiu G, Tessa G, Favelli M, Angelini C, Doglio S, Clare FC, Gazzaniga E, Lapietra F, Garner TWJ. (2009). Fatal chytridiomycosis in the Tyrrhenian painted frog. *Ecohealth*, 6: 27–32. doi: 10.1007/s10393-009-0232-2

Boyle DG, Boyle DB, Olsen V, Morgan JAT, Hyatt AD. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis. Aquat. Org*, 60: 141–148. doi: 10.3354/dao060141

Doddington BJ, Bosch J, Oliver JA, Grassly NC, García G, Benedikt RS, Garner TWJ, Fisher MC. (2013). Context-dependent amphibian host population response to an invading pathogen. *Ecology*, 98: 1795–1804. doi: 10.1890/12-1270.1

Fisher MC, Garner TWJ, Walker SF. (2009). The global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in space, time and host. *Annu. Rev. Micro*, 63: 291–310. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073435

Garner TWJ, Garcia G, Carroll B, Fisher MC. (2009). Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Dis. Aquat. Org*, 83: 257–260. doi: 10.3354/dao02008

Hanlon SM, Kerby JL, Parris MJ. (2012). Unlikely remedy: fungicide clears infection from pathogenic fungus in larval southern leopard frogs (*Lithobates sphenoccephalus*). *PLoS ONE*, 7: e43573. doi: 10.1371/journal.pone.0043573

## ***Eliminación exitosa de Bd en la naturaleza***

Johnson M, Berger L, Philips L, Speare R. (2003). Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Org*, 57: 255–260. doi: 10.3354/dao057255

Kueneman JG, Parfrey LW, Woodhams DC, Archer HM, Knight R, McKenzie VJ. (2014). The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. *Mol. Ecol*, 23: 1238–1250. doi: 10.1111/mec.12510

Lubick N. (2010). Emergency medicine for frogs. *Nature*, 465: 680–681. doi: 10.1038/465680a

Mariner JC, House JA, Mebus CA, Sollod AE, Chibeu D, Jones BA, Roeder PL, Admassu B, van't Klooster GGM. (2012). Rinderpest eradication: appropriate technology and social innovations. *Science*, 337: 1309–1312. doi: 10.1126/science.1223805

Martel A, Van Rooij P, Vercauteren G, Baert K, Van Waeyenberghe L, Debacker P, Garner TWJ, Woeltjes T, Ducatelle R, Haesebrouck F, Pasmans F. (2011). Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Medical Mycology*, 49: 143-149. doi: 10.3109/13693786.2010.508185

Martel A, Blooi M, Adriaensen C, Van Rooij P, Beukema W, Fisher MC, Farrer RA, Schmidt BR, Tobler U, Goka K, Lips KR, Muletz C, Zamudio KR, Bosch J, Wombwell E, Garner TWJ, Cunningham AA, Spitzen-van der Sluijs A, Salvidio S, Ducatelle R, Nishikawa K, Nguyen TT, Kolby JE, Van Boclaer I, Bossuyt F, Pasmans F. (2014). Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science*, 346: 630–631. doi: 10.1126/science.1258268

Michaels CJ, Antwis RE, Preziosi RF. (2014). Impact of plant cover on fitness and behavioural traits of captive red-eyed tree frogs (*Agalychnis callidryas*). *PLoS ONE*, 9: e95207. Doi: 10.1371/journal.pone.0095207

Pearman PB, Garner TWJ, Straub M, Greber UF. (2004). Response of the Italian agile frog *Rana latastei* to a Ranavirus, frog virus 3: a model for viral emergence in a naïve population. *J. Wildl. Dis*, 40: 600–609. doi: 10.7589/0090-3558-40.4.660

Rosatte RC, Power MJ, MacInnes CD, Campbell JD. (1992). Trap-vaccinate: release and oral vaccination for rabies control in urban skunks, raccoons and foxes. *J. Wildl. Dis*, 28: 562–571. doi: 10.7589/0090-3558-28.4.562

Scheele BC, Hunter DA, Grogan LF, Berger L, Kolby JE, McFadden MS, Marantelli G, Skerratt LF, Driscoll DA. (2014). Interventions for reducing extinction risk in chytridiomycosis-threatened amphibians. *Conserv. Biol*, 28: 1195–1205. doi: 10.1111/cobi.12322

Schmidt BR, Geiser C, Peyer N, Keller N, von Rütte M. (2009). Assessing whether disinfectants against the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* have negative effects on tadpoles and zooplankton. *Amphibia-Reptilia*, 30: 313–319. doi:10.1163/156853809788795245

Skrjabin KI. (1970). Preventative measures against the spreading of helminthiasis among game animals. *Trans. Int. Congr. Game Biol*, 9: 54.

Stice MJ, Briggs CJ. (2010). Immunization is ineffective at preventing infection and mortality due to the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *J. Wildl. Dis*, 46: 70–77. doi:10.7589/0090-3558-46.1.70

Walker SF, Bosch J, James TY, Litvintseva AP, Valls JAO, Piña S, Garcia G, Rosa GA, Cunningham AA, Hole S, Griffiths R, Fisher MC. (2008). Invasive pathogens threaten species recovery programs. *Curr. Biol*, 18: R853-R854.

Walker SF, Bosch J, Gomez V, Cunningham AA, Schmeller DS, Ninyerola M, Henk D, Ginestet C, Arthur CP, Fisher MC. (2010). Factors driving pathogenicity vs prevalence of amphibian panzootic chytridiomycosis in Iberia. *Ecology Letters*, 13: 372-382. doi: 10.1111/j.1461-0248.2009.01434.x

Wobeser G. (2002). Disease management strategies for wildlife. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, 21: 159–178.



## **CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN INTEGRADORA**

## DISCUSIÓN INTEGRADORA

En la quitridiomycosis, como en cualquier otra enfermedad, se producen una serie de interacciones entre el agente patógeno y el hospedador. De este modo, ante las defensas desplegadas por este último, el patógeno también pone en marcha una serie de mecanismos que facilitan su ataque, dificultan su detección, y consiguen evitar las acciones preventivas del sistema inmune. En el caso de *Bd*, se ha demostrado que el agente fúngico secreta enzimas proteolíticas (proteasas) y lipasas que causan una rápida disrupción de las uniones intercelulares en la piel, lo que lleva a la muerte celular o apoptosis de esas células (Brutyn et al. 2012). Además de facilitarle así la colonización de la piel del anfibio afectado, enzimas como las metaloproteasas podrían contribuir a la virulencia mostrada por el hongo quitridio y al mismo tiempo, podrían ayudarle a la hora de evadir la respuesta inmune, como ya se ha observado que ocurre en el caso de otros patógenos fúngicos como *Coccidioides posadasii* (Hung et al. 2005).

Otro mecanismo que alteraría las funciones inmunitarias y causaría efectos perniciosos inmunosupresores sería la situación de estrés crónico que produce en los anfibios la infección por *Bd* (Grogan et al. 2018). Los glucocorticoides juegan un papel esencial en la regulación del sistema inmune anfibio, ya que determinan el número de leucocitos circulantes en sangre. El principal glucocorticoide anfibio, la corticosterona, ve incrementados sus niveles en situaciones de estrés o como consecuencia de sufrir una infección o padecer una enfermedad. La respuesta inmune anfibia ante una infección está modulada por el eje hipotalámico-hipofisario-interrenal (HHI), muy similar al eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) de los mamíferos. Cuando el eje HHI es activado y las glándulas interrenales son estimuladas, los niveles de glucocorticoides en sangre aumentan. Esta liberación inicial de corticosterona, ocasiona cambios fisiológicos, metabólicos y de comportamiento que preparan

## **Discusión Integradora**

al organismo para responder de una manera más adecuada frente al estrés o la acción de un patógeno, al activar el sistema inmunitario anfibio. Sin embargo, si la situación de estrés se prolonga o la enfermedad se vuelve crónica, el efecto de tener unos elevados niveles de corticosterona durante un largo periodo de tiempo se vuelve contraproducente y negativo para el sistema inmune, provocándose un estado de inmunosupresión. Es precisamente esto último lo que sucede con la infección por *Bd*. La quitridiomycosis produce un aumento crónico en los niveles de corticosterona y ésta a su vez, modula la respuesta inmune y altera el perfil leucocitario del hospedador. Produce también efectos subclínicos en los individuos infectados, que provocan un incremento adicional del estrés. En varias especies como la rana toro americana (*Lithobates catesbeianus*), la rana de Wilcox (*Litoria wilcoxii*) o la rana arborícola verde australiana (*Litoria caerulea*), se ha observado que esa alteración leucocitaria se traduce en un aumento de la ratio neutrófilos-linfocitos. Es decir, se incrementan los neutrófilos circulantes mientras descende el número de linfocitos (Davis et al. 2010; Kindermann et al. 2012; Peterson et al. 2013). Otro estudio ha demostrado la existencia de una asociación positiva entre el aumento en los niveles de corticosterona y la intensidad de la infección, dependiendo de la cepa del hongo quitridio que actúe. Gabor et al. (2013) mostraron que esa asociación se daba sólo en individuos de sapo partero común (*A. obstetricans*) infectados por la cepa hipervirulenta (*BdGPL*), pero no en individuos de sapo partero balear (*Alytes muletensis*) infectados por una cepa menos virulenta como es *BdCAPE*. Determinaron así, que los diferentes linajes del hongo quitridio causan distintos niveles de estrés en los anfibios que infectan.

Pero quizá el mecanismo de evasión puesto en marcha por el patógeno fúngico que tiene un efecto más directo sobre el sistema inmune del hospedador anfibio, consiste en la inhibición de la proliferación linfocitaria en células del bazo de distintas especies, y en su capacidad de alterar la regulación de la expresión de ciertos genes relacionados con la respuesta inmune. En su

estudio, Fites et al. (2013) pusieron de manifiesto que *Bd* es capaz de provocar la inhibición de funciones inmunitarias críticas, como la proliferación linfocitaria. El patógeno fúngico podría llegar a impedir la proliferación de linfocitos de forma dosis-dependiente en los esplenocitos (células del bazo). La causa detrás de esta inhibición a la proliferación linfocitaria podría ser la liberación por parte de *Bd* de factores solubles tóxicos, que se especula podrían provenir de su pared celular, y que impedirían la proliferación, conseguirían que los linfocitos no pudiesen desarrollar su función, e incluso causarían su muerte celular o apoptosis (Fites et al. 2013). En contraposición a este efecto sobre los linfocitos, se ha visto que las funciones de reconocimiento y fagocitosis de macrófagos o neutrófilos, componentes del sistema inmune innato, no se ven afectadas por la infección. Además de esta inhibición en la proliferación linfocitaria, otros estudios han demostrado la capacidad del hongo quitridio para alterar la expresión génica. En la rana de uñas tropical (*Silurana tropicalis*), una especie sensible a los efectos del hongo, se han observado tanto una regulación negativa de algunos marcadores del sistema inmune adquirido, como una regulación positiva de genes del sistema inmune innato después de una infección por *Bd*. La citada regulación positiva afecta a genes de péptidos antimicrobianos que operan en la piel anfibia, mientras que la regulación negativa acontece, aún encontrándose el hospedador dentro de su rango óptimo de temperatura, a nivel de marcadores genéticos en el bazo de linfocitos T y B, así como de factores del complemento (Ribas et al. 2009). En la misma línea, otro estudio detectó un efecto negativo en la expresión genética que afectaba también a genes de células hepáticas relacionados con el complemento inmunitario en *S. tropicalis*, así como también una regulación positiva en los genes que regulan el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés) (Rosenblum et al. 2009). Algo, esto último, que iría en consonancia con lo observado en un reciente estudio llevado a cabo con una especie sensible a la quitridiomycosis como es la rana de Yavapai (*Rana yavapaiensis*), en el que también se reveló la existencia de un aumento en la

## **Discusión Integradora**

expresión de los genes relativos al MHC Clase-II en especies sensibles, y no solo eso, sino que se estableció una correlación negativa entre ese aumento en la expresión de los marcadores genéticos del MHC Clase-II y la probabilidad de supervivencia anfibia al afrontar la infección por *Bd*. Algo que podría indicar que no siempre una regulación positiva de genes inmunitarios tiene efectos beneficiosos y que por el contrario, el incremento en la regulación génica de ciertos genes específicos del sistema inmune adquirido en las especies anfibias susceptibles a la enfermedad, puede llegar a producir efectos dañinos al hospedador (Savage et al. 2020). Todo esto, corrobora los hallazgos de otro estudio que concordaría con las investigaciones anteriormente reseñadas en que *Bd* provocaría una inmunosupresión a través de una regulación genética negativa en genes de células esplénicas que codifican la producción, diferenciación y maduración de linfocitos o del complemento inmunitario, y al mismo tiempo sería capaz de provocar un aumento generalizado en la expresión genética de genes en células de la piel anfibia, que regulan desde la producción de inmunoglobulinas o linfocitos T y B, al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), o la producción de algunas enzimas como la quitinasa, con un rol fundamental en la degradación de la pared celular fúngica (Ellison et al. 2014). Este incremento en las células dérmicas de la expresión génica, confirmado en una especie altamente sensible al hongo quitridio como es la rana dorada de Panamá (*Atelopus zeteki*), indicaría que algunas especies de anfibio, aún siendo sensibles al hongo, al ser infectadas por *Bd* son capaces de desplegar una respuesta inmune para tratar de hacer frente al patógeno (Ellison et al. 2014).

Como acabamos de reseñar, estas publicaciones parecen indicar que la respuesta inmune adquirida carece de eficacia, no se produce en cantidad suficiente para frenar la infección, y está afectada negativamente por el hongo quitridio (Ellison et al. 2014; Savage et al. 2020). Al mismo tiempo, el importante papel que podrían desempeñar los péptidos antimicrobianos (AMPs) para evitar la colonización dérmica por parte del hongo quitridio, o el

aumento en la regulación génica en las células de la piel donde se produce la infección fúngica (Ribas et al. 2009; Ellison et al. 2014), son elementos que parecen resaltar la importancia de la respuesta inmune innata, sobre todo si es una respuesta temprana. Estas investigaciones podrían explicar porqué este patógeno fúngico, dada su aparente capacidad para inhibir al sistema inmune adquirido, puede llegar a ser tan letal para aquellas especies de anfibio que, al carecer de un sistema innato robusto, eficiente y capaz de hacer frente al hongo, mostrarán una mayor susceptibilidad a la infección fúngica (Fites et al. 2013; Grogan et al. 2018). Esto concordaría con los resultados obtenidos en la presente tesis, que muestra en su Capítulo 2 como la exposición a *Bd* de larvas pertenecientes a una especie sensible como *A. obstetricans*, influye en el normal desarrollo de su sistema inmune adquirido, y conlleva una disminución significativa en los niveles circulantes en sangre de inmunoglobulinas (IgM e IgY) una vez que esas larvas han superado la metamorfosis y se han convertido en juveniles.

A lo largo de estos años de investigación se han utilizado, bajo condiciones controladas de cautividad, tratamientos que son efectivos contra la enfermedad, como pueden ser productos farmacológicos que gracias a sus efectos antifúngicos se han empleado para intentar eliminar al hongo quitridio. Dentro de esta categoría encontramos al itraconazol, el antifúngico que se ha utilizado más frecuentemente dadas las múltiples ventajas que presenta. Entre ellas, estaría el poco tiempo necesario para dispensar el tratamiento a través de baños diarios de pocos minutos con soluciones del producto a diferentes concentraciones. Otras ventajas giran en torno a su tolerancia, pues parece ser bien tolerado por la mayoría de especies en las que se ha utilizado, y no presenta grandes riesgos para la salud humana a la hora de su manejo para la aplicación. Una posible ventaja más es que, al menos en mamíferos, se ha documentado que el itraconazol se acumula y persiste en las células queratinizadas de los tejidos. Esto último todavía no se ha probado en

## **Discusión Integradora**

anfibios, pero podría ser de gran ayuda para tratar una enfermedad como la quitridiomycosis, que está causada por un hongo quitridio que precisamente se localiza exclusivamente en este tipo de células (Pessier & Mendelson 2010). Se han detectado sin embargo también, inconvenientes que desaconsejan su uso para tratar según qué cepas de *Bd*, sobre todo en los estadios larvarios. Existen ya casos en los que el uso de itraconazol para tratar la enfermedad en larvas y en animales recién metamorfoseados, utilizando concentraciones seguras en adultos, ha resultado en episodios de toxicidad e incluso mortalidad (Pessier & Mendelson 2010; Baitchman & Pessier 2013). La solución oral del fármaco que se comercializa, además de tener un alto coste económico, es muy ácida (pH=2), ya que contiene ácido clorhídrico (Nichols & Lamirande 2001). Dado que el producto se administra a través de baños diarios en una solución con una concentración determinada, esta acidez puede llegar a ocasionar irritación cutánea en los anfibios y también, una disfunción osmótica en animales que como ya hemos visto, debido a la fisiopatología de la enfermedad que padecen, tienen de hecho esa función osmótica comprometida (Pessier & Mendelson 2010). Pero sus efectos secundarios no terminan ahí. En mamíferos, son varios los estudios que han detectado un descenso en los niveles de potasio en sangre (hipopotasemia o hipokalemia), y una hepatotoxicidad en humanos que reciben tratamientos crónicos, que ocasiona un aumento de las enzimas hepáticas (Tucker et al. 1990; Collazos et al. 1995). En roedores, se observaron extensos daños a nivel hepático como pueden ser necrosis hepatocelular, degeneración, hiperplasia del conducto biliar y cirrosis biliar causados por un tratamiento prolongado con itraconazol (Somchit et al. 2004). Estas afecciones hepáticas se han encontrado también en el caso de anfibios tratados con este fármaco. En el transcurso de un tratamiento experimental frente a *Bd* realizado con larvas de sapo partero balear (*A. muletensis*), se observó una depigmentación en los renacuajos tratados. Esta pérdida de pigmento puede ser indicativa de un fallo en la producción de melanina y de toxicidad a nivel hepático, ya que la melanina se produce entre otras, en las células de Kupffer

localizadas en el hígado de los anfibios (Garner et al. 2009). También en anfibios, otro estudio ha revelado que el uso de itraconazol en metamorfos puede llegar a ocasionar inmunosupresión, y a aumentar las probabilidades de muerte de los individuos tratados si posteriormente al tratamiento se les somete a un estrés térmico. El itraconazol podría tener así efectos secundarios que se mostrarían sólo en caso de estar sometidos los individuos a unas condiciones estresantes. Este estudio pone de manifiesto además, que el itraconazol quizá no debería ser el fármaco de elección para el tratamiento de la quitridiomycosis en anfibios dentro de programas de cría en cautividad y reintroducción, o en aquellos que intentan mitigar los efectos de la enfermedad, ya que al causar una inmunosupresión, estaría favoreciendo y aumentando las probabilidades de reinfección de los animales por parte del hongo quitridio (Loyau et al. 2016).

Debido a estos problemas de toxicidad y todos los efectos secundarios presentados por el itraconazol, se ha comenzado a utilizar de forma más reciente otro fármaco perteneciente a la familia de los triazoles, el voriconazol. Este antifúngico es un triazol sistémico de segunda generación que, de acuerdo a los estudios que se han realizado hasta el momento, parece ser efectivo a la hora de eliminar la infección por *Bd* y no originar ninguno de los efectos adversos del itraconazol en los estadios larvarios anfibios (Martel et al. 2011). Igualmente, en cuanto a productos antifúngicos se refiere, se ha utilizado también el metil tiofanato. Este fungicida es un pesticida utilizado mayoritariamente contra los hongos micorrízicos. Un estudio demostró su eficacia a la hora de tratar la quitridiomycosis en larvas de *L. sphenoccephalus* sin que se detectara ningún tipo de toxicidad o de efecto secundario adverso. Es más, se observó un aumento en la masa y el tamaño de las larvas tratadas (Hanlon et al. 2012). Como hemos visto, han sido diferentes los productos que se han probado y que podrían hacer frente a la quitridiomycosis sirviendo como tratamiento de la misma. Aunque en la actualidad, a pesar de la toxicidad y los efectos secundarios nocivos mostrados por el itraconazol, éste

## ***Discusión Integradora***

sigue siendo el fármaco antifúngico de elección debido a su exitoso historial clínico.

Un factor muy importante a tener en cuenta es que la efectividad de los tratamientos depende en gran medida de la cepa del hongo quitridio que se esté enfrentando, así como de la intensidad de la infección y la carga fúngica que esté soportando el hospedador. De esta manera, nos encontramos con que, tal y como ilustra el estudio presentado en el Capítulo 3 de esta tesis doctoral, el tratamiento con itraconazol de larvas de sapo partero común (*A. obstetricans*) infectadas naturalmente con la cepa hipervirulenta del hongo quitridio (*BdGPL*), no sólo no es efectivo, sino que puede tener consecuencias fatales para las larvas tratadas. De hecho, la utilización de concentraciones de itraconazol por encima de un determinado nivel para intentar limpiar completamente a las larvas, tiene efectos negativos muy significativos en la propia supervivencia post-tratamiento de esas mismas larvas.

Es por esa razón, que también en el Capítulo 3 de la presente tesis, se tratan de explorar nuevas vías de tratamiento utilizando fármacos ya conocidos. Nuevas posibilidades que podrían permitir, gracias a la sinergia entre fármacos antifúngicos y a su combinación, eliminar las cepas más virulentas y resistentes del patógeno fúngico utilizando para ello concentraciones más reducidas, disminuyendo así la aparición en los anfibios de efectos contraproducentes durante los tratamientos contra la enfermedad (Kirkpatrick et al. 2002; Baitchman & Pessier 2013). Lamentablemente, como se constata al analizar los resultados del estudio, la combinación de dos productos como son el itraconazol y el metil tiofanato no obtiene tampoco los resultados esperados, y no es efectiva a la hora de tratar los estadios larvarios de *A. obstetricans* frente a *BdGPL*.

La susceptibilidad del hongo quitridio a un incremento de las temperaturas ha sido ya puesta de manifiesto. En cultivos laboratoriales, se ha

visto que *Bd* es capaz de crecer, aunque lentamente, a temperaturas por debajo de su rango térmico óptimo. Del mismo modo se ha observado que su tasa reproductiva es mínima por encima de los 25°C, y que su crecimiento se paraliza a los 29°C (Stevenson et al. 2013). Se ha comprobado también, siempre en condiciones de laboratorio, que temperaturas por encima de los 30°C provocan su muerte (Piotrowski et al. 2004). Respecto al rango térmico óptimo del patógeno hay ciertas discordancias, puesto que mientras algunos autores lo sitúan entre los 17-25°C (Piotrowski et al. 2004), hay otros que fijan ese rango a menor temperatura, entre los 13-15°C (Stevenson et al. 2013). Estas variaciones no obstante, podrían deberse a la capacidad exhibida por *Bd* de ofrecer respuestas adaptativas locales a diferentes regímenes térmicos (Stevenson et al. 2013). La sensibilidad, en condiciones de laboratorio, mostrada por el hongo quitridio a un incremento térmico unido a que, como ya hemos visto, la temperatura posee una gran influencia sobre el sistema inmune anfibio, potenciándolo a medida que aumenta (Fisher et al. 2007; Murphy et al. 2011), ha precipitado el desarrollo de tratamientos que no precisan del uso de ningún antifúngico, sino que están basados exclusivamente en un aumento de este factor ambiental (Figura 1). De esta manera, se ha conseguido limpiar completamente de la infección a juveniles de la rana arborícola de ojos rojos australiana (*Litoria chloris*), sometiéndolos a una acusada elevación de la temperatura hasta los 37°C durante 16 horas (Woodhams et al. 2003). Siguiendo esta misma línea, se consiguió un éxito por encima del 95% en el tratamiento de individuos adultos de rana toro americana (*Lithobates catesbeianus*) y de rana grillo norteña (*Acris crepitans*), al mantenerlos durante diez días a temperaturas de 30°C (Chatfield & Richards-Zawacki 2011). La temperatura se ha utilizado también con funciones terapéuticas en larvas de sapo partero común (*A. obstetricans*). Geiger et al. (2011) no consiguieron la eliminación completa de la cepa hipovirulenta suiza del hongo (*BdCH*), pero sí que un elevado porcentaje de

## Discusión Integradora

hasta un 90% de animales, perdieran la infección tras un tratamiento consistente en exponer a las larvas a una media de 29,7°C durante 59 horas.



**Figura 1.** Centro de Cría en Cautividad de Anfibios Amenazados de la Sierra de Guadarrama (izda). Tratamiento con temperatura aplicado a larvas de *A. obstetricans* (dcha) como parte de un estudio de esta Tesis Doctoral (Capítulo 2).

Una importante consecuencia del calentamiento global que podríamos reseñar, es el hecho de que un aumento generalizado de las temperaturas hará que los organismos tengan que soportar situaciones térmicas cada vez más cercanas a su umbral térmico máximo (CTmax), punto térmico en el cual se alcanzan unas temperaturas críticas máximas que provocan un desequilibrio en el animal con consecuencias letales si se mantienen en el tiempo. Se define

tolerancia térmica de una especie a la diferencia existente entre su umbral térmico máximo (CT<sub>max</sub>) y la temperatura ambiental máxima (T<sub>max</sub>) (Duarte et al. 2012; Greenspan et al. 2017). Así, las especies anfibias de regiones tropicales presentan una tolerancia térmica reducida, debido a que la temperatura ambiental está ya muy cerca de sus límites térmicos máximos, haciendo que estas especies estén sujetas a declives o extinciones locales si las temperaturas aumentan por encima de ese umbral térmico máximo (CT<sub>max</sub>). Esta delicada situación, se vería acentuada en aquellas especies anfibias tropicales de montaña adaptadas a regímenes térmicos bajos, que además del calentamiento global sufrieran los efectos de la quitridiomycosis, ya que se ha comprobado que estas dos amenazas podrían actuar de manera sinérgica (Neely et al. 2020). Por otra parte, las especies anfibias de zonas templadas estarían relativamente seguras frente a los impactos ocasionados por el aumento global de las temperaturas, ya que su tolerancia térmica es mayor. No obstante, la previsión ya mencionada de que las tasas de calentamiento vayan a ser mayores en las regiones templadas, hace que la vulnerabilidad de las especies anfibias que habitan estas zonas frente al calentamiento global se vea incrementada (Duarte et al. 2012). Adicionalmente, se ha comprobado que *Bd* podría llegar a conseguir alterar la fisiología térmica de su hospedador y reducir su umbral térmico máximo (CT<sub>max</sub>) hasta en 4°C (Greenspan et al. 2017). Este aumento en la sensibilidad a las altas temperaturas que se da en los anfibios infectados, puede hacer que el hospedador no sea tan proclive a seguir comportamientos protectores que incrementen su temperatura corporal (fiebre comportamental), lo que acaba favoreciendo al patógeno. Y al mismo tiempo, reduciría significativamente los rangos de seguridad térmicos de las especies, dejando a los individuos y poblaciones más expuestos a sufrir los efectos del calentamiento global (Greenspan et al. 2017). Los resultados obtenidos con larvas de *A. obstetricans* infectadas por *Bd* y presentados dentro de esta tesis doctoral (Capítulo 4), corroborarían este fenómeno originado por

## **Discusión Integradora**

el hongo quitridio de alteración de la fisiología térmica de su hospedador y reducción de las temperaturas máximas toleradas.

El citado estudio desarrollado en el Capítulo 4 de la presente tesis demuestra como *Bd*, al ser capaz de alterar la fisiología térmica de las larvas de *A. obstetricans* y disminuir su umbral térmico máximo (CTmax), posee el potencial de dejar a esta especie anfibia más expuesta a sufrir declives en el escenario de calentamiento global actual. El estudio también muestra como la capacidad de resistencia del hongo a las altas temperaturas aumenta en el medio natural cuando infecta a su hospedador objetivo, ya que temperaturas muy por encima de los 30°C no consiguen limpiar a *A. obstetricans* de la infección.

El mundo globalizado en el que vivimos ha supuesto un significativo aumento en el tránsito tanto de bienes como de personas. El transporte y el comercio, en muchas ocasiones ilegal, de especies animales, está intensificando la dispersión de patógenos. Esto implica también un aumento en la dificultad a la hora de controlar o prevenir la transmisión de enfermedades (Fisher et al 2012; Hudson et al. 2016). Más tarde o más temprano patógenos como *Bd* acaban llegando a localizaciones en las que entran en contacto con hospedadores por vez primera, y dan lugar a brotes epidémicos causando graves daños y marcados declives en las poblaciones afectadas.

En los dos últimos capítulos de la presente tesis doctoral, se han descrito dos de los escasos métodos de mitigación que se han puesto hasta el momento en marcha directamente en el medio natural, con el objetivo de reducir la presencia o eliminar completamente al hongo quitridio del entorno, y conseguir así la desaparición a su vez de los efectos que éste produce sobre los anfibios.

El primero de estos ejemplos se basa en la manipulación y en la implementación de cambios en las condiciones del entorno para intentar conseguir deshacernos de la presencia del patógeno fúngico en el medio. Es la estrategia de mitigación que se llevó a cabo en Teruel como parte de una serie de tratamientos de mitigación experimentales *in situ*, aplicados en distintas poblaciones de sapo partero común (*A. obstetricans*) infectadas con la cepa hipervirulenta *BdGPL*. El estudio y los resultados obtenidos, que son descritos en el Capítulo 5 de la presente tesis doctoral, muestran como, evitando el uso de desinfectantes químicos y combinando una disminución en la densidad poblacional del hospedador, junto con una modificación del hábitat consistente en el completo secado de los puntos de agua durante al menos 20 días (Figura 2), se consigue reducir significativamente la presencia del patógeno e incluso se llega a eliminar, no de forma permanente pero sí por un periodo prolongado de dos o tres años, a *Bd* del medio. A pesar de que estudios recientes han comprobado que una reducción en la abundancia del hospedador solamente consigue impactar de forma muy leve en las cargas infectivas del hongo (Bosch et al. 2020), en el estudio aquí presentado sí se observa que la combinación de la reducción poblacional del hospedador, junto con el secado prolongado de los puntos de agua sí obtiene resultados positivos. El no poseer una pared celular, hace que las zoosporas, formas infectivas de *Bd*, sean sensibles a la desecación en condiciones de laboratorio (Johnson et al. 2003). Sin embargo, la reinfección de las poblaciones de *A. obstetricans* que se observó en el referido estudio al cabo del tiempo, sugiere que una vez está en la naturaleza el patógeno muestra cierta resistencia, y podría llegar a sobrevivir en condiciones extremas como el secado. De hecho, este tipo de resistencia ya se ha documentado en el caso de *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*), la otra especie de hongo quitridio descrita, endémica en Asia, que ha llegado a Europa a través del comercio de especies, afecta no tanto a anuros sino principalmente a urodelos, y que a diferencia de *Bd*, sí es capaz de fabricar unas esporas enquistadas con pared celular que le

### ***Discusión Integradora***

confieren resistencia tanto en ambientes acuáticos como en el sustrato terrestre, y dificultan mucho su erradicación del medio (Stegen et al. 2017; Thomas et al. 2019).



**Figura 2.** Actuaciones implementadas en el medio natural para la mitigación de la enfermedad. Vallado (izda) y Secado (dcha) de los puntos de agua.

Diversos autores han planteado la posibilidad de que los efectos letales de la quitridiomycosis sólo se dejen notar en el hospedador, cuando la carga infectiva del patógeno rebasa un límite máximo que se ha dado en llamar el umbral de carga fúngica letal, por encima del cual las funciones fisiológicas se ven totalmente rebasadas y se producen los episodios de mortandad en masa y el declive de las poblaciones (Briggs et al. 2010; Vredenburg et al. 2010; Puschendorf et al. 2011; Searle et al. 2011). Este límite crítico de carga sería

diferente según la especie de anfibio afectada, siendo las especies más tolerantes las que lo tendrían en niveles más elevados. Esto podría significar que se estaría en disposición de frenar una ola epidémica de la enfermedad o hacer que sus efectos negativos sobre los anfibios fuesen menores, si se pudiesen implementar medidas de mitigación que aunque no consiguiesen la erradicación total y permanente de *Bd* del medio, sí fueran capaces de reducir significativamente la presencia del patógeno fúngico, y de mantener su carga infectiva por debajo de esos límites críticos (Vredenburg et al. 2010). El éxito alcanzado con la estrategia de mitigación descrita en el Capítulo 5, aún sin ser permanente ni definitivo sí nos hace albergar cierta esperanza, ya que a través de la combinación entre el secado de los puntos de agua y la reducción de la densidad poblacional, se consiguieron disminuir significativamente la prevalencia y las cargas infectivas del hongo en el medio. Podría ser por lo tanto, una solución a aplicar si se dan las circunstancias adecuadas para ello, con el fin de favorecer la supervivencia de poblaciones de anfibios afectadas por el hongo quitridio.

Como ya se ha comprobado, los posibles resultados exitosos que se alcanzan sólo con el tratamiento *in situ* a través de la aplicación de antifúngicos bien en animales adultos (Hudson et al. 2016), bien en los estadios larvarios (Geiger et al. 2017), no son suficientes sino únicamente transitorios, y sólo representan una mejoría a corto plazo. Esta circunstancia pone de manifiesto el hecho de que el uso de productos antifúngicos para tratar a anfibios infectados por *Bd* en el medio, puede servir para reducir de forma sólo temporal la prevalencia y la carga infectiva del hongo, o frenar la ola epidémica de la enfermedad por un breve espacio de tiempo, durante el cual poder implementar otro tipo de medidas de conservación. Y también, enfatiza la importancia de combinar estos tratamientos junto con la aplicación de desinfectantes en el medio, si se quiere conseguir alargar los plazos en lo que a erradicación de *Bd* del medio se refiere. Es precisamente esta última

### ***Discusión Integradora***

estrategia de mitigación, la combinación de tratamientos antifúngicos con la aplicación de desinfectantes directamente en el medio natural, la segunda de las técnicas de mitigación descritas en la presente tesis doctoral (Capítulo 6), y la que se llevó a cabo con éxito en Mallorca, representando el primer caso de erradicación del hongo en el medio natural a nivel mundial (Bosch et al. 2015). El conjunto del estudio y la implementación en Mallorca de esta metodología de mitigación en concreto, retrata además varios aspectos de la enfermedad que creo conviene remarcar. Es primero un claro ejemplo de diseminación involuntaria del patógeno por parte del hombre, ya que el hongo quitridio fue inadvertidamente introducido en la isla a través de un programa de reintroducción del sapo partero balear (*A. muletensis*), puesto en marcha por la Durrell Wildlife Conservation Trust (DWCT), una importante entidad dedicada a la conservación de especies animales en todo el mundo. En el transcurso de dicho programa de reintroducción, se introdujeron *A. muletensis* (Figura 3) en Mallorca contaminados con una cepa hipovirulenta del hongo proveniente de Sudáfrica (*BdCAPE*), al haber estado previamente en contacto en las instalaciones de la DWCT con ejemplares de *Xenopus gilli* infectados (Walker et al. 2008).



**Figura 3.** Sapo partero balear (*A. muletensis*). Foto: Jaime Bosch.

En segundo lugar, muestra claramente como las respuestas frente a la quitridiomycosis a nivel poblacional dentro de una misma especie pueden ser diferentes, y están fuertemente influenciadas por las condiciones ambientales a las que estén expuestas esas poblaciones (Puschendorf et al. 2011; Doddington et al. 2013). Y también, como los microhábitats cálidos y secos favorecen la supervivencia de los anfibios infectados con *Bd* (Puschendorf et al. 2011). Dos de las poblaciones de *A. muletensis* infectadas de la isla, Cocó de sa Bova y Torrent des Ferrerets, difieren únicamente en su grado de exposición al sol, pero esto hace que la temperatura alcanzada por el agua en una y otra localización sea muy distinta y en consecuencia, mientras que la población de Torrent des Ferrerets, donde las temperaturas rondan los 20°C, se ha visto reducida y ha sufrido un declive desde que *Bd* fue introducido en la isla, la población de Cocó de sa Bova, en la que la exposición al sol es máxima y se alcanzan temperaturas superiores a 25°C, ha ido en aumento y no parece

### **Discusión Integradora**

sufrir tanto los efectos del patógeno fúngico (Doddington et al. 2013). Finalmente en tercer lugar, este estudio refleja las grandes diferencias existentes a la hora de tratar cepas más o menos virulentas y resistentes del hongo quitridio. Si bien el tratamiento que se realizó a las larvas de *A. muletensis* infectadas con la cepa hipovirulenta *BdCAPE* fue un éxito, y consiguió limpiarlas del hongo utilizando una pequeña concentración de itraconazol (Bosch et al. 2015), como ya ha sido expuesto en el estudio que conforma el Capítulo 3 de esta tesis, y reseñado anteriormente en esta discusión, esas mismas concentraciones de itraconazol no son efectivas cuando se tratan larvas infectadas naturalmente con la cepa *BdGPL*. Esta última cepa, hipervirulenta y mucho más resistente, requiere de concentraciones de antifúngico mucho más elevadas para ser eliminada y esto, genera la aparición de efectos secundarios nocivos y no deseados como una alta toxicidad, que puede llevar a la muerte de las larvas tratadas.

Debido a que, como hemos podido comprobar con la pandemia producida por el SARS-CoV-2 y sus terribles consecuencias, frenar el avance o la dispersión de enfermedades en este mundo global en el que vivimos es una tarea prácticamente imposible, es necesario diseñar y desarrollar estrategias que nos permitan hacer frente a esas enfermedades sobre el terreno, una vez que han llegado a una zona y afectan a los organismos presentes en ella. En el caso de la quitridiomycosis, eso se traduce en el diseño y la implementación de estrategias de mitigación que nos permitan paliar los efectos causados por el patógeno fúngico en las poblaciones de anfibios de todo el planeta. Sin embargo, encontrar una estrategia de mitigación que sea segura, viable, efectiva, duradera, fiable, fácil de ser implementada, que no conlleve un desembolso económico elevado y sobre todo, que pueda ser aplicada en distintas especies, poblaciones y condiciones ambientales, es a buen seguro un reto de difícil consecución, ya que trabajar directamente en el medio natural implica la presencia de múltiples factores que escapan a nuestro control.

Existen además, como hemos visto a lo largo de los diferentes capítulos del presente trabajo, otros elementos que componen el llamado “triángulo epidemiológico”, que vienen determinados tanto por el patógeno, como por el hospedador y por el hábitat, que van a intervenir o influir directamente en el diseño y la implementación de cualquier tipo de actuación de mitigación de la enfermedad en el entorno natural. En este sentido, factores como la cepa del hongo quitridio a la cual nos estemos enfrentando, la especie de anfibio tratada, sus rasgos ecológicos, la sensibilidad o la respuesta inmune que presente frente al patógeno, los estadíos predominantes en la población sobre la cual queramos intervenir, o también la altitud y la temperatura en las que implementaremos nuestras medidas, van a condicionar de una manera significativa la forma de actuar y la estrategia de mitigación a emplear en cada caso, complicando exponencialmente nuestra capacidad para encontrar un método de mitigación que se pueda aplicar de manera global o universal, y haciendo necesario estudiar cada situación de manera individualizada con el fin de aplicar las medidas correctoras más adecuadas.

No obstante, a la hora de aplicar las distintas estrategias de mitigación si podríamos quizá distinguir entre unos medios simples, habitados por una sola especie de anfibio y en los que se tiene acceso a todos los individuos de la población, como puede ser el caso del estudio descrito en el Capítulo 6 llevado a cabo en Mallorca, y otro tipo de medios o entornos más complejos, con condiciones ambientales cambiantes, con características geográficas que hagan complicada la implementación y uniformidad de acción de las medidas, o habitados por distintas especies con diferentes respuestas frente al patógeno o ante los tratamientos que se puedan utilizar. En ambos casos, como se ha tratado de exponer a lo largo de esta tesis doctoral y muy especialmente en sus dos últimos capítulos, las estrategias a implementar diferirán tanto en el grado de complejidad, como en las probabilidades de éxito y su durabilidad o permanencia.

## ***Discusión Integradora***

Para este tipo de entornos más complejos, existen líneas de investigación actualmente en progreso enfocadas a hacer frente a esta patología sobre el terreno, y que potencialmente podrían aportar soluciones más o menos perdurables en el tiempo. Uno de estos estudios, se centra en investigar diferencias genéticas entre poblaciones que puedan explicar la variedad existente en la respuesta o susceptibilidad ante *Bd*. Al mismo tiempo, plantea la posibilidad de implantar programas de cría en los que a través de selección genética se podrían conseguir individuos resistentes al hongo quitridio que posteriormente podrían ser devueltos a la naturaleza (Kosch et al. 2018). El segundo de ellos, propone la utilización de focos de calor en el medio acuático y también terrestre, con los que proveer a los anfibios de refugios térmicos que les ayudarían a luchar contra la enfermedad en condiciones óptimas de temperatura (Hettyey et al. 2019). La tercera de estas líneas de investigación estaría enfocada en el uso del tebuconazol, un fungicida sistémico de la familia de los triazoles utilizado frecuentemente en el sector agrario para el tratamiento de distintas enfermedades causadas por hongos que afectan a cultivos como la vid (*Vitis vinifera*). En este momento hay diferentes procesos experimentales en desarrollo con el fin de determinar si el uso en el medio natural de concentraciones muy bajas de este producto antifúngico, siempre controlando sus niveles de bioacumulación, puede llegar a eliminar a *Bd* del medio, limpiando así a las poblaciones de anfibios presentes en un determinado hábitat sin alterar las relaciones interespecíficas o el correcto funcionamiento de los ecosistemas. De estas tres líneas de investigación, la relacionada con el uso del tebuconazol está, hoy en día, siendo testada en el medio natural ofreciendo unos resultados muy esperanzadores (J. Bosch pers. comun). Con lo que, aún faltando todavía por conocer algunos aspectos de diversa índole que afectarían a su implementación como tratamiento de la enfermedad en el medio, podría llegar a formar parte de nuevas medidas de mitigación de la quitridiomycosis en un futuro no muy lejano.

La presente tesis doctoral representa una pequeña aportación al ingente trabajo científico desarrollado por múltiples equipos de investigación a lo largo de las últimas décadas, que ha logrado gracias a la inversión de una gran cantidad de recursos, tiempo y esfuerzo, revelar elementos hasta hace poco desconocidos de la quitridiomycosis, como el agente patógeno causante de la enfermedad, los efectos que tiene sobre los hospedadores anfibios y sus defensas, o los factores tanto bióticos como abióticos que influyen en su transmisión y su fisiopatología. Queda no obstante un largo camino por recorrer y muchas incógnitas por desvelar que atañen a la inmunidad que presentan las distintas especies de anfibios frente al hongo quitridio, a nuevos tratamientos más efectivos y seguros, y sobre todo, al desarrollo y la implementación de medidas de mitigación sobre el terreno que sean realmente transferibles, y ofrezcan resultados duraderos o incluso permanentes. Estas serán sin duda, algunas de las líneas de investigación en las que habrá que ahondar en el futuro.

## **DISCUSIÓN INTEGRADORA: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Baitchman EJ, Pessier AP. (2013). Pathogenesis, diagnosis, and treatment of amphibian chytridiomycosis. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 16 (3): 669-685. doi: 10.1016/j.cvex.2013.05.009

Bosch J, Sanchez-Tomé E, Fernández-Loras A, Oliver JA, Fisher MC, Garner TWJ. (2015). Successful elimination of a lethal wildlife infectious disease in nature. *Biology Letters*, 11: 20150874. doi: 10.1098/rsbl.2015.0874

Bosch J, Carrascal LM, Manica A, Garner TWJ. (2020). Significant reductions of host abundance weakly impact infection intensity of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE*, 15 (11): e0242913. doi: 10.1371/journal.pone.0242913

Briggs CJ, Knapp RA, Vredenburg VT. (2010). Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 9695-9700. doi: 10.1073/pnas.0912886107

Brutyn M, D'Herde K, Dhaenens M, Van Rooij P, Verbrugghe E, Hyatt AD, Croubels S, Deforce D, Ducatelle R, Haesebrouck F, Martel A, Pasmans F. (2012). *Batrachochytrium dendrobatidis* zoospore secretions rapidly disturb intercellular junctions in frog skin. *Fungal Genetics and Biology*, 49: 830-837. doi: 10.1016/j.fgb.2012.07.002

Chatfield MWH, Richards-Zawacki CL. (2011). Elevated temperature as a treatment for *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in captive frogs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94: 235-238. doi: 10.3354/dao02337

Collazos J, Mayo J, Martínez E, Díaz F. (1995). Unusual liver toxicity due to the new antifungal agents fluconazole and itraconazole. *International Hepatology Communications*, 3 (2): 112-115.

Davis AK, Keel MK, Ferreira A, Maerz JC. (2010). Effects of chytridiomycosis on circulating white blood cell distributions of bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*). *Comp. Clin. Pathol*, 19: 49-55. doi: 10.1007/s00580-009-0914-8

Doddington BJ, Bosch J, Oliver JA, Grassly NC, Garcia G, Schmidt BR, Garner TWJ, Fisher MC. (2013). Context-dependent amphibian host population response to an invading pathogen. *Ecology*, 94: 1795-1804.

Duarte H, Tejedo M, Katzenberger M, Marangoni F, Baldo D, Beltrán JF, Martí DA, Richter-Boix A, Gonzalez-Voyer A. (2012). Can amphibians take a heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities. *Global Change Biology*, 18: 412-421. doi: 10.1111/j.1365-2486.2011.02518.x

Ellison AR, Savage AE, DiRenzo GV, Langhammer P, Lips KR, Zamudio KR. (2014). Fighting a losing battle: vigorous immune response countered by pathogen suppression of host defenses in the chytridiomycosis-susceptible frog *Atelopus zeteki*. *G3 (Bethesda)*, 4: 1275-1289. doi: 10.1534/g3.114.010744

Fites JS, Ramsey JP, Holden WM, Collier SP, Sutherland DM, Reinert LK, Gayek AS, Dermody TS, Aune TM, Oswald-Richter K, Rollins-Smith LA. (2013). The invasive chytrid fungus of amphibians paralyzes lymphocyte responses. *Science*, 342: 366-369.

Fisher MC. (2007). Potential interactions between amphibian immunity, infectious disease and climate change. *Animal Conservation*, 10: 420-421.

Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484: 186-194. doi: 10.1038/nature10947

Gabor CR, Fisher MC, Bosch J. (2013). A non-invasive stress assay shows that tadpole populations infected with *Batrachochytrium dendrobatidis* have elevated corticosterone levels. *PloS ONE*, 8 (2): e56054. doi: 10.1371/journal.pone.0056054

## **Discusión Integradora**

Garner TWJ, Garcia G, Carroll B, Fisher MC. (2009). Using itraconazole to treat *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83: 257-260. doi: 10.3354/dao02008

Geiger CC, Küpfer E, Schär S, Wolf S, Schmidt BR. (2011). Elevated temperature clears chytrid fungus infections from tadpoles of the midwife toad, *Alytes obstetricans*. *Amphibia-Reptilia*, 32: 276-280.

Geiger CC, Bregnard C, Maluenda E, Voordouw MJ, Schmidt BR. (2017). Antifungal treatment of wild amphibian populations caused a transient reduction in the prevalence of the fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Scientific Reports*, 7: 5956. doi: 10.1038/s41598-017-05798-9

Greenspan SE, Bower DS, Roznik EA, Pike DA, Marantelli G, Alford RA, Schwarzkopf L, Scheffers BR. (2017). Infection increases vulnerability to climate change via effects on host thermal tolerance. *Scientific Reports*, 7: 9349. doi: 10.1038/s41598-017-09950-3

Grogan LF, Robert J, Berger L, Skerratt LF, Scheele BC, Castley JG, Newell DA, McCallum HI. (2018). Review of the amphibian immune response to chytridiomycosis, and future directions. *Frontiers in Immunology*, 9: 2536. doi: 10.3389/fimmu.2018.02536

Hanlon SM, Kerby JL, Parris MJ. (2012). Unlikely remedy: fungicide clears infection from pathogenic fungus in larval southern leopard frogs (*Lithobates sphenoccephalus*). *PLoS ONE*, 7 (8): e43573. doi: 10.1371/journal.pone.0043573

Hettyey A, Ujszegi J, Herczeg D, Holly D, Vörös J, Schmidt BR, Bosch J. (2019). Mitigating disease impacts in amphibian populations: capitalizing on the thermal optimum mismatch between a pathogen and its host. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7: 254. doi: 10.3389/fevo.2019.00254

Hudson MA, Young RP, Lopez J, Martin L, Fenton C, McCrea R, Griffiths RA, Adams SL, Gray G, Garcia G, Cunningham AA. (2016). In-situ itraconazole treatment improves survival rate during an amphibian chytridiomycosis epidemic. *Biol. Cons*, 195: 37-45.

Hung CY, Seshan KR, Yu JJ, Schaller R, Xue J, Basrur V, Gardner MJ, Cole GT. (2005). A metalloproteinase of *Coccidioides posadasii* contributes to evasion of host detection. *Infection and Immunity*, 73 (10): 6689-6703. doi: 10.1128/IAI.73.10.6689-6703.2005

Johnson ML, Berger L, Philips L, Speare R. (2003). Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57: 255-260.

Kindermann C, Narayan EJ, Hero JM. (2012). Urinary corticosterone metabolites and chytridiomycosis disease prevalence in a free-living population of male Stony Creek frogs (*Litoria wilcoxii*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol*, 162: 171-176.

Kirkpatrick WR, Perea S, Coco BJ, Patterson TF. (2002). Efficacy of caspofungin alone and in combination with voriconazole in a Guinea pig model of invasive aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (8): 2564-2568.

Kosch TA, Silva CNS, Brannelly LA, Roberts AA, Lau Q, Marantelli G, Berger L, Skerratt LF. (2018). Genetic potential for disease resistance in critically endangered amphibians decimated by chytridiomycosis. *Animal Conservation*, 22 (3): 238-250. doi: 10.1111/acv.12459

Loyau A, Cornuau JH, Clare FC, Schmeller DS. (2016). Side effects of itraconazole on post-metamorphic *Alytes obstetricans* after a cold stress. *Amphibia-Reptilia*, 37: 345-357.

Martel A, Van Rooij P, Vercauteren G, Baert K, Van Waeyenberghe L, Debacker P, Garner TWJ, Woeltjes T, Ducatelle R, Haesebrouck F, Pasmans F. (2011). Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Medical Mycology*, 49: 143-149. doi: 10.3109/13693786.2010.508185

## **Discusión Integradora**

Murphy PJ, St-Hilaire S, Corn PS. (2011). Temperature, hydric environment, and prior pathogen exposure alter the experimental severity of chytridiomycosis in boreal toads. *Diseases of Aquatic Organisms*, 95: 31-42. doi: 10.3354/dao02336

Neely WJ, Greenspan SE, Ribeiro LP, Carvalho T, Martins RA, Rodriguez D, Rohr JR, Haddad CFB, Toledo LF, Becker CG. (2020). Synergistic effects of warming and disease linked to high mortality in cool-adapted terrestrial frogs. *Biological Conservation*, 245: 108521. doi: 10.1016/j.biocon.2020.108521

Nichols DK, Lamirande EW. (2001). Successful treatment of chytridiomycosis. *Froglog*, 46: 1.

Pessier AP, Mendelson III JR. (2010). A manual for control of infectious diseases in amphibian survival assurance colonies and reintroduction programs. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, Minnesota, USA.

Peterson JD, Steffen JE, Reinert LK, Cobine PA, Appel A, Rollins-Smith L, Mendonça MT. (2013). Host stress response is important for the pathogenesis of the deadly amphibian disease, chytridiomycosis, in *Litoria caerulea*. *PloS ONE*, 8 (4): e62146. doi: 10.1371/journal.pone.0062146

Piotrowski JS, Annis SL, Longcore JE. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96 (1): 9-15.

Puschendorf R, Hoskin CJ, Cashins SD, McDonald K, Skerratt LF, Vanderwal J, Alford AR. (2011). Environmental refuge from disease-driven amphibian extinction. *Conservation Biology*, 25 (5): 956-964. doi: 10.1111/j.1523-1739.2011.01728.x

Ribas, L, Li MS, Doddington BJ, Robert J, Seidel JA, Kroll JS, Zimmerman LB, Grassly NC, Garner TWJ, Fisher MC. (2009). Expression profiling the temperature-dependent amphibian response to infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PloS ONE*, 4 (12): e8408. doi: 10.1371/journal.pone.0008408

Rosenblum EB, Poorten TJ, Settles M, Murdoch GK, Robert J, Maddox N, Eisen MB. (2009). Genome-wide transcriptional response of *Silurana (Xenopus) tropicalis* to infection with the deadly chytrid fungus. *PLoS ONE*, 4 (8): e6494. doi: 10.1371/journal.pone.0006494

Savage AE, Gratwicke B, Hope K, Bronikowski E, Fleischer RC. (2020). Sustained immune activation is associated with susceptibility to the amphibian chytrid fungus. *Molecular Ecology*, 29 (15): 2889-2903. doi: 10.1111/mec.15533

Searle CL, Gervasi SS, Hua J, Hammond JI, Relyea RA, Olson DH, Blaustein AR. (2011). Differential host susceptibility to *Batrachochytrium dendrobatidis*, an emerging amphibian pathogen. *Conservation Biology*, 25 (5): 965-974. doi: 10.1111/j.1523-1739.2011.01708.x

Somchit N, Norshahida AR, Hasiah AH, Zuraini A, Sulaiman MR, Noordin MM. (2004). Hepatotoxicity induced by antifungal drugs itraconazole and fluconazole in rats: a comparative *in vivo* study. *Human and Experimental Toxicology*, 23: 519-525.

Stegen G, Pasmans F, Schmidt BR, Rouffaer LO, 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: 353-363. doi: 10.1038/nature22059

Stevenson LA, Alford RA, Bell SC, Roznik EA, Berger L, Pike DA. (2013). Variation in thermal performance of a widespread pathogen, the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE*, 8 (9): e73830. doi: 10.1371/journal.pone.0073830

Thomas V, Wang Y, Van Rooij P, Verbrugghe E, Balaz V, Bosch J, Cunningham AA, Fisher MC, Garner TWJ, Gilbert MJ, Grasselli E, Kinet T, Laudelout A, Lötters S, Loyau A, Miaud C, Salvadio S, Schmeller DS, Schmidt BR, Spitzen-van der Sluijs A, Steinfartz S, Veith M, Vences M, Wagner N, Canessa S, Martel A, Pasmans F. (2019). Mitigating *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. *Amphibia-Reptilia*, 40: 265-290. doi: 10.1163/15685381-20191157

## ***Discusión Integradora***

Tucker RM, Haq Y, Denning DW, Stevens DA. (1990). Adverse events associated with itraconazole in 189 patients on chronic therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 26 (4): 561-566.

Vredenburg VT, Knapp RA, Tunstall TS, Briggs CJ. (2010). Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107 (21): 9689-9694. doi: 10.1073/pnas.0914111107

Walker SF, Bosch J, James TY, Litvintseva AP, Valls JAO, Piña S, Garcia G, Rosa GA, Cunningham AA, Hole S, Griffiths R, Fisher MC. (2008). Invasive pathogens threaten species recovery programs. *Curr. Biol*, 18: R853-R854.

Woodhams DC, Alford RA, Marantelli G. (2003). Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55: 65-67.



## **CONCLUSIONES / CONCLUSIONS**

## CONCLUSIONES

1. El hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) es capaz de influir negativamente en el sistema inmune adquirido de sus hospedadores anfibios. Los inmunosuprime al infectarlos durante su desarrollo larvario y, reduce los niveles de inmunoglobulinas (IgM e IgY) circulantes en sangre, una vez que éstos han completado la metamorfosis. Esta supresión del sistema inmune adaptativo, podría explicar en parte la variable susceptibilidad de las distintas especies de anfibio frente a la acción del patógeno fúngico. Las especies de anfibios que carezcan de un sistema inmune innato robusto y eficiente, podrían sufrir más los efectos de *Bd*.
2. La eficacia del tratamiento de la enfermedad difiere según el estado de desarrollo del hospedador a tratar, y la cepa del hongo quitridio frente a la que se esté aplicando el tratamiento. La cepa hipervirulenta *BdGPL*, extendida globalmente y que afecta a la mayoría de especies de anfibios del planeta, es también la más resistente ante los tratamientos antifúngicos.
3. El uso del metil tiofanato, y sobre todo del itraconazol, para tratar la enfermedad en los estadios larvarios está desaconsejado, debido a los altos niveles de toxicidad que presentan, y a su baja efectividad a la hora de eliminar al patógeno, bien sea en solitario o combinando ambos productos. Es necesario continuar con la búsqueda de protocolos terapéuticos seguros, eficaces, y que puedan ser aplicados en todas las diferentes fases de desarrollo anfibio.
4. El hongo quitridio *Bd* posee la capacidad de alterar la fisiología térmica de su hospedador reduciendo su umbral térmico máximo (CTmax). Esta reducción del CTmax anfibio puede resultar en una mayor vulnerabilidad de las especies de anfibios ante el actual escenario de cambio climático. Algo que dejaría a los anfibios

más expuestos a sufrir estrés térmico y en consecuencia, aumentaría su susceptibilidad a padecer diversas enfermedades.

5. Debido a la imparable diseminación del patógeno, es absolutamente imprescindible diseñar y poner en práctica estrategias de sencilla aplicación, económicas, seguras, con capacidad de ser implementadas bajo condiciones ambientales diversas y transferibles entre distintas especies, que consigan mitigar a largo plazo los efectos de la enfermedad en el medio natural.

6. La acción combinada de una reducción poblacional del hospedador, y la manipulación del hábitat a través del secado, sin el uso de desinfectantes, consigue sólo un éxito temporal de varios años en la eliminación del patógeno del medio, y una disminución significativa de la prevalencia y la carga fúngicas.

7. Alcanzar la completa y permanente erradicación del patógeno fúngico del medio es un reto de muy difícil consecución. Si esto no fuese posible, se debe fijar como objetivo reducir la abundancia de *Bd* por debajo de su umbral de carga letal, a partir del cual aumenta exponencialmente la tasa de mortalidad que produce. Con ello se mantendría a la enfermedad en niveles enzoóticos, y se ganaría tiempo para implementar diferentes medidas de conservación con las que tratar de salvar a las especies amenazadas.

8. La combinación de métodos de mitigación como pueden ser el tratamiento con itraconazol de las formas larvarias, el vaciado de los puntos de agua, y la desinfección del medio con productos químicos (Virkon S), logra la erradicación de *Bd* del medio natural a largo plazo en medios de baja humedad ambiental y comunidades de anfibios simples.



## CONCLUSIONS

1. The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) has a negative influence on the acquired immune system of its amphibian hosts. This immunosuppression occurs once it infects them during their larval development, by reducing the blood circulating levels of the amphibian host's immunoglobulins (IgM and IgY) after they have completed metamorphosis. This acquired immune system immunosuppression could partially explain the different susceptibility shown by amphibian species against the fungal pathogen. Those species lacking an efficient and robust innate immune system would be more prone to suffer the negative effects of *Bd*.
2. The efficiency of treatment against the disease differs depending on the developmental stage of the host and the fungal strain you are dealing with. The hypervirulent *Bd*GPL, which is widespread globally and affects the vast majority of amphibian species, is also more resistant to antifungal treatments.
3. The use of thiophanate-methyl and specially itraconazole, is not recommended for disease treatment in larval stages, due to their high toxicity levels and their low efficacy in cleaning the host from the pathogen, both in single or in combined application. A search for safe and efficient treatment protocols that could be applied in all the different amphibian developmental stages is still needed.
4. The chytrid fungus *Bd* is able to alter the thermal physiology of its hosts, reducing their critical thermal maximum (CT<sub>max</sub>). This reduction of the amphibian CT<sub>max</sub> could render amphibian species more vulnerable to the current climate change scenario. Something that would leave amphibians

more exposed to suffer from thermal stress, and increase their susceptibility to different infectious diseases.

5. The unstoppable spread of the pathogen has conferred a crucial importance to the design and *in situ* application of feasible, cost-effective, safe, and transferable between different species and conditions mitigation strategies, in order to achieve long-term environmental pathogen eradication.

6. Reduction in host population density and severe habitat manipulation such as drying amphibian natural breeding points achieved only temporal success. Through the combination of these two mitigation strategies, without using chemical disinfectants, the pathogen was eradicated for years from the natural environment and its prevalence and fungal loads were significantly reduced.

7. Complete and permanent eradication of the pathogen from the natural environment is a truly difficult challenge. Providing this is not possible, we should aim at reducing *Bd* abundance below its lethal threshold, a point from which amphibian mortality rate experiences a sheer increase. Thus, maintaining the disease in its enzootic stage and gaining some extra time to implement other conservation measures in order to try to save threatened amphibian species.

8. Combination of mitigation methods such as larval itraconazole antifungal treatments, emptying breeding ponds and environmental chemical disinfection with Virkon S, achieves long-term eradication of *Bd* from the natural environment in low humidity conditions and single amphibian host systems.



Foto: Andrés Fernández Loras

