

Literatuuroverzicht Ranavirose en Chytridiomycose: recente ontwikkelingen, risicoanalyse in België en mogelijke strategieën voor de preventie en controle van verdere verspreiding

## **Inhoud**

1. INLEIDING 4
2. CHYTRIDIOMYCOSE 4
  - 2.1. *Oorzaken, geschiedenis en belangrijkste kenmerken* 4
  - 2.2. *Huidige verspreiding en omvang van Bd en Bsal* 5
  - 2.3. *Klinische symptomen van chytridiomycose* 9
  - 2.4. *Diagnose* 10
3. RANAVIROSE 11
  - 3.1. *Oorzaken, geschiedenis en belangrijkste kenmerken* 11
  - 3.2. *Huidige verspreiding en omvang van RV* 12
  - 3.3. *Klinische symptomen van RV* 13
  - 3.4. *Diagnose* 14
4. GECOMBINEERDE EFFECTEN VAN OPKOMENDE INFECTIEZIEKTEN BIJ AMFIBIEËN 16
5. MANIEREN VAN INTRODUCTIE EN VERSPREIDING VAN OPKOMENDE INFECTIEZIEKTEN BIJ AMFIBIEËN 17
  - 5.1. *Chytridiomycose* 17
    - 5.1.1. De rol van handel in amfibieën 17
    - 5.1.2. Transmissie en persistentie van *Bd* en *Bsal* in de omgeving 19
  - 5.2. *Ranavirose* 20
    - 5.2.1. De rol van handel in amfibieën 20
    - 5.2.2. Transmissie en persistentie van RV in de omgeving 22
  - 5.3. *Handel in amfibieën en wetgeving in België* 25
6. MAATREGELLEN OM DE EXPANSIE EN IMPACT VAN OPKOMENDE INFECTIEZIEKTEN BIJ AMFIBIEËN TE STOPPEN 31
  - 6.1. *Preventieve maatregelen* 32
    - 6.1.1. Import controle en verbod van handel 32
    - 6.1.2. Vroege waarschuwingssystemen 35
    - 6.1.3. Monitoringsgegevens 36
    - 6.1.4. Actieve Opvolging 37
    - 6.1.5. Bioveiligheidsmaatregelen 38
    - 6.1.6. Antropogene en natuurlijke maatregelen 40
  - 6.2. *Maatregelen na blootstelling* 41
    - 6.2.1. Maatregelen om verspreiding door de mens tegen te gaan 41

6.2.2.	Continue opvolging	47
6.2.3.	<i>Ex situ</i> aanpak	47
	a) Kweek in gevangenschap ( <i>ex situ</i> ) en herintroductie	48
	b) Behandeling	56
6.2.4.	<i>In situ</i> aanpak	60
	a) Manipulaties om de buffercapaciteit van een populatie te vergroten	61
	b) De hoeveelheid <i>Bd</i> in het veld reduceren	61
	c) <i>In situ</i> behandeling	63
	d) Toepassen van fungiciden in de omgeving	64
6.3.	<i>Welke maatregelen kunnen we toepassen als er een Bsal uitbraak is?</i>	64
7.	DISCUSSIE	66
8.	REFERENTIES	68
9.	FIGUREN & TABELLEN	86

## 1. INLEIDING

Amfibieënpopulaties nemen wereldwijd snel af, soorten sterven aan een hoge snelheid uit en het voortbestaan van tal van amfibieën wordt sterk bedreigd (IUCN, 2015). De opkomende infectieziekten chytridiomycose en ranavirose spelen hierbij een sleutelrol (zie bv. Berger e.a., 1998; Green e.a., 2002; Daszak e.a., 2007; Spitzen-van der Sluijs e.a., 2013). De infectieuze agentia van chytridiomycose zijn de chytride schimmels *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) en *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*). De infectieuze agentia van ranavirose zijn verschillende virale types binnen het genus *Ranavirus*. Deze pathogenen komen ook in België voor, maar hun impact op Belgische amfibieënpopulaties is tot op vandaag ongekend. Met deze review willen we algemene informatie over deze opkomende infectieziekten (OIZ) verschaffen en willen we een overzicht bieden van de huidige situatie in België. Om de ontwikkeling van een noodactieplan te vergemakkelijken, geven we een overzicht van de gevoelige uit-en inheemse gastheersoorten voor België en bediscussiëren we effectieve preventieve controle- en bestrijdingsmaatregelen voor deze OIZ in het wild, samen met een kosten-baten analyse.

## 2. CHYTRIDIOMYCOSE

### 2.1. Oorzaken, geschiedenis en belangrijkste kenmerken

*Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) en *B. salamandrivorans* (*Bsal*) zijn primitieve microscopische schimmels die behoren tot de Chytridiomycota. Beide schimmels hebben twee belangrijke levensstadia: een motiele geflagelleerde spore (zoöspore) als infectieus stadium en een sporendoozje waarin de zoösporen geproduceerd worden (zoösporangium). Beide schimmels parasiteren op de huid van amfibieën (Longcore e.a., 1999; Martel e.a., 2013). *Bd* infecteert de huid van tal van Anura (kikkers en padden), Urodela (watersalamanders en salamanders) (voor meer details zie Spatial epidemiology, 2014; Olson e.a., 2013) en wormsalamanders (Churgin e.a., 2013; Doherty-Bone e.a., 2013; Gower e.a.,

2013), terwijl *Bsal* gelimiteerd blijft tot de Urodela (Martel e.a., 2014). Beide schimmels werden redelijk recent ontdekt. *Bd* werd eind de jaren 90 beschreven als de oorzaak van plotselinge dalingen van de amfibieënpopulaties in ongerepte en beschermde gebieden van Centraal-Amerika en Australië (Berger e.a., 1998; Lips e.a., 2006). Tot 40% van de lokale soorten werden uitgeroeid. *Bsal* werd beschreven in 2013 als de oorzaak van een sterke daling in de vuursalamanderpopulatie (*Salamandra salamandra*) van Nederland. Slechts 4% van de oorspronkelijke populatiegrootte bleef over (Spitzen-van der Sluijs e.a., 2013; Martel e.a., 2013). Infectie met deze pathogenen heeft een invloed op de vitale functies van de huid, namelijk ademhaling en onderhoud van de waterbalans, en is vaak dodelijk. Toch kan de reactie op een infectie niet veralgemeend worden. De respons van een soort, populatie of een individuele gastheer tegen een chytride infectie kan sterk variëren, gaande van resistent (geen infectie door inhibitie of snelle klaring van de infectie) naar tolerant (persistente infectie in afwezigheid van ziekte) tot gevoelig (infectie met tekenen van ziekte, gevolgd door klinisch herstel of door sterfte). De chytride infectiedynamiek en de klinische uitkomst van de infectie zijn beide sterk afhankelijk van de gastheer (bv. levensstadium, genetische achtergrond, stress, ...) en de virulentie van de schimmel en omgevingsfactoren (biotisch en abiotisch) (zie Van Rooij e.a., 2015 voor meer details). De groei en overleving van *Bd* en *Bsal* zijn sterk afhankelijk van de temperatuur. De optimale temperatuur voor *Bd* ligt tussen 17 en 25°C en voor *Bsal* tussen 10 en 15°C. Temperaturen boven 25°C of 37°C zijn dodelijk voor respectievelijk *Bsal* en *Bd* (Piotrowski e.a., 2004; Martel e.a., 2013; Blooi e.a., 2015a).

## **2.2. Huidige verspreiding en omvang van *Bd* en *Bsal***

*Bd* is momenteel bijna overal aanwezig waar amfibieën voorkomen (Fisher e.a., 2009; Olson e.a., 2013) en vooral in Australië (Berger e.a., 1998), de neotropen (Lips e.a., 2006; Cheng e.a., 2011) en West-Amerika (voornamelijk Sierra Nevada in California) (Rachowicz e.a., 2006) heeft deze schimmelziekte geresulteerd in een groot verlies van biodiversiteit waarbij

tal van amfibiesoorten uitgestorven zijn. Tot nu toe bleef het grootste deel van Europa hiervan gespaard en blijft de impact vooral beperkt tot het Iberisch Schiereiland waar er naar Europese normen een grote biodiversiteit aan amfibieën aanwezig is. In Centraal-Spanje en de Pyreneeën zijn populaties van vroedmeesterpadden (*Alytes obstetricans*) bijna volledig uitgeroeid ten gevolge van chytridiomycose (Bosch e.a., 2001; Bosch & Martínez-Solano, 2006; Walker e.a., 2010). Ook op populaties van salamanders (*Salamandra salamandra*) en padden (de gewone pad of *Bufo bufo* en de rugstreeppad *Epidalea calamita*) heeft de schimmel een invloed gehad op verschillende plaatsen in dit gebied (Bosch & Martínez-Solano, 2006). Daarenboven werden ook in Centraal-Portugal dalingen waargenomen van populaties *Alytes obstetricans* (Rosa e.a., 2013). Al deze epidemieën werden gelinkt aan één bepaalde hypervirulente epizoötische stam van *Bd* (*BdGPL*) (Farrer e.a. 2011).

In tegenstelling tot de situatie hierboven beschreven, komt *Bd* in Noord-Europa voor in een staat van evenwicht met de gastheer (Garner e.a., 2005; Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010, 2014; Martel e.a., 2012; Lötters e.a., 2012; Tobler e.a., 2012; Ohst e.a., 2013), met slechts zeldzame gevallen van *Bd* gelinkte sterfte (Pasmans e.a., 2010; Tobler & Schmidt, 2010). Het aantal amfibiesoorten in België telt 15 inheemse en 2 uitheemse amfibiesoorten die opgelijst worden in **tabel 1**. Tot nu toe werden *Bd* geïnfecteerde amfibieën slechts sporadisch gedetecteerd in België: lage prevalenties werden gedetecteerd in alpenwatersalamanders *Ichthyosaura alpestris* (2% prevalentie; Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010) en *Bufo bufo* (0.63% prevalentie; Martel e.a., 2012). *Bd* gelinkte sterfte werd enkel gerapporteerd in *Alytes obstetricans* (Pasmans e.a., 2010). In het noorden van België (provincie Antwerpen) werd wel een hoge prevalentie (tot 20%) gedetecteerd in Amerikaanse stierkikker populaties (*Lithobates catesbeianus*). Hoewel *Bd* sterk verspreid is binnen Vlaanderen, is er tot nu toe geen bewijs voor sterke dalingen in het aantal amfibieën binnen besmette populaties. Aangezien zowel de ziekteprevalentie als de schimmelaantallen van *Bd* in geïnfecteerde

amfibieën heel laag zijn, zijn er geen *Bd*-isolaten beschikbaar uit Noord-Europa. Het gevolg hiervan is dan ook dat de informatie over *Bd* stammen in Noord-Europa en hun virulentie ontbreekt. Zoals geïllustreerd in **tabel 1**, werd *Bd* in Nederland in meer amfibiesoorten gedetecteerd (tot 11 inheemse soorten), waarbij de hoogste prevalentie voor *Bd* gevonden werd in *A. obstetricans* (tot 18%; Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010). De soorten die gevoelig blijken te zijn in België omvatten *Epidalea calamita* (Martinez-Solano e.a., 2003; Cunningham & Minting, 2008), vinpootsalamander *Lissotriton helveticus* (Cunningham & Minting, 2008) en heikikker *Rana arvalis* (Mutschmann 2000). Daarenboven is het geweten dat de meerkikker (*Pelophylax ridibundus*) een drager kan zijn voor *Bd* (Erismis e.a., 2014). Hieruit blijkt dat *Bd* potentieel alle Belgische amfibiesoorten kan infecteren. Vooral *Bufo bufo* (Garner e.a., 2009a), *Alytes obstetricans* en *Salamandra salamandra* (Bosch e.a., 2001; Bosch & Martinez-Solano, 2006; Pasmans e.a., 2010) worden bedreigd door letale chytridiomycose. *Bsal* werd nog niet waargenomen in natuurlijke amfibieënpopulaties buiten Oost-Azië, Nederland, België en Duitsland (Martel e.a., 2014; Muletz e.a., 2014; Zhu e.a., 2014; Bales e.a., 2015; Spitzen-van der Sluijs e.a., 2016). In ten minste Japan, Thailand en Vietnam, komt *Bsal* voor in lage aantallen op hynobiidae en salamandridae salamanders, waarschijnlijk zonder sterfte in de populaties te veroorzaken, wat wijst op lange termijn endemisme (Martel e.a., 2013; 2014). Detectie van *Bsal* in een museum specimen van de Aziatische watersalamander *Cynops ensicauda* (zwaardstaartsalamander) dat dateert van 1861 ondersteunt deze hypothese (Martel e.a., 2014). Experimentele infectieproeven tonen aan dat ten minste vijf Aziatische salamandersoorten (Japanse vuurbuiksalamander *Cynops pyrrhogaster*, *Cynops cyanurus*, Tam Dao salamander *Paramesotriton deloustali* en Siberische landsalamander *Salamandrella keyserlingii*) reservoirs kunnen vormen van de schimmel en dat ze tot ten minste 5 maanden geïnfecteerd kunnen zijn zonder ziekte te ontwikkelen (Martel e.a., 2014). In Nederland, België (Dinant, Eupen, Luik, Robertville en

Duffel) en Duitsland (de Eifel regio en Essen), werd *Bsal* gedetecteerd in ten minste 15 veld regio's (Spitzen-van der Sluijs e.a., 2016). In Nederland werden populaties van (ten minste) *Salamandra salamandra* zwaar getroffen door *Bsal*. De huidige populatie wordt op minder dan 1% van de originele populatiegrootte geschat (Spitzen-van der Sluijs e.a., 2013; Spitzen-van der Sluijs e.a., 2016). Voor de amfibieënpopulaties in Eupen zijn er geen monitoring trends beschikbaar, maar de uitbraak heeft ten minste voor *Salamandra salamandra* een zware impact gehad op de populaties (Spitzen-van der Sluijs e.a., 2016). De uitbraak in Robertville wordt opgevolgd door de Universiteit Gent en ook al zijn er geen data beschikbaar over de originele populatiegrootte voor de uitbraak, toch kan er besloten worden dat de infectie een sterke daling in de geïnfecteerde populatie veroorzaakt heeft (Stegen e.a., 2017). Voor Luik, waar er enkele dode vuursalamanders gevonden zijn, zijn er ook geen monitoringsgegevens beschikbaar. Naast vuursalamanders, werden ook positieve alpenwatersalamanders (*Ichthyosaura alpestris*) (in Vlaanderen, België en Nederland) en kleine watersalamanders (*Lissotriton vulgaris*) (enkel in Nederland) gevonden (Bosman e.a., 2015; Spitzen-van der Sluijs e.a., 2016). Voor deze soorten is de impact van *Bsal* op populatieniveau echter nog onduidelijk. Experimentele infectieproeven hebben aangetoond dat ten minste vuursalamanders heel erg gevoelig zijn voor de schimmel met een 100% sterftcijfer binnen 2-3 weken na initiële blootstelling. Kamsalamanders (*Triturus cristatus*) zijn gevoelig, maar kunnen de experimentele infectie tot 3 tot 8 weken weerstaan alvorens sterfte optreedt (Martel e.a., 2014). Tot nu toe is de enige uitzondering de vinpootsalamander (*Lissotriton helveticus*), die resistent blijkt te zijn aan *Bsal* (Martel e.a., 2014). De specifieke kenmerken die deze onderliggende verschillen in gevoeligheid tussen de Aziatische en Europese salamandridae salamanders en tussen de Europese salamandersoorten bepaalt, blijven ongekend. Om meer inzicht te verkrijgen in de gevoeligheid van andere Europese



salamander- en watersalamandersoorten en om andere regio's te identificeren waar *Bsal* voorkomt (endemisch of niet), is er meer onderzoek nodig.

### **2.3. Klinische symptomen van chytridiomycose**

Klinische symptomen in kikkervisjes geïnfecteerd met *Bd* zijn vooral gelimiteerd tot depigmentatie van de monddelen (Berger e.a., 1998; Rachowicz & Vredenburg, 2004), maar ze kunnen ook lethargisch zijn en een kleinere lichaamsgrootte door slechte zwem- en foerageercapaciteit kan ook waargenomen worden (Hanlon e.a., 2015). Bij de Urodela werden tot nu toe geen geïnfecteerde larven gevonden en labo-experimenten tonen ook aan dat blootstelling van *Salamandra salamandra* larven aan *Bsal* niet resulteert in infectie (Van Rooij e.a., 2015).

In gemetamorfoseerde amfibieën zijn de meest voorkomende klinische symptomen van een *Bd* infectie vervelling van de huid, erytheem (roodheid) of verkleuring van de huid (Pessier 2002; 2008). Lethargie, anorexie, abnormale houding (vb. achterpoten), neurologische symptomen zoals het verlies van de vecht-of-vluchtreactie of plotselinge dood kunnen ook optreden (Pessier 2002; 2008) (**figuur 1A**). In gemetamorfoseerde Urodela wordt een infectie met *Bsal* voornamelijk gekarakteriseerd door extensieve en gegeneraliseerde ulceratie van de huid (**figuur 1B**). Daarenboven kunnen er nog andere klinische symptomen optreden zoals overvloedig vervellen van de huid, anorexie, apathie, ataxie en sterfte (Martel e.a., 2013).

Geïnfecteerde amfibieën ontwikkelen niet altijd klinische symptomen. Verschillende amfibiesoorten kunnen drager zijn van hoge aantallen van de schimmel zonder morbiditeit of mortaliteit te veroorzaken. De aantallen van de schimmel aanwezig op deze dragersoorten of “carriers” kunnen echter wel dodelijk zijn voor de meeste andere amfibiesoorten. Vooral *L. catesbeianus* is een berucht reservoir voor *Bd* infectie (Garner e.a., 2006).

## 2.4. Diagnose

In de praktijk hangt de diagnose van een chytrid infectie vooral af van de detectie van schimmel DNA op een uitstrijkje van de huid of op weefselstalen met een kwantitatieve real-time PCR (qPCR) die tot 0.1 genomisch zoöspore equivalent (GE) kan detecteren. Specifieke qPCR protocollen voor de detectie van *Bd* (Boyle e.a., 2004) of *Bsal* DNA (Martel e.a., 2013) zijn beschikbaar, net als een duplex real-time qPCR protocol dat de simultane detectie van beide chytrid pathogenen mogelijk maakt (Blooï e.a., 2013). Toevoeging van BSA (runderalbumine) ( $400 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) aan de PCR mix is aangewezen om PCR inhibitie te vermijden wat kan optreden door de aanwezigheid van fenolische componenten uit de bodem of bladafval dat aanwezig is op het uitstrijkje (Garland e.a., 2010). Voor *Bd* zijn er specifieke protocollen ontwikkeld om stalen te nemen bij Anura en Urodela, waarbij gestreefd wordt naar een maximale detectie probabilliteit (bv. Puschendorf & Bolaños, 2006; Van Rooij e.a., 2011). Het staalnameprotocol van het uitstrijkje gecombineerd met de qPCR detectie laat een gemakkelijke, niet invasieve screening en monitoring toe van amfibieën in gevangenschap en in het wild (Hyatt e.a., 2007; Skerratt e.a., 2011). Niettegenstaande wordt voorzichtigheid aangeraden om de qPCR data te interpreteren (zie bv. Clare e.a., 2016). Langs de ene kant is detectie van lage GE aantallen op de huid van amfibieën niet altijd gecorreleerd met de infectie, dus kolonisatie van de huid moet bevestigd worden met histologische technieken. Langs de andere kant, ook al wordt mortaliteit geassocieerd met hoge infectie-aantallen van de schimmel (een arbitraire drempel is 10.000 genomische equivalenten (GE) (Carey e.a., 2006; Vredenburg e.a., 2010; Kinney e.a., 2011, Blooï e.a., 2013), toch kunnen salamanders stervende of dood gevonden worden door *Bsal* waarbij slechts lage GE aantallen gedetecteerd worden, of zelfs vals negatieve resultaten verkregen worden. Routinematige kleuringen zoals haematoxyline en eosine (HE) en periodic acid Schiff (PAS) kunnen gebruikt worden om intracellulaire thalli te visualiseren en om informatie te krijgen over de pathologie van de huid

en de ernst van de infectie. Een immunoperoxidase kleuring (IPX) met polyklonale antilichamen tegen *Bd* (Berger e.a., 2002) kan ook gebruikt worden voor de detectie van *Bd* en zelfs *Bsal* in huidsecties door de cross-reactiviteit tussen het antiserum en *Bsal*. Gomori methenamine zilverkleuring (GMS or Grocott) is gebaseerd op een specifieke reactie met de celwand van polysachariden en kleurt schimmels bruin tot zwart. Deze kleuring is echter enkel reactief met de celwand van *Bd* en laat visualisatie van *Bsal* sporangiën niet toe.

### **3. RANAVIROSE**

#### **3.1. Oorzaken, geschiedenis en belangrijkste kenmerken**

Ranavirussen (RVs) behoren tot de familie van de Iridoviridae en het zijn grote (120-300 nm) icosahedrale virussen die dubbelstrengig DNA bevatten en die koudbloedige vertebraten kunnen aantasten (Chinchar, 2002). Het eerste geïsoleerde en goed gekarakteriseerde *Ranavirus* dateert van de jaren zestig. Het “Frog virus 3” (FV3) is de typesoort van het genus *Ranavirus* en werd origineel geïsoleerd uit tumorweefsel van luipaardkikkers (*Lithobates pipiens*) in Noord-Amerika (Rafferty, 1965; Granoff e.a., 1966). De precieze oorsprong van dit multigastheer pathogeen is onbekend. De meest waarschijnlijke verklaring is dat het voorouderlijk RV een virus was die vissen infecteerde en dat het recent een gastheersprong gemaakt heeft naar amfibieën en reptielen (Jancovich e.a., 2010; Stör e.a., 2015). Recent zijn deze virussen onder de aandacht gekomen omdat ze steeds meer gelinkt worden aan een massasterfte van zowel gekweekte als wilde zoetwatervissen, amfibieën en reptielen, die wereldwijd sinds de jaren 1980 geobserveerd worden (review door Duffus e.a., 2015). De effecten van RVs op de gastheerpopulaties blijken nogal te verschillen (Chinchar & Waltzek, 2014; Price e.a., 2014) en kunnen variëren van geen schijnbare sterfte tot plotse massasterfte (Duffus e.a., 2008; Greer e.a., 2009). Deze willekeurigheid in symptomen heeft geleid tot de hypothese dat omgevingsfactoren een belangrijke rol spelen in de ziekte-uitbraak (Brunner e.a., 2015). Inderdaad, natuurlijk variabelen (densiteit van de gastheerpopulatie, temperatuur

van het water, co-infectie, ontwikkelingsstadium, voedselbeperking, predatie), antropogene stressoren (pesticiden, meststoffen, stikstofhoudend afval, zware metalen, verzuring, genetische isolatie) en de virulentie van de RV stam (recente stam, blootstellingshistoriek, co-evolutie) zijn beslissend voor de RV-ziektedynamiek. Voor een volledige review refereren we naar Gray e.a. (2009).

Het genus *Ranavirus* omvat verschillende soorten en types. Heel vaak wordt de soort bepaald en het type afgebakend op basis van verschillende criteria waaronder genetische kenmerken en gastheerspecificiteit (Fauquet e.a., 2005). De RV-soorten waarvan gekend zijn dat ze amfibieën kunnen infecteren omvatten onder andere “Frog Virus 3” (FV3), “*Ambystoma tigrinum* virus” (ATV), “Bohle iridovirus” (BIV), “Common Midwife Toad virus” (CMTV), “epizootic hematopoietic necrosis virus” (EHNV) en “European catfish virus” (ECV) (Chinchar e.a., 2009). Ranavirale replicatie treedt op bij 12-32°C. De synthese van virale proteïnen start al binnen enkele uren na de infectie van gastheercellen, gevolgd door celdood (necrose of apoptose) (Chinchar, 2002). Bij temperaturen hoger dan 40°C worden de RVs onschadelijk gemaakt (La Fauce e.a., 2012).

### ***3.2. Huidige verspreiding en omvang van RV***

RV infectie, ziekte en massasterfte op grote schaal werden gerapporteerd in Amerika, Australië, Afrika, Azië en Europa (Miller e.a., 2011; Duffus e.a., 2015) en de virussen zijn in staat om de meeste grote families binnen de Anura en Urodela aan te tasten. Voor Europa is een overzicht van de laatste lokale ziekte-uitbraken, de geassocieerde virale types en de betrokken amfibiesoorten weergegeven in **tabel 2**.

Zoals aangegeven in **tabel 2**, is RV aanwezigheid in Europa voornamelijk geassocieerd met CMTV of FV-3 en FV3-like virussen. Terwijl uitbraken met FV3 en FV3-like virussen wereldwijd voorkomen (review door Duffus e.a., 2015), blijkt CMTV beperkt te zijn tot Europa en veroorzaakt dit type, met een stijgende incidentie, significante ziekte en dood in tal

van gastheersoorten. CMTV werd het eerst geïsoleerd uit *Alytes obstetricans* kikkervisjes die massale sterfte ondergingen in 2007 in Noord-Spanje (Balseiro e.a., 2010a). Opvolging van de amfibieënpopulaties in dit gebied van 2005 tot 2012 heeft aangetoond dat sterfte in 6 amfibiesoorten te wijten was aan CMTV en dit op verschillende plaatsen. Dit heeft geleid tot dalingen in de populaties van *Alytes obstetricans*, *Bufo bufo* en *Ichthyosaura alpestris* (Price e.a., 2014). In België en Nederland werd ziekte ten gevolge van RV enkel waargenomen bij amfibieën in gevangenschap die afkomstig waren van hobbykwekers. Echter, in 2010 werd in Nederland een eerste grote RV uitbraak waargenomen in het wild, die geassocieerd bleek te zijn met CMTV (Kik e.a., 2011). Deze uitbraak werd gevolgd door verschillende andere uitbraken (Rijks e.a., 2013) en sinds 2007 worden episodes van amfibiesterfte in natuurlijke populaties in België systematisch getest op de aanwezigheid van RV. Tot op vandaag werd in België nog geen RV-geïnduceerde massasterfte waargenomen, ondanks de aanwezigheid van dit pathogeen in België. Een lage RV-prevalentie (0.75% prevalentie), meer specifiek een CMTV-like stam, werd gedetecteerd in gezonde stierkikkerlarven van een invasieve populatie in Hoogstraten (Sharifian-Fard e.a., 2011).

Inheemse Belgische amfibiesoorten die gevoelig blijken te zijn voor RV infectie omvatten, *Pelophylax kl. esculentus* (middelste groene kikker) (Kik e.a., 2011), *Pelophylax ridibundus* (Rijks e.a., 2013), *Pelophylax lessonae* (poelkikker) (Kik e.a., 2011), *Lissotriton vulgaris* (Rijks e.a., 2013), *Bufo bufo* (Rijks e.a., 2013), *Alytes obstetricans* (Balseiro e.a., 2010a), *Ichthyosaura alpestris* (Balseiro e.a., 2010b), en *Pelobates fuscus* (knoflookpad) (Rijks e.a., 2013).

### **3.3. Klinische symptomen van RV**

RV uitbraken zijn meestal geassocieerd met massasterfte die 80-90 % van iedere populatie over alle levensstadia treft. Mortaliteit is vaak het enige klinische symptoom. Virale invasie veroorzaakt structurele veranderingen in de gastheercellen wat celdood veroorzaakt en

resulteert in een plotselinge hemorragische ziekte. Laesies in volwassen amfibieën omvatten erytheem (roodheid) van de poten, ventrale oppervlakten van de voet en voetzool, ecchymose (uitgebreide bloedingen) dicht bij de cloaca en/of urostyle, petechiën (puntvormige bloedingen) van de huid en inwendige organen (lever, nieren, milt en darmen), zwerende huidletsels (**figuur 1C**) en necrose van de distale ledematen (**figuur 1D**). Ook anorexie en abnormale vervelling van de huid kunnen waargenomen worden (Cunningham e.a., 1996; Miller e.a., 2011; Price e.a., 2014).

Bij larven zijn de meest voorkomende laesies erytheem t.h.v. de basis van de kieuwen, ventrum en poten, zwelling van de poten, lichaam en keel, en bloedingen van inwendige organen (**figuur 1E**) (Jancovich e.a., 1997; Bollinger e.a., 1999; Docherty e.a., 2003). Niettegenstaande kunnen RV infecties ook ontwikkelen in afwezigheid van klinische symptomen of histopathologische veranderingen (review door Miller e.a., 2011). Amfibieën kunnen dus ook asymptomatisch drager zijn van een RV. Robert e.a. (2007) hebben gevonden dat het FV3 virus zich kan verschuilen in macrofagen van gezonde Afrikaanse klauwkikkers (*Xenopus laevis*).

Vissen geïnfecteerd met RV kunnen cutane bloedingen (vooral perioculair) en rode gezwollen kieuwen vertonen. Vissen kunnen ook een verlies van levendigheid, een onregelmatig zwempatroon, ataxie en/of anorexie vertonen. De laesies omvatten bloedingen van de interne organen (vooral vetcellen en de zwemblaas), een gezwollen abdomen met zwelling van de lever, nieren en zwemblaas, necrose van organen, en verschillende bleke foci op de lever (review door Miller e.a., 2015).

### ***3.4. Diagnose***

Diagnose van RV wordt gesteld op basis van klinische symptomen en door bevestigende diagnostische testen. In de praktijk kan RV via PCR (Mao e.a., 1997; Hyatt e.a., 2000) of qPCR (bv. Pallister e.a., 2007; Picco e.a., 2007; Holopainen e.a., 2011) gedetecteerd worden

in staart- en teenbiopten, in uitstrijkjes van de mondholte, cloaca en huid of in weefselstalen van interne organen (met voorkeur de nieren, milt of lever). Via PCR en qPCR wordt de aanwezigheid nagegaan van het belangrijkste eiwitkapselgen, dat sterk geconserveerd is tussen de verschillende RV soorten. Niet-letale staalnametechnieken kunnen een onderschatting geven van de infectieprevalentie in vergelijking met leverstalen, maar deze zijn praktischer voor de screening en surveillance van levende amfibieën, terwijl letale technieken meer kans hebben om een systemische infectie aan te tonen (Greer & Collins, 2007; Gray e.a., 2012). DNA sequenceren kan uitgevoerd worden om te bepalen welke stam betrokken is in de infectie (Greer & Collins, 2007).

De aanwezigheid van viruspartikels correleert niet altijd met ziekte, waardoor andere technieken nodig zijn om de infectie aan te tonen. Een HE-kleuring van de huid en interne organen kan gebruikt worden om grote pathologische veranderingen aan te tonen, maar ook meer subtiele veranderingen die gelinkt zijn aan een subletale infectie kunnen opgemerkt worden (Gray e.a., 2012). Ranavirose gaat gepaard met epidermale hyperplasie met necrose en/of foci van necrose in hematopoëtisch nier- en/of miltweefsel en/of de lever in aan- of afwezigheid van intracytoplasmatische inclusies in de hepatocyten. IPX kleuringen die gebruik maken van specifieke polyklonale antilichamen kunnen gebruikt worden als bevestigende test (Reddacliff & Whittington, 1996). Daarenboven kunnen mature viruspartikels, met een icosahedrale morfologie, via elektronenmicroscopie opgespoord worden in het cytoplasma van geïnfecteerde cellen (Hyatt e.a., 2000). RV kan ook geïsoleerd worden uit de nieren, lever of milt van geïnfecteerde amfibieën door gebruik te maken van verschillende celtypes met amfibieën of vissen als oorsprong, in combinatie met andere testen om het betrokken virus te identificeren (Greer & Collins, 2007).

#### **4. GECOMBINEERDE EFFECTEN VAN OPKOMENDE INFECTIEZIEKTEN BIJ AMFIBIEËN**

Gegeven de huidige aanwezigheid van RV, *Bd* en *Bsal* in België, en de mogelijkheid dat het infectiegebied van RV en *Bsal* uitbreidt, is de kans heel reëel dat inheemse amfibieën met meerdere pathogenen in contact komen. Voor zowel amfibieën in gevangenschap als in het wild, werd co-infectie van *Bd* en RV (Kik e.a., 2012; Whitfield e.a., 2013) waargenomen. In verschillende tropische kikkersoorten werd een positieve correlatie gezien in infecties met RV en *Bd* (Whitfield e.a., 2013). Hoe *Bsal* en RV infecties met elkaar correleren, blijft tot op vandaag een vraagteken.

In Nederland en België zijn zowel *Bsal* en *Bd* aanwezig in inheemse amfibiepopulaties. Voor *Bd* is er een evenwichtssituatie ontstaan tussen de schimmel en gastheer (Spitzen-van der Sluijs e.a., 2014; Martel e.a., 2011) terwijl *Bsal* snel massale sterfte veroorzaakt van *Salamandra* populaties in zowel Nederland als België (Spitzen-van der Sluijs e.a., 2013; Martel e.a., 2013). Als het verspreidingsgebied van beide schimmels zou overlappen, dan zijn er twee scenario's mogelijk, namelijk co-infectie door beide schimmels (i) versterkt de hoge letaliteit van *Bsal* of zelfs eventueel *Bd*, of, (ii) tempert de virulentie van de chytrid schimmels. De laatste situatie blijkt het geval te zijn in Brazilië waar twee *Bd* lijnen (de hypervirulente *Bd*GPL en de minder virulente *BdBz*, die endimisch is voor Brazilië) al voor meer dan een eeuw gevonden worden in het Atlantisch Woud. Ook al zijn de meeste amfibieën in dat gebied geïnfecteerd met de hypervirulente *Bd*GPL, toch wordt er geen massale sterfte waargenomen. *Bd* blijkt constant aanwezig te zijn in amfibieënpopulaties met een gemiddelde prevalentie, maar het treft enkel een klein deel van dieren op een bepaald moment (enzoötisch). Daarenboven zijn er verschillende genetische studies die *Bd* isolaten met een hybride genotype geïdentificeerd hebben. Deze isolaten zijn waarschijnlijk ontstaan door seksuele recombinitie of hybridisatie tussen de genetische lijnen van *Bd*GPL en *BdBz* (Schloegel e.a., 2012; Rodriguez e.a., 2014). Het wordt aangenomen dat hypervirulentie



recent ontstaan is door recombinatie/hybridisatie tussen verschillende genetische *Bd* lijnen (bv. Farrer e.a., 2011). Dit betekent dat zelfs als het pathogeen een staat van endemisme bereikt heeft in een populatie van amfibieën, er toch een risico bestaat dat er een verhoogde virulentie ontstaat als er genetisch materiaal uitgewisseld wordt met een andere stam. Tot op vandaag is er weinig informatie beschikbaar over hoe vaak dit in het verleden gebeurd is en wat de kans is dat dit in de toekomst zal optreden. Om hier meer inzicht in te krijgen zou er in de toekomst meer onderzoek (verzamelen en genotyperen) moeten gebeuren naar (i) genetische *Bd* lijnen die circuleren in Europa en naburige gebieden, en/of (ii) genetische *Bsal* lijnen die aanwezig zijn in Europa en Azië.

## **5. MANIEREN VAN INTRODUCTIE EN VERSPREIDING VAN OPKOMENDE INFECTIEZIEKTEN BIJ AMFIBIEËN**

### ***5.1. Chytridiomycose***

#### **5.1.1. De rol van handel in amfibieën**

De precieze oorsprong van *Bd* is nog altijd niet zeker, maar het is wel geweten dat de internationale handel in amfibieën een belangrijke rol gespeeld heeft in de verspreiding van *Bd* tussen continenten (zie bv. Fisher & Garner, 2007; Schloegel e.a., 2012; De Paula e.a., 2012; Wombwell e.a., 2016). *Bsal* werd enkel gedocumenteerd in Aziatische en Noord-Europese salamanders, waardoor het heel aannemelijk is dat de schimmel België is binnengedrongen door internationale handel (Martel e.a., 2014).

Een gedeelte studie tussen het Nederlandse RAVON (Reptielen Amfibieën Vissen Onderzoek Nederland) en de Universiteit Gent, evalueerde verschillende mogelijke routes van *Bsal* naar en in Nederland. Deze studie identificeerde verschillende vereisten voor de introductie van een chytrid schimmel in een land en de verspreiding in de omgeving: i) aanwezigheid van het pathogeen in het exportland, ii) overleving van het pathogeen gedurende het transport, iii) overleving van het pathogeen op de uiteindelijke bestemming,

ofwel op de gastheer, ofwel in water of bodem, iv) vrijzetting van het pathogeen in de onmiddellijke nabijheid van wilde amfibieën, v) infectie van wilde amfibieën, en vi) vestiging en persistentie van het pathogeen in natuurlijke populaties van amfibieën (Spitzen-van der Sluijs e.a., 2015).

Beide pathogenen kunnen echter ook onopgemerkt aanwezig zijn op in gevangenschap houden amfibieën of op amfibieën die bestemd zijn voor de handel. Deze asymptomatische dragers vormen vooral een bijzonder risico voor onopzettelijke verspreiding van pathogenen tussen landen, collecties en zelfs naar het wild. Vooral de Afrikaanse klauwkikker (*Xenopus laevis*) en de Noord-Amerikaanse stierkikker (*Lithobates catesbeianus*) zijn hierin berucht. In natuurlijk geïnfecteerde stierkikkers kunnen de *Bd* aantallen oplopen tot  $10^5$  zoösporen per uitstrijkje (Garner e.a., 2006) zonder dat ze klinische symptomen vertonen, terwijl deze aantallen meestal letaal zijn voor de meeste andere soorten (Carey e.a., 2006; Vredenburg e.a., 2010). Beide amfibiesoorten zijn heel invasief wanneer ze geïntroduceerd worden in een nieuwe omgeving (Fisher & Garner, 2007) en ze kunnen de infectie overbrengen naar inheemse amfibiesoorten (Daszak e.a., 2004; Garner e.a., 2006; Greenspan e.a., 2012). *Xenopus laevis* wordt wereldwijd verhandeld voor het gebruik in wetenschappelijk onderzoek (Weldon e.a., 2004). Een recente studie van laboratoria in het VK waar ze *Xenopus laevis* gebruiken voor onderzoek, detecteerde in 89% van de laboratoria infecties in lage aantallen (< 100 GE) (Tinsley e.a., 2015). *Lithobates catesbeianus* is een soort die in verschillende Europese landen, waaronder ook België en Nederland, verkocht wordt met de intentie om deze dieren vrij te laten in siertuin vijvers (Stumpel, 1992; Spitzen-van der Sluijs & Zollinger, 2010). Verschillende van deze stierkikkers die drager zijn voor *Bd* infecties hebben echter wilde populaties uitgebouwd in het noorden van België (Provincie Antwerpen) (Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010). In een onderzoek van Spitzen-van der Sluijs e.a. (2011) werd aangetoond dat ongeveer 3 % van de amfibieën in gevangenschap afkomstig van private

collecties in België, Duitsland, Frankrijk en Nederland positief waren voor *Bd*, zonder klinische symptomen te vertonen. In ongeveer 14 % van de stalen werd *Bd* gedetecteerd. Voor *Bsal* zijn er ten minste twee Aziatische salamandersoorten gekend die een mogelijk reservoir kunnen vormen voor de ziekte en die actief verhandeld worden: *Cynops cyanurus* en *Cynops pyrrhogaster* (Herrel e.a., 2014; Yap e.a., 2015). Deze soorten zijn in staat om zoösporen vrij te zetten en dit gedurende zeker 5 maanden zonder noodzakelijk klinische ziekte te ontwikkelen (Martel e.a., 2014). Recent zijn er ook *Bsal* uitbraken gerapporteerd bij gevangenschapsdieren (private collecties) van Europese salamanders (waaronder *Salamandra* en *Speleomantes* spp.) in het VK (Cunningham e.a., 2015), Duitsland (Sabino-Pinto e.a., 2015), Nederland (2016) en Spanje (2016) (Fitzpatrick e.a., 2016). Het risico voor de introductie van *Bsal* in andere regio's dan Noord-Europa is dus heel reëel.

#### **5.1.2. Transmissie en persistentie van *Bd* en *Bsal* in de omgeving**

Transmissie tussen verschillende gastheren kan optreden door contact met motiele zoösporen en in het geval van *Bsal* ook geëncysteerde sporen (Stegen e.a., 2017), die zich in het water bevinden, via direct contact tussen geïnfecteerde amfibieën tijdens bijvoorbeeld de paring (Rowley & Alford, 2007; Stegen e.a., 2017), door larven die zich te goed doen aan dode amfibieën (Bosch e.a., 2015) of door dieren samen te huisvesten in gevangenschap of tijdens het transport (Martel e.a., 2014; Kolby e.a., 2014). *Bsal* is zeer besmettelijk via direct contact: experimenten waarbij dieren samen gehuisvest werden, hebben aangetoond dat een contactperiode van 8 uur al voldoende is om *Bsal* over te brengen van geïnfecteerde *Cynops pyrrhogaster* naar naïeve individuen van dezelfde en van andere amfibiesoorten (Martel e.a., 2014). Transport waarbij dieren dezelfde ruimte en/of water delen verhoogt het risico om *Bsal* te verspreiden. Een onderzoek van Kolby en collega's (2014) toonde aan dat het water waarin *X. laevis* kikkers getransporteerd werden, tot  $10^3$ - $10^4$  *Bd* zoösporen per liter water bevatte.

Geïnfecteerde amfibieën kunnen aanzienlijke aantallen van zoösporen uitscheiden in het water waardoor ze potentiële reservoirs zijn voor omgevingscontaminatie (Reeder e.a., 2012; Kolby e.a., 2014). Hoewel laboratorium experimenten aangetoond hebben dat *Bd* kan overleven in water en vochtige grond voor weken tot zelfs maanden (Johnson & Speare, 2003; 2005; Kirshtein e.a., 2007), is de ecologie van vrij-levende chytrid pathogenen buiten hun gastheer (amfibie) en hun mogelijkheid om te persisteren in natuurlijke omgevingen nog niet goed onderzocht. Daarentegen is het wel geweten dat deze vrij-levende chytrid pathogenen slecht kunnen overleven in de aanwezigheid van organismen die hen consumeren (Searle e.a., 2013; Strauss e.a., 2013; Schmeller e.a., 2014; Stegen e.a., 2017). *In vitro* studies hebben ook aangetoond dat zowel *Bd* als *Bsal* saprofytisch kunnen groeien op steriele vogelveren en op pootschubben van wilde ganzen (Johnson & Speare, 2005; Garmyn e.a., 2012; Van Rooij e.a., 2015; Burrowes en De La Riva, 2017), wat een mogelijke verspreiding via waterwild suggereert. Daarenboven kan *Bd* groeien op het exoskelet van geleedpotigen en kan het overleven in het gastro-intestinaal stelsel van rivierkreeften (Longcore e.a., 1999; Johnson & Speare, 2003; 2005; Garmyn e.a., 2012; Mc Mahon e.a., 2013). Desondanks het feit dat *Bd* kan groeien op steriele huid van slangen (Longcore e.a., 1999) en dat *Bd* DNA gevonden werd op wilde Panamese hagedissen en slangen (Kilburn e.a., 2011), zijn er meer studies nodig om te bepalen of reptielen mogelijke vectoren zijn voor chytridiomycose

## **5.2. Ranavirose**

### **5.2.1. De rol van handel in amfibieën**

Ook voor RV is de wereldwijde verplaatsing van amfibieën gekoppeld met het feit dat ze veel verschillende gastheersoorten kunnen infecteren, de oorzaak van de brede geografische verspreiding van deze virussen (Chinchar & Waltzek, 2014). Stöhr en collega's (2015) hebben sequentiedata gebruikt om een aantal RVs, geïsoleerd uit amfibieën uit het wild en in gevangenschap in Europa, te karakteriseren. Zowel isolaten uit reptielen (schildpadden,

hagedissen en een slang) en amfibieën (Anura en Urodela) werden in deze studie geanalyseerd. De RVs afkomstig uit reptielen waren vaak dichter gerelateerd aan RV stammen geïsoleerd uit amfibieën (FV3-like, Tiger Frog virus (TFV)-like or CMTV-like) uit dezelfde geografische regio, dan aan elkaar. Deze bevindingen tonen ook aan welke impact de rol van handel in reptielen kan hebben in de epidemiologie van ranavirose.

Opdat RV zich kan verspreiden, moeten de geïmporteerde en geïnfecteerde dieren eerst in contact komen met lokaal wild of gekweekte fauna. Goudvissen (*Carassius auratus*) en koi karpers (*Cyprinus carpio koi*) zijn vaak verhandelde vissoorten, maar het is nog onduidelijk of deze vissoorten een rol spelen in de introductie van RV in Europa. Experimentele infecties van goudvissen en karpers met RV resulteren niet in een significante sterfte (Bang-Jensen e.a., 2011), wat er mogelijks op wijst dat deze vissoorten kunnen fungeren als subklinische dragers. De studie van North e.a. (2015) in de VS toont tevens aan dat RV uitbraken vaak geassocieerd zijn met de aanwezigheid van goudvissen en karpers in vijvers. Daarenboven is er heel recent massasterfte waargenomen bij gekweekte koi karpers in Zuid-India, veroorzaakt door Santee-Cooper Ranavirus (SCRV) (George e.a., 2015). Het is echter wel zo dat er tot nu toe geen tot een heel lage prevalentie van RV gedetecteerd is in siervissen geïmporteerd in de EU (RANA, 2009; Vesely e.a., 2011). Er is dus meer onderzoek nodig om tot een eenduidige conclusie te kunnen komen over de rol van siervissen in de verspreiding van RV

De rol van amfibieën daarentegen is wel duidelijk. De commerciële handel van levende amfibieën voor hobbykweek, onderzoek en consumptie heeft het potentieel om RV in de naïeve omgeving en nieuwe gastheren te verspreiden (Picco e.a., 2007). In kikkers geïmporteerd uit Amerika, Azië en Afrika werden verschillende virale types aangetoond (RANA, 2009). Daarenboven is de prevalentie van RV in amfibieën bestemd voor de handel redelijk hoog. Schloegel e.a. (2009) vond een prevalentie van 8.5% in ongeveer 4.66 miljoen levende kikkers die jaarlijks geïmporteerd worden in de VS. Systematische screening van

cloaca uitstrijkjes van commerciële verzendingen van levende amfibieën geëxporteerd uit Hong Kong International Airport toonde zelfs een prevalentie voor RV van 56.8% aan in de Chinese vuurbuikpad *Bombina orientalis*, *Paramesotriton hongkongensis*, en de Chinese vuurbuiksalamander *Cynops orientalis* (Kolby e.a., 2014). Introductie van viruspartikels in de natuur kan ook optreden (hoewel nog niet gekwantificeerd) door de vrijzetting van (onbewust) geïnfecteerde, uitheemse amfibieën in het wild of door het niet correct verwerken van water waarin geïnfecteerde dieren gehuisvest werden. Virus partikels kunnen gedurende enkele weken overleven. Jammer genoeg is het vaak de gangbare praktijk bij aquariumhouders om hun afvalwater uit te gieten in het gras, de tuin of in buitenvijvers (Duggan e.a., 2010; Strecker e.a., 2011; Rijks e.a., 2012). Water van aquaria of van dieren in gevangenschap zou eerst gedesinfecteerd (bv. door bleekwater toe te voegen, zie § 6.2.1) moeten worden alvorens dit uitgegoten wordt. Op die manier kan de verspreiding van virus partikels vermeden worden.

### **5.2.2. Transmissie en persistentie van RV in de omgeving**

RVs kunnen voor enkele weken en zelfs langer persisteren in aquatische systemen of vochtige bodem (Nazir e.a., 2012; Brunner e.a., 2007). Overleving in de omgeving wordt versterkt door koude temperaturen: bij 4°C kunnen viruspartikels tot 2 maanden stabiel blijven in vijverwater (Nazir e.a., 2012) en voor enkele maanden in bevroren karkassen (Bollinger e.a., 1999).

RVs kunnen ook in reservoirs persisteren. Een RV infectie resulteert niet altijd in sterfte. Laboratorium experimenten en veldstudies hebben aangetoond dat individuen subletaal (zonder te bezwijken aan de infectie en zonder ze te overwinnen) geïnfecteerd kunnen zijn voor lange periodes (Brunner e.a., 2004; Pearman e.a., 2004; Gray e.a., 2007; Greer e.a., 2009). Amfibieën zijn één van de eerste reservoirs van RVs. In aquatische omgevingen kunnen amfibiesoorten met larven die zich ontwikkelen over meer dan 1 seizoen (bv.

*Lithobates catesbeianus*; Gray e.a., 2007; Sharifian Fard e.a., 2011), soorten met een neotene ontwikkeling (Jancovich e.a. 1997) of soorten met aquatische adulten (Duffus e.a., 2008; Gray e.a., 2009) mogelijke reservoirs vormen. Blootstelling aan RV blijkt een adaptieve immuunrespons te induceren wat, indien het individu overleeft, bescherming helpt bieden tegen een volgende virale blootstelling (Zupanovic et al, 1998; Majji e.a., 2006; Maniero e.a., 2006). Zelfs RV-resistente *Xenopus laevis* adulten kunnen drager zijn van lage aantallen van het virus in hun nieren en macrofagen zonder klinische symptomen te vertonen, wat deze amfibiesoort een belangrijk en potentieel reservoir maakt (Robert e.a., 2007). Vissen en reptielen kunnen ook dienen als reservoirs voor RVs die op hun beurt amfibieën kunnen infecteren (Gray e.a., 2009).

Horizontale transmissie van RVs kan optreden tussen individuen via indirecte en directe routes. Directe transmissie van RV is zeer effectief tussen amfibieën en omvat direct contact met geïnfecteerde individuen of opname van geïnfecteerd weefsel via necrofagie, kannibalisme of predatie (review door Miller e.a., 2011). Brunner en collega's (2007) hebben ook aangetoond dat één seconde direct huidcontact tussen een geïnfecteerde en een ongeïnfecteerde larvale salamander genoeg was om transmissie van ATV te krijgen. Transmissie van RV tussen beschadigde en intacte huid werd ook aangetoond (Brunner e.a., 2007; Cunningham e.a., 2007). Indirecte transmissie omvat blootstelling aan gecontamineerd water of bodem, of zelfs besmet materiaal (review door Miller e.a., 2011). Viruspartikels die in de aquatische omgeving vrijgesteld zijn, kunnen met succes een nieuwe gastheer infecteren (binnen 24 uur), waarbij de infectie het meest waarschijnlijk optreedt t.h.v. epitheliale oppervlakten (bv. intestinale mucosa, kieuwlammellen) (Harp & Petranka, 2006; Greer e.a., 2009; Brunner e.a., 2007). Blootstelling van naïeve amfibieën aan FV3-geïnfecteerde individuen in water zonder direct contact kan resulteren in transmissie binnen 3 uur (Robert e.a., 2011). Inname van het virus resulteert in een snellere dood dan wanneer de infectie via

besmet water gebeurt (Hoverman e.a., 2011; Harp & Petranka, 2006). Gedurende een uitbraak is het heel aannemelijk dat RV zijn gastheer infecteert via verschillende routes van horizontale transmissie. RV epidemieën starten meestal als subleetaal geïnfecteerde adulten terugkeren naar hun broedplaatsen. Op die manier kunnen ze de infectie direct overbrengen naar de larven, of indirect als gecontamineerde karkassen geconsumeerd worden door voedende larven. Accumulatie van geïnfecteerde karkassen kan dus de transmissie vergemakkelijken (Brunner e.a., 2004). Verticale transmissie wordt als mogelijk geacht, maar het werd nog niet experimenteel aangetoond (review door Brunner e.a., 2015).

Daarenboven kan een bepaalde gastheersoort fungeren als een reservoir voor andere amfibiesoorten (Mao e.a., 1999; Duffus e.a., 2008). Er bestaat bewijs dat transmissie tussen taxonomische klassen kan optreden tussen wilde populaties. Gedurende RV uitbraken in Noord-Spanje, werden CMTV en CMTV-like virussen geïsoleerd van verschillende kikker- en watersalamandersoorten, maar ook van een adderringslang (*Natrix maura*) die dood gevonden werd met zwerende huidletsels (Price e.a., 2014). In een studie van Bayley e.a. (2013) werd de gevoeligheid onderzocht van een algemene amfibiesoort (bruine kikker *Rana temporaria*) voor een reeks van RVs, geïsoleerd uit vissen en amfibieën. Larven bleken gevoelig te zijn voor FV3 (frog virus 3), REV (*Rana esculenta* virus) en PPIV (Pike perch Iridovirus), maar enkel PPIV bleek in staat om sterfte bij de larven te veroorzaken. Post-metamorfen waren gevoelig voor FV3 en REV. Snoekbaars (*Stizostedion lucioperca*), een algemene zoetwatervis in België is een gastheer voor PPIV (Tapiovaara e.a., 1998), maar ook BIV (Bohle iridovirus) dat initieel geïsoleerd werd uit de kikker *Limnodynastes ornatus*, kan experimenteel overgedragen worden naar vissen (Moody & Owens, 1994; Ariel & Owens, 1997). Experimenten door Brenes e.a. (2014) hebben transmissie van een FV3-like isolaat van vissen naar amfibieën aangetoond.



In gebieden met lopende RV uitbraken of gebieden waar er een RV uitbraak geweest is in het verleden, kan water of bezinksel dat gecontamineerd is met viruspartikels getransporteerd worden via permanente wateren door mensen (bv. recreanten, vissers, onderzoeker) of door dieren. Transport van de viruspartikels kan ook optreden via gecontamineerd materiaal zoals botten, vis- en onderzoeksmateriaal, landbouwmateriaal en boten (Harp & Petranka, 2006; Miller e.a., 2011). RVs kunnen meegedragen worden op veren en poten van vogels, waardoor deze verdacht zijn als mogelijke mechanische vectoren. Ondersteunend wetenschappelijk bewijs ontbreekt echter nog (Whittington e.a., 1996).

### ***5.3. Handel in amfibieën en wetgeving in België***

In 2012 werd het aantal geïmporteerde amfibieën in België via luchthavens en havens geregistreerd door het Federaal Agentschap voor de veiligheid van de voedselketen (FAVV) geschat op 4000 dieren. De belangrijkste landen van oorsprong waren Panama, Nicaragua, VS, Nigeria, Burundi en Indonesië. *Silurana tropicalis* en *Xenopus laevis* werden vaak geïmporteed voor wetenschappelijk onderzoek (in 2011, ongeveer 500 individuen van elke soort, uitsluitend geïmporteed uit de VS). In 2012, werden ongeveer 5000 amfibieën aangeboden op de Belgische markt. De top tien van de meest verhandelde amfibieën in dierenwinkels waren: *Hymenochirus boettgeri* (Pipidae, n = 1000), *Xenopus laevis* (Pipidae, n = 596), *Epipedobates anthonyi* (Dendrobatidae, n = 510), *Bombina orientalis* (Bombinatoridae, n = 322), *Agalychnis callidryas* (Hylidae, n = 292), *Rhacophorus annamensis* (Rhacophoridae, n = 265), *Dendrobates auratus* (Dendrobatidae, n = 255), *Ambystoma mexicanum* (Ambystomatidae, n = 243), *Polypedates otilophus* (Rhacophoridae, n = 214), en *Dendrobates tinctorius* (Dendrobatidae, n = 151) (Rijks e.a., 2013). Ongeveer 50-60% van de verhandelde amfibieën door Belgische importeurs, of amfibieën aangeboden in dierenwinkels, zijn dieren die in gevangenschap gekweekt zijn. De overige 50-40% zijn amfibieën die in het wild gevangen werden of dieren van een onbekende oorsprong (Rijks

e.a., 2013). Het is echter aannemelijk dat het echte aantal van geïmporteerde amfibieën onderschat wordt. De import van amfibieën kan namelijk ook optreden via informele circuits (bv. hobbykwekers) en wereldwijde beurzen zoals bv. in Nederland, Duitsland en Frankrijk. Daarenboven hebben we geen idee van de omvang van de internationale handel afkomstig uit Azië, die mogelijks *Bsal* reservoirs bevat. Op de luchthaven van Schiphol (Nederland), die dient als een 'ingangspoort' tot Europa, behoren de *Paramesotriton chinensis*, de groene watersalamander *Notophthalmus viridescens* en *Cynops* spp. tot het grootste deel van de meer dan 20,000 dieren die in 2013 geïmporteerd werden (Spitzen-van der Sluijs e.a., 2015). Zowel *Notophthalmus viridescens* en *Cynops* zijn gekende gastheren voor *Bsal* (Martel e.a., 2014).

Internationale handel in een bepaald aantal amfibiesoorten is onderworpen aan een aantal controles die opgelegd zijn door de Conventie over de Internationale handel in Bedreigde Soorten (CITES) met het doel om deze soorten te beschermen tegen overexploitatie. Dit omvat onder andere een licentiesysteem dat de autorisatie vereist voor de import en (her)export van de diersoort beschreven in één van de CITES appendices. Echter, enkel 2% van alle amfibiesoorten is inbegrepen in de CITES-appendices, waarvan slechts 6 Urodela soorten: *Andrias* spp. (genus of reuzensalamanders) en *Neurergus kaiseri* (Appendix I<sup>1</sup>), *Ambystoma dumerilii* en de Mexicaanse salamander *Ambystoma mexicanum* (Appendix II<sup>2</sup>), en *Hynobius amjiensis* (Appendix III<sup>3</sup>) (<https://www.cites.org/eng/disc/species.php>). Door de "single market" strategie en de afwezigheid van systematische grenscontroles, is CITES op een uniforme manier geïmplementeerd in alle EU landen via reglementering die gekend staat als handel in wilde dieren regelgeving. In Europa wordt de import en export van bedreigde diersoorten gereguleerd door de Council Regulation (EC) No 338/97 van 9 December 1996 ([http://ec.europa.eu/environment/cites/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/cites/legislation_en.htm)). Ongeveer 153 Anura en 36

---

<sup>1</sup> Soorten dat met uitsterven bedreigd zijn en voor dewelke intrernationale handel verboden is, tenzij het bedoeld is voor niet-commerciële doelen, zoals wetenschappelijk onderzoek.

<sup>2</sup> Soort daent met uitsterven bedreigd kunnen komen als de handel niet gecontroleerd wordt.

<sup>3</sup> Soorten dat ingesloten worden op vraag van het land van oorsprong dat reeds de handel in de soort reguleert en waarvoor de samenwerking van andere landen vereist is om onhoudbare en illegale exploitatie tegen te houden .

Urodela soorten zijn geïmplementeerd in de appendices (<http://www.speciesplus.net/>). Commerciële handel in exemplaren opgelijst in Annex A (omvat bv. *Andrias* spp, bonte of gouden klompvoetkikker *Atelopus zeteki*) is verboden en voor verplaatsingen binnen de EU van levende dieren is eerst autorisatie vereist. Verplaatsingen van alle levende exemplaren opgelijst in Annexen B (omvat bv. stierkikker, *Ambystoma* spp., en de gifkikkersoorten *Dendrobates* spp. and *Phyllobates* spp.) en C zijn onderworpen aan regels voor certificatie, terwijl in Annex D de doorvoer van andere levende dieren, volledige huid en plantproducten beschreven staat. De EU reglementeringen omsluiten striktere import condities dan deze ingevoerd door CITES. Import vergunningen zijn niet enkel nodig voor soorten opgelijst in Annex A, maar ook voor de species opgelijst in Annex B. Import notificaties zijn vereist voor Annexen C en D. Wat belangrijk is, is dat Appendix D 4 Anura en 29 Urodela soorten omvat, voornamelijk Aziatische *Paramesotriton* en *Tylototriton* spp., die niet opgelijst worden door CITES.

Concreet is het zo dat wanneer een verzending met amfibieën arriveert in Brussel-Nationale Luchthaven, er een grenscontrole uitgevoerd wordt volgens 91/496/EG en wetgeving (EG)282/2004. Zowel het land van oorsprong als het land van bestemming worden gecontroleerd, net als het aantal en de soort van geïmporteerde stalen. Daarenboven wordt de algemene (klinische) gezondheid en het welzijn van de dieren visueel gecontroleerd. Verzendinginformatie wordt ingediend in 'TRACES' (Trade Control and Expert System), een centrale database om verzendingen van dieren of producten van dierlijke oorsprong op te volgen en dit zowel voor dieren van binnen als buiten de EU. Een nadeel van dit systeem is echter dat het moeilijk is om een algemene schatting te krijgen van het aantal amfibieën dat verhandeld wordt, omdat dit systeem niet enkel amfibieën omvat.

Wanneer (exotische) amfibieën verhandeld worden via informele circuits (hobbykweker, beurzen) binnen de EU, dan gebeurt dit alles meestal op een manier die niet onderworpen is

aan controles. Enkel voor de soorten die opgelijst staan in Annex A is een geldig CITES certificaat vereist, terwijl voor dieren opgelijst in Annex B een verklaring van wettelijke herkomst vereist is. Daarenboven moeten de eigenaars van dieren opgelijst in Annexen A en B, het aantal amfibieën dat ze aangekocht en/of verkocht hebben bijhouden (FPS Health, Food Chain Safety and Environment, 2015). Binnen België zijn alle inheemse amfibiesoorten beschermd onder het decreet van de Vlaamse regering (Soortenbesluit). Dit decreet verbiedt het opzettelijk vangen, doden of verstoren van inheemse amfibiesoorten. Daarenboven verbiedt het ook het bezit, transport, handel of ruilen van deze amfibiesoorten. Dit brengt ook met zich mee dat geen enkele van de desbetreffende soorten verkocht mag worden in tuincentra of gevangen mag worden in het wild om deze in tuinvijvers of aquaria te plaatsen. Door de Europese wetgeving betreffende de bescherming van inheemse soorten, is de handel verschoven naar exotische soorten zoals de Oostelijke meerkikker (*Pelophylax bedriagae* s.l.) die geïmporteerd wordt uit het Midden-Oosten. Deze invasieve exotische soort wordt niet opgelijst in het decreet en wordt nog altijd verkocht in tuincentra als de ‘Egyptische groene kikker’ (Jooris & Holsbeek, 2010). Import van stierkikker larven (*L. catesbeianus*) in de EU is daarentegen verboden sinds 1997 (EG regulation 338/97/EC). In België staat deze stierkikker op de zwarte lijst van invasieve exotische soorten en er is een koninklijk besluit op komst dat de import, export, doorvoer en het bezit van deze diersoort verbiedt (INVEXO, 2016). Binnen de EU is er ook een embargo op de handel, het bezit en import van deze soort sinds januari 2015 (EU Regulation 1143/2014 on Invasive Alien Species). EU landen zijn daarenboven verplicht om, waar mogelijk, nieuwe stierkikker populaties te eradiceren binnen de 2 maanden na opduiken van deze dieren (EC Environment, 2016).

Door de nadelige impact op commercieel en ecologisch belangrijke ectothermische vertebraten, staan zowel *Bd* als RV infecties in amfibieën door de World Organisation for Animal Health (OIE) opgelijst als aangifteplichtige pathogenen (Schloegel e.a., 2010),

waardoor er richtlijnen opgelegd zijn voor de invoer van amfibieën over internationale grenzen. Momenteel heeft het OIE opgelegd dat RV-geassocieerde amfibie epizoötieën en EHNV uitbraken in vissen aangifteplichtig zijn. FV3-like virussen gedetecteerd in wilde vissen of schildpadden moeten daarentegen niet gerapporteerd worden ondanks de aanwezigheid van genetisch identieke RVs in epizoötieën in sympatrische ectotherme vertebraten (Chinchar e.a., 2009; Chinchar & Waltzek, 2014). In België dienen *Bd* en RV infecties ook aangegeven te worden aan het FAVV. In september 2016 werd *Bsal* toegevoegd aan de lijst van aangifteplichtige pathogenen door het OIE. De wetgeving in België is echter nog niet aangepast, waardoor de pathogeen officieel nog niet aangifteplichtig is in België.

Zijn de huidige controlemaatregelen en beperkingen in de handel van in- en uitheemse amfibieën genoeg om verdere verspreiding van OIZ te voorkomen? Het antwoord is nee. Het is geweten dat RV, *Bd* en *Bsal* aanwezig zijn in hobbykweek amfibieën (bv. Pasmans e.a., 2008; Spitzen-van der Sluijs e.a., 2011; Sabino-Pinto e.a., 2015; Cunningham e.a., 2015), waardoor screening van deze dieren een heel belangrijke eerste stap zou zijn. In de VS worden eigenaars van gezelschapsdieren (zowel commercieel als niet-commercieel) aangemoedigd om hun salamanders te laten testen voor *Bsal*. Om dit te vergemakkelijken hebben de Amphibian Specialist Group (ASG) en de Amphibian Survival Alliance (ASA) tijdelijk gratis *Bsal* bemonstering kits aangeboden ([www.amphibians.org/news/free-base-testing-kits](http://www.amphibians.org/news/free-base-testing-kits)), waarop massaal beroep gedaan werd. In het totaal werden 639 salamander stalen onderzocht van 65 verschillende species voor *Bd* (prevalentie 1.3%) en *Bsal* (prevalentie 0.0%) (Klocke e.a., 2017). Ook in Nederland, worden groothandelaars en hobbykwekers aangemoedigd om hun ziek of overleden dier gratis te laten testen. Deze oproep werd verspreid op de website en het tijdschrift van de Nederlandse salamander society. Voor 2016 financieren de autoriteiten de kosten voor 100 dieren (Spitzen-van der Sluijs A., pers.comm).

Daarenboven zou men moeten overwegen om verplichte testen voor RV, *Bd* en *Bsal* in het land van herkomst uit te voeren alvorens de dieren geëxporteerd kunnen worden (Gray e.a., 2007). Momenteel kunnen amfibieën verscheept worden naar een ander continent binnen 24 uur. Bij aankomst op de transit wordt de gezondheidsstatus maar kort en visueel gecontroleerd, waardoor klinisch gezonde, maar geïnfecteerde amfibieën onopgemerkt de controle kunnen passeren. Een alternatief zou kunnen zijn dat men een quarantaine periode invoert bij aankomst en dat men tijdens deze quarantaine een verplichte screening van *Bd*, *Bsal* en RV uitvoert d.m.v. staalname via uitstrijkjes van de huid of door het water te analyseren waarin de dieren getransporteerd werden (Spitzen-van der Sluijs e.a., 2015). Daarenboven is het dringend noodzakelijk om het transport van zowel wildvang en geïnfecteerde amfibieën via handel te verbieden door lacunes in de wetgeving betreffende de handel in amfibieën op te lossen en door internationaal transport in toom te houden. Accurate registratie van geïmporteerde en verstuurde amfibieën in de luchthaven en andere plaatsen is noodzakelijk, net als een algemeen Europees verbod op grootschalige import van ziekte reservoir soorten zoals verschillende exotische salamandersoorten (waaronder *Bsal* reservoirs zoals *Cynops* spp., *Paramesotriton* spp.), voor commerciële doeleinden, ten minste totdat er correcte maatregelen getroffen zijn om ziekte-invoer te vermijden. Daarenboven zou het gunstig zijn om een 'vroeg waarschuwingssysteem' in te voeren en dit in samenwerking met de amfibie handelaars en dierenwinkels, waardoor morbiditeit en mortaliteit in geïmporteerde amfibieën opgevolgd kan worden en waardoor karkassen beschikbaar worden voor de screening van OIZ (Spitzen-van der Sluijs e.a., 2015).

## **6. MAATREGELEN OM DE EXPANSIE EN IMPACT VAN OPKOMENDE INFECTIEZIEKTEN BIJ AMFIBIEËN TE STOPPEN**

Zowel *Bsal* als RV zijn invasief en vormen een groot gevaar voor de biodiversiteit. De ontwikkeling van controle- en bestrijdingsmaatregelen die de effecten van deze pathogenen beperken is cruciaal. Daarenboven vormt ook *Bd* nog een mogelijks gevaar. De introductie van uitheemse genetische *Bd* lijnen kan leiden tot chytridiomycose uitbraken, ondanks het feit dat een endemische stam momenteel een evenwichtstoestand vormt met de gastheer in Noordwest-Europa (bv. Spitzen-van der Sluijs e.a., 2014).

Het probleem aanpakken van chytridiomycose en ranavirose in wilde populaties blijft een grote uitdaging. In tegenstelling tot *Bd* (Johnson & Speare 2003; 2005; Kirshstein e.a., 2007) is de kennis over de huidige verspreiding van *Bsal*, de mogelijke reservoirs, niet-amfibie vectoren en persistentie in de omgeving heel beperkt. Zich baserende op het potentieel van dit nieuwe pathogeen om zich snel te verspreiden tussen Urodela en zijn hoge pathogeniciteit in veel verschillende en vaak voorkomende salamandersoorten, is het van het grootste belang om preventieve maatregelen te nemen om verspreiding van dit pathogeen naar naïeve populaties en regio's te minimaliseren en zelfs te vermijden. Dit geldt ook voor ranavirose: eens het zich gevestigd heeft in wilde populaties, is het heel moeilijk om transmissie tussen dieren te vermijden (Ariel e.a., 2009). Heel vaak is het opduiken van RV gelinkt aan humane factoren, aan immunosuppressie door antropogene stressoren (chemicaliën, habitat fragmentatie/verandering) of aan de introductie van nieuwe virale types. Hieruit blijkt dat het, vooral voor RV, dringend noodzakelijk is om zich te focussen op strategieën die antropogene stressoren of de kans op pathogeen vervuiling minimaliseren (Gray e.a., 2009). Hoe dit uitgevoerd kan worden, zal meer in detail besproken worden in de volgende paragrafen (§ 6.1).

Hoewel er praktisch geen effectieve strategieën zijn om pathogene chytrid fungi en RV in aangetaste gebieden te eradiceren, is het toch mogelijk om *Bd* en *Bsal* te behandelen bij dieren in gevangenschap. Effectieve behandelingen voor RV bestaan er daarentegen nog niet. Algemeen is het wel zo dat er strategieën beschikbaar zijn om de effecten van de ziekte in een natuurlijke omgeving te bestrijden. Twee stadia kunnen dus geïdentificeerd worden, namelijk (i) preventieve maatregelen zoals het invoeren van import controles en het opleggen van een handelsverbod, ontwikkeling van een vroeg waarschuwingssysteem en het verzamelen van data over de huidige distributiepatronen van amfibieën en hun populatiegroottes; en (ii) maatregelen na blootstelling, waaronder bioveiligheidsmaatregelen, beperking van het verspreidingsgebied, educatie en kweek in gevangenschap (*ex-situ*). In de volgende paragrafen zullen deze maatregelen uitvoerig besproken worden. In **tabel 3** wordt een beknopt overzicht gegeven van de controle- en bestrijdingsmaatregelen die effectief geïmplementeerd zijn in bepaalde landen, maar ook maatregelen die momenteel onderzocht worden (onder gecontroleerde veldcondities). Een overzicht van alle mogelijke maatregelen die kunnen genomen worden, samen met een kosten-baten analyse, kan gevonden worden in **tabel 4**. Voor een uitvoerige review over bestrijdingsmaatregelen, verwijzen we naar Young e.a. (2007), Woodhams e.a. (2011) en Scheele e.a. (2014).

### ***6.1. Preventieve maatregelen***

#### **6.1.1. Import controle en verbod van handel**

Om introductie, vestiging en verspreiding van *Bsal* in het wild in de VS te vermijden, heeft de U.S. Fish and Wildlife Service als tijdelijke regel een lijst van 201 salamandersoorten opgesteld als schadelijk wild onder de Lacey Act (US Fish and Wildlife Service, 2016). Deze lijst omvat soorten van het geslacht *Chioglossa*, *Cynops*, *Euproctus*, *Hydromantes* (waaronder *Speleomantes*, gezien de gemeenschappelijke kijk op de taxonomie van deze taxa tussen Amerikaanse herpetologen), *Hynobius*, *Ichthyosaura*, *Lissotriton*, *Neurergus*, *Notophthalmus*,



*Onychodactylus*, *Paramesotriton*, *Plethodon*, *Pleurodeles*, *Salamandra*, *Salamandrella*, *Salamandrina*, *Siren*, *Taricha*, *Triturus* en *Tylototriton*. Sinds januari 2016, is de import en het transport tussen verschillende staten van al deze soorten strikt verboden. Zowel levende als dode exemplaren vallen onder deze tijdelijke regel, alsook lichaamsdelen waaronder ook uitstrijkjes van de huid en bewaard weefsel. Enkel eieren en gameten vallen buiten deze regel. Er kan wel nog een uitzondering verkregen worden door de US Fish and Wildlife Service als het gaat om transport die een staatslijn overschrijdt (of delen ervan) voor onderwijs, medische of wetenschappelijke redenen. Exemplaren (zowel dood als levend) die onder deze toelating vallen (eventuele nakomelingen behoren hier niet meer toe) moeten gehuisvest worden op een manier die dubbel beveiligd is (bv. een kooi in een kooi of gesloten ruimte). Deze maatregel moet onopzettelijke vrijlating van deze exemplaren verhinderen (US Fish and Wildlife Service, 2016). Het naburige land Canada heeft eveneens importcontroles geïmplementeerd en onderzoekt noodmaatregelen gelijkaardig aan deze van de VS om de risico's van *Bsal* te verminderen (Gray e.a., 2015).

Binnen Europa was Zwitserland het eerste land om onmiddellijk actie te ondernemen. Sinds 2015 heeft de Swiss Federal Food Safety and Veterinary Office (FSVO) een verbod ingevoerd op de import van alle salamandersoorten in Zwitserland (Schmidt, 2015). Het permanent comité van de conventie van Bern (internationaal verdrag inzake het behoud van in het wild voorkomende dier- en plantensoorten en de daarbij behorende grensoverschrijdende natuurlijke habitats in Europa) was de eerste om het belang en het potentieel gevaar van *Bsal* aan te kaarten. In december 2015 heeft het permanent comité van de raad van de EU een aanbeveling omtrent *Bsal* goedgekeurd waarbij ze de andere landen aanmoedigt om dringend actie te ondernemen tegen dit pathogeen. Meer bepaald worden de contractpartijen aangemoedigd om een noodactieplan op te stellen, te investeren in onderzoek over de biologie en bestrijdingsmaatregelen van dit pathogeen, om monitoringsprogramma's op te stellen, om

handelsrestrictie toe te passen en om pre-import screenings uit te voeren als voorzorgsmaatregel. Vooral in gebieden met een hoog risico, zoals regio's met endemische populaties en regio's die naast een ziekte-uitbraak gelegen zijn (bv. België), heeft het comité opgeroepen om dringend monitoringsprogramma's op te stellen en handelsrestrictie in te voeren (COE, 2015). In februari 2016 heeft een consortium van meer dan 45 NGO's en wetenschappers, een oproep geplaatst naar de Europese commissie en de Belgische federale minister van leefmilieu om deze bovengenoemde aanbevelingen te implementeren en om *Bsal* te omschrijven als een pathogeen van wereldwijde zorg onder de wetgeving van dierenwelzijn. De Europese commissie heeft hierop als respons een tender (aanbesteding) uitgeschreven "tender ENV.B.3/SER/2016/0028; Mitigating a new infectious disease in salamanders to counteract the loss of European biodiversity.

The Pet Industry Joint Advisory Council (PIJAC) heeft aan alle exporteurs, verscheper, importeurs en kopers van *Cynops orientalis* en *Pachytriton labiatus* (lipsalamander) aangeraden om onmiddellijk een vrijwillig moratorium in te voeren betreffende de import van deze dieren in de VS. Ze hebben ook aangeraden dat alle groothandelaren die betrokken zijn in de handel van salamanders, regelmatig hun faciliteiten ontsmetten als een profylactische maatregel. Het Ornamental Fish International (OFI) heeft het PIJAC gevolgd en vraagt aan alle leden om dit moratorium te respecteren (OFI, 2016).

### **6.1.2. Vroege waarschuwingssystemen**

Het invoeren van vroege waarschuwingssystemen is zeer gunstig om uitbraken zo snel als mogelijk in kaart te brengen (zie bv. Young e.a., 2012a). Het Vlaamse Agentschap voor Natuur en Bos (ANB) heeft in samenwerking met de Universiteit Gent een meldpunt geopend (meldpuntziekeamfibieën@ugent.be) dat door het algemene publiek gebruikt kan worden om observaties omtrent verdachte overlijdens bij amfibieën te melden. Dode amfibieën kunnen daarenboven verstuurd worden naar de Universiteit Gent waar ze vervolgens de doodsoorzaak

achterhalen. Dit alles wordt gefinancierd door het ANB. De effectiviteit van dit vroege waarschuwingssysteem is o.a. gebleken in 2015 door de ontdekking van *Bsal* in Duffel (provincie Antwerpen) in een dode *I. alpestris* die verzameld werd door een lokale vrijwilliger. De kosten om dit vroege waarschuwingssysteem uit te werken zijn eerder laag, terwijl de kosten die nodig zijn voor het transport en de diagnose eerder gemiddeld zijn. Voor Wallonië is er een meldingspunt geopend door het Département de la Nature et des Forêts (DNF)(DNF, 2016). Ook via deze weg kunnen dode amfibieën opgestuurd worden naar de Universiteit Gent voor verder onderzoek. Gelijkaardige meldpunten zijn ook uitgewerkt in naburige landen door het Dutch Wildlife Health Centre (DWHC) in samenwerking met RAVON, de Duitse Universiteiten van Trier en Braunschweig, het Zwitserse KARCH, ZLS te London, CEFE te Montpellier, Frankrijk, Universiteit van Genova, Italië en CSIC in Spanje. Observaties door de gemeenschap of door organisaties kunnen een belangrijke rol spelen door het aanleveren van surveillance data, wat kan toelaten om het onderscheid te maken tussen een endemische en opkomende amfibieziekte (Young e.a., 2012). In België, hebben de Vlaamse natuurvereniging “Natuurpunt” en de Waalse tegenhanger “Natagora” een specifieke website ontwikkeld (<http://waarnemingen.be/>; <http://observations.be/>) om observaties omtrent amfibiesoorten (en andere) te verzamelen en beschikbaar te stellen voor de gemeenschap. De input komt van vrijwilligers, alsook van verschillende natuurwerkgroepen en wordt continu geëvalueerd door specialisten op het vlak van amfibieën. In vergelijking met Vlaanderen zijn de observaties in Wallonië minder uitgebreid, wat een belangrijk punt voor verbetering is. De meeste *Bsal* uitbraken zijn in Wallonië gesitueerd (behalve Duffel), waardoor de observaties door vrijwilligers heel belangrijk kunnen zijn om nieuwe uitbraken op te sporen, zeker in deze gebieden.

### 6.1.3. Monitoringsgegevens

Om te kunnen nagaan wanneer er een significante daling optreedt in een amfibiepopulatie, zou essentiële ecologische basisinformatie zoals distributiepatronen en populatieaantallen beschikbaar moeten zijn (Nichols & Williams, 2006; Grogan e.a., 2014). Bijvoorbeeld, studies waarbij dieren gemarkeerd worden waardoor ze bij hervangst geïdentificeerd kunnen worden, leveren meestal lange termijn data op over populatiedynamiek en zijn hiervoor een geschikte manier (Cooch e.a., 2012). Betreffende de OIZ, is het belangrijk om amfibieënpopulaties te identificeren die gevoelig kunnen zijn voor de introductie van *Bd*, *Bsal* en RV. Opvolging van deze populaties zou voorrang moeten krijgen (Skerratt e.a., 2010). Data over de distributie van amfibieën in België is meestal voldoende beschikbaar (<http://www.hylawerkgroep.be/>; Jacob e.a., 2007), maar informatie over de effectieve populatieaantallen (aantal individuen in een populatie) en hun aandeel in aanwezigheid (relatieve representatie van een soort in een specifiek ecosysteem) ontbreekt heel vaak. De haalbaarheid om dergelijke gegevens op nationale schaal te collecteren is laag wegens financiële en logistieke beperkingen. Niettegenstaande kan er prioriteit gegeven worden om te starten met het bepalen van de populatiegrootte van zeldzame en kwetsbare amfibiesoorten of kan hun aandeel in aanwezigheid geschat worden. In België, zijn de meest kwetsbare soorten en ook de soorten die het meest beperkt zijn in gebied, *Alytes obstetricans* en *Salamandra salamandra*. Het zijn ook de amfibiesoorten die significante dalingen in populatieaantallen ondergaan hebben in andere landen ten gevolge van RV uitbraken en chytridiomycose (Bosch e.a., 2001; Balseiro e.a., 2010a; Spitzen-van der Sluijs e.a., 2013). Een onderzoeksproject van het ANB in samenwerking met de Universiteit Gent (2015-2017) heeft als doel om schattingen te bieden van populatiegrootte/aanwezigheid via monitoring van bepaalde geselecteerde populaties van vuursalamanders en vroedmeesterpadden in Vlaanderen. De gebieden waar deze amfibieën voorkomen zijn veel uitgestrekter in Wallonië, waardoor de

haalbaarheid om voldoende populatie data te verzamelen daalt. Niettegenstaande is het aangewezen om populatieaantallen van *Alytes obstetricans* en *Salamandra salamandra* op strategische plaatsen uit te voeren, bv. langs de veronderstelde zuid-westwaartse verspreidingsroute van *Bsal*. Monitoringsprotocollen omvatten vang-hervang technieken (waarbij individuen gemerkt worden of op basis van hun patroon herkend worden) en bemonsteringen van populaties, die vaak geïmplementeerd worden langs bepaalde routes in het geval van terrestrische dieren. Aquatische larven en watersalamanders, kikkers en padden, maar ook parende volwassen salamanders kunnen gevangen worden via fuiken tijdens herhaaldelijke bemonsteringen van een bepaalde locatie (bv. een vijver). De gegevens en aantallen kunnen vervolgens gebruikt worden om een schatting te maken van de populatieaantallen. Voor een gedetailleerde review, zie Heyer e.a. (2014).

#### **6.1.4. Actieve opvolging**

Verschillende auteurs van wetenschappelijke artikels pleiten voor de implementatie van systematische surveillance programma's (zie bv. Grogan e.a., 2014; Tompkins e.a., 2015). Momenteel gebeurt de ziekte-opvolging vaak *ad hoc* en is dit afhankelijk van passieve surveillance (data gecollecteerd door de lokale bevolking). Effectieve surveillance is cruciaal voor het vroeg opsporen van OIZ-uitbraken, wat het treffen van geschikte maatregelen tijdens een noodtoestand mogelijk maakt. Deze opvolging is aan de dure kant, maar het kan op lange termijn eventueel leiden tot een daling van de kosten verbonden aan een ziekte-uitbraak. Systematische surveillance van ziekte zou in eerste instantie toegepast moeten worden op gastheren en plaatsen die een groot gevaar lopen om geïnfecteerd te geraken zoals kleine, gesloten populaties van sterk gevoelige soorten in sterk gefragmenteerde gebieden. In het algemeen is geweten dat kleinere populaties vatbaarder zijn voor uitroeiing (Lande, 1993). Herhaaldelijk pathogeen-geassocieerde massale sterfte in kleine, demografisch geïsoleerde populaties met geen immigratie van naburige gezonde populaties, kan uitsterven veroorzaken

als het herstel negatief beïnvloed wordt gedurende verschillende opeenvolgende jaren. Voor RV zijn er populatiemodellen die voorspellen dat herhaaldelijke RV-geassocieerde massale sterfte (jaarlijks of 2-jaarlijks interval) een gesloten amfibiepopulatie kan doen uitsterven binnen de 5 of 25-44 jaar, respectievelijk (Earl & Gray, 2014). Een emblematisch voorbeeld van *Bd*-geïnduceerde uitroeiing is het Neotropisch genus *Atelopus* (harlekijnkikker), waarvan ten minste 30 van de 97 soorten vermoedelijk uitgestorven zijn. De meeste *Atelopus* soorten bezetten relatief kleine geografische gebieden, zoals één bepaalde stroom (IUCN, 2015).

Ten tweede, zou er surveillance moeten gebeuren van sentinel soorten of individuen die zich in sentinel gebieden bevinden (Grogan e.a., 2014; Earl & Gray, 2014). In de brede zin van het woord kunnen deze sentinel soorten een vroege indicatie geven van gevaren voor het milieu (meestal voor mensen, zoals kanaries in de koolmijnen). Hier worden sentinel soorten gedefinieerd als met voorkeur soorten die een wijdverspreide aanwezigheid en/of distributie vertonen en die gevoelig zijn voor het pathogeen dat opgevolgd wordt. Deze sentinel soorten zijn dus ook in staat om een detecteerbare respons te ontwikkelen t.o.v. het pathogeen. Daarenboven is de kans dat de sentinel populatie blootgesteld wordt aan het pathogeen groter of is de reactie t.o.v. het pathogeen groter dan bij andere populaties (Halliday e.a., 2007). Als voorbeeld in België kan *Alytes obstetricans* dienen als een sentinel soort voor *Bd* (Pasmans e.a., 2010), terwijl *Salamandra salamandra* kan dienen als een sentinel soort voor *Bsal*. Sentinel locaties zijn fysieke locaties die geselecteerd worden om een bepaalde ziekte op te volgen (Halliday e.a., 2007). In samenwerking met het ANB en Natuurpunt is de Universiteit van Gent bezig met de opvolging van 10 sentinel locaties waar *Salamandra salamandra* populaties gevonden kunnen worden en bij 5 sentinel locaties *Alytes obstetricans*. Voor de praktische aanpak refereren we naar Grogan e.a. (2014).

### 6.1.5. Bioveiligheidsmaatregelen

Preventieve maatregelen zouden de kans op pathogeen vervuiling moeten reduceren. Het is echter ook van uiterst belang dat deze preventieve maatregelen zoals monitoringsactiviteiten met de nodige aandacht voor bioveiligheidsmaatregelen uitgevoerd worden. Dit om te vermijden dat OIZ zich verder verspreiden. Er werd een handelingscode uitgewerkt door het 'Declining Amphibian Populations Task Force' namelijk de DAPTF Fieldwork Code of Practice (<http://www.fws.gov/ventura/docs/species/protocols/DAFTA.pdf>) waarin specifieke richtlijnen vermeld staan voor veldwerkers in voortplantingsgebieden van amfibieën of in andere aquatische habitats, om onopzettelijke verspreiding van het ziekte-agens te vermijden. De richtlijnen beschrijven het gebruik van een 70% ethanol oplossing of 3-6% natriumhypochloriet om veldmateriaal te ontsmetten. Deze richtlijnen zijn geïmplementeerd in de meeste Angelsaksische landen en ze werden samen met hygiëneprotocollen verspreid naar verschillende organisaties (bv. Amphibian Ark (AArk), FrogLog) en wildlife onderzoekscentra zoals NSW National Parks en Wildlife Service (Department of Environment and Climate change, Australië). Binnen Europa heeft het RACE (Risk Assessment of Chytridiomycosis to European Amphibian Biodiversity) project, dat als doel had handelingen en protocollen te ontwikkelen die surveillance van *Bd* mogelijk maken, hygiëne protocollen gepubliceerd waarbij 1% VirkonS<sup>®</sup> als desinfectans gebruikt wordt (RACE, 2010). Als gevolg van de RV en *Bsal* uitbraken in Nederland, werd ook een hygiëneprotocol opgesteld door veldwerkers waarbij ook gebruik gemaakt werd van 1% Virkon S<sup>®</sup> als desinfectans. Dit protocol werd uitgegeven door het Nederlandse RAVON (RAVON, 2016) en werd ondertussen geïmplementeerd in de meeste Europese landen, waaronder België. De praktische zaken en de mogelijkheden om veldmateriaal te desinfecteren zal uitvoerig besproken worden in **6.2.1**.

Zoals eerder vermeld kunnen larven en volwassen amfibieën subklinisch (zonder duidelijke symptomen van ziekte te vertonen) geïnfecteerd zijn met RVs of met pathogene chytrid schimmels. Dit brengt met zich mee dat aquarium dieren niet in het wild vrijgelaten mogen worden en zelfs niet uitgewisseld mogen worden tussen verschillende vijvers. In feite mogen geïnfecteerde amfibieën totaal niet verplaatst worden. Er zijn geen quarantaine data beschikbaar uit de literatuur, waardoor het ook onduidelijk is of vrijzetting of translocatie van amfibieën gebruikelijke praktijken zijn in België. Als we ons baseren op de huidige distributie van de stierkikker rond Antwerpen en de aangrenzende gebieden met Nederland, dan moet dit zeker het geval geweest zijn voor deze amfibiesoort tijdens de jaren 90. De larven van de stierkikker waren populair om vrijgezet te worden in tuivijvers, maar door de uiteindelijke grootte van een volwassen dier en hun luid gekwaak, zijn sommige stierkikkers in het wild vrijgezet geweest (INVEXO, 2016). De meest waarschijnlijke manieren voor vrijzetting van amfibieën in het algemeen zijn (i) ontsnapping van aquarium dieren, (ii) vrijzetting van amfibieën uit tuincentra in tuinvijvers en (iii) vrijzetting van wildvang (inheemse) amfibieën in tuinvijvers.

#### **6.1.6. Antropogene en natuurlijke maatregelen**

Antropogene (bv. chemicaliën, fragmentatie en verandering van habitat) en natuurlijke stressoren (bv. de aanwezigheid van invasieve soorten) kunnen beide op een directe of indirecte manier het immuunsysteem beïnvloeden via veranderingen in pathogeen-gastheer interacties (Martin e.a., 2010). Als preventieve maatregel, voornamelijk voor RV, zouden strategieën geïmplementeerd moeten worden die antropogene stressoren minimaliseren. Dit kan bereikt worden door het gebruik van chemicaliën in voortplantingsgebieden voor amfibieën te beperken. Daarenboven kunnen onverstoorde bufferzones met vegetatie aangelegd worden rond deze voortplantingsgebieden om de impact van de mens op de aquatische omgeving te minimaliseren (Semlitsch & Bodie 2003). Het verwijderen van vee



van deze gebieden is tevens een efficiënte maatregel om RV prevalentie in bepaalde amfibiesoorten te reduceren (Gray e.a., 2007). Om RV uitbraken in tuinvijvers te vermijden, dient men de introductie van uitheemse amfibiesoorten en het gebruik van herbiciden en slakkenkorrels in de zomer te minimaliseren (North e.a., 2015). Ander belangrijke preventieve maatregelen omvatten o.a. de bescherming van terrestrische en zoetwater habitats (zie bv. Scheele e.a., 2015a) en eradicatie van invasieve soorten (Rijks e.a., 2013; Scheele e.a., 2014). Amfibieënpopulaties waar chytridiomycose zou kunnen toeslaan zouden ook voordeel hebben van deze maatregelen.

## ***6.2. Maatregelen na blootstelling***

De acties die opgelijst staan in **box 1** moeten in het geval van een OIZ uitbraak toegepast worden en deze worden onderaan verder besproken.

- Het vastnemen van amfibieën mag enkel uitgevoerd worden als het echt nodig is.
- Alle activiteiten voor de opvolging, het onderzoek en beheer van het gebied kunnen enkel uitgevoerd worden als alle voorzorgsmaatregelen en hygiëneprotocollen gevolgd worden.
- Het uitbraakgebied moet in quarantaine geplaatst worden.
- Het lokale publiek en de lokale betrokkenen moeten geïnformeerd worden.
- “Pathogene-vrije” amfibie stocks (vooral in het geval van conservatieprogramma’s) kunnen aangelegd worden.

**Box 1:** Onmiddellijke acties die ondernomen moeten worden in het geval er een OIZ uitbraak is (NSW, 2008; Woodhams e.a., 2011; Rijks e.a., 2013; Scheele e.a., 2014).

### **6.2.1. Maatregelen om verspreiding door de mens tegen te gaan**

Veldbiologen, boswachters, onderwijzers, toeristen, studenten en andere bezoekers van een uitbraakgebied kunnen bijdragen tot de verspreiding van het pathogeen door een wijde waaier van acties. Dit omvat, maar is niet gelimiteerd tot het vastnemen van de dieren, het gebruik van veldmateriaal (bv. schepnet, fuiken, botten) zonder desinfectie, of het verplaatsen van dieren zoals kikkervisjes, van de ene locatie naar de andere. Het volledig afsluiten van het uitbraakgebied is echter ook geen goede zaak, omdat veldwerk voor wetenschappelijke doeleinden en onderwijzende activiteiten van groot belang zijn. Na een uitbraak zou daarom

een bioveiligheidsprotocol geïmplementeerd moeten worden (zie bv. Scheele e.a., 2014). De haalbaarheid voor de implementatie van dergelijke protocollen is hoog. Meer zelfs, deze zijn recent ontwikkeld en werden reeds toegepast op verschillende plaatsen van uitbraak, zowel in België en Nederland. Bioveiligheidsprotocollen reguleren de activiteiten die in het veld uitgevoerd worden, zoals het vastnemen van dieren, desinfectie van veldmateriaal en het aantal plaatsen die bezocht kunnen worden tijdens één dag. Het doel van deze maatregelen is een uitbraak tegengaan en expansie van het pathogeen via humane activiteiten verhinderen (Rijks e.a., 2013; Scheele e.a., 2014).

Het is aangeraden om veldmateriaal dat in contact geweest is met amfibieën, vijverwater of modder (zoals netten, botten, baggerlaarzen) te desinfecteren tussen verschillende plaatsen waar er stalen genomen worden (Johnson & Speare, 2003; Webb e.a., 2007; Young e.a. 2007), en om ze te laten drogen alvorens te hergebruiken. Een aantal fysieke maatregelen en chemische desinfectantia kunnen *Bd* en *RV in vitro* (**tabellen 5 en 6**) inhiberen. Echter, geen enkele van deze maatregelen en desinfectantia werden getest voor *Bsal*, dus validatie voor het gebruik tegen *Bsal* is dringend nodig. Het weken van potentieel gecontamineerd materiaal in een 3-5% natriumhypochloriet oplossing (bleekwater), 1% kalium monopersulfaat (Virkon S<sup>®</sup>) of 70% EtOH gedurende 1 minuut is voldoende om zowel *Bd* als *RV* te inactiveren (Langdon et al 1989; Phillott e.a., 2010; Johnson e.a., 2003; Webb e.a., 2007; Becker and Gratwicke, 2017; Van Rooij e.a., 2017). Blootstelling aan een 0.75% chloorhexidine (Nolvasan<sup>®</sup>) oplossing gedurende 1 minuut desinfecteert materiaal gecontamineerd met *RV* en/of *Bd* (Bryan e.a., 2009; Gold e.a., 2013). Zowel bleekwater als chloorhexidine verliezen echter hun kracht als ze blootgesteld worden aan organisch materiaal. Dit impliceert dat het materiaal eerst schoongemaakt moet worden (verwijderen van plantmateriaal en modder), alvorens dit gedesinfecteerd kan worden. Ook al is het belangrijk om het gebruikte materiaal ter plaatse te desinfecteren, toch moet men opletten dat het gebied en de omgeving niet

vervuild worden met deze desinfectantia. De meeste van deze ontsmettingsproducten zijn namelijk toxisch voor aquatische organismen en van sommige is de ecotoxiciteit nog niet (volledig) gekend (zie **tabel 7**). Indien het gebruikte materiaal niet gedesinfecteerd kan worden op de plaats zelf, dan moet het materiaal verpakt worden in plastic en achteraf gedesinfecteerd worden in het laboratorium of thuis. Om kledij en/of materiaal te steriliseren kan een combinatie van desinfectie door hitte (30 min bij 60°C of 24 uur bij 40°C) en vervolgens door uitdroging gebruikt worden (Langdon e.a., 1989; Johnson e.a., 2003; Jancovich e.a., 2011). Indien geopteerd wordt om enkel via uitdroging te werken, dan moet dit lang genoeg duren opdat al het water verdampt is (Johnson e.a., 2003). Warm water op een temperatuur dat nog veilig is voor de mens (> 60°C voor een minimum van 5 minuten) kan gebruikt worden om aquarium materiaal, containers en reservoirs te desinfecteren (Johnson e.a., 2003). Sterilisatie via ultraviolet licht kan ook gebruikt worden om RV besmet water te inactiveren (Miocevic e.a., 1993).

De meeste hygiëneprotocollen beschrijven het gebruik van ofwel bleekwater of Virkon S<sup>®</sup> als desinfectans in het veld. Recent werd door Van Rooij e.a. (2017) aangeraden om 1% Virkon S<sup>®</sup>, 4% natriumhypochloriet (bleekwater) of 70% ethanol te gebruiken om materiaal te desinfecteren, met een minimale inwerkingstijd van 5 minuten voor 1% Virkon S<sup>®</sup> en 1 minuut voor natriumhypochloriet en ethanol. Deze condities zijn efficiënt om zowel *Bsal*, *Bd* als RV te inactiveren. In de meeste Angelsaksische landen wordt een 70% ethanol oplossing of 3-6% natriumhypochloriet (bleekwater) (DAPTF) beschreven in de hygiëneprotocollen. Toch geniet het gebruik van Virkon S<sup>®</sup> de voorkeur in Europa (RACE, 2010; RAVON, 2016). Het wordt aanbevolen boven het gebruik van bleekwater omdat de impact op de omgeving geringer is (RACE, 2010). Virkon S<sup>®</sup> is minder toxisch voor amfibieën indien er zich een accidentele blootstelling zou voordoen (Schmidt e.a., 2009). Virkon S<sup>®</sup> heeft geen detecteerbaar of significante negatieve effecten op kikkervisjes en zoöplankton (Schmidt e.a.,

2009; Hangartner & Laurila, 2012), terwijl directe blootstelling aan bleekwater kan resulteren in nadelige effecten, waaronder sterfte (Schmidt e.a., 2009). Het is belangrijk om op te merken dat Virkon S<sup>®</sup> momenteel geklasseerd wordt door de federale overheidsdienst (FOD) voor volksgezondheid als een product type 3 (PT3) biocide met een groot risico voor de gezondheid. Dit heeft als gevolg dat dit product in België enkel gebruikt mag worden voor diergeneeskundige hygiëne maatregelen binnen gesloten systemen. Virkon S<sup>®</sup> is dus niet geregistreerd voor veldwerk in België, terwijl desinfectantia geregistreerd als PT2 zoals bleekwater wel toegelaten worden voor veldwerk (zie **tabel 7**). Dettol<sup>®</sup>, een wereldwijd beschikbaar fenolisch desinfectans geregistreerd als PT2, is voor zover we weten nog niet geëvalueerd als desinfectans tegen OIZ in amfibieën. Een groot nadeel van Dettol is echter dat het heel toxisch is voor amfibieën<sup>4</sup>. De meeste andere desinfectantia met een *in vitro* activiteit tegen *Bd* en *RV* zijn nog niet geregistreerd als biocide in België. Tijdens de zoektocht naar desinfectantia die actief zijn tegen *RV*, *Bd* en *Bsal*, moet men rekening houden met residuele activiteit, effecten op stof en metaal, toxiciteit voor de omgeving, relatieve veiligheid voor de mens, de kosten, beschikbaarheid en mogelijke inactivatie in de aanwezigheid van organisch materiaal en andere componenten zoals zeep. Daarenboven zouden de alternatieve desinfectantia geregistreerd moeten worden als een PT2 biocide dat gebruikt kan worden in open circuits.

Voertuigen zouden ook schoongemaakt en gedesinfecteerd moeten worden (Phillott e.a., 2010) en dit niet enkel na het bezoeken van uitbraakgebieden, maar ook in gebieden waar nog geen OIZ gevonden zijn. Het is belangrijk dat de banden eerst schoongemaakt (verwijderen van modder) en gedesinfecteerd worden alvorens het gebied te verlaten. Desinfectantia die geschikt zijn om schoeisel te desinfecteren, kunnen gebruikt worden. Het schoonmaken van

---

<sup>4</sup> In een poging om de invasieve reuzenpad (*Rhinella marina*) in het tropisch Australië tegen te houden, werden vijverranden besproeid met Dettol om metamorfen van deze soort te doden. In 2009 werd het gebruik van Dettol voor het onder controle houden van paddenpopulaties verboden wegens de schadelijke effecten op de inheemse dieren (zie bv. Kelehear e.a., 2012).

voertuigen dient uitgevoerd te worden op een veilige afstand van water (bv. poel, vijver) om het risico op contaminatie te minimaliseren (Murray e.a., 2011). Ideaal gezien zou een voertuig tussen verschillende gebieden gewassen moeten worden in een carwash waar gewerkt wordt met warm water onder hoge druk. Dezelfde procedure is ook aangeraden voor groter materiaal, zoals boten, kano's, sleepnetten, etc. Als dit niet haalbaar is, zoals het geval is voor grote voertuigen die gebruikt worden voor het beheer van grote natuurgebieden (bv. graafmachine, vorkheftruck, vrachtwagens, tractoren), moet ten minste alle modder verwijderd worden op het gebied zelf door proper water te gebruiken (RAVON, 2016).

Belangrijke punten waarop gelet moet worden zijn inderdaad de voorzorgen die men moet nemen als er werkzaamheden op het gebied uitgevoerd worden (bv. uitgraven van vijvers, beken en banken, het omzagen van bomen, maaien, ...). Gedurende de *Bsal* uitbraak in Robertville hebben de onderzoekers die monitoringsactiviteiten uitgevoerd hebben, laten weten dat er nog altijd werkzaamheden uitgevoerd werden in dit gebied. Voor gebieden waar OIZ gedetecteerd zijn, bestaan er nog geen richtlijnen over het feit of deze activiteiten onmiddellijk gestopt moeten worden, of enkel wanneer de toepassing van bioveiligheidsmaatregelen niet gegarandeerd kan worden.

Transmissie van OIZ wordt in de hand gewerkt door het vastnemen van amfibieën zonder het nemen van voorzorgsmaatregelen. Daarom wordt het aangeraden om 1 paar niet-latex handschoenen per dier te gebruiken (Mendez e.a., 2008). Naast latex blijken ook vinyl en nitril handschoenen schadelijk te zijn voor larven, waardoor handschoenen eerst gereinigd dienen te worden met water alvorens larven te hanteren (Cashins e.a., 2008). Als het niet mogelijk/haalbaar is om handschoenen te dragen, dan raadt men aan om de handen te wassen met een desinfecterende handgel.

Tot op heden blijft het ongekend welke rol het algemeen publiek zoals wandelaars en ecotoeristen speelt in de verspreiding van pathogenen. Uit voorzorg werden bepaalde

uitbraakgebieden gesloten voor het grote publiek om mens-gemedieerde verspreiding uit te sluiten. In Nederland bijvoorbeeld werden bepaalde poelen met succes afgesloten voor het grote publiek nadat mortaliteit t.g.v. RV vastgesteld en bevestigd werd (Kik e.a., 2011). Dit kan een effectieve maatregel zijn als de gastheer een aquatische levensstijl heeft. Natuurlijk kunnen dergelijke maatregelen pas geïmplementeerd worden als alle lokale betrokken partijen zoals natuurorganisaties, boeren en andere private landeigenaren akkoord zijn hiermee (Minteer & Collins, 2008). Om de effectiviteit van deze quarantainemaatregel te verzekeren, kunnen informatieborden geplaatst worden waarop de aanwezigheid van het pathogeen en het effect op de gastheer vermeld wordt. Dit kan tevens een mogelijkheid bieden om de mensen bewust te maken van de problemen die zich kunnen voordoen omtrent conservatie (Rijks e.a., 2013). Extra informatieve en onderwijzende presentaties of persberichten op lokale schaal kunnen eveneens helpen om het brede publiek te informeren over het belang van quarantainemaatregelen en de bescherming van gastheersoorten. De haalbaarheid en de kosten verbonden aan deze acties kunnen sterk verschillen. Voor het afsluiten van kleinere gebieden, poelen of vijvers voor het grote publiek zullen er waarschijnlijk minder partijen betrokken zijn en zal er minder educatie nodig zijn (hoge haalbaarheid en lage kosten). Voor het afsluiten van grotere gebieden zoals bossen zullen er echter meer partijen betrokken zijn en veel educatie en informatie nodig zijn om de effectiviteit van de maatregelen te garanderen (hogere kosten). Aangezien de routes van natuurlijke verspreiding van *Bd*, *Bsal* en RVs nog niet volledig gekend zijn, is het volledig inperken van wilde dieren in een uitbraakgebied niet mogelijk. Daarenboven zijn de inspanningen die men maakt om conservatie in het algemeen te stimuleren, vaak gericht naar het in contact brengen van populaties van wilde dieren om op die manier functionele metapopulaties tot stand te brengen. Een mogelijkheid om de natuurlijke verspreiding van amfibieën toch enigszins te beperken is het gebruiken van

bestaande natuurlijke barrières (takkenhopen, landschapselementen) of deze tijdelijk op te stellen (Rijks e.a., 2013).

### **6.2.2. Continue opvolging**

Monitoring van populaties en amfibiesoorten moet verdergezet worden indien hier al mee gestart werd, maar zou zeker gestart moeten worden na een uitbraak van een OIZ (Woodhams e.a., 2011). In het eerste geval kunnen de populatiegroottes voor en na de uitbraak vergeleken worden met elkaar om op die manier de achteruitgang van de gastheersoort in kaart te brengen (bv. Spitzen-van der Sluijs e.a., 2013). Monitoring na een uitbraak kan echter ook helpen om inzicht te krijgen in de impact van een pathogeen. Het opvolgen en beschikbaar stellen van deze data kunnen inzicht verschaffen in hoe RV, *Bsal* en *Bd* specifieke populaties treffen en welke maatregelen er getroffen kunnen worden om de gevolgen in te perken. De haalbaarheid en de kosten verbonden aan deze acties stemmen overeen met de eerder vernoemde kosten verbonden aan monitoring.

Om de impact van *Bd* op de biodiversiteit van inheemse amfibieën na te gaan, startte het ANB, in 2015 in samenwerking met de Universiteit Gent en Natuurpunt, met de monitoring en de surveillance van chytridimycose in Vlaanderen. Momenteel zijn er geen dergelijke opvolging- en surveillanceprogramma's voor OIZ in Wallonië, ondanks de dreiging van *Bsal* in deze gebieden.

### **6.2.3. Ex-situ aanpak**

**a) Kweek in gevangenschap (ex situ) en herintroductie** – De kweek in gevangenschap en de herintroductie zijn belangrijk maar controversieel<sup>5</sup>, ondanks goed gedocumenteerde gevallen van succes (voor een review zie bv. Griffiths & Pavajeau, 2008; Smith & Sutherland, 2014). Het is echter zo dat het uitwerken van een leefbare populatie in gevangenschap enkel gerechtvaardigd is als er extreme noodmaatregelen genomen moeten worden. Deze actie zou

---

<sup>5</sup> Gevangenschap kan de overleving van hergeïntroduceerde dieren in het algemeen negatief beïnvloeden door inteelt, verlies aan genetische diversiteit en algemene aanpassing aan het leven in gevangenschap (Frankham e.a., 2004).

bovendien gezien moeten worden als een actie van korte tot medium duur tegen massale sterfte en uitroeiing van bepaalde populaties.

*Ex situ* kolonies kunnen extra tijd opleveren om *in situ* conservatiemaatregelen uit te werken en te implementeren, en om de gevangengenomen dieren te herintroduceren (Gascon e.a., 2007). Conservatieprogramma's kunnen onderverdeeld worden in kweek in gevangenschap (KG), kweek in gevangenschap en herintroductie (KG&H), en translocatie (T). KG soorten worden enkel gehouden om te kweken in gevangenschap zonder onmiddellijke plannen van herintroductie of vrijzetting, meestal door de nog steeds aanwezige dreigingen in het wild die niet bestrijd kunnen worden. KG&H soorten zijn gekweekt in gevangenschap met de bedoeling tot herintroductie. T soorten zijn dieren die verplaatst worden naar een ander gebied. Hieronder valt ook de techniek "voorsprong" (zie later) met gevangengenomen dieren (Griffiths & Pavajau, 2008; Harding e.a. 2015). Harding e.a. (2015) heeft alle KG&H programma's voor amfibieën verzameld uit de literatuur, de AArk database en IUCN Red List sinds de publicatie van het Amphibian Conservation Action Plan (ACAP) (Gascon e.a., 2007). De meeste programma's hebben zich gefocust op gevangenschap-zekerheid programma's, d.w.z. soorten die in gevangenschap genomen zijn om uitsterving in het wild te vermijden. Dit gaat over een 75 tal soorten. Er zijn relatief weinig herintroducties uitgevoerd (41 soorten), waarvan slechts 21 soorten een herlocatie ondergaan hebben. Elk programma type zal hieronder in detail besproken worden.

Voornamelijk zoos en aquaria zijn betrokken in KG, maar ook andere partners zoals universiteiten, musea, private faciliteiten, overheidsfaciliteiten, etc. kunnen een significante rol spelen (Zippel e.a., 2011; Harding e.a., 2015). Na de Global Amphibian Assessment (GAA)(Stuart e.a., 2004) in 2004, is het aantal van wereldwijde bedreigde amfibiesoorten (WBS) die in zoos gehouden worden significant gestegen. Het is echter zo dat dit nog altijd maar 6% van alle WBS omvat. De WBS van Noord-Amerika, Europa en Oceanië zijn het best



vertegenwoordigd in zoos, met die van Oceanië als sterkste stijger sinds 2004. Zuid-Amerikaanse en Aziatische WBS blijven achter. De Europese zoos bezitten echter het laagste aandeel van WBS en er werd geen stijging waargenomen na 2004 (Dawson e.a., 2015).

Het succes van KG hangt af van de gezondheid en het kweksucces van de oorspronkelijke “startpopulatie”. Dit kunnen echter uitdagende factoren zijn, zeker voor soorten waarmee nog nooit gekweekt werd in gevangenschap (Ferrie e.a., 2014; Pessier e.a., 2014). Er zijn slechts beperkte data beschikbaar over uitvalpercentages bij KG. De studie van Pessier e.a. (2014) is de eerste die de oorzaken van sterfte samenvat bij een grote *ex situ* gevangengenomen kolonie in Panama. Er werd een uitval van ongeveer 350 individuen van 53 verschillende Anura soorten gedetecteerd en dit over een periode van 5 jaar (2006-2011) (het totaal aantal van amfibieën die *ex situ* gehuisvest werden, werd niet vermeld). De mortaliteit was het grootst bij dieren die een langere periode *ex situ* gehuisvest werden (>3 maanden). Deze studie en die van andere (zie bv. De Paula e.a., 2012; Smith & Sutherland, 2014) toont aan dat overleving van *ex situ* kolonies vaak gecompliceerd wordt door on gepaste voeding, ziekte (door slechte voeding zoals vitamine A-deficiëntie, metabole botziekte of infectieziekten zoals chytridiomycose, *Rhabdias* sp. longwormen), slechte aanpassing aan de huisvesting in gevangenschap, wat vaak te wijten is aan een gebrek aan basiskennis over de verzorging en voeding in gevangenschap, onvoldoende dieren om mee te starten, en slechte resultaten op het vlak van voortplanting. Om de duurzaamheid van *ex situ* kolonies te verbeteren is het heel belangrijk om de optimale condities te bepalen om diverse soorten in gevangenschap te houden (Pessier e.a., 2014). Er werd al veel werk verricht door bv. Amphibian Ark (AArk) en de Association of Zoos and Aquariums (AZA). De AZA “Husbandry Resource” handleiding (Pramuk & Gagliardo, 2012) en de “Conservation Breeding Specialist Group Disease” handleiding (Pessier & Mendelson, 2010) bieden informatie over de basiszorg van amfibieën en belangrijke richtlijnen omtrent bioveiligheid en ziektes. Voor het succesvol kweken in

gevangenschap kunnen hormonen nodig zijn om de vrijzetting van sperma en eieren te induceren, alsook artificiële fertilisatie of cryopreservatie van sperma of eieren (Lentini, 2006; Smith & Sutherland, 2014). Voor een volledige review over amfibiesoorten die met succes in gevangenschap gekweekt werden, verwijzen we naar Smith & Sutherland (2014). Om dit te illustreren zullen we at random enkele voorbeelden bespreken. Een review over gevangenschapsprogramma's van 2001-2007 van prioritaire amfibiesoorten uit Panama in 50 zoos en aquaria in de VS toonde aan dat het houden en kweken in gevangenschap een wisselend succes had. Het grootste aandeel van de 30 gecollecteerde soorten kweekte met succes in gevangenschap. Echter, sommige soorten zijn moeilijk op te kweken tot het adulte stadium en dit wegens nutritionele oorzaken. Soorten zoals *Hyloscirtus palmeri* en *Hemiphractus fasciatus* (beiden boomkikkers) bleken heel moeilijke soorten te zijn om in gevangenschap te houden. Sterfte bij deze dieren was ook vaak te wijten aan ondervoeding (Gagliardo e.a., 2008).

Eventueel kunnen dieren in gevangenschap die vrij zijn van ziekte geherintroduceerd worden op hun originele vindplaats. Het IUCN zegt echter dat herintroductie enkel acceptabel is als er duidelijk bewijs is dat de aanwezige dreigingen correct geïdentificeerd en verwijderd of voldoende gereduceerd zijn. Waar er nog steeds twijfels zijn, mag herintroductie niet plaatsvinden en dienen er alternatieve conservatie-oplossingen gezocht te worden (IUCN/SSC, 2013).

Het is heel belangrijk om een grondige diagnostische screening van de dieren uit te voeren alvorens ze te herintroduceren. Dit blijkt onder meer uit een case studie waar men de onopzettelijke introductie van *Bd* in Mallorca bespreekt via een KG&H voor de Balearen pad (*Alytes muletensis*)(Walker e.a., 2008). Niettegenstaande blijken de meeste KG&H van de voorbije jaren succesvol te zijn (voor een review zie Germano & Bishop, 2008; Griffiths & Pavajau, 2008). Herintroductie wordt als succesvol geacht wanneer er zelf-onderhoudende

populaties ontwikkelen na vrijlating in het wild (zie bv. Woodhams e.a., 2011). Europese amfibiesoorten die in gevangenschap gekweekt en met succes geherintroduceerd werden omvatten, *Epidalea calamita* in Groot-Brittannië (Denton e.a., 2003), *Alytes muletensis* in Spanje (Buley & Garcia, 1997; Buley & Gonzales-Villavicencio, 2000), *Hyla arborea* in Letland (Zvirgzds e.a., 1995), *Triturus cristatus* en *Lissotriton vulgaris* in Duitsland (Kinne, 2006), *Bombina bombina*, *Rana temporaria* en *Bufo bufo* (Harding e.a., 2015). *Alytes obstetricans* werd met gedeeld succes (enkel bewijs van succesvol kweken) geherintroduceerd (Harding e.a., 2015). Ook in gevangenschap gekweekte *Pelobates fuscus* dieren werden geherintroduceerd, maar er zijn geen data beschikbaar over het succes van deze actie (Harding e.a., 2015). In verschillende gevallen is het echter zo dat geherintroduceerde populaties wel overleven in het wild, maar niet kweken (Dodd & Seigel, 1991; Daly e.a., 2008; Muths e.a., 2008). Deze populaties kunnen een boost krijgen door jaarlijks extra individuen uit gevangenschap in het wild vrij te zetten. Dit is het geval voor de Wyoming pad (*Anaxyrus baxteri*). Deze diersoort staat nog altijd geklasseerd als “uitgestorven in het wild” (IUCN, 2015), maar herintroducties hebben twee populaties in het wild tot stand gebracht waarvan één populatie zelfvoorzienend is en de andere populatie jaarlijkse aanvulling met nieuwe dieren nodig heeft (Odum & Corn, 2005). Daarenboven zijn er tal van soorten die voordeel hebben gehad van KG, waaronder ook enkele die bijna uitgestorven waren. In deze context is het “Puerto Rican Crested pad (*Peltophryne lemur*) Recovery Program” een model geworden voor amfibie conservatie. *Peltophryne lemur* is een sterk bedreigde bufonidae voor dewelke er twee verschillende genetisch lijnen gekweekt worden in gevangenschap (verdeeld over 21 instituten) en waarvan er nog slechts 1 populatie in het wild bestaat. In een poging om deze soort van uitsterven te redden werd een “Species Survival Plan (SSP)” gecreëerd in 1984 onder auspiciën van de “American Zoo and Aquarium Association” (AZA). Het dagelijks beheer, de verzorging en de kweek werden in groot detail gedocumenteerd in dit plan (zie

Lentini, 2006). Een herintroductieprogramma is een grote component van het herstelplan van een soort. Elk jaar worden amfibieën in zoos en aquaria in de VS en Canada gekweekt en worden kikkervisjes opgestuurd naar Puerto Rico om deze terug vrij te zetten (Lentini, 2006; Joglar e.a., 2007). Dankzij KG&H, konden sommige soorten zoals *Alytes muletensis* zich terug herstellen in bepaalde gebieden waar ze oorspronkelijk uitgestorven waren (Buley & García, 1997). KG&H is echter duur en arbeidsintensief (Daly e.a., 2008; Woodhams e.a., 2011). In een gedetailleerd rapport van een 4 jaarlijks project om 5000 *Litoria aurea* kikkervisjes te herintroduceren in Nieuw-Zuid-Wales (Australië), werden de kosten voor dagelijks beheer, de kweek in gevangenschap en de herintroductie geschat op meer dan € 130.000 (Daly e.a., 2008).

Als alternatief kunnen dieren vrij van ziekte (uit gevangenschap of uit het wild) geherintroduceerd worden in een ander gebied waarvan bewezen is dat het pathogeen-vrij is (zie aanbevelingen van IUCN/SSC, 2013). Slechts enkele van deze translocaties zijn mislukt en dit doordat er nog *Bd* aanwezig was in de omgeving (zie bv. Fellers e.a. 2007). In een studie van Woodhams e.a. (2011) werd de noordelijke pad (*Anaxyrus boreas*) die in gevangenschap gekweekt werd, geherintroduceerd in een gebied in het Rocky Mountain National Park (VS), maar pas nadat zowel staalname bij sympatrische populaties (kikker *Pseudacris maculata* en boskikker *Lithobates sylvaticus*) en waterstalen negatieve resultaten opleverden voor *Bd* en dit voor 3 opeenvolgende jaren. Voor *Bsal* ligt dit iets complexer. Aangezien er nog weinig geweten is over de persistentie van dit pathogeen in de omgeving en in niet-amfibie reservoirs, is het bijna niet haalbaar om de af- of aanwezigheid van dit pathogeen na te gaan op een bepaalde plaats.

In de context van herintroductie wordt vaak een “voorsprongtechniek” gebruikt bij soorten waar chytridiomycose een veel hogere mortaliteit veroorzaakt in metamorfen dan in adulten. Eieren of kikkervisjes worden uit het wild gehaald en in gevangenschap opgekweekt totdat ze

de *Bd*-gevoelige levensfase voorbij zijn. Vervolgens worden ze als jonge adulten terug vrijgezet op de oorspronkelijke vangplaats (Scheele e.a., 2014). Deze techniek zou ook gebruikt kunnen worden in amfibiesoorten waar infectie subleetaal is, maar op een negatieve manier de kans op voortplanting beïnvloed, wat bv. het geval is in *Bd*-resistente *Lissotriton helveticus* (Cheatsazan e.a., 2013). Deze strategie werd met succes toegepast voor *Pelobates fuscus* kikkervisjes, *Bombina bombina* en *Hyla arborea* in Denemarken (Skriver, 1988; Briggs, 1997; Jensen, 1997) en het zou ook haalbaar moeten zijn voor ten minste *Triturus cristatus* en *Lissotriton vulgaris* (Kinne e.a., 2006). Deze “voorsprongtechniek” heeft als voordeel dat de individuen voor herintroductie snel geproduceerd kunnen worden, dat de kosten lager liggen en dat het ook wat minder arbeidsintensief is dan het kweken met en het grootbrengen van adulten. In dit opzicht is het belangrijk om te bepalen welk levensstadium het meest geschikt (kosten-effectiviteit) is om te herintroduceren (zie bv. Muths e.a., 2008). De gevoeligheid van de verschillende levensstadia van inheemse amfibieën voor *Bd* en *Bsal* is niet goed gekend (voor zover we weten is dit meestal gelimiteerd tot adulten) en dit werd nog niet in detail onderzocht (zie § 2.2). Hieruit blijkt dat er meer informatie nodig is om te beslissen of deze “voorsprongtechniek” gebruikt kan worden voor inheemse amfibiesoorten in België.

Na de grote *Bsal* uitbraak in 2010 (Bunderbos, Nederland) werd een kolonie van 20 *Salamandra salamandra* individuen opgestart ( $\pm$  50% mannelijk/ 50% vrouwelijk). Op het moment dat de dieren in gevangenschap geplaatst werden, bleken enkele vrouwelijke individuen zwanger te zijn. Op dit moment is deze kolonie in gevangenschap gegroeid tot 124 salamanders die over 2 zoos verdeeld zijn. Een groot deel van deze salamanders zijn genetisch niet met elkaar gelinkt waardoor het mogelijk is om te kweken in gevangenschap zonder het verlies van genetische diversiteit. Aangezien *Bsal* nog altijd gedetecteerd werd in het Bunderbos in 2015, zijn er geen onmiddellijke plannen om deze soorten te herintroduceren

(Spitzen-van der Sluijs A, pers.comm). Een gelijkaardige aanpak wordt aangeraden mocht er tijdens toekomstige uitbraken van *Bsal*, RV of invasieve *Bd* stammen een duidelijke impact waargenomen worden op vuursalamanderpopulaties en geïsoleerde populaties van zeldzame amfibiesoorten in België, zoals de vroedmeesterpad en knoflookpad. Om dit echter te kunnen uitvoeren, moet de geschikte infrastructuur alsook de nodige vergunningen en financiële draagkracht aanwezig zijn. *Ex situ* KG brengt dus de nodige investeringen in tijd, middelen en onderzoek met zich mee. De haalbaarheid om amfibieën te vangen en te behandelen is eerder hoog (zie later), maar de kosten kunnen sterk variëren tussen matig tot hoog, zeker als het pathogeen aanwezig blijft in de initiële plaats van uitbraak. In dat geval kunnen de dieren niet geherintroduceerd worden op de originele vindplaats, waardoor de dieren voor een langere periode in gevangenschap moeten blijven.

Specifieke aanbevelingen waaraan voldaan moet worden wanneer men *ex situ* kolonies opstart, werden uitgeschreven door het Instituut voor Natuur-en Bosonderzoek (INBO) (Mergeay e.a., 2015). De populatie waarmee gestart wordt moet voldoende genetische variatie bevatten (ten minste 95% genetische variatie of heterozygositeit binnen (een) bronpopulatie(s)) (Weeks e.a., 2011). Om te beslissen welke metapopulaties geschikt zijn als startpopulatie en hoeveel individuen er van elke bronpopulatie genomen moeten worden om die startpopulatie te vormen, heeft men data over de genetische variatie tussen en binnen de bronpopulaties nodig. Dit is in zekere mate het geval voor verschillende vuursalamanderpopulaties (n=14), maar bij andere populaties is dit nog niet nagegaan of is er nog extra screening nodig. Ongepubliceerde data van het INBO tonen aan dat de gemiddelde heterozygositeit van de onderzochte populaties ligt tussen 0.50 en 0.60, terwijl er een heterozygositeit van 0.95 nagestreefd dient te worden. De effectieve populatiegroottes zijn ook eerder aan de kleine kant. In België en Nederland wordt slechts één subsoort teruggevonden, namelijk *Salamandra salamandra terrestris* die slechts weinig variatie

vertoont. In Spanje daarentegen worden verschillende subsoorten waargenomen waarbij er sterke verschillen zijn tussen lokale populaties. In Vlaanderen worden ten minste twee vuursalamanderpopulaties gevonden die enigszins genetisch verschillend zijn. Er zijn geen verschillen beschikbaar over genetische diversiteit tussen de Nederlandse en Waalse populaties. Binnen West-Duitse populaties werd er wel aanzienlijke genetische variatie waargenomen (zie bv. Weir e.a., 2004; Steinfartz e.a., 2007). Als de startpopulatie groot genoeg is en ten minste 95% van de genetische diversiteit in Vlaanderen omsluit, dan is er geen nood om individuen van de Nederlandse, Waalse of Duitse populaties in te sluiten (Mergeay e.a., 2015).

Het is dus van groot belang om de genetische diversiteit van de startpopulatie te bepalen en dit te gebruiken als referentie om de populatie de komende jaren op te volgen (Mergeay e.a., 2015). Hoeveel dieren zijn er nu exact nodig om een goede startpopulatie te hebben? Het antwoord is hoe meer individuen je hebt, hoe minder snel je genetische diversiteit zal verliezen. De grootte om een startpopulatie die nodig is om een bepaalde heterozygositeit (met voorkeur 0.95) te onderhouden, kan bepaald worden via formule 1.

$$N_e = \frac{t}{-2 \ln \left( \frac{H_t}{H_0} \right)}$$

**Formule 1.**  $N_e$ : minimale effectieve populatie,  $t$ : aantal generaties in gevangenschap,  $H_t$ : heterozygositeit in een generatie;  $H_0$ : heterozygositeit bij de start (Frankham e.a., 2004).

Om de grootte van de effectieve populatie te berekenen, moeten we eerst bepalen hoe lang de populaties in gevangenschap gehouden zullen worden ( $t$  = aantal generaties). In het wild is de generatietijd voor vuursalamanders 4-6 jaar, terwijl ze tot 20 jaar oud kunnen worden. Als de generatietijd in gevangenschap gerekend kan worden (max. 20 jaar, i.p.v. een gemiddelde 4-6 jaar), dan kan de genetische variatie behouden worden met minder dieren (Frankham e.a., 2010). Als we bijvoorbeeld rekenen met een natuurlijke generatietijd van 10 jaar en we

houden 2 opeenvolgende generaties in gevangenschap (20 jaar), dan zijn er ongeveer 20 dieren nodig om een heterozygositeit van 95% te verkrijgen. Als we rekenen met een gemanipuleerde generatietijd van 20 jaar, dan hebben we enkel 10 dieren nodig om een heterozygositeit van 95% te verkrijgen in eenzelfde tijdspanne. *Ex situ* kweekkolonies worden ideaal gezien opgestart met drachtige vrouwtjes die gecollecteerd zijn in het veld rond de late herfst tot winter of met larven die op verschillende plaatsen gecollecteerd zijn (om genetische variatie te verkrijgen) (Mergeay e.a., 2015). De grootte van de startpopulatie hangt onder meer ook af van de beschikbare infrastructuur en de financiële middelen die beschikbaar zijn om een populatie (voor verschillende jaren) te huisvesten in gevangenschap.

**b) Behandeling** – Amfibiesoorten hebben elk hun specifieke letale temperatuur en gevoeligheid voor antifungale middelen, waardoor behandeling van chytridiomycose een soort-afhankelijke aanpak beoogt (Blooï e.a., 2015b). In gevangenschap blijkt topicale behandeling met voriconazole (dagelijkse besprenkeling gedurende 7 dagen) (Martel e.a., 2011) succesvol te zijn om *Bd* te behandelen zonder nadelige effecten. Ook het onderdompelen van de dieren in een itraconazole oplossing (in een 0.01% waterige oplossing voor 5 min gedurende 11 dagen of voor 30 min gedurende 5 dagen) blijkt effectief te zijn (Nichols e.a., 2000; Forzan e.a., 2008). Applicatie van chlooramfenicol (door continue ondiepe immersie gedurende 5-14 dagen afhankelijk van de soort en de ernst van de infectie) (Bishop, 2009; Young e.a., 2012) zorgt voor een significante reductie van *Bd* aantallen, maar zorgt niet voor een volledige opruiming van de infectie (Holden e.a., 2014). In combinatie met een antifungale behandeling, kan de toediening van elektrolyten sterfte vermijden (Voyles e.a., 2009; Young e.a., 2012a). Het is echter belangrijk om te vermelden dat deze antifungale middelen ook enkele nadelige effecten en beperkingen met zich meebrengen. Voriconazole is zeer duur en de intraveneuze vorm is heel moeilijk te verkrijgen. Daarenboven wordt dit als laatste redmiddel gebruikt bij humane behandeling van



systemische mycose (bv. aspergillose) (Martel e.a., 2011). Niettegenstaande is het aangetoond dat deze behandeling goed werkt, veilig en efficiënt is. Het is daarenboven de routinebehandeling voor *Bd* aan de Universiteit Gent. Chlooramfenicol is goedkoop in vergelijking met itraconazole en voriconazole, maar het is echter aangetoond dat dit product leukemie kan induceren in amfibieën (Muijsers e.a., 2012). Itraconazole kan dan op zijn beurt toxische neveneffecten (Woodhams e.a., 2012) en depigmentatie van kikkervisjes veroorzaken (Garner e.a., 2009b), waardoor ze een makkelijker slachtoffer worden voor predatie.

Recent werd de doeltreffendheid van F10SC onderzocht in experimenteel geïnfecteerde kikkervisjes en juveniele keelpadden (*Sclerophrys gutturalis*) en in kikkervisjes van *Sclerophrys poweri* en *Amietia hymenopus* (De Jong e.a., 2017). Uit deze studie blijkt dat F10SC de capaciteit heeft om *Bd* zo goed als volledig te elimineren. Er zijn echter extra studies nodig om dit te bevestigen in andere amfibiesoorten.

Verschillende andere componenten kunnen *Bd in vitro* inhiberen, maar slagen hier *in vivo* niet in, zijn veel te toxisch of zijn veel te duur voor klinisch gebruik in amfibieën (Young e.a., 2007; Berger e.a., 2010; Martel e.a., 2011; Muijsers e.a., 2012; Woodhams e.a., 2012; Geiger e.a., 2017). Voor *Bsal* werd aangetoond dat topicale behandeling met een combinatie van polymyxine E (onderdompeling) en voriconazole (spray) gedurende 10 dagen tweemaal per dag bij een temperatuur van 20°C effectief is in het behandelen van *Bsal* infecties en getolereerd wordt door de meeste Urodela (Blooï e.a., 2015b).

Temperatuurbehandeling of blootstelling van *Bd*-geïnfecteerde dieren aan temperaturen tussen 30 en 35°C gedurende een periode langer dan 24 uur, kan met succes de infectie-intensiteit reduceren of zelfs de infectie volledig doen verdwijnen. Blootstelling van *Bsal*-geïnfecteerde Urodela gedurende 10 dagen aan 25°C, is tevens een effectieve behandeling voor dit pathogeen (Blooï e.a., 2015a). In tegenstelling tot antifungale geneesmiddelen is deze

benadering veel goedkoper en heeft het geen toxische neveneffecten. Het nadeel is echter dat het enkel geschikt is voor amfibiesoorten die hogere temperaturen tolereren (Woodhams e.a., 2003; Retallick & Miera, 2007; Chatfield & Richards-Zawacki, 2011).

Amfibieën die geïnfecteerd zijn met *Bd* kunnen als “genezen” verklaard worden als staalnames van de huid (uitstrijkjes) negatieve qPCR resultaten oplevert gedurende 2-5 opeenvolgende weken (Martel e.a., 2011; Schmeller e.a., 2011). Voor *Bsal* wordt het aangeraden om de dieren op te volgen en te testen gedurende ten minste 6 weken. Indien nodig kan een tweede behandelingsperiode gestart worden (Martel e.a., 2011). Behandeling van dieren in gevangenschap via hitte en antifungale middelen is enkel succesvol als er herhaaldelijke dagelijkse behandelingen uitgevoerd worden, waardoor *in situ* (in het wild) behandeling hiermee weinig haalbaar is (zie § *in situ* interventies).

Behandeling van een volledig populatie *ex situ* zou, afhankelijk van de populatiegrootte, extreem duur en arbeidsintensief zijn. Daarom is het aangeraden om het levensstadium te bepalen waarop *Bd/Bsal* een invloed heeft op de overlevingskansen van een populatie en deze individuen tijdelijk over te brengen naar gevangenschap om de infectie te behandelen. Nadat deze dieren “genezen” verklaard zijn, kunnen ze teruggeplaatst worden op de originele vindplaats. Het idee achter deze strategie is dat amfibieënpopulaties kunnen herstellen of persisteren in lage aantallen als sommige individuen verlost geraken van de infectie. Deze aanpak kan echter enkel succesvol zijn als sommige gevoelige individuen een bepaalde immuniteit opgebouwd hebben nadat ze de initiële infectie overwonnen hebben door behandeling (Briggs e.a., 2005, 2010).

In een studie door Hardy e.a. (2015) werden *Bd*-gevoelige *Rana cascadae* (cascade frog) post-metamorfen met een lage infectiegraad gevangen, in gevangenschap gebracht, behandeld met itraconazole gedurende 4 dagen (10 min onderdompeling), gekenmerkt en vrijgezet op de vangstplaats. Het verschil in *Bd* prevalentie tussen de behandelde kikkers en de experimentele

controles was niet duidelijk onmiddellijk na de behandeling, maar wel 5 weken na de vrijzetting. De itraconazole behandeling veroorzaakte echter een vertraagde groei, maar deze behandeling zorgde wel voor een verhoogde (tijdens de winter) overleving van behandelde dieren. Bijgevolg kan een itraconazole behandeling van gevoelige levensstadia een goede maatregel zijn om de overleving van een populatie te verhogen, maar dit moet geval per geval bekeken worden. In een poging om *Bd* te elimineren, hebben Bosch e.a. (2015) een *ex situ* behandeling uitgevoerd op larven van de balearenpad (*Alytes muletensis*) die een reservoir vormen voor *Bd* infectie. Dit bleek in eerste instantie succesvol, maar de volgende lente bleek de *Bd* prevalentie terug dezelfde aantallen aan te nemen wanneer de behandelde kikkervisjes teruggeplaatst werden op de vangplaats. Hieruit kan besloten worden dat de combinatie van antifungale behandeling en chemische desinfectie van de omgeving gehanteerd moet worden om een eradicatie van de infectie te verkrijgen (zie § 6.2.4.4).

Beschikbare behandelingen voor RV zijn erg gelimiteerd en sterk variërend in efficiëntie. Aangezien de meeste RVs niet vermenigvuldigen boven 32°C (Chinchar 2002; Ariel e.a. 2009), kan hittebehandeling een bruikbare maatregel zijn voor gastheersoorten die hoge temperaturen tolereren. Behandeling met antibiotica zoals enrofloxacin kan helpen om een secundaire bacteriële infectie tegen te gaan (Pessier & Mendelson, 2010). Antivirale geneesmiddelen zoals aciclovir, valaciclovir en DNA aptameren tonen potentieel om een RV infectie in schildpadden (Allender e.a., 2012) en vissen (Li e.a., 2014) te controleren. Data over de efficaciteit in geïnfecteerde amfibieën is er echter nog niet beschikbaar.

Het gebruik van vaccinatie om gevoelige kikkers te immuniseren en om de infectiedruk te verlagen tot subletale aantallen om OIZ te overwinnen, zou een mogelijke aanpak kunnen zijn voor collecties in gevangenschap of voor conservatieprogramma's van zeldzame soorten (Miller et al, 2011; 2015). Vaccinatie kan snel ingevoerd worden maar het biedt een bescherming op korte termijn (immuniteit wordt niet doorgegeven aan nakomelingen). Ook al

is er enig bewijs dat er een beschermende immuunrespons optreedt tegen *Bd* (Ramsey e.a., 2010; Mc Mahon e.a., 2014) en RV (Zupanovic et al, 1998; Majji e.a., 2006) in amfibieën, toch is het gebruik van vaccinaties nog veraf. Recent werd door Stegen e.a. (2017) aangetoond dat vuursalamanders en alpenwatersalamanders geen immuniteit tegen *Bsal* ontwikkelen. Het is dus heel waarschijnlijk dat vaccinatie geen bescherming zal bieden tegen *Bsal*.

Een andere aanpak zou het selectief kweken voor een verhoogde resistentie of tolerantie kunnen zijn. Dit kan bereikt worden door dieren in gevangenschap bloot te stellen aan het pathogeen, gevolgd door het kweken met de dieren die overleven of langer overleven (behandeld met antifungale middelen om sterfte tegen te gaan) (Venesky e.a., 2012; 2014). Als alternatief zou men met genetische merkers voor ziekteresistentie kunnen werken. Op die manier zou men de resistente individuen kunnen screenen om vervolgens mee te kweken (Savage & Zamudio, 2011). Dit werd in beperkte mate onderzocht voor *Bd*. Hoewel deze strategie arbeidsintensiever is dan vaccinatie, toch kan het een bescherming bieden op lange termijn (overerfbare immuniteit) en zou het de kans op herintroductie van een populatie, ondanks persistentie van *Bd*, kunnen verhogen (Scheele e.a., 2014).

#### **6.2.4. *In situ* aanpak**

Eradicatieprotocollen voor RV, *Bd* of *Bsal* in het wild zijn momenteel onbestaand. Er zijn wel enkele veelbelovende strategieën in de maak om de prevalentie te reduceren en ziekte-uitbraken in het wild te bestrijden, maar deze zijn grotendeels nog niet getest in het veld of ze hebben nog extra bewijs nodig (Sutherland e.a., 2015). *In situ* bestrijdingsmaatregelen hebben als doel (i) het aandeel van het pathogeen in de omgeving en/of op amfibieën te reduceren, en/of (ii) de capaciteit te verhogen van amfibieënpopulaties om te persisteren ondanks de aanwezigheid van een dodelijke ziekte. Een uitgebreid overzicht wordt weergegeven in **tabel 5** en de opgelijste maatregelen worden in detail besproken in de volgende paragrafen.

**a) Manipulaties om de buffercapaciteit van een populatie te vergroten** – Verschillende studies hebben aangetoond dat, ten minste voor *Bd*, amfibieënpopulaties sterfte in adulten kunnen tolereren als het herstel/overleving voldoende hoog is (Muths e.a., 2011; Scheele et al., 2015b). Er kan dus tegenwicht geboden worden aan de impact van een infectieziekte door nieuwe larven en juveniele dieren uit gevangenschap vrij te zetten in de kweekpoelen (bv. door de “voorsprongtechniek”) gedurende verschillende jaren. Het minimaliseren van andere oorzaken van natuurlijke sterfte zoals predatie (bv. door een omheining te plaatsen rond nieuwe poelen), competitie (bv. door het elimineren van invasieve exotische amfibiesoorten) en een onvoldoende lange vochtige periode (bv. door het voorzien van vochtige schuilplaatsen) kan tevens helpen om tegenwicht te bieden (review door Scheele e.a., 2014). Populaties met een sterke conservatiestatus kunnen heel waarschijnlijk beter de infectie weerstaan dan diegene die al blootgesteld worden aan andere stressoren.

**b) De hoeveelheid *Bd* in het veld reduceren** – Verschillende maatregelen hebben als doel om de geschiktheid van een gebied voor OIZ te reduceren door manipulatie van omgevingscondities (abiotische en biotische). Biocontrole met natuurlijk micropredatoren van *Bd* die zich voeden met het infectiestadium van de schimmel (zoösporen) kunnen een geschikte strategie bieden om de hoeveelheid *Bd* (en het overeenkomstig risico op infectie) in een aquatische omgeving te reduceren. Schmeller e.a. (2014) hebben aangetoond dat de prevalentie van *Bd* in bergmeren (Pyreneeën, Frankrijk) correleert met de aanwezigheid en de diversiteit van de aanwezige aquatische microfauna. Onder gecontroleerde condities worden ciliaten, rotiferen en zoöplankton (bv. watervlooien (*Daphnia*)) gevonden die zich voeden met de aquatische zoösporen van *Bd*, en op die manier de mate van *Bd* aanwezigheid kunnen beïnvloeden (Searle e.a., 2013; Schmeller e.a., 2014). Voor de toepassing in het veld zijn verdere experimenten in een microcosm opstelling en in het veld nodig. Er is ook extra

onderzoek vereist om te evalueren of micropredatoren zich ook voeden op zoösporen als er alternatieve voedingsbronnen aanwezig zijn (Woodhams e.a., 2011).

Bioaugmentatie of de toevoeging van gunstige probiotica bacteriën aan een gastheer of zijn habitat kan tevens een maatregel bieden in de bestrijding van OIZ. Meer zelfs, laboratoriumexperimenten en een veldexperiment hebben aangetoond dat deze maatregel effectief is in de bestrijding van *Bd* infecties (Bletz e.a., 2013). Deze probiotica bacteriën zijn aanwezig op de huid van amfibieën en scheiden antifungale metabolieten uit, waarop ze dan geselecteerd zijn (*Bd*-inhibitie activiteit) (Brucker e.a., 2008; Harris e.a., 2009). Tot op vandaag blijft het ongekend of deze metabolieten ook in staat zijn om *Bsal* te inhiberen.

Verschillende abiotische factoren hebben een negatief effect op *Bd* groei, zoals temperaturen boven 25°C, uitdroging en het verhogen van het zoutgehalte (Johnson e.a., 2003, Stockwell e.a., 2012). Er zijn verschillende strategieën die inspelen op de manipulatie van abiotische omgevingscondities, waaronder aanpassingen van temperatuur en zoutgehaltes van de omgeving, en het uitdrogen van poelen. Schuilplaatsen met warm water kunnen gecreëerd worden door de schaduw te reduceren t.h.v. ondiepe wateren, de begroeiing te verminderen om meer zonlicht te creëren, alsook het gebruik van artificiële ondiepe vijvers uit zwart materiaal (review door Scheele e.a., 2014). Het verhogen van het zoutgehalte kan op een natuurlijke manier verkregen worden door de toevoeging van boorwater of door het aanbrengen van grondwater (Heard e.a., 2014), maar dit werd tot op vandaag nog niet toegepast in het veld (zie later, § 6.2.4.4).

Aangezien *Bd* voornamelijk voorkomt in permanente poelen, kan het draineren van deze poelen een effectieve manier zijn om *Bd* te onderdrukken. Als dit uitgevoerd wordt laat in het seizoen wanneer de kikkervisjes niet langer aanwezig zijn in het water, dan zal deze maatregel geen negatieve invloed hebben op de amfibiepopulatie (review door Woodhams e.a., 2011). Niettegenstaande heeft Bosch e.a. (2015) aangetoond dat het uitdrogen van poelen,

gecombineerd met een *ex situ* behandeling van *A. muletensis* met itraconazole geen eliminatie van *Bd* in dat gebied gaf, maar het zorgde wel voor een daling in de infectie-intensiteit.

**c) *In situ* behandeling** - Hudson e.a., (2016) hebben de haalbaarheid en de impact van een *in situ* antifungale behandeling nagegaan van de sterk bedreigde montserratfluitkikker (*Leptodactylus fallax*), om de impact van chytridiomycose tegen te gaan en als een alternatief voor *ex situ* conservatie (wat moeilijk en duur zou zijn wegens de eetlust van deze soort en de uitgebreide huisvesting). Langs een bepaald traject werden de individuen systematisch gevangen, gemerkt en verdeeld in een controle- en behandelingsgroep. De meeste individuen van de behandelingsgroep werden 1 maal per week gevangen en behandeld en dit gedurende 15 weken. Voor de behandeling werd ieder dier ondergedompeld in een 0.01% waterige itraconazole oplossing (ter plaatse gemaakt met plaatselijk stroomwater) voor 5 minuten in een wegwerpbaar zak. Gedurende de behandeling zag men een daling in de waarschijnlijkheid om geïnfecteerd te geraken, infectie zelf en mortaliteit van geïnfecteerde individuen. Het nadeel was echter dat dit allemaal terug steeg eens de behandeling stopgezet werd. Toch kan deze *in situ* behandeling van individuen een bruikbare maatregel zijn om chytridiomycose-geïnduceerde sterfte op korte termijn te reduceren in afwachting van andere bestrijdingsmaatregelen. Op die manier kan de overlevingskans van een populatie stijgen tijdens de kritieke periode. Het nadeel is echter dat deze maatregel arbeidsintensief is en gelimiteerd is tot amfibiesoorten waarvoor hervangst mogelijk en haalbaar is. Er zijn dus dringend meer studies nodig die efficaciteit van nieuwe en bestaande behandelingen voor chytridiomycose in het veld testen.

**d) Toepassen van fungiciden in de omgeving** – Toepassen van fungiciden in de omgeving is enkel nog maar getest in simpele systemen met één enkele gastheersoort en één enkel gebied omdat het op die manier gecontroleerd kan verlopen (bv. duidelijk afgebakende poelen). Bosch e.a. (2015) zijn erin geslaagd om met succes een *Bd* infectie te bestrijden op

kweekplaatsen van *Alytes muletensis* en dit door de omgeving te desinfecteren met 1% Virkon S® als een laatste redmiddel tegen de afname van *Alytes muletensis* op Mallorca. Ook het verhogen van het zoutgehalte in poelen (tot 2-4 ppt) met natuurlijk zeezout of het creëren van gezouten vluchtplaatsen kan een goede bestrijdingsmaatregel (qua tijd en kosten) zijn voor zoetwater en zouttolerante ecosystemen (Stockwell e.a., 2012; 2015a; 2015b). In beide gevallen is er een belangrijk voordeel/nadeel uitwisseling: het voordeel, namelijk het overleven van de gastheer, moet afgewogen worden tegen de mogelijke negatieve effecten van bv. fungiciden op het ecosysteem (schimmels zijn belangrijke opruimers en producenten van biomassa in poelen), de gezondheid van kikkervisjes, de aanwezigheid van andere diersoorten en gemeenschapsdynamiek.

### **6.3. Welke maatregelen kunnen we toepassen als er een *Bsal* uitbraak is?**

De laatste 5 jaar zijn de vuursalamanderpopulaties in Nederland en België sterkt getroffen door *Bsal*. Het is heel waarschijnlijk dat *Bsal* zich verder zal verspreiden, zeker in België, Nederland en Duitsland, en het zal zich permanent vestigen in West-Europa. De belangrijkste vraag is nu: “Welke maatregelen moeten we nemen bij een *Bsal* uitbraak?”

Eerst moeten we rekening houden met verschillende onzekerheden en moeilijkheden die bestrijding kunnen bemoeilijken. We missen namelijk essentiële informatie over waar *Bsal* voorkomt in de omgeving en hoe het zich verspreidt. Binnen een populatie is contact tussen geïnfecteerde Urodela waarschijnlijk de belangrijkste bron van infectie. Tussen populaties speelt de mens waarschijnlijk een grote rol (hoewel bewijs momenteel ontbreekt). Vooral bij *Salamandra salamandra* is de infectie sterk en snel overdraagbaar en is ze fataal binnen 2-3 weken na blootstelling (Martel e.a., 2014). Dit brengt met zich mee dat eens *Bsal* gedetecteerd wordt in een populatie, de infectie zich heel waarschijnlijk al verspreid heeft als wildvuur binnen een getroffen populatie. Snelle en duidelijke actie is dus zeker en vast vereist.



Er zijn momenteel geen bewezen maatregelen die een *Bsal* uitbraak *in situ* kunnen bestrijden. Aangezien *Bsal* uitbraken voornamelijk salamanders in terrestrische systemen treffen, gelden de bestrijdingsmaatregelen voor *Bd* niet want deze zijn vooral toegespitst op amfibieën in een aquatisch systeem.

Tijdens de Nederlandse uitbraak van *Bsal* werd voor de zekerheid een *ex situ* kolonie uitgewerkt. Het is echter nog altijd een grote vraag hoe men met succes deze dieren kan herintroduceren aangezien de meeste salamandersoorten niet in staat zijn om samen met *Bsal* voor te komen in het wild. Selectie voor een verhoogde ziekte tolerantie of een sterkere gezondheid/conditie bij een blootstelling aan een bepaalde *Bsal* dosis, zou kunnen helpen om persistentie van een populatie in aanwezigheid van de schimmel tot stand te brengen en bijgevolg een duurzame populatie te creëren (Mergaey e.a., 2015). Veel amfibiesoorten hebben een lange generatietijd (bv. *Salamandra salamandra*: 8-10 jaar), waardoor dit proces heel arbeidsintensief zal zijn en geen oplossing zal bieden op korte termijn. In tegenstelling tot vaccinatie, kan het echter wel een bescherming bieden op lange termijn. Alvorens deze maatregel ingevoerd kan worden is er echter preliminair onderzoek nodig. Het is noodzakelijk om bewijzen te hebben dat deze maatregel effectief een salamanderpopulatie in een experimentele opstelling kan beschermen. Indien dit succesvol blijkt te zijn, dan dient de effectiviteit van deze maatregel ook geëvalueerd te worden na herintroductie van de dieren. Hiervoor dienen er uitgebreide monitoringsprogramma's opgesteld te worden. In tussentijd zijn het uitwerken van *ex situ* kolonies en *ex situ* behandeling van geïnfecteerde individuen vaak de enige opties.

## 7. DISCUSSIE

Binnen de inheemse Belgische amfibieënpopulaties zijn er momenteel 3 OIZ aanwezig, met variërende effecten op de gastheerpopulaties. De belangrijkste kenmerken van deze OIZ worden samengevat op een geheugenkaart (**figuur 2**). Momenteel is het recent opgedoken

*Bsal* pathogeen de belangrijkste dreiging voor de inheemse amfibieën. Meer bepaald de hoge gevoeligheid van salamanders en de verspreiding van deze schimmel binnen Europa is zorgwekkend. In tegenstelling tot *Bsal* is er in België nog geen massasterfte waargenomen t.g.v. RV, en *Bd*-gelinkte sterfte wordt slechts sporadisch gemeld. Toch moeten we alert blijven om introductie van RVs en exotische (*Bd*-GPL) *Bd* stammen door dierenhandel of door buurlanden te vermijden.

Uit deze literatuurstudie kunnen we besluiten dat er niet zoiets bestaat als één oplossing voor dit probleem. Om verdere *Bsal* uitbraken te vermijden is het prioritair om verdere verspreiding van de schimmel in de kiem te smoren. Het is tevens belangrijk om *ex situ* kolonies uit te werken, wat echter een serieuze investering vraagt in onderzoek, financiële middelen en tijd (Mergeay e.a., 2015). Daarnaast kunnen verschillende effectieve en haalbare maatregelen ondernomen worden die een relatief lage kost met zich meebrengen (samengevat in **figuur 3**). Het tot stand brengen van een vroeg waarschuwingssysteem, voor zowel verhandelde als wilde dieren, is cruciaal om de problemen in kaart te brengen en om een noodactieplan te kunnen uitvoeren. Dit omvat onder meer de implementatie van sterke bioveiligheidsmaatregelen om de verdere verspreiding van het pathogeen te verhinderen of te limiteren (zie bv. Skerratt e.a., 2010; Philips e.a., 2010).

Deze review heeft ook verschillende punten aan het licht gebracht die zeker verder onderzocht moeten worden, waaronder (i) onderzoek naar de omvang van RV verspreiding en de prevalentie van endemische en nieuwe virale types; (ii) monitoring van amfibiepopulaties, met speciale aandacht voor gebieden waar RV, maar ook *Bd* en *Bsal* kunnen voorkomen. Vooral Wallonië blijft een blinde vlek met betrekking tot monitoring en surveillance; (iii) identificatie van dragers, niet-amfibie vectoren en andere abiotische factoren die de persistentie van RV, *Bd* en vooral *Bsal* in de omgeving in de hand werken; (iv) ontwikkeling van nieuwe, veilige en efficiënte behandelingsprotocollen om ranavirose te behandelen (zowel

*in* als *ex situ*); (v) ontwikkeling voor meer duurzame maatregelen (dan *ex situ* conservatie of beperkingsmaatregelen) ter hoogte van uitbraakgebieden om het pathogeen aantal te reduceren; (vi) geschikte efficaciteit controle van voorgestelde controle- en bestrijdingsmaatregelen (vergelijkende studies ontbreken heel vaak).

## 8. REFERENTIES

- Allender MC, Mitchell MA, Yarborough J, Cox S (2013) Pharmacokinetics of a single oral dose of acyclovir and valacyclovir in North American box turtles (*Terrapene* sp.). *J Vet Pharmacol Therap* 36: 205–208.
- Alves de Matos AP, Caeiro MF, Marschang RE, Papp T, Soares C, Marçal MR, Carretero MA (2008) Adaptation of rnaviruses from Peneda-Gerês National Park (Portugal) to cell cultures and their characterization. *Microsc Microanal* 14: 139-140.
- Ariel E, Owens L (1997) Epizootic mortalities in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Dis Aquat Org* 29:1–6
- Ariel E, Kielgast J, Svart HE, Larsen K, Tapiovaara H, Bang Jensen B, Holopainen R (2009) *Ranavirus* in wild edible frogs *Pelophylax kl. esculentus* in Denmark. *Dis Aquat Organ* 85: 7-1
- Bales EK, Hyman OJ, Loudon AH, Harris RN, Lipps G, Chapman E, Roblee K, Kleopfer JD, Terrell KA (2015) Pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, but not *B. salamandrivorans*, detected on eastern hellbenders. *PLoS One* 10:e0116405
- Balseiro A, Dalton KP, Del Cerro A, Marquez I, Cunningham AA, Parra F, Prieto JM, Casais R (2010a) Pathology, isolation and molecular characterization of a *Ranavirus* from the common midwife toad *Alytes obstetricans* on the Iberian Peninsula. *Dis Aquat Organ* 84: 95-104.
- Balseiro A, Dalton KP, Del Cerro A, Marquez I, Cunningham AA, Parra F, Prieto JM, Casais R (2010b) Outbreak of common midwife toad virus in alpine newts (*Mesotriton alpestris cyreni*) and common midwife toads (*Alytes obstetricans*) in Northern Spain: A comparative pathological study of an emerging *Ranavirus*. *Vet J* 186: 256-258.
- Bang Jensen B, Reschova S, Cinkova K, Ariel E, Vesely T (2011) Common carp (*Cyprinus carpio*) and goldfish (*Carassius auratus*) were not susceptible to challenge with ranavirus under certain challenge conditions. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 31: 112-118.
- Bayley AE, Hill BJ, Feist SW (2013) Susceptibility of the European common frog *Rana temporaria* to a panel of ranavirus isolates from fish and amphibian hosts. *Dis Aquat Organ* 103:171–183.
- Becker MH, Gratwicke B (2017) Minimum lethal concentration of sodium hypochlorite for the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE* 12(4): e0176439.
- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, Slocombe R, Ragan MA, Hyatt AD, McDonald KR, Hines HB, Lips KR, Marantelli G, Parkes H (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9031-9036.
- Berger L, Hyatt AD, Olsen V, Hengstberger SG, Boyle D, Marantelli G, Humphreys K, Longcore JE (2002) Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. *Dis Aquat Organ* 48: 213-20
- Berger L, Speare R, Pessier A, Voyles J, Skerratt LF (2010) Treatment of chytridiomycosis requires urgent clinical trials. *Dis Aquat Organ* 92:165-74.
- Biocide database - Lijst van toegelaten biociden Federale Overheidsdienst (FOD) Volksgezondheid, Veiligheid van de voedselketen en leefmilieu. Available at <http://www.health.België.be/nl/lijest-van-toegelaten-biociden>. Accessed April 20, 2016.

- 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.
- Bletz MC, Loudon AH, Becker MH, Bell SC, Woodhams DC, Minbiole KP, Harris RN (2013) Mitigating amphibian chytridiomycosis with bioaugmentation: characteristics of effective probiotics and strategies for their selection and use. *Ecol Lett* 16: 807-20.
- Blooi M, Pasmans F, Longcore JE, Spitzen-van der Sluijs A, Vercammen F, Martel A (2013) Duplex real-time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples. *J Clin Microbiol* 51:4173-7
- Blooi M, Martel A, Haesebrouck F, Vercammen F, Bonte D, Pasmans F. (2015a) Treatment of urodelans based on temperature dependent infection dynamics of *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Sci Rep* 5: 8037.
- Blooi M, Pasmans F, Rouffaer L, Haesebrouck F, Vercammen F, Martel A (2015b) Successful treatment of *Batrachochytrium salamandrivorans* infections in salamanders requires synergy between voriconazole, polymyxin E and temperature. *Sci Rep* 5:11788.
- Bollinger TK, Mao J, Schock D, Brigham RM, Chinchar VG (1999) Pathology, isolation, and primary molecular characterization of a novel iridovirus from tiger salamanders in Saskatchewan. *J Wildl Dis* 35: 413-429.
- 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.
- Bosch J, Martinez-Solano I (2006) Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in Peñalara National Park, Spain. *Oryx* 40: 84-89.
- 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.
- Bosman W, Creemers RCM, Spitzen-van der Sluijs A, Zollinger R (2015) Monitoring van de vuursalamander in 2013 en 2014. Stichting RAVON, Nijmegen.
- Boyle DG, Boyle DB, Olsen V, Morgan JA, Hyatt AD (2004) Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis Aquat Organ* 60:141-8.
- Brenes R, Gray MJ, Waltzek TB, Wilkes RP, Miller DL (2014) Transmission of *Ranavirus* between ectothermic vertebrate hosts. *PloS One* 9: e92476.
- Briggs L (1997) Recovery of *Bombina orientalis* in Funen County, Denmark. *Memoranda Soc Fauna Flora Fennica* 73: 101-104.
- Briggs CJ, Vredenburg VT, Knapp RA, Rachowicz LJ (2005). Investigating the population-level effects of chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibians. *Ecology* 86: 3149-3159.
- Briggs CJ, Knapp RA, Vredenburg VT (2010) Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *PNAS* 107: 9695-9700.
- Brucker RM, Harris RN, Schwantes CR, Gallaher TN, Flaherty DC, Lam BA, Minbiole KPC (2008) Amphibian chemical defense: Antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. *J Chem Ecol* 34: 1422-1429.
- Brunner JL, Schock DM, Davidson EW, James P Collins JP(2004) Intraspecific reservoirs: complex life history and the persistence of a lethal ranavirus. *Ecology* 85: 560-566.

- Brunner JL, Schock DM, Collins JP (2007) Transmission dynamics of the amphibian ranavirus *Ambystoma tigrinum* virus. *Dis Aquat Organ* 77: 87-95.
- Brunner JL, Storfer A, Gray MJ, Hoverman JT (2015) Ranavirus Ecology and Evolution: From Epidemiology to Extinction In: *Ranaviruses: Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates*. Gray MJ, Chinchar VG (eds.) Springer, Heidelberg, Duitsland: pp 171-208.
- Bryan LK, Baldwin CA, Gray MJ, Miller DL (2009) Efficacy of select disinfectants at inactivating *Ranavirus*. *Dis Aquat Organ* 84: 89-94.
- Buley KR, Garcia G (1997) The recovery programme for the Mallorcan midwife toad *Aytes muletensis*: an update. *Dodo* 33:80–90.
- Buley KR, Gonzalez-Villavicencio C (2000) The Durrell Wildlife Conservation Trust and the Mallorcan midwife toad, *Alytes muletensis*—into the 21st century. *Herpetol Bull* 72:17–20.
- Burrowes PA and De la Riva I (2017) Detection of the Amphibian Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Museum Specimens of Andean Aquatic Birds: Implications for Pathogen Dispersal. *Journal of Wildlife Diseases* 53: 349-355.
- Carey C, Bruzgul JE, Livo LJ, Walling ML, Kuehl KA, Dixon BF, Pessier AP, Alford RA, Rogers KB (2006) Experimental exposures of boreal toads (*Bufo boreas*) to a pathogenic chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *EcoHealth* 3: 5-21.
- Cashins SD, Alford RA, Skerratt LF (2008) Lethal effect of latex, nitrile, and vinyl gloves on tadpoles. *Herpetological Review* 39: 298–301.
- Centre for Disease Control (CDC) (2003) A guide to selection and use of disinfectants. BCCDC Laboratory Services. 18pp. Available at <https://uwaterloo.ca/safety-office/sites/ca.safety-office/files/uploads/files/guide-selection-use-of-disinfectants.pdf>. Accessed April 20, 2016.
- Chatfield MW, Richards-Zawacki CL (2011) Elevated temperature as a treatment for *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in captive frogs. *Dis Aquat Organ* 94:235-8.
- Cheatsazan H, Lugon Gavinho de Almedia AP, Russell AF, Bonneaud C (2013) Experimental evidence for a cost of resistance to the fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*, for the palmate newt, *Lissotriton helveticus*. *BMC Ecology* 13:27.
- Cheng TL, Rovito SM, Wake DB, Vredenburg VT (2011) Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 9502-9507.
- Chinchar VG (2002) Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers. *Arch Virol* 147:447-70
- Chinchar VG, Hyatt A, Miyazaki T, Williams T (2009) Family Iridoviridae: poor viral relations no longer. *Curr Top Microbiol Immunol*: 123-70.
- Chinchar VG, Waltzek TB (2014) Ranaviruses: not just for frogs. *PLoS Pathog* 10(1): e1003850.
- Churgin SM, Raphael BL, Pramuk JB, Trupkiewicz JG, West G (2013) *Batrachochytrium dendrobatidis* in aquatic caecilians (*Typhlonectes natans*): a series of cases from two institutions. *J Zoo Wildl Med* 44:1002-9.
- Clare F, Daniel O, Garner T, Fisher M (2016) Assessing the ability of swab data to determine the true burden of infection for the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *EcoHealth*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10393-016-1114-z>.
- Council of Europe (COE) (2015) Convention on the conservation of European wildlife and natural habitats (2015) Recommendation on the prevention and control of the *Batrachochytrium salamandrivorans*. Available:

- <https://wcd.coe.int/com.instranet.InstraServlet?command=com.instranet.CmdBlobGet&InstranetImage=2824834&SecMode=1&DocId=2278696&Usage=2>. Accessed 8 December 2015.
- Cooch EG, Conn PB, Ellner SP, Dobson AP, Pollock KH (2012) Disease dynamics in wild populations: modeling and estimation: a review. *J Ornithol* 152 (Supplement 2): S485–S509.
- Cunningham AA, Langton TES, Bennett PM, Drury SEN, Gough RE, Kirkwood JK (1993) Unusual mortality associated with poxvirus-like particles in frogs (*Rana temporaria*). *Vet Rec* 133: 141-142.
- Cunningham AA, Langton TE, Bennett PM, Lewin JF, Drury SE, Gough RE, Macgregor SK (1996) Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351: 1539-1557.
- Cunningham AA, Hyatt AD, Russell P, Bennett PM (2007) Experimental transmission of a ranavirus disease of common toads (*Bufo bufo*) to common frogs (*Rana temporaria*). *Epidemiol Infect* 135: 1213-1216.
- Cunningham AA, Minting P (2008) National survey of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in UK amphibians. Institute of Zoology, Zoological Society of London.
- Cunningham AA, Beckmann K, Perkins M, Fitzpatrick L, Cromie R, Redbond J, O'Brien MF, Ghosh P, Shelton J, Fisher MC (2015) Emerging disease in UK amphibians. *Vet Rec* 176: 468.
- Daly G, Johnson P, Malolakis G, Hyatt A, Pietsch R (2008) Reintroduction of the Green and Golden Bell Frog *Litoria aurea* to Pambula on the south coast of New South Wales. *Aust Zoo* 34: 261-270.
- Daszak P, Strieby A, Cunningham AA, Longcore JE, Brown CC, Porter D (2004) Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetol J* 14: 201-207.
- Daszak P, Lips K, Alford R, Carey C, Collins JP, Cunningham A, Harris R, Ron S (2007) Infectious diseases. In: Gascon C, Collins JP, Moore RD, Church DR, McKay JE, Mendelson JR III (eds) Amphibian Conservation Action Plan. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: pp 21-25.
- Dawson J, Patel F, Griffiths RA, Young RP (2015) Assessing the global zoo response to the amphibian crisis through 20-year trends in captive collections. *Conserv Biol* 30: 82-91.
- Denton J S, Hitchings SP, Beebee TJC, Gent A (1997) A Recovery Program for the Natterjack Toad (*Bufo calamita*) in Britain. *Conserv Biol* 11: 1329–1338.
- DEH (Department of the Environment & Heritage, Australian Government) (2006) Background document for the treat abatement plan-Infection of amphibians with the chytrid fungus resulting in chytridiomycosis. Commonwealth Australia. Pp 70.
- De Jong MS, Van Dyk R, Weldon C (2017) Antifungal efficacy of F10SC veterinary disinfectant against *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Medical Mycology* 00:1-9.
- De Paula CD, Pacífico-Assis EC, Catão-Dias JL (2012) *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians confiscated from illegal wildlife trade and used in an ex situ breeding program in Brazil. *Dis Aquat Organ* 98: 171-5.
- DGHT (2016) Standard-Verhaltensregeln für Halter von Schwanzlurchen im Umgang mit *Batrachochytrium salamandrivorans*. Available: [http://www.ag urodela.de/banner\\_amphibia/Verhaltensregeln\\_Bsal.pdf](http://www.ag urodela.de/banner_amphibia/Verhaltensregeln_Bsal.pdf). Accessed May 3, 2016.

- DNF (2016) La salamandre tachetée en péril – appel à la collaboration de tous ! Available: <http://biodiversite.wallonie.be/fr/02-12-2015-la-salamandre-tachetee-en-peril-appel-a-la-collaboration-de-tous.html?IDC=3425&IDD=4878>. Accessed May 3, 2016.
- Docherty DE, Meteyer CU, Wang J, Mao J, Case ST, Chinchar VG (2003) Diagnostic and molecular evaluation of three iridovirus-associated salamander mortality events. *J Wildl Dis* 39: 556-66.
- Dodd CK, Seigel RA (1991) Relocation, repatriation, and translocation of amphibians and reptiles: are they conservation strategies that work? *Herpetologica* 47: 336–350.
- Doherty-Bone TM, Gonwouo NL, Hirschfeld M, Ohst T, Weldon C, Perkins M, Kouete MT, Browne RK, Loader SP, Gower DJ, Wilkinson MW, Rödel MO, Penner J, Barej MF, Schmitz A, Plötner J, Cunningham AA (2013) *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians of Cameroon, including first records for caecilians. *Dis Aquat Organ* 102: 187-94.
- Drury SEN, Gough RE, Cunningham AA (1995) Isolation of an *Iridovirus* like agent from common frogs (*Rana temporaria*). *Vet Rec* 137:72-73.
- Duffus ALJ, Pauli BD, Wozney K, Brunetti CR, Berrill M (2008) Frog virus 3-like infections in aquatic amphibian communities. *J Wildl Dis* 44: 109-20.
- Duffus ALJ (2009) *Ranavirus* Ecology in Common Frogs (*Rana temporaria*) from the United Kingdom: Transmission Dynamics, Alternate Hosts and Host-Strain Interactions. PhD thesis. London: Queen Mary, University of London.
- Duffus ALJ, Waltzek TB, Stöhr AC, Allender MC, Gotesman M, Whittington RJ, Hick P, Hines MK, Marschang RE (2015) Distribution and host Range of Ranaviruses. In: *Ranaviruses: Lethal pathogens of ectothermic Vertebrates*. Gray MJ, Chinchar VG (eds.) Springer, Heidelberg, Duitsland: pp 9-58.
- Duggan IC (2010) The freshwater aquarium trade as a vector for incidental invertebrate fauna. *Biol Invasions* 12 (11): 3757-3770.
- DWHC-Dutch Wildlife and Health Centre (2016) Available at: <https://www.dwhc.nl/meldingsformulier/>. Accessed May 3, 2016.
- Earl JE, Gray MJ (2014) Introduction of *Ranavirus* to isolated wood frog population could cause local extinction. *Ecohealth* 11: 581-592.
- EC Environment-European Commission Environment (2016) EU Regulation 1143/2014 on Invasive Alien Species. Available: [http://ec.europa.eu/environment/nature/invasivealien/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/nature/invasivealien/index_en.htm). Accessed 30 April, 2016.
- Erisimis UC, Konuk M, Yoldas T, Agyar P, Yumuk D, Korcan SE (2014) Survey of Turkey's endemic amphibians for chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Organ* 111: 153-7.
- Farrer RA, Weinert LA, Bielby J, Garner TWJ, Balloux F, Clare F, Bosch J, Cunningham AA, Weldon C, du Preez LH, Anderson L, Kosakovsky Pond SL, 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: 18732-18736.
- Fauquet C, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (2005) *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (1st edition). Elsevier Academic Press, London UK, pp 1162.
- 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. *Herpetol Conserv Biol* 2:5–21.
- Ferrie GM, Alford VC, Atkinson J, Baitchman E, Barber D, Blaner WS, Crawshaw G, Daneault A, Dierenfeld E, Finke M, Fleming G, Gagliardo R, Hoffman EA, Karasov



- W, Klasing K, Koutsos E, Lankton J, Lavin SR, Lentini A, Livingston S, Lock B, Mason T, McComb A, Morris C, Pessier AP, Olea-Popelka F, Probst T, Rodriguez C, Schad K, Semmen K, Sincage J, Stamper MA, Steinmetz J, Sullivan K, Terrell S, Wertan N, Wheaton CJ, Wilson B, Valdes EV (2014) Nutrition and health in amphibian husbandry. *Zoo Biology* 33: 485-501.
- Fijan N, Matašin Z, Petrinc Z, Valpotic I, Zwillenberg LO (1991). Isolation of an *Iridovirus*-like agent from the green frog (*Rana esculenta* L.). *Veterinarski Arhiv* 61: 151–158.
- Fisher MC, Garner TWJ (2007) The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biol Rev* 21: 2-9.
- Fisher MC, Garner TWJ, Walker SF (2009) Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Ann Rev Microbiol* 63: 291-310.
- FPS Health, Food Chain Safety and Environment (2015) Reptielen en amfibieën: wettelijke verplichtingen in het kader van CITES. Available: [http://www.gezondheid.belgie.be/internet2Prd/groups/public/@public/@mixednews/documents/ie2divers/19101315\\_nl.pdf](http://www.gezondheid.belgie.be/internet2Prd/groups/public/@public/@mixednews/documents/ie2divers/19101315_nl.pdf). Accessed 27 December 2015.
- Forrest MJ, Schlaepfer MA (2011) Nothing a hot bath won't cure: infection rates a amphibian chytrid fungus correlate negatively with water temperature under natural field settings. *PLoS ONE* 6: e28444.
- Forzan MJ, Gunn H, Scott P (2008) Chytridiomycosis in an aquarium collection of frogs: diagnosis, treatment and control. *J Zoo Wildl Med* 39: 406-411.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2004) A primer of Conservation Genetics. University Press, Cambridge. pp 220.
- Gagliardo R, Crump P, Griffith E, Mendelson J, Ross H, Zippel K. (2008) The principles of rapid response for amphibian conservation, using the programmes in Panama as an example. *International Zoo Yearbook*, 42: 125–135.
- Garmyn A, Van Rooij P, Pasmans F, Hellebuyck T, Van Den Broeck W, Haesebrouck F, Martel A (2012) Waterfowl: potential environmental reservoirs of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS One* 7: e35038.
- Garland S, Baker A, Phillott AD, Skerratt LF (2010) BSA reduces inhibition in a TaqMan assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Organ* 92:113-6.
- Garner TWJ, Walker S, Bosch J, Hyatt AD, Cunningham AA, Fisher MC (2005): Chytrid fungus in Europe. *Emerg Infect Dis*, 11: 1639–1641.
- 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*. *Biol Letters* 2: 455-459.
- Garner TWJ, Walker S, Bosch J, Leech S, Rowcliffe JM, Cunningham AA, Fisher MC (2009a) Life history tradeoffs influence mortality associated with the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Oikos* 118: 783-791.
- Garner TWJ, Garcia G, Carroll B, Fisher MC (2009b) Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Dis Aquat Organ* 83:257-60.
- Gascon C, Collins JP, Moore RD, Church DR, McKay JE, Mendelson JR III (2007) Amphibian Conservation Action Plan. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Zwitserland and Cambridge, UK, pp 64.

- Geiger C, Bregnard C, Maluenda E, Voordouw M, Schmidt B (2017) Antifungal treatment of wild amphibian populations caused a transient reduction in the prevalence of the fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Scientific Reports* 7: 5956.
- George MR, John KR, Mansoor MM, Saravanakumar R, Sundar P, Pradeep V (2015) Isolation and characterization of a ranavirus from koi, *Cyprinus carpio* L., experiencing mass mortalities in India. *J Fish Dis* 38: 389–403.
- Germano JM, Bishop PJ (2008) Suitability of amphibians and reptiles for translocation. *Conserv Biol* 23: 7–15.
- Gold KK, Reed PD, Bemis DA, Miller DL, Gray MJ, Souza MJ (2013) Efficacy of common disinfectants and terbinafine in inactivating the growth of *Batrachochytrium dendrobatidis* in culture *Dis Aquat Organ* 107:77-81.
- Gower DJ, Doherty-Bone T, Loader SP, Wilkinson M, Kouete MT, Tapley B, Orton F, Daniel OZ, Wynne F, Flach E, Müller H, Menegon M, Stephen I, Browne RK, Fisher MC, Cunningham AA, Garner TW (2013) *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and lethal chytridiomycosis in caecilian amphibians (Gymnophiona). *Ecohealth* 10:173-83.
- Granoff A, Came PE, Breeze DC (1966) Viruses and and renal carcinoma of *Rana pipiens*. I. isolation and properties of virus from normal and tumor tissue. *Virology* 29: 133-148.
- Gray MJ, Miller DL, Schmutzer AC, Baldwin CA (2007) Frogvirus 3 prevalence in tadpole populations inhabiting cat-tle-access and non-access wetlands in Tennessee, USA. *Dis Aquat Organ* 77:97–103.
- Gray MJ, Miller DL, Hoverman JT (2009) Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Dis Aquat Organ* 87: 243-266.
- Gray MJ, Miller DL, Hoverman JT (2012) Reliability of non-lethal surveillance methods for detecting ranavirus infection. *Dis Aquat Organ* 99: 1-6.
- Gray MJ, Lewis JP, Nanjappa P, Klocke B, Pasmans F, Martel A, e.a. (2015) *Batrachochytrium salamandrivorans*: The North American Response and a Call for Action. *PLoS Pathog* 11(12): e1005251. doi:10.1371/journal.ppat.1005251.
- Green DE, Converse KA, Schrader AK (2002) Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996–2001. *Ann NY Acad Sci* 969: 323–33.
- Greenspan SE, Calhoun AJ, Longcore JE, Levy MG (2012) Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* to wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) via a bullfrog (*L. catesbeianus*) vector. *J Wildl Dis* 48: 575-582.
- Greer AL, Collins JP (2007) Sensitivity of a diagnostic test for amphibian ranavirus varies with sampling protocol. *J Wildl Dis* 43: 525-532.
- Greer AL, Brunner JL, Collins JP (2009) Spatial and temporal patterns of *Ambystoma tigrinum* virus (ATV) prevalence in tiger salamanders *Ambystoma tigrinum nebulosum*. *Dis Aquat Organ* 85: 1-6.
- Griffiths RA, Kuzmin SL (2008). Captive breeding of amphibians for conservation. In: H Heatwole and J Wilkinson (Eds.). *Amphibian Biology* vol. 8A: Conservation of Amphibians, Chapter 25, Surrey Beatty, Australië: pp 3687-3703.
- Griffiths RA, Pavajeau L (2008) Captive breeding, reintroduction, and the conservation of amphibians. *Conserv Biol* 22: 852-61.
- Grogan LF, Berger L, Rose K, Grillo V, Cashins SD, Skerratt LF (2014) Surveillance for Emerging Biodiversity Diseases of Wildlife. *PLoS Pathog* 10(5): e1004015.
- Hadfield CA, Whitaker BR (2005) Amphibian emergency medicine and care. *Sem Av Exot Pet Med* 14:79-89.
- Halliday JEB, Meredith AL, Knobel DL, Shaw DJ, Bronsvoort B, Cleaveland S (2007) A framework for evaluating animals as sentinels for infectious disease surveillance. *J R Soc Interface* 4: 973–984.

- Hangartner S, Laurila A (2012) Effects of the disinfectant Virkon S on early life-stages of the moor frog (*Rana arvalis*). *Amph-Rept* 33: 349-353.
- Hanlon SM, Lynch KJ, Kerby J, Parris MJ (2015) *Batrachochytrium dendrobatidis* exposure effects on foraging efficiencies and body size in anuran tadpoles. *Dis Aquat Organ* 112: 237-242.
- Harding G, Griffiths RA, Pavajau L (2015) Development in amphibian captive breeding and reintroduction programs *Conserv Biol* 30: 340-349.
- Hardy BM, Pope KL, Piovia-Scott J, Brown RN, Foley JE (2015) Itraconazole treatment reduces *Batrachochytrium dendrobatidis* prevalence and increases overwinter field survival in juvenile Cascades frogs. *Dis Aquat Organ* 112:243-50.
- Harris RN, Lauer A, Simon MA, Banning JL, Alford RA (2009) Addition of antifungal skin bacteria to salamanders ameliorates the effects of chytridiomycosis. *Dis Aquat Organ* 83: 11-16.
- Harp EM, Petranka JW (2006) *Ranavirus* in wood frogs (*Rana sylvatica*): potential sources of transmission within and between ponds. *J Wildl Dis* 42: 307-18.
- Heard GW, Scroggie MP, Clemann N, Ramsey DSL (2014) Wetland characteristics influence disease risk for a threatened amphibian. *Ecol Applic* 24: 650-662.
- Herrel A, van der Meijden A (2014) An analysis of the live reptile and amphibian trade in the USA compared to the global trade in endangered species. *Herpetol J* 24:103-110.
- Heyer R, Donnelly MA, Foster M, McDiarmid R (Eds.) (2014) *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington DC.
- Holopainen R, Honkanen J, Bang Jensen B, Ariel E, Tapiovaara H (2011) Quantitation of ranaviruses in cell culture and tissue samples. *Journal of Virological Methods*. 171: 225–233.
- 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 Conserv* 195:37-45.
- Hoverman JT, Gray MJ, Haislip JT, Miller DL (2011) Phylogeny, life history, and ecology contribute to differences in amphibian susceptibility to ranaviruses. *Ecohealth* 8: 301-319.
- 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.
- Hunter D, Osborne W, Marantelli G, Green K (1999) Implementation of a population augmentation project for remnant populations of the southern corroboree frog (*Pseudophryne corroboree*). In: *Declines and Disappearances of Australian Frogs*. Ed A. Campbell. Environment Australia, Canberra. Pp158–67.
- Hyatt AD, Gould AR, Zupanovic Z, Cunningham AA, Hengstberger S, Whittington RJ, Kattenbelt J, Coupar BE (2000) Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Arch Virol* 145: 301-31.
- Hyatt AD, Boyle DG, Olsen V, Boyle DB, Berger L, Obendorf D, Dalton A, Kriger K, Heros M, Hines H, Phillott R, Campbell R, Marantelli G, Gleason F, Coiling A (2007) Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Organ* 73:175-92.
- INVEXO (Invasieve exoten in Vlaanderen en Zuid-Nederland)(2016). Probleemsoorten: de Stierkikker. Available: <http://www.invexo.be/nl-BE/probleemsoorten/stierkikker>. Accessed April 25, 2016.

- IUCN/SSC (2013). Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations. Version 1.0. Gland, Zwitserland: IUCN Species Survival Commission, viiii + 57 pp.
- IUCN (2015) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-3. Available: <http://www.iucnredlist.org>. Accessed 19 September 2015.
- Jacob JP, Percsy C, de Wavrin H, Graitson E, Kinet T, Denoël M, Paquay M, Percsy N, Remacle A (2007) Amphibiens et Reptiles de Wallonie. la Série Faune-Flore-Habitats n° 2. Aves – Raîgne et Direction Générale des Ressources naturelles et de l' Environnement, Ministère de la Région wallonne, Namur.
- Jancovich JK, Davidson EW, Morado JF, Jacobs BL, Collins JP (1997) Isolation of a lethal virus from the endangered tiger salamander *Ambystoma tigrinum stebbinsi*. Dis Aquat Organ 31: 161-7.
- Jancovich JK, Bremont M, Touchman JW, Jacobs BL (2010) Evidence for multiple recent host species shifts among the Ranaviruses (family Iridoviridae). J Virol 84: 2636–2647.
- Jancovich JK, Chinchar VG, Hyatt A, Miyazaki T, Williams T, e.a. (2011) Family Iridoviridae. In: King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB (Eds.) Virus Taxonomy: 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier: San Diego, CA, USA: pp 193–210.
- Jensen BH (1997) Relocation of a garlic toad (*Pelobates fuscus*) population. Memoranda Societatis pro Fauna et Flora Fennica, 73: 111-113.
- Joglar RL, Alvarez AO, Aide TM, Barber D, Burrowes PA, Garcia MA, León-Cardona A, Longo AV, Pérez-Buitrago N, Puente A, Rios-Lopez N, Tolson PJ (2007) Conserving the Puerto Rican herpetofauna. Appl Herpetol 4: 327-345.
- 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*. Dis Aquat Organ 57: 255-260
- Johnson ML, Speare R (2003) Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: Quarantine and disease control implications. Emerg Infect Dis 9: 922-925.
- Johnson ML, Speare R (2005) Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. Dis Aquat Organ 65: 181-186.
- Jooris R, Holsbeek G (2010) Groene kikkers in Vlaanderen en het Brussels Hoofdstedelijk Gewest. Rapport Natuur.studie 2010/2 Mechelen.83pp.
- Kelehear C, Cabrera-Guzman E, Sjine R (2012) Inadvertent consequences of community-based efforts to control invasive species. Conserv Lett 5: 360–365.
- Kik M, Martel A, Spitzen-van der Sluijs A, Pasmans F, Wohlsein P, Gröne A, Rijks JM (2011) Ranavirus-associated mass mortality in wild amphibians, Nederland, 2010: a first report. Vet J 190: 284-286.
- Kik M, Stege M, Boonyarittichaij R, van Asten A (2012) Concurrent ranavirus and *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in captive frogs (*Phyllobates* and *Dendrobates* species), Nederland, 2012: a first report. Vet J 194: 247-9.
- Kilburn VL, Ibanez R, Green DM (2011) Reptiles as potential vectors and hosts of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Panama. Dis Aquat Organ 97: 127-134.
- Kinne O (2006) Successful re-introduction of the newts *Triturus cristatus* and *T. vulgaris*. Endang Spec Res 4:1–16.
- Kinney VC, Heemeyer JL, Pessier AP, Lannoo MJ (2011) Seasonal pattern of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and mortality in *Lithobates areolatus*: affirmation of Vredenburg's '10.000 zoospore rule'. PLoS One 6: e16708.

- Kirshtein JD, Anderson CW, Wood JS, Longcore JE, Voytek MA (2007) Quantitative PCR detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* DNA from sediments and water. *Dis Aquat Organ* 77: 11-15.
- Klocke B, Becker M, Lewis J, Fleicher R (2017) *Batrachochytrium salamandrivorans* not detected in U.S. survey of pet salamanders. *Scientific Reports* 7: 13132.
- Kolby JE, Smith KM, Berger L, Karesh WB, Preston A, Pessier AP, Skerratt LF (2014) First evidence of amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and ranavirus in Hong Kong amphibian trade. *PLoS One* 9: e90750.
- Langdon JS (1989) Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redbfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *J. Fish Dis* 12: 295–310.
- La Fauce K, Ariel E, Munns S, Rush C, Owens L (2012) Influence of temperature and exposure time on the infectivity of Bohle iridovirus, a *Ranavirus*. *Aquaculture* 354-355: 64-67.
- Lande R (1993) Risk of population extinction from demographic and environmental stochasticity and random catastrophes. *Am Nat* 142: 911-927.
- Lentini A (2006) Husbandry manual Puerto Rican crested Toad (*Peltophryne lemur*) 2006/07 update. Toronto Zoo Canada.65pp. Available: <http://www.amphibianark.org/pdf/Husbandry/Puerto%20Rican%20Crested%20Toad%20%28Peltophryne%20lemur%29%20Husbandry%20Manual.pdf>. Accessed April 29, 2016.
- Li P, Yan Y, Wei S, Weiv J, Gao R, Huang X, Huang Y, Jiang G, Qin Q (2014) Isolation and characterization of a new class of DNA aptamers specific binding to Singapore grouper iridovirus (SGIV) with antiviral activities. *Virus Res* 188:146–154.
- Lips KR, Brem F, Brenes R, Reeve JD, Alford RA, Voyles J, Carey C, Livo L, Pessier AP, Collins JP (2006) Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 3165-3170.
- Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen et sp nov, a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91: 219-227.
- Lötters S, Kielgast J, Sztatecsny M, Wagner N, Schulte U, Werner P, Rödder D, Dambach J, Reissner T, Hochkirch A, Schmidt BR (2012) Absence of infection with the amphibian chytrid fungus in the terrestrial Alpine salamander, *Salamandra atra*. *Salamandra*, 48: 58-62.
- McFadden M (2013) Captive-bred southern corroboree frog eggs released. *Amphibian Ark Newsletter* 19: 10.
- Majji S, LaPatra S, Long SM, Sample R, Bryan L, Sinning A, Chinchar VG (2006) *Rana catesbeiana* virus z (rcv-z): A novel pathogenic ranavirus. *Dis Aquat Organ* 73:1–11.
- Maniero GD, Morales H, Gantress J, Robert J (2006) Generation of a long-lasting, protective, and neutralizing antibody response to the ranavirus FV3 by the frog *Xenopus*. *Dev Comp Immunol* 30: 649–657.
- Martel A, Van Rooij P, Vercauteren G, Baert K, Van Waeyenberghe L, Debacker P, Garner TW, Woeltjes T, Ducatelle R, Haesebrouck F, Pasmans F (2011) Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Med Mycol* 49:143-9
- Martel A, Fard MS, Van Rooij P, Jooris R, Boone F, Haesebrouck F, Van Rooij D, Pasmans F (2012) Road-killed Common Toads (*Bufo bufo*) in Vlaanderen (België) reveal low prevalence of Ranaviruses and *Batrachochytrium dendrobatidis*. *J Wildl Dis* 48: 835-839.
- Martel A, Spitzen-van der Sluijs A, Blooi M, Bert W, Ducatelle R, Fisher MC, Woeltjes A, Bosman W, Chiers K, Bossuyt F, Pasmans F (2013) *Batrachochytrium*

- salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. Proc Natl Acad Sci USA 110:15325-9.
- 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, Lötters S, Wombwell E, Garner TW, Cunningham AA, Spitzen-van der Sluijs A, Salvidio S, Ducatelle R, Nishikawa K, Nguyen TT, Kolby JE, Van Bocxlaer I, Bossuyt F, Pasmans F (2014) Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. Science 346:630-1.
- Martin LB, Hopkins WA, Mydlarz LD, Rohr JR (2010) The effects of anthropogenic global changes on immune functions and disease resistance. In: Ostfeld RS, Schlesinger WH, (eds.) Year in Ecology and Conservation Biology: p 129–148.
- Martínez-Solano I, Bosch J, García-París M (2003) Demographic trends and community stability in a montane amphibian assemblage. Conserv Biol 17: 238–244.
- Mao JH, Hedrick RP, Chinchar VG (1997) Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. Virology 229: 212-220.
- Mao J, Green DE, Fellers G, Chinchar VG (1999) Molecular characterization of iridoviruses isolated from sympatric amphibians and fish. Virus Res 63: 45-52.
- McMahon TA, Brannelly LA, Chatfield MWH, Johnson PTJ, Joseph MB, McKenzie VJ, Richards-Zawacki CL, Venesky MD, Rohr JR (2013) Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian hosts and releases chemicals that cause pathology in absence of infection. Proc Natl Acad Sci USA 110: 210-215.
- 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: 224-7
- Mendez D, Webb R, Berger L, Speare R (2008) Survival of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* on bare hands and gloves: hygiene implications for amphibian handling. Dis Aquat Organ 82: 97-104.
- Mergeay J, Cox K, Speybroeck J (2015) Advies over de opzet van een ex-situ kweek van vuursalamander in Vlaanderen. Adviezen van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek; no. 48, 23 juni 2015. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO).
- Miller D, Gray M, Storfer A (2011) Ecolopathology of ranavirus infecting amphibians. Viruses 3: 2351-2373.
- Miller DM, Pessier AP, Hick P, Whittington RJ (2015) Comparative Pathology of Ranaviruses and Diagnostic Techniques. In: Ranaviruses: Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates Gray MJ, Chinchar VG (eds.) Springer, Heidelberg, Duitsland: p 171-208.
- Minteer BA, Collins JP (2008) From environmental to ecological ethics: Towards a practical ethics for ecologists and conservationists. Sci Eng Ethics 14: 483-501.
- Miocevic I, Smith J, Owens L, Speare R (1993) Ultraviolet sterilisation of model viruses important to finfish aquaculture in Australië. Aust Vet J 70: 25-27.
- Moody NJG, Owens L (1994) Experimental demonstration of the pathogenicity of a frog virus, Bohle iridovirus, for a fish species, barramundi *Lates calcarifer*. Dis Aquat Organ 18: 95-102.
- Muijsers M, Martel A, Van Rooij P, Baert K, Vercauteren G, Ducatelle R, De Backer P, Vercammen F, Haesebrouck F, Pasmans F (2012) Antibacterial therapeutics for the treatment of chytrid infection in amphibians: Columbus's egg? BMC Vet Res 8:175.
- Muletz C, Caruso NM, Fleischer RC, McDiarmid RW, Lips KR (2014) Unexpected rarity of the pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Appalachian Plethodon Salamanders: 1957-2011. PLoS One 9:e103728.

- Murray K, Skerratt L, Marantelli G, Berger L, Hunter D, Mahony M, Hines H (2011) Hygiene protocols for the control of diseases in Australian frogs. A report for the Australian Government Department of Sustainability, Environment, Water, Population and Communities. Pp 26.
- Muths E, Dreitz V (2008) Monitoring programs to assess reintroduction efforts: a critical component in recovery. *Anim Biodiv Conserv* 31.1: 47–56.
- Muths E, Scherer RD, Pilliod DS (2011) Compensatory effects of recruitment and survival when amphibian populations are perturbed by disease. *J Appl Ecol* 48: 873-879.
- Mutschmann F, Berger L, Zwart P, Gaedicke C (2000). Chytridiomycosis in amphibians -first report in Europe. *Berl Munch Tierarztl* 113: 380-383.
- Nazir J, Spengler M, Marschang RE (2012) Environmental persistence of amphibian and reptilian ranaviruses. *Dis Aquat Organ* 98: 177-184.
- Nichols DK, Lamirande EW, Pessier AP, Longcore JE (2000) Experimental transmission and treatment of cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates auratus* and *Dendrobates tinctorius*) (abstract), Proceedings: Joint Conf Am Assoc Zoo Vet and Internat Assoc Aqua An Med, New Orleans, LA, 17-21 September 2000, pp. 42-44.
- Nichols JD, Williams BK (2006) Monitoring for conservation. *Trends Ecol Evol* 21: 668-673.
- North AC, Hodgson DJ, Price SJ, Griffiths AG (2015) Anthropogenic and ecological drivers of amphibian disease (ranaviruses). *PLoS One* 10(6): e0127037.
- NSW-Department of Environment and Climate Change (2008) Hygiene protocol for the control of disease in frogs. Information Circular Number 6. DECC (NSW), Sydney South.
- Odum R A, Corn PS (2005) *Bufo baxteri* Porter, 1968. Wyoming toad. In Lannoo MJ (ed.) Amphibian declines: the conservation status of United States species. University of California Press, Berkeley, California, USA: p 390-392.
- OFI (Ornamental Fish International). Available: <http://www.ofish.org/ofi-recommends-immediate-temporary-moratorium-trade-firebelly-and-paddletail-newts>. Accessed 3 May 2016.
- Ohst T, Gräser Y, Plötner J (2013) *Batrachochytrium dendrobatidis* in Duitsland: distribution, prevalences, and prediction of high risk areas. *Dis Aquat Organ* 107: 49-59
- Olson DH, Aanensen DM, Ronnenberg KL, Powell CI, Walker SF, e.a. (2013) Mapping the Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the Amphibian Chytrid Fungus. *PLoS ONE* 8: e56802.
- Pallister J, Gould A, Harrison D, Hyatt A, Jancovich J, e.a. (2007) Development of real-time PCR assays for the detection and differentiation of Australian and European ranaviruses. *J Fish Dis* 30: 427–438.
- Pasmans F, Blahak S, Martel A, Pantchev N, Zwart P (2008) *Ranavirus*-associated mass mortality in imported red tailed knobby newts (*Tylototriton kweichowensis*): a case report. *Vet J* 176: 257-9.
- Pasmans F, Muijsers M, Maes S, Van Rooij P, Brutyn M, Ducatelle R, Haesebrouck F, Martel A (2010) Chytridiomycosis related mortality in a midwife toad (*Alytes obstetricans*) in België. *Vlaams Diergen Tijds* 79: 460-462.
- Pearman PB1, Garner TW, 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 naive populations. *J Wildl Dis* 40: 660-9.
- Pessier AP (2002) An overview of amphibian skin disease. *Semin Avian Exot Pet Med* 11: 162-174.

- Pessier AP (2008) Amphibian chytridiomycosis. In: Fowler ME, Miller ER (eds.). Zoo and Wild Animal Medicine. Current therapy, vol 6. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri: pp 137-143.
- Pessier A, Mendelson JR (eds.) (2010) A manual for control of infectious diseases in amphibian survival assurance colonies and reintroduction programs. IUCN/SSCConservation Breeding Specialist Group: AppleValley, MN, 229 pp.
- Pessier AP, Baitchman EJ, Crump P, Wilson B, Griffith E, Ross H (2014) Causes of mortality in anuran amphibians from an *ex situ* survival assurance colony in Panama. Zoo Biology 33: 516-526.
- Philips A, Voyles J, Wilson D, Driessen M (2010) Tasmanian Chytrid Management Plan Biodiversity Conservation Branch, DPIPWE, Tasmania, 2010, Department of Primary Industries, Parks, Water and Environment, 30 pp.
- Phillott AD, Spear R, Hines HB, Meyer E, Skerratt LF, McDonald KR, Cashins SD, Mendez D, Berger L (2010) Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies. Dis Aquat Organ 92:175-185.
- Picco AM, Brunner JL, Collins JP (2007) Susceptibility of the endangered California tiger salamander, *Ambystoma californiense*, to *Ranavirus* infection. J Wildl Dis 43: 286-90.
- Piotrowski JS, Annis SL, Longcore JE (2004) Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. Mycologia 96: 9-15.
- Pramuk JB, Gagliardo R (2012) AZA recommended husbandry practices manual. In: Poole VA, Grow S, editors. Amphibian husbandry resource guide, Edition 2.0. Silver Spring, MD: Association of Zoos and Aquaria. pp 238.
- Price SJ, Garner TW, Nichols RA, Balloux F, Ayres C, Mora-Cabello de Alba A, Bosch J (2014) Collapse of amphibian communities due to an introduced *Ranavirus*. Curr Biol 24: 2586-91.
- PubChem. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. Available at <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Accessed April 20, 2016.
- Puschendorf R, Bolaños F (2006) Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Eleutherodactylus fitzingeri*: Effects of skin sample location and histologic stain. J Wildl Dis 42: 301-306.
- RACE (Risk assessment of Chytridiomycosis to European Amphibian Biodiversity) (2010) Hygiene protocol to contain the spread of Chytridiomycosis during fieldwork. RACE (Risk assessment of Chytridiomycosis to European Amphibian Biodiversity), 4 pp. Available: <http://www.nonnativespecies.org/index.cfm?pageid=174>. Accessed April 25, 2016.
- Rachowicz LJ, Vredenburg VT (2004) Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. Dis Aquat Organ 61: 75-83.
- Rachowicz LJ, Knapp RA, Morgan JA, Stice MJ, Vredenburg VT, Parker JM, Briggs CJ (2006) Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality. Ecology 87:1671-83.
- Rafferty KA (1965) The cultivation of inclusion-associated viruses from Lucke tumor frogs. Ann NY Acad Sci 126: 3-21.
- Ramsey JP, Reinert LK, Harper LK, Woodhams DC, Rollins-Smith LA (2010) Immune defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus Linked to global amphibian declines, in the South African Clawed Frog, *Xenopus laevis*. Infect Immun 78: 3981-3992.
- RANA (2009) Risk assessment of new and emerging systemic iridoviral diseases for European fish and aquatic ecosystems. Final activity Report Project No.6459, 17 pp.-
- RAVON (2016) Hygiene protocol. Available at (<http://www.ravon.nl/Infotheek/Protocollen/>



- Hygieneprotocol/tabid/1513/Default.aspx). Accessed April 20, 2016.
- Reeder NMM, Pessier AP, Vredenburg VT (2012) A reservoir species for the emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* thrives in a landscape decimated by disease. *PLoS One* 7: e33567
- Reddacliff LA, Whittington RJ (1996). Pathology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redbfin perch (*Perca fluviatilis* L). *J Comp Pathol* 115:103-115.
- Retallick RWR, Miera V (2007) Strain differences in the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and non-permanent, sub-lethal effects of infection. *Dis Aquat Organ* 75: 201-207.
- Rijks JM, Spitzen-van der Sluijs A, Leuven RSEW, Martel A, Kik MJL, Pasmans F, Zollinger R, Verbrugge LNH, Gröne A (2013) Risk analysis of the common midwife toad-like virus (CMTV-like virus) in Nederland. Utrecht: NVA, Min EZ report 60000784-2012.
- Robert J, Abramowitz L, Gantress J, Morales HD (2007) *Xenopus laevis*: a possible vector of Ranavirus infection? *J Wildl Dis* 43: 645-652.
- Robert J, George E, De Jesús Andino F, Chen G (2011) Waterborne infectivity of the *Ranavirus* Frog Virus 3 in *Xenopus laevis*. *Virology* 2: 410-417.
- Rodriguez D, Becker CG, Pupin NC, Haddad CF, Zamudio KR (2014) Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. *Mol Ecol* 23:774-87
- Rosa GM, Anza I, Moreira PL, Conde J, Martins F, Fisher MC, Bosch J (2013) Evidence of chytrid-mediated population declines in common midwife toad in Serra da Estrela, Portugal. *Anim Conserv* 16: 306-315.
- Rowley JJJ, Alford RA (2007) Behaviour of Australian rain forest stream frogs may affect the transmission of chytridiomycosis. *Dis Aquat Organ* 77: 1-9.
- Russell AD, Day MJ (1993) Antibacterial activity of chlorhexidine. *J. Hosp. Infect.* 25:229–238.
- Sabino-Pinto J, Bletz M, Hendrix R, Bina Perl RG, Martel A, Pasmans F, Lötters S, Mutschmann F, Schmeller DS, Schmidt BR, Veith M, Wagner N, Vences M, Steinfartz S (2015) First detection of the emerging fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* in Duitsland. *Amphibia-Reptilia* 36: 411-416.
- Savage AE, Zamudio KR (2011) MHC genotypes associate with resistance to a frog-killing fungus. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 16705-16710.
- 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, Driscoll DA, Fisher J, Fletcher AW, Hanspach J, Vörös J, Hartel T (2015a) Landscape context influences chytrid fungus distribution in an endangered European amphibian. *Anim Conserv* 18: 480-488.
- Scheele BC, Hunter DA, Skerratt LF, Branelly LA, Driscoll DA (2015b) Low impact of chytridiomycosis on frog recruitment enables persistence in refuges despite high adult mortality. *Biol Conserv* 182: 36-43.
- Schloegel LM, Picco AM, Kilpatrick AM, Davies AJ, Hyatt AD, Daszak P (2009) Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biol Conserv* 142: 1420–1426.
- Schloegel LM, Daszak P, Cunningham AA, Speare R, Hill B (2010) Two amphibian diseases, chytridiomycosis and ranaviral disease, are now globally notifiable to the World

- Organization for Animal Health (OIE): an assessment. *Dis Aquat Organ* 92: 101-108.
- Schloegel LM, Toledo LF, Longcore JE, Greenspan SE, Vieira CA, Lee M, Zhao S, Wangen C, Ferreira CM, Hipolito M, Davies AJ, Cuomo CA, Daszak P, James TY (2012) Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Mol Ecol* 21: 5162-5177.
- Schmeller DS, Loyau A, Dejean T, Miaud C (2011) Using amphibians in laboratory studies: precautions against the emerging infectious disease chytridiomycosis. *Lab Anim* 45: 25-30.
- Schmeller DS, Blooi M, Martel A, Garner TW, 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. *Curr Biol* 24:176-180.
- 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.
- Schmidt BR (2015) Importverbot für Salamander und Molche in die Schweiz: Warum? Terraria/Elaphe. Available: <http://www.ravon.nl/Portals/0/PDFx/Schmidt,%20Importverbot%20f%C3%BCr%20Salamander%20und%20Molche%20in%20die%20Schweiz.pdf>. Accessed May 9, 2016.
- Searle CL, Mendelson JR III, Green LE, Duffy MA (2013) *Daphnia* predation on the amphibian chytrid fungus and its impacts on disease risk in tadpoles. *Ecol Evol* 3: 4129-4138.
- Semlitsch RD, Bodie JR (2003) Biological Criteria for Buffer Zones around Wetlands and Riparian Habitats for Amphibians and Reptiles. *Conserv Biol* 17: 1219–1228.
- Sharifian-Fard M, Pasmans F, Adriaensen C, Devisscher S, Adriaens T, Louette G, Martel A (2011) Ranaviruses in invasive bullfrogs, België. *Emerg Infect Dis* 17: 2371-2.
- Skerratt LF, McDonald KR, Hines HB, Berger L, Mendez D, Phillott AD, Cashins SD, Murray KA, Speare R (2010) Application of the survey protocol for chytridiomycosis to Queensland, Australië. *Dis Aquat Organ* 92: 117-129.
- Skerratt LF, Mendez D, McDonald KR, Garland S, Livingstone J, Berger L, Speare R (2011) Validation of diagnostic tests in wildlife: the case of chytridiomycosis in wild amphibians. *J Herpetol* 45: 444-450.
- Skriver P (1988) A pond restoration project and a tree-frog *Hyla arborea* project in the municipality of Aarhus Denmark. *Memoranda Soc Fauna Flora Fennica* 64: 146–147.
- Smith RK, Sutherland WJ (2014) Amphibian conservation: Global evidence for the effects of interventions. Exeter, Pelagic Publishing. 281pp.
- Spatial epidemiology *Bd*-maps. Available: <http://www.bd-maps.net>. Accessed 20 October 2015.
- Spitzen-van der Sluijs AM, Zollinger R, Bosman W, Pasmans F, Martel A, Van Rooij P, Clare F (2010) Short Report: *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians in the Nederland and Vlaanderen (België). Stichting RAVON, Nijmegen.
- Spitzen-van der Sluijs AM, Zollinger R (2010) Risk Assessment on the American bullfrog and the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. Stichting RAVON, Nijmegen.
- Spitzen-van der Sluijs AM, Martel A, Wombwell E, Van Rooij P, Zollinger R, Woeltjes T, Rendle M, Haesebrouck F, Pasmans F (2011) Clinically healthy amphibians in captive collections and at pet fairs: a reservoir of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Amphibia-Reptilia* 32: 419-423.
- Spitzen-van der Sluijs A, Spikmans F, Bosman W, de Zeeuw M, van der Meij T, Goverse E, Kik M, Pasmans F, Martel A (2013). Rapid enigmatic decline drives the

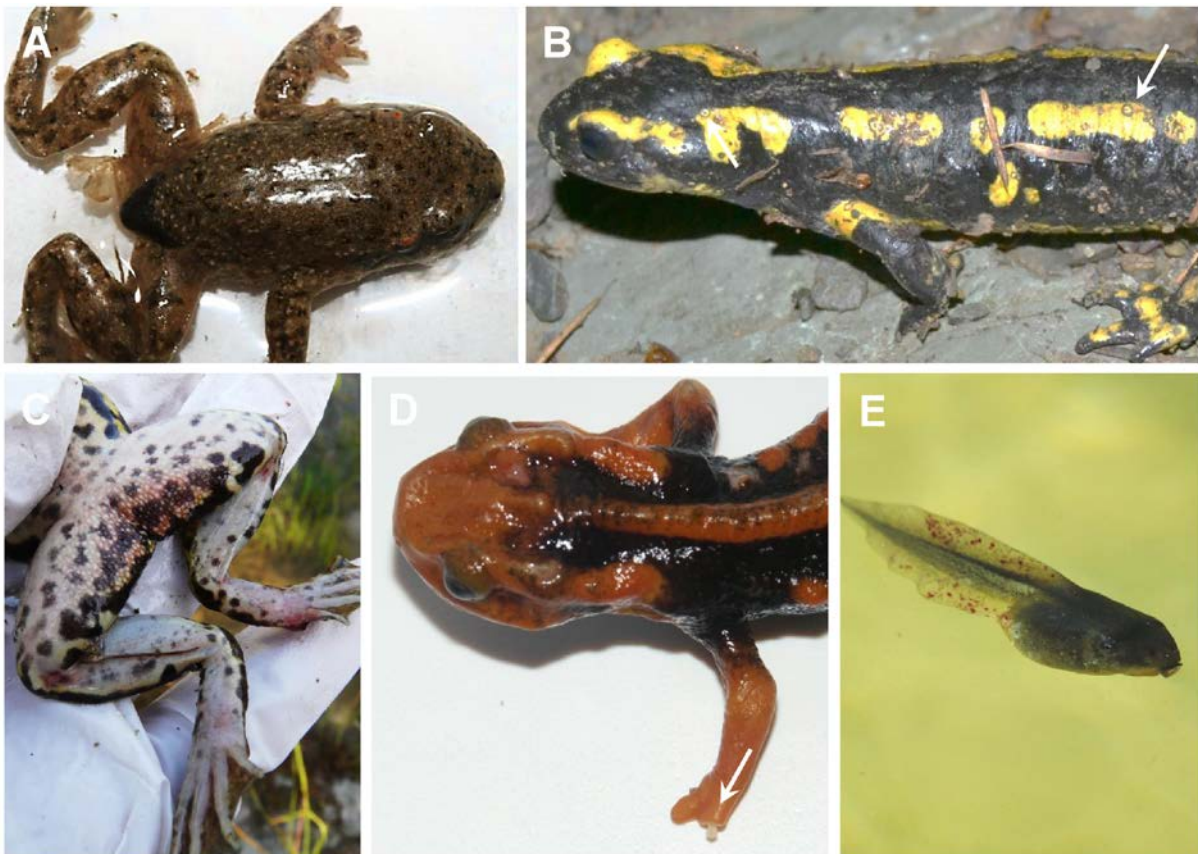
- fire salamander (*Salamandra salamandra*) to the edge of extinction in Nederland. *Amphibia-Reptilia* 34: 233-239.
- Spitzen-van der Sluijs A., Martel A, Hallmann CA, Bosman W, Garner TWJ, Van Rooij P, Jooris R, Haesebrouck F, Pasmans F (2014) Environmental determinants of recent endemism of *Batrachochytrium dendrobatidis* infections in amphibian assemblages in the absence of disease outbreaks. *Conserv Biol* 28: 1302-1311.
- Spitzen-van der Sluijs A, Bogaerts S, Woeltjes T, Pasmans F, Martel A (2015) Rapport Pathway Analyse Chytrid 2.0. Stichting RAVON, Nijmegen, 46 pp.
- Spitzen-van der Sluijs A, Martel A, Asselberghs J, Bales EK, Beukema W, Bletz MC, e.a. (2016) Expanding distribution of lethal amphibian fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. *Emerg Infect Dis.* 7: 1286-1288.
- Spitzen-van der Sluijs A, Canessa S, Martel A, Pasmans F (2017) Fragile coexistence of a global chytrid pathogen with amphibian populations is mediated by environment and demography. *Proc. R. Soc. B* 284: 20171444.
- Stegen G, Pasmans F, Schmidt BR, Rouffaer LO, Van Praet S, Schaube M, Canessa S, Laudelouts A, Kinet T, Adriaensen C, Haesebrouck F, Bert W, Bossuyt F, Martel A (2017) Drivers of salamanders extirpation mediated by *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Science* 544: 353-356.
- Steinfartz S, Weitere M, Tautz D (2007) Tracing the first step to speciation: ecological and genetic differentiation of a salamander population in a small forest. *Mol Ecol* 16: 45550-4561.
- Stockwell M P, Clulow J, Mahony MJ (2012) Sodium chloride inhibits the growth and infective capacity of the amphibian chytrid fungus and increases host survival rates. *PLoS ONE* 7: e36942.
- Stockwell MP, Storrer LJ, Pollard CJ, Clulow J, Mahony MJ (2015a) Effects of pond salinization on survival rate of amphibian hosts infected with the chytrid fungus. *Conserv Biol* 29:391-9.
- Stockwell MP, Clulow J, Mahony MJ (2015b) Evidence of a salt refuge: chytrid infection loads are suppressed in hosts exposed to salt. *Oecologia* 177:901-910.
- Stöhr AC, Fleck J, Mutschmann F, Marschang RE (2013) Ranavirus infection in a group of wild-caught Lake Urmia newts *Neurergus crocatus* imported from Iraq into Duitsland. *Dis Aquat Organ* 103:185-189.
- Stöhr AC, López-Bueno A, Blahak S, Caeiro MF, Rosa GM, Alves de Matos AP, e.a. (2015) Phylogeny and Differentiation of Reptilian and Amphibian Ranaviruses Detected in Europe. *PLoS ONE* 10: e0118633.
- Strecker AL, Campbell PM, Olden JD (2011) The aquarium trade as invasion pathway in the Pacific Northwest. *Fisheries* 36: 74-85.
- Strauss A, Smith KG (2013) Why does amphibian chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) not occur everywhere? An exploratory study in Missouri ponds. *PLoS ONE* 8: e76035
- 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: 1783-1785.
- Stumpel AHP (1992) Successful reproduction of introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in northwestern Europe: A potential threat to indigenous amphibians. *Biol Conserv* 60: 61-62.
- Sutherland WJ, Dicks LV, Ockendon N, Smith RK (2015) What Works in Conservation. Cambridge, UK: Open Book Publishers. Pp 374. <http://dx.doi.org/10.11647/OBP.0060>
- Tapiovaara H, Olesen NJ, Lindén J, Rimaila-Pärnänen E, von Bonsdorff CH (1998). Isolation of an iridovirus from pike-perch *Stizostedion lucioperca*. *Dis Aquat Org* 32: 185–193.

- Teacher AGF, Cunningham AA, Garner TWJ (2010) Assessing long-term impact of *Ranavirus* infection in wild common frog populations. *Anim Conserv* 13: 514-22.
- Tinsley RC, Coxhead PG, Stotta LC, Tinsley MC, Piccinni MZ, Guille MJ (2015) Chytrid fungus infections in laboratory and introduced *Xenopus laevis* populations: assessing the risks for U.K. native amphibians *Biol Conserv*: 380–388.
- 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.
- Tompkins DM, Carver S, Jones ME, Krkošek M, Skerratt LF (2015) Emerging infectious diseases of wildlife: a critical perspective. *Trends Parasitol* 31: 149-159.
- TOXNET Toxicology Data network, US National Library of Medicine. Available at <http://toxnet.nlm.nih.gov/>. Accessed April 20, 2016.
- US Fish and Wildlife Service (2016). Listing salamanders as injurious due to risk of salamander chytrid fungus. Available at <http://www.fws.gov/injuriouswildlife/salamanders.html>. Accessed April 20, 2016.
- van Beurden SJ, Hughes J, Saucedo B, Rijks J, Kik M, Haenen OLM, Engelsma MY, Gröne A, Verheije MH, Wilkieb G (2014) Complete Genome Sequence of a Common Midwife Toad Virus-Like *Ranavirus* Associated with Mass Mortalities in Wild Amphibians in Nederland. *Genome Announc* 2: e01293-14.
- Van Rooij P, Martel A, Nerz J, Voitel S, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Pasmans F (2011) Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Mexican bolitoglossine salamanders using an optimal sampling protocol. *Ecohealth*. 2011 8:237-43
- Van Rooij P, Martel A, Pasmans F, Haesebrouck F (2015) Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions *Vet Res* 46: 137.
- Van Rooij, Pasmans F, Coen Y, Martel A (2017) Efficacy of chemical disinfectants for the containment of the salamander chytrid fungus *Batrachochytrium salamandrivorans*. *PLoS ONE* 12 (10): e0186269.
- Venesky MD, Mendelson III JR, Seras BF, Stiling P, Rohr JR (2012) Selecting for tolerance against pathogens and herbivores to enhance success of reintroduction and translocation. *Conserv Biol* 26: 586-592.
- Venesky MD, Raffel TR, McMahon TA, Rohr JR (2014) Confronting inconsistencies in the amphibian-chytridiomycosis system: implications for disease management *Biol. Rev.* (2014), 89, pp. 477–483. 477.
- Vesely T, Cinkova K, Reschova S, Gobbo F, Ariel E, Vicenova M, Pokorova D, Kulich P, Bovo G (2011) Investigation of ornamental fish entering the EU for the presence of ranaviruses. *J Fish Dis* 34: 159-66.
- 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* 107: 9689-9694.
- Walker SF, Bosch J, James TY, Litvintseva AP, Valls JAO, Piña S, García G, Rosa GA, Cunningham AA, Hole S, Griffiths R, Fisher MC (2008) Invasive pathogens threaten species recovery programs. *Current Biol* 18: R853–R854.
- Webb R, Mendez D, Berger L, Speare R (2007) Additional disinfectants effective against the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Organ* 74:13-6.

- Weeks AR, Sgro CM, Young AG, Frankham R, Mitchell NJ, Miller KA, Byrne M, Coates DJ, Elridge MDB, Sunnucks P e.a. (2011) Assessing the benefits and risks of translocations in changing environments: a genetic perspective. *Evol Appl* 4: 709-725.
- Weitere M, Tautz D, Neumann D, Steinfartz S (2004) Adaptive divergence vs. environmental plasticity: tracing local genetic adaptation of metamorphosis traits in salamanders. *Mol Ecol* 13: 1665-1677.
- Weldon C (2002) Chytridiomycosis survey in South Africa. *Froglog* 51: 1-2.
- Weldon C, du Preez LH, Hyatt AD, Muller R, Speare R (2004) Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerg Infect Dis* 10: 2100-2105.
- Whitfield SM, Geerdes E, Chacon I, Ballesteros Rodriguez E, Jimenez RR, Donnelly MA, Kerby JL (2013) Infection and co-infection by the amphibian chytrid fungus and ranavirus in wild Costa Rican frogs. *Dis Aquat Organ* 104:173-8.
- Whittington RJ, Kearns C, Hyatt AD, Hengstberger S, Rutzou T (1996) Spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch (*Perca fluviatilis*) in southern Australia. *Aust Vet J* 73: 112–114.
- Wombwell EL, Garner TW, Cunningham AA, Quest R, Pritchard S, Rowcliffe JM, Griffiths RA (2016) Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians imported into the UK for the pet trade. *Ecohealth*. Epub ahead of print.
- Woodhams DC, Alford RA, Marantelli G (2003) Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Dis Aquat Organ* 55:65-7.
- 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* 8:8.
- 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 Organ* 98:11-25
- Yap TA, Koo MS, Ambrose RF, Wake DB, Vredenburg VT (2015) Averting a North American biodiversity crisis. *Science* 349: 481-482
- Young S, Berger L, Speare R (2007) Amphibian chytridiomycosis: strategies for captive management and conservation. *Int Zoo Yb* 41: 85–95.
- 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.
- Young S, Skerratt LF, Mendez D, Speare R, Berger L, Steele M (2012) Using community surveillance data to differentiate between emerging and endemic amphibian diseases. *Dis Aquat Organ* 98: 1-10.
- Zhu W, Bai C, Wang S, Soto-Azat C, Li X, Liu X, Li Y (2014) Retrospective survey of museum specimens reveals historically widespread presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in China. *Ecohealth* 11: 241-50.
- Zippel K, Johnson K, Gagliardo R, Gibson R, McFadden M, Browne R, Martinez C, Townsend E (2011) The Amphibian Ark: a global community for ex-situ conservation of amphibians. *Herpetol Conserv Biol* 6: 340-352.
- Zupanovic Z, Lopez G, Hyatt AD, Green B, Bartran G, Parkes H, Whittington RJ, Speare R (1998) Giant toads *Bufo marinus* in Australia and Venezuela have antibodies against 'ranaviruses'. *Dis Aquat Organ* 32:1–8.
- Zvirgzds J, Stasuls M, Vilnitis V (1995). Reintroductions of the European tree frog (*Hyla arborea*) in Latvia. *Memoranda Society Fauna Flora Fennica* 71:139–142.

## 9. FIGUREN & TABELLEN

**Figuur 1. Klinische symptomen die gelinkt zijn aan de opkomende infectieziekten chytridiomycose en ranavirose. (A) Stervende vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*) met een abnormale houding van de achterpoten en overvloedig losse afgeworpen huid, wat typisch is voor een *Bd* infectie (Bron: Frank Pasmans); (B) Vuursalamander (*Salamandra salamandra*) met zweren die over de volledige huid verspreid zijn, veroorzaakt door een infectie met *Bsal* (Bron: Gwij Stegen); (C) RV-geïnfekteerde *Pelophylax* sp. die roodheid vertoont t.h.v. de poten en voeten (Bron: Annemarieke Spitzen-van der Sluijs); (D) *Tylototriton shanjing* uit een privécollectie, met necrose van ledematen (distaal) ten gevolge van een RV-infectie (bron: Frank Pasmans); (E) Een RV-geïnfekteerde *Pelobates fuscus* kikkervisje dat puntvormige bloedingen vertoont t.h.v. de staart (bron: Marc Schils).**



Soort	<i>Bd</i> -positief	Referenties	<i>Bsal</i> -positief	Referenties
<b>- inheemse Anura</b>				
<i>Alytes obstetricans</i>	x (BE*)(NL)	Pasmans e.a., 2010; Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010	-	
<i>Bombina variegata</i> (NL)	x (NL)	Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010, 2017	-	
<i>Bufo bufo</i>	x (BE)(NL)	Martel e.a., 2012; Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010	-	
<i>Epidalea calamita</i>	-		-	
<i>Hyla arborea</i>	x (NL)	Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010	-	
<i>Pelobates fuscus</i>	-		-	
<i>Pelophylax lessonae</i>	x (NL)	Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010	-	
<i>Pelophylax</i> kl. <i>esculentus</i>	x (NL)	Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010	-	
<i>Pelophylax ridibundus</i>	x (NL)	Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010	-	
<i>Rana arvalis</i>			-	
<i>Rana temporaria</i>	x (NL)	Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010	-	
<b>- uitheemse Anura</b>				
<i>Lithobates castesbeianus</i>	x (BE)(NL)	Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010	-	
<b>- inheemse Urodela</b>				
<i>Salamandra salamandra</i>	-		x (BE*)(NL*)	Spitzen-van der Sluijs e.a., 2013 ; Martel e.a., 2014; Stegen e.a. 2017
<i>Ichtyosaura alpestris</i>	x (BE)(NL)	Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010	x (BE*)(NL)	Spitzen-van der Sluijs e.a., 2016; Bosman e.a., 2015
<i>Lissotriton helveticus</i>	-		-	
<i>Lissotriton vulgaris</i>	x (NL)	Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010	x(NL)	Spitzen-van der Sluijs e.a., 2016
<i>Triturus cristatus</i>	-		-	
<b>- uitheemse Urodela</b>				
<i>Triturus marmoratus</i> (NL)	-		-	
<i>Triturus carnifex</i> (NL)	-		-	

**Tabel 1.** Literatuuroverzicht betreffende de prevalentie van *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) en *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) in inheemse en uitheemse Belgische en Nederlandse amfibieën. NL: Nederland; BE: België; Species die enkel aanwezig zijn in Nederland worden aangeduid met (NL); \* infectie geassocieerd met morbiditeit en mortaliteit.

Land	Amfibie gastheer (familie)	Ranavirus	Wild /Gevangenschap	Referenties
België	<i>Tylotriton kweichowensis</i>	FV3	G	Pasmans e.a., 2008
	<i>Lithobates catesbeianus</i> (Ranidae)	CMTV	W	Sharifian Fard e.a., 2011
Kroatië	<i>Pelophylax klepton esculentus</i> (Ranidae)	FV3-achtig?	W	Fijan e.a., 1991
Denemarken	<i>Pelophylax klepton esculentus</i> (Ranidae)	FV3-achtig	W	Ariel e.a., 2009
Duitsland	<i>Neurergus crocatus</i> (Salamandridae)	FV3-achtig	G	Stöhr e.a. 2013
Nederland	<i>Phyllobates vittatus</i> (Dendrobatidae)	CMTV	G	Kik e.a., 2012
	<i>Phyllobates bicolor</i> (Dendrobatidae)	CMTV	G	Kik e.a., 2012
	<i>Dendrobates auratus</i> (Dendrobatidae)	CMTV	G	Kik e.a., 2012
	<i>Pelophylax lessonae</i> (Ranidae)	CMTV-achtig	W	Kik e.a., 2011; Van Beurden e.a., 2014
	<i>Lissotriton vulgaris</i> (Salamandridae)	CMTV-achtig	W	Kik e.a., 2011; Van Beurden e.a., 2014
	Portugal	<i>Alytes obstetricans</i> (Alytidae)	PNTRV	W
Spanje	<i>Lissotriton boscai</i> (Salamandridae)	PNTRV	W	Stöhr e.a., 2013
	<i>Triturus marmoratus</i> (Salamandridae)	FV3-achtig	W	Alves de Matos e.a., 2008
	<i>Alytes obstetricans</i> (Alytidae)*	CMTV	W	Balseiro e.a., 2010a; Price e.a., 2014
	<i>Ichthyosaura alpestris</i> (Salamandridae)*	CMTV	W	Balseiro e.a., 2010b; Price e.a., 2014
	<i>Bufo bufo</i> (Bufonidae)*	CMTV	W	Price e.a., 2014
	<i>Rana temporaria</i> (Ranidae)	CMTV	W	Price e.a., 2014
	<i>Triturus marmoratus</i> (Salamandridae)	CMTV	W	Price e.a., 2014
Zwitserland	<i>Lissotriton boscai</i> (Salamandridae)	CMTV	W	Price e.a., 2014
	<i>Pelophylax kl. esculentus</i> (Ranidae)	FV3	G	Miller e.a., 2011
Engeland	<i>Pelophylax ridibundus</i> (Ranidae)	FV3	G	Miller e.a., 2011
	<i>Alytes obstetricans</i> (Alytidae)	FV3-achtig	W	Duffus e.a., 2009
	<i>Lissotriton vulgaris</i> (Salamandridae)	FV3-achtig	W	Hyatt e.a., 2000
	<i>Bufo bufo</i> (Bufonidae)	FV3-achtig	W	Cunningham e.a., 1993, 1996
	<i>Rana temporaria</i> (Ranidae)*	FV3	W	Drury e.a., 1995; Teacher e.a., 2010

**Tabel 2.** Literatuuroverzicht van het opkomende ranavirus in Europa: FV3 (Frog virus 3), CMTV (Common Midwife Toad virus), PNTRV (Portugese Newt and Toad Ranavirus), W(wild), G(evangenschap). Soorten waarbij sterke dalingen in aantallen waargenomen werden ten gevolge van ranavirose, worden weergegeven met een asterisk (\*).



Actie	Land	Status	B	G	BB	Pathoogeen	Referentie
<b>HANDEL</b>							
Oplijsting door OIE (import regulatie)	globaal	geïmplementeerd	x			<i>Bd, RV, Bsal</i>	Schloegel e.a., 2010
Organisatie taakgroep + noodactieplan	USA	geïmplementeerd	x			<i>Bsal</i>	Gray e.a., 2015
	België	lopend	x			<i>Bsal, Bd</i>	ANB, Natuurpunt, DNF, Natagora
	Nederland	lopend	x			<i>Bsal, Bd, RV</i>	RAVON, DWHC 2016
	Europe	lopend	x			<i>Bsal</i>	
	Europe	geïmplementeerd	x			<i>Bd</i>	RACE 2010
	Australië	geïmplementeerd	x			<i>Bd</i>	Gray e.a., 2015
Gratis screening van hobbykweek amfibieën	USA	lopend	x			<i>Bsal</i>	ASG & ASA
	Nederland	lopend	x			<i>Bsal</i>	RAVON
Import-handelsverbod	USA	geïmplementeerd	x			<i>Bsal</i>	Gray e.a., 2015
	Zwitserland	geïmplementeerd	x			<i>Bsal</i>	Gray e.a., 2015
Import controle	Canada	geïmplementeerd	x			<i>Bsal</i>	Gray e.a., 2015
	Australië	geïmplementeerd	x			RV	DEH 2006
<b>PREVENTIEVE MAATREGELEN</b>							
Uitwerken van een meldpunt	België	geïmplementeerd	x			<i>Bsal, Bd, RV</i>	ANB, DNF
	Nederland	geïmplementeerd	x			<i>Bsal, Bd, RV</i>	RAVON
	Duitsland	geïmplementeerd	x			<i>Bsal, Bd, RV</i>	DGHT 2016
	Spanje	geïmplementeerd	x			<i>Bsal</i>	
	Frankrijk	Geïmplementeerd	X			<i>Bsal</i>	
	VK	geïmplementeerd	x			<i>Bsal</i>	
	Italië	Geïmplementeerd	x			<i>Bsal</i>	
	Zwitserland	geïmplementeerd	x			<i>Bsal, Bd, RV</i>	DGHT 2016
Surveillance door de gemeenschap	Australië	geïmplementeerd	x			<i>Bd</i>	Young e.a., 2012
	Nederland	geïmplementeerd	x			<i>Bd, Bsal, RV</i>	RAVON
	België	geïmplementeerd	x			<i>Bd, Bsal, RV</i>	Natuurpunt, Natagora
Opvolging	België (Vlaanderen)	lopend	x			<i>Bd, Bsal, RV</i>	ANB

Bemonstering per land (nationaal onderzoek )	Zuid-Afrika	uitgevoerd(West-Kaap)	x	<i>Bd</i>	Weldon 2002
	Australië	uitgevoerd	x	<i>Bd</i>	DEH 2006; Skerratt e.a., 2008
	Engeland	uitgevoerd	x	<i>Bd</i>	Cunningham & Minting, 2008
	Nederland	uitgevoerd	x	<i>Bd</i>	Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010
	België (Vlaanderen)	lopend	x	<i>Bd</i>	Spitzen-van der Sluijs e.a., 2010; ANB
Passieve surveillance	België	geïmplementeerd	x	<i>Bd, Bsal, RV</i>	ANB, DNF
	Nederland	geïmplementeerd	x	<i>Bd, Bsal, RV</i>	RAVON
	Australië	geïmplementeerd	x	<i>Bd</i>	DEH 2006;
Actieve surveillance	België (Vlaanderen)	geïmplementeerd	x	<i>Bd, Bsal</i>	ANB, DNF
	USA	geïmplementeerd	x		Gray e.a., 2015
	Canada	geïmplementeerd	x		Gray e.a., 2015
	Australië	geïmplementeerd	x	<i>Bd</i>	DEH 2006; Skerratt e.a., 2008
Minimalisering van antropogene stressoren	USA	experimenteel (veld)	x	<i>RV</i>	Gray e.a., 2007; North e.a., 2015
<b>LIMITEER VERSPREIDING DOOR DE MENS</b>					
Publieke belangstelling vergroten	Nederland	geïmplementeerd	x	<i>Bsal, Bd, RV</i>	Gray e.a., 2015; RAVON
	Duitsland	geïmplementeerd	x	<i>Bsal</i>	DGHT 2016
	België	geïmplementeerd	x	<i>Bsal, Bd</i>	Gray e.a., 2015; ANB
	VK	geïmplementeerd	x	<i>Bsal</i>	
	Spanje	geïmplementeerd	x	<i>Bsal</i>	
	Frankrijk	geïmplementeerd	x	<i>Bsal</i>	
	Italie	geïmplementeerd	x	<i>Bsal</i>	
	USA	geïmplementeerd	x	<i>Bsal</i>	Gray e.a., 2015
	Canada	geïmplementeerd	x	<i>Bsal</i>	Gray e.a., 2015
	Australië	geïmplementeerd	x	<i>Bd</i>	DEH 2006
Inperking van het uitbraakgebied	algemeen aanbevolen	weinig data	x (x)	<i>Bd, RV</i>	Rijks e.a., 2013; Bosch J (pers. com.)
	België	geïmplementeerd	x	<i>Bsal</i>	ANB
Desinfectie van veldmateriaal	algemeen aanbevolen	routinematig uitgevoerd	x	<i>Bd, Bsal, RV</i>	DAPTF; RACE, 2010; RAVON, 2016

Desinfectie van voertuigen	algemeen aanbevolen	weinig data	x	(x) <i>Bd, Bsal, RV</i>	bv. RAVON, Phillott e.a., 2010
<b>EX-SITU MAATREGELEN</b>					
Kweek in gevangenschap	Panama	geïmplementeerd	x	<i>Bd</i>	Gagliardo e.a., 2008
	Australië	geïmplementeerd	x	<i>Bd</i>	DEH 2006
	Nederland	geïmplementeerd	x	<i>Bsal</i>	RAVON
Kweek in gevangenschap & herintroductie	USA	experimenteel (veld)	x	<i>Bd</i>	Woodhams e.a., 2011
	Spanje	geïmplementeerd	x	<i>Bd</i>	Buley & Garcia, 1997
	Puerto Rico	geïmplementeerd	x	<i>Bd</i>	Joglar e.a., 2007
Kweek in gevangenschap & herintroductie + selectie van resistente amfibieën	USA	experimenteel (labo)	x	<i>Bd</i>	Venesky e.a., 2012, 2013
	Australië	geïmplementeerd	x	<i>Bd</i>	Scheele e.a., 2014
Herlocatie	USA	experimenteel (veld)	x	<i>Bd</i>	Woodhams e.a., 2011
	algemeen aanbevolen	routinematig uitgevoerd	x	<i>Bd, Bsal</i>	bv. Martel e.a., 2011; Blooi e.a., 2015
Ex-situ behandeling van de geïnfecteerde gastheer	Spanje	experimenteel (veld)	x	<i>Bd</i>	Bosch e.a., 2015
Ex-situ behandeling voor vrijlating	USA	experimenteel (labo)	x	<i>Bd</i>	Ramsey e.a., 2010; McMahon e.a., 2015
Vaccinatie					
<b>IN-SITU MAATREGELEN</b>					
In -situ behandeling van de geïnfecteerde gastheer	USA	experimenteel (veld)	x	<i>Bd</i>	Hardy e.a., 2015
Verhoging van de buffercapaciteit van een populatie					
1) <i>Supplementatie/populatie verhoging</i>	Australië	geïmplementeerd	x	<i>Bd</i>	Hunter et al., 1999
	Honduras	geïmplementeerd	x	<i>Bd</i>	Scheele e.a., 2014
2) <i>Eliminatie van invasieve soorten</i>	Nederland	geïmplementeerd (stierkikker)	x	<i>RV, Bd</i>	Rijks e.a., 2013
	België	geïmplementeerd (stierkikker)	x	<i>RV, Bd</i>	INVEXO 2016, EC Environment 2016
3) <i>Voorzien van vochtige schuilplaatsen</i>	USA	experimenteel (veld)	x	<i>Bd</i>	Scheele e.a., 2013
Reductie van de aanwezigheid van het pathogeen in het veld					
1) <i>bio-augmentatie</i>	USA	experimenteel (veld)	x	<i>Bd</i>	Bletz e.a., 2013
2) <i>micropredatoren</i>	Frankrijk	experimenteel (labo)	x	<i>Bd</i>	Schmeller e.a., 2014
	USA	experimenteel (labo)	x	<i>Bd</i>	Woodhams e.a., 2011
3) <i>verhoging van de temperaturen (verwijderen van schaduw)</i>	Australië	experimenteel (veld)	x	<i>Bd</i>	Heard e.a., 2014

	USA	experimenteel (veld)	x	<i>Bd</i>	Forrest & Schlaepfer, 2011
	Spanje	experimenteel (veld)	x	<i>Bd</i>	Bosch e.a., 2015
4) droogleggen van vijvers	Spanje	experimenteel (veld)	x	<i>Bd, RV</i>	Bosch e.a., 2015
5) verhogen van het zoutgehalte in de vijver	Australië	experimenteel (veld)	x	<i>Bd</i>	Heard e.a. 2014; Stockwell e.a., 2015a
Behandeling van de omgeving met fungiciden	Spanje	experimenteel (veld)	x	<i>Bd</i>	Bosch e.a., 2015
<b>ONDERZOEK</b>					
Investeren in labo-onderzoek	USA	geïmplementeerd	x	<i>Bsal</i>	Gray e.a., 2015
	Australië	geïmplementeerd	x	<i>Bd</i>	DEH 2006
Identificatie van referentielaboratoria	Canada	geïmplementeerd	x	<i>Bsal</i>	Gray e.a., 2015
	Australië	geïmplementeerd	x	<i>Bd</i>	DEH, 2006
Testen van de gevoeligheid van inheemse amfibiesoorten	Mexico	lopend	x	<i>Bsal</i>	Gray e.a., 2015
	USA	lopend	x	<i>Bsal</i>	Gray e.a., 2015

**Tabel 3:** Overzicht van wereldwijde controle- en beperkingsmaatregelen om opkomende infectieziekten bij amfibieën tegen te gaan en hun effectiviteit. De lijst met opgegeven landen is niet beperkend. Afkortingen: OIE: Wereldorganisatie voor diergezondheid, B: bewezen, G: gunstig of waarschijnlijk gunstig, BB: beperkt bewijs

Maatregelen	Prioriteit	Haalbaarheid	Kosten	Commentaar	Referenties
<b>Preventieve maatregelen</b>					
<i>Creëren van vroege waarschuwingssystemen</i>	heel hoog	goed	medium		Skerratt e.a., 2010; Kik e.a. 2012
<i>Opstellen en uitvoeren van monitoringsprogramma's</i>	heel hoog	heel goed	laag		Kik e.a., 2012
<i>Implementatie van surveillance programma's</i>	hoog	goed	medium		Grogan e.a., 2014
<i>Implementatie van hygiëneprotocollen voor amfibieën in gevangenschap</i>	heel hoog	goed	laag tot medium		Young e.a., 2007; Kik e.a., 2012
<i>Minimaliseren van antropogene stressoren</i>	hoog	lange termijn	laag tot medium	afhankelijk van de bereidwilligheid van de landbouw en veeteelt	North e.a., 2015
<i>Ontwikkelen van een noodactieplan</i>	heel hoog	goed	laag		Skeratt e.a., 2010
<b>Maatregelen na de infectie</b>					
<i>Implementatie van een bioveiligheidsprotocol</i>	heel hoog	heel goed	laag tot medium	afhankelijk van de gebruikte methode	Phillot e.a., 2010; Johnson e.a., 2003; Webb e.a., 2007
<i>Afsluiten van een uitbraakgebied</i>	heel hoog	lange termijn	laag	afhankelijk van de bereidwilligheid van de gemeenschap	Kik e.a., 2011
<i>Creëren van dialoog met de lokale belanghebbenden</i>	hoog	lange termijn	medium		Kik e.a., 2011
<i>Informereren van de lokale gemeenschap</i>	hoog	lange termijn	medium		Kik e.a., 2011
<i>Verder uitwerken of opstarten van monitoringsprogramma's</i>	hoog	goed	laag	haalbaarheid is afhankelijk van de gastheersoort en het type pathoogeen	Skerratt e.a., 2010; Woodhams e.a., 2011
<i>Kweken van dieren in gevangenschap</i>				kosten zijn afhankelijk van hoelang de dieren in gevangenschap moeten blijven	
1) herintroductie t.h.v. de originele plaats	hoog tot medium	laag tot goed	hoog tot heel hoog	strikte screening gedurende het kweken/voor herintroductie + extensieve opvolging na herintroductie	Griffiths & Pavajau, 2008
2) translocatie naar een OIZ negatieve plaats	hoog tot medium	laag tot goed	hoog tot heel hoog	strikte screening gedurende het kweken/voor herintroductie + extensieve opvolging na herintroductie	Griffiths & Pavajau, 2008
3) herintroductie van eitjes/kikkervisjes	hoog tot medium	medium tot goed	laag tot medium	enkel wanneer de larven gevoelig zijn + kweek van adult dieren	Scheele e.a. 2014
<i>Reductie van de densiteit van amfibieën om een uitbraak te vermijden</i>					
1) translocatie van gezonde gastheren	hoog tot medium	medium tot goed	laag tot medium	Vergt een extensieve opvolging	Woodhams e.a., 2011
<i>Behandeling van de gastheer ex-situ + eventuele herintroductie</i>	hoog	goed	medium tot heel hoog	Kosten zijn afhankelijk van het type behandeling; mogelijks een verhoogde immuniteit	Woodhams e.a., 2011; Bosch e.a., 2015
<i>Behandeling van de gastheer in-situ</i>					
1) probiotica/bio-augmentatie	laag	laag tot goed	hoog tot heel hoog	enkel gebruik van locale omgevingsbacteriën; meer studies zijn nodig om dit te kunnen toepassen in Europa	Vredenburg e.a., 2011; Bletz e.a., 2013
<i>Behandeling van het aangetast gebied (habitat)</i>					
1) Virkon S	laag	laag tot goed	hoog tot heel hoog	langetermijneffecten op het ecosysteem zijn ongekend	Bosch e.a., 2015
2) verhoging van het zoutgehalte	laag	laag	laag	negatieve bijwerkingen op het ecosysteem/larven, enkel wanneer het doelsysteem zout tolereert	Stockwell e.a., 2012; Stockwell e.a., 2015

3) droogleggen van vijvers/creëren van tijdelijke vijvers <i>Elimineren van andere factoren die sterfte veroorzaken</i>	laag tot medium	medium tot goed	laag		Woodhams e.a., 2011
1) habitat bescherming	hoog tot heel hoog	laag tot medium	medium tot hoog	bv. stierkikker populaties dichtbij Hoogstraten met CMTV-achtige infecties	Scheele e.a. 2014; Scheele e.a., 2015 Rijks e.a., 2012; Scheele e.a. 2014
2) eliminatie van geïntroduceerde soorten	hoog tot heel hoog	goed	medium		

**Tabel 4:** Kosten-batenanalyse van preventieve maatregelen en acties die ondernomen kunnen worden na blootstelling aan het pathogeen.

Type desinfectans	Naam desinfectans	Actief ingrediënt (AI)	Concentratie AI	Minimale contacttijd	Doelpathogeen	Referenties
<i>Aldehyden</i>	formaldehyde	formaldehyde	1%	5 min	<i>Bd</i>	Johnson e.a., 2003
<i>Alcoholen</i>	ethanol	EtOH	70%	20 s, 30 s	<i>Bd, Bsal</i>	Johnson e.a., 2003; Van Rooij e.a. 2017
	Disolol®	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	onverdund	30 s	<i>Bd, Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
	Dettol Medical®	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> ClO	1:20 verdunning	30 s, 5 min	<i>Bd, Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
	chloorhexidine gluconaat	chloorhexidine gluconaat	0,25-0,75%	1 min, 30 s	<i>Bd, Bsal</i>	Gold e.a., 2013; Van Rooij e.a., 2017
<i>Biguaniden</i>	Nolvasan®	chlorhexidine diacetaat hydraat	0,75%	1 min	<i>Bd, RV</i>	Gold e.a., 2013; Bryan e.a., 2009
	Betadine®	povidonjood	onverdund, 1-10%	1 min	<i>Bd</i>	Webb e.a., 2007
<i>Jodium desinfectans Oxiderende agentia</i>	bleekwater	natriumhypochloriet	1:5 verdunning (1,6%)	30 s, 5 min	<i>Bd, Bsal</i>	Johnson e.a., 2003; Gold e.a., 2013; Van Rooij e.a. 2017
			4%	30s	<i>Bd, Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
			3-5%	1 min	RV	Bryan e.a., 2009
	kaliumpermanganaat	KMnO <sub>4</sub>	2%	5 min	<i>Bd, Bsal</i>	Johnson e.a., 2003; Van Rooij e.a. 2017
			1%	10 min	<i>Bd, Bsal</i>	Johnson e.a., 2003; Van Rooij e.a. 2017
	Virkon S®	Kalium monopersulfaat	1%	1 min, 2 min	<i>Bd, Bsal</i>	Gold e.a., 2013; Van Rooij e.a., 2017
			1%	1 min	RV	Bryan e.a., 2009
	Chloramine-T®	chloramine	0,5%	5 min	<i>Bd, Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
			1%	2 min	<i>Bd, Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
	waterstofperoxide	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,5%	inactief, inactief	<i>Bd, Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
			1%	10 min, inactief	<i>Bd, Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
			3%	2 min, inactief	<i>Bd, Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
			6%	1 min, inactief	<i>Bd, Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
	koper(II)sulfaat	CuSO <sub>4</sub>	0,001-1%	inactief	<i>Bd, Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
			Kickstart®	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	0,01%	10 min, inactief
0,05%	30 s, 5 min	<i>Bd, Bsal</i>			Van Rooij e.a., 2017	
0,1%	30 s, 2 min	<i>Bd, Bsal</i>			Van Rooij e.a., 2017	
QAC	benzalkoniumchloride F10 ®	BAC, PHMB hydrochloride	2mg/ml	1 min	<i>Bd</i>	Phillott e.a., 2010
			1:100 verdunning	30 s	<i>Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
			1:250 verdunning	1 min, 30 s	<i>Bd, Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
			1:500 verdunning	30 s	<i>Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
			1:1000 verdunning	1 min, 30 s	<i>Bd, Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
1:1500 verdunning	1 min	<i>Bd</i>	Webb e.a., 2007			

			1:3000 verdunning	1 min	<i>Bd</i>	Webb e.a., 2007
			1:3500 verdunning	10 min	<i>Bd</i>	Webb e.a., 2007
			1:7000 verdunning	5 min	<i>Bd</i>	De Jong e.a., 2017
	PathX®	DDAC	0,01-0,1%	30 s	<i>Bd</i>	Johnson e.a., 2003
	QAC 128®	DDAC	onverdund-0,01%	30 s	<i>Bd</i>	Johnson e.a., 2003
	Trigene®	BAC, DDAC, PHMB hydrochloride	1:5000 verdunning	1 min	<i>Bd</i>	Webb e.a., 2007
	Biocidal ZF™	ongedefinieerde QAC	onverdund	30 s	<i>Bd, Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
	Pro-San®	BAC	0,19%	1 min	<i>Bd</i>	Gold e.a., 2013
	Saf4®	BAC	onverdund	30 s	<i>Bd, Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
Zouten	natrium chloride	NaCl	0,3%	inactief	<i>Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
			0,5%	inactief	<i>Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
			1%	inactief	<i>Bsal</i>	Van Rooij e.a., 2017
			5%	5 min, inactief	<i>Bd</i>	Johnson e.a., 2003; Van Rooij e.a., 2017
			10%	2 min, 10 min	<i>Bd</i>	Johnson e.a., 2003; Van Rooij e.a., 2017

**Tabel 5.** Literatuuroverzicht van de desinfectantia die *in vitro* activiteit vertonen tegen *Bd* en RV. QAC: Quaternaire ammonium componenten, DDAC: didecyldimethylammonium chloride, PHMB: polyhexamethyleenbiguanide, BAC: benzalkonium chloride

Fysieke maatregel	Minimale blootstellingstijd	Pathogeen	Referenties
Uitdroging	3 u	<i>Bd</i> (niet effectief tegen RV)	Johnson e.a., 2003
Verwarming	1 min (100°C)	<i>Bd/RV</i>	Johnson e.a., 2003
	5 min/30 min (60°C)	<i>Bd/RV</i>	Johnson e.a., 2003; La Fauce e.a., 2012
	30 min (47°C)	<i>Bd</i>	Johnson e.a., 2003
	4 u (37°C)	<i>Bd</i>	Johnson e.a., 2003
UV licht	1 min	RV (niet effectief tegen <i>Bd</i> )	Miocevic e.a., 1993; Johnson e.a., 2003

**Tabel 6.** Literatuuroverzicht van fysieke maatregelen om opkomende infectieziekten bij amfibieën te elimineren.



Naam desinfectans	Actief ingrediënt	Voordelen	Nadelen	Aangeraden gebruik	Product type (PT) Biocide <sup>j</sup>
<i>Formaldehyde</i>	formaldehyde	actief in de aanwezigheid van organisch debris <sup>a</sup>	hoge toxiciteit <sup>a</sup> carcinogeen <sup>a</sup> sterk irriterend <sup>a</sup>	beperkt gebruik, het gebruik wordt niet aangeraden <sup>a</sup>	N.v.t
<i>Ethanol</i>	ethanol	snelwerkend <sup>a</sup> geen residu <sup>a</sup> niet corrosief voor metalen <sup>a</sup> geen vlekken <sup>a</sup>	ontvlambaar <sup>b</sup> verdamping kan leiden tot een concentratiedaling <sup>a</sup> kan rubber/plastic aantasten <sup>a</sup> te duur voor algemeen gebruik irriterend <sup>a</sup> giftig <sup>a</sup> direct contact is schadelijk voor amfibieën <sup>f</sup>	desinfectie van materiaal (scharen, schuifmaat, weegschalen,...) en harde oppervlakken <sup>g</sup>	2
<i>Chloorhexidine gluconaat</i>	chloorhexidinegluconaat	veilig voor het gebruik bij amfibieën <sup>e</sup> relatief ongevaarlijk voor mensen <sup>i</sup>	bioaccumulatie in vissen en zoöplankton <sup>b</sup> gemiddelde tot hoge toxiciteit in vissen en zoöplankton <sup>b,i</sup> inactief bij aanwezigheid van organisch debris <sup>h</sup>	desinfectie van verzamel materiaal en containers	N.v.t
<i>Nolvasan®</i>	chloorhexidinediacetaathydraat	snelwerkend <sup>g</sup> actief bij lage concentraties <sup>g</sup> relatief onschadelijk <sup>l</sup>	gemiddelde tot hoge toxiciteit in vissen en zoöplankton <sup>b,i</sup> inactief bij aanwezigheid van organisch debris <sup>h</sup>	desinfectie van schoeisel, verzamel materiaal en containers <sup>g</sup>	N.v.t
<i>Betadine®</i>	povidonjood	snelwerkend <sup>a</sup> relatief onschadelijk <sup>a</sup> relatief vrij van irritatie <sup>a</sup>	inactief bij aanwezigheid van organisch debris <sup>a</sup> veroorzaakt vlekken <sup>a</sup> corrosief voor metalen <sup>a</sup> toxisch voor amfibieën <sup>e</sup>	niet bruikbaar op harde oppervlakken <sup>a</sup>	N.v.t
<i>Bleekwater</i>	natriumhypochloriet	snelwerkend <sup>a</sup> beschikbaar <sup>a</sup> onaangetast door de waterhardheid <sup>a</sup> goedkoop <sup>a</sup>	inactief bij aanwezigheid van organisch debris <sup>a</sup> veroorzaakt vlekken kan irritatie van de huid-ogen veroorzaken <sup>a</sup> corrosief voor metalen <sup>a</sup> schadelijk voor aquatische organismen <sup>b,c</sup>	desinfectie van schoeisel, verzamel materiaal en containers <sup>g</sup>	2
<i>kaliumpermanganaat</i>	KMnO <sub>4</sub>	beschikbaar <sup>g</sup>	zeer toxisch voor het waterleven <sup>b</sup> onverdund poeder is irriterend voor de huid en	desinfectie van schoeisel, verzamel materiaal en containers	N.v.t

			ogen <sup>i</sup> veroorzaakt vlekken <sup>i</sup>		
<i>Virkon S®</i>	kaliumpersulfaat	snelwerkend <sup>g</sup> actief bij lage concentraties <sup>g</sup> relatief stabiel in de aanwezigheid van organisch debris	sterk irriterend <sup>d</sup> schadelijk voor aquatische organismen <sup>i</sup> , geen meetbare effecten in andere studies <sup>c,d</sup>	desinfectie van schoeisel, verzamel materiaal en containers <sup>g</sup>	3
<i>Benzalkoniumchloride</i>	BAC	snelwerkend <sup>g</sup> actief bij lage concentraties <sup>g</sup>	activiteit wordt beïnvloed door de waterhardheid <sup>a</sup> schadelijk voor aquatische organismen <sup>b</sup> mag niet gebruikt worden om materiaal te desinfecteren <sup>a</sup>	desinfectie van schoeisel, verzamel materiaal en containers <sup>g</sup>	N.v.t
<i>F10®</i>	BAC, PHMB hydrochloride	snelwerkend <sup>g</sup> actief bij lage concentraties <sup>g</sup>	activiteit wordt beïnvloed door de waterhardheid <sup>a</sup> schadelijk voor aquatische organismen <sup>b</sup> mag niet gebruikt worden om materiaal te desinfecteren <sup>a</sup>	desinfectie van schoeisel, verzamel materiaal en containers	N.v.t
<i>PathX®</i>	DDAC	snelwerkend <sup>g</sup> actief bij lage concentraties <sup>g</sup>	corrosief voor metalen activiteit wordt beïnvloed door de waterhardheid <sup>a</sup> mag niet gebruikt worden om materiaal te desinfecteren <sup>a</sup> schadelijk voor aquatische organismen <sup>b</sup>	desinfectie van schoeisel, verzamel materiaal en containers <sup>g</sup>	N.v.t
<i>QAC 128®</i>	DDAC	snelwerkend <sup>g</sup> actief bij lage concentraties <sup>g</sup>	activiteit wordt beïnvloed door de waterhardheid <sup>a</sup> mag niet gebruikt worden om materiaal te desinfecteren <sup>a</sup> schadelijk voor aquatische organismen <sup>b</sup>	desinfectie van schoeisel, verzamel materiaal en containers <sup>g</sup>	N.v.t
<i>Trigene®</i>	BAC, DDAC, PHMB hydrochloride	snelwerkend <sup>g</sup> actief bij lage concentraties <sup>g</sup>	activiteit wordt beïnvloed door de waterhardheid <sup>a</sup> mag niet gebruikt worden om materiaal te desinfecteren <sup>a</sup> schadelijk voor aquatische organismen <sup>b</sup>	desinfectie van schoeisel, verzamel materiaal en containers <sup>g</sup>	N.v.t
<i>Pro-San®</i>	BAC	snelwerkend <sup>g</sup> actief bij lage concentraties <sup>g</sup>	activiteit wordt beïnvloed door de waterhardheid <sup>a</sup> mag niet gebruikt worden om materiaal te desinfecteren <sup>a</sup> schadelijk voor aquatische organismen <sup>b</sup>	desinfectie van schoeisel, verzamel materiaal en containers <sup>g</sup>	N.v.t
<i>Natriumchloride</i>	NaCl	beschikbaar <sup>g</sup> goedkoop	effectieve concentratie veroorzaakt schade aan de uitrusting <sup>g</sup>	bruikbaar voor de desinfectie van schoeisel?	N.v.t

**Tabel 7. Voor- en nadelen van desinfectantia, het gebruik en classificatie volgens de FOD Volksgezondheid, veiligheid van de voedselketen en leefmilieu België.** QAC: Quaternaire ammonium componenten, DDAC: didecyl dimethyl ammonium chloride, PHMB: polyhexamethyleenbiguanide, BAC: benzalkonium chloride. Referenties: <sup>a</sup>Centre for disease Control (CDC), <sup>b</sup>Toxnet database, <sup>c</sup>Schmidt e.a., 2009, <sup>d</sup>Hangartner & Laurila, 2012, <sup>e</sup>Hadfield & Whitaker, 2005, <sup>f</sup>Phillott e.a., 2010, <sup>g</sup>Johnson e.a., 2003, <sup>h</sup>Russell & Day, 1993, <sup>i</sup>Pubchem database, <sup>j</sup>Biocide database, <sup>k</sup>Webb e.a., 2007.

**Geheugenkaart** OIZ bij amfibieën

<b>Naam OIZ</b>	<b>ranavirose</b>	<b>chytridiomycose</b>
<i>pathogeen</i>	<i>Ranavirus</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>
<i>1<sup>e</sup> maal gedetecteerd</i>	rond 1980	rond 1990
<i>verspreiding</i>	wereldwijd, behalve Antarctica	wereldwijd, behalve Antarctica
<i>mogelijke oorsprong</i>	ongekend	ter discussie
<i>gastheer bij amfibieën</i>	Anura, Urodela	Anura, Urodela, wormsalamanders
<i>gevoelige levensfase</i>	alle levensstadia (ook eieren)	soortafhankelijk: kikkervisje, postmetamorf of adult
<i>gastheer doel</i>	organen, huid	huid
<i>klinische symptomen</i>	ulceraties, bloedingen, dood	vervellen van de huid, roodheid van de huid, apathie, dood
<i>voorkeursplaatsen</i>	poten, ventrale lichaamszijde, voeten	Anura: bekken; Urodela : ventrale lichaamszijde en staart
<i>histopathologie</i>	ulceratie, erosie, epidermale hyperplasie	Epidermale hyperplasie, hyperkeratose, intracellulaire thalli
<i>infectiestadium</i>	virion (viruspartikel)	motiele zoospore
<i>optimale temperatuur</i>	12-32 graden	17-25 graden
<i>dodelijke temperatuur</i>	40 graden en hoger	30 graden en hoger
<i>reservoir bij gewervelde dieren</i>	amfibieën, vissen, reptielen	amfibieën
<i>reservoir in de omgeving</i>	bodem, water	Bodem, water, vogelveren-pootschubben*
<i>vector</i>	amfibieën, vissen, reptielen	amfibieën, rivierkreeften, waterwild
<i>zoonose</i>	nee	nee
<i>OIE status</i>	opgelijst	opgelijst

**Figuur 2. Geheugenkaart van opkomende infectieziekten (OIZ) die een (potentieel) gevaar vormen voor de Europese amfibieën.** Overzicht van de belangrijkste kenmerken en de opvallendste verschillen tussen ranavirose en chytridiomycose. Urodela: salamanders en watersalamanders; Anura: kikkers en padden; OIE: Wereldorganisatie voor diergezondheid; (\*) overleving en voortplanting aangetoond onder laboratoriumomstandigheden.

<b>1. Controle internationale verspreiding van OIZ</b>	<p><i>Bsal</i> moet verklaard worden als een aangifteplichtige ziekte in België (FAVV)</p> <p>Screening van hobbykweek amfibieën voor OIZ</p> <p>Verplicht testen voor OIZ alvorens verzending van amfibieën</p> <p>Als screening niet mogelijk is, dan moet er een (tijdelijk) verbod van handel ingevoerd worden</p>
<b>2. Vroege detectie om verspreiding van OIZ in België te vermijden</b>	<p>Implementeer een monitoringssysteem voor OIZ binnen de dierenhandel</p> <p>Implementeer een vroeg waarschuwingssysteem voor OIZ binnen de dierenhandel en in het wild</p> <p>Implementeer een monitoringsprogramma voor populaties in risicozones</p> <p>Implementeer systematisch surveillance van ziektes in risicozones door het gebruik van sentinels</p> <p>Collecteer data over distributiepatronen en populatiegroottes van risicopopulaties</p> <p>Ontwikkel een noodactieplan, indien OIZ zouden opduiken in risicopopulaties</p>
<b>3. Reductie van de verspreiding van OIZ binnen België</b>	<p>Implementeer bioveiligheidsprocedures gedurende het onderzoek van amfibieën/aquatische organismen</p> <p>Implementeer strenge bioveiligheidsprocedures gedurende conservatie-acties</p> <p>Implementeer strenge bioveiligheidsprocedures voor dieren in gevangenscahp</p>
<b>4. Onzekerheden aanpakken</b>	<p>Ondersteun onderzoek over de biologie, epidemiologie en bestrijdingsmaatregelen van OIZ</p> <p>Ondersteun onderzoek over conservatiebiologie van salamanders en watersalamanders</p>

**Figuur 3. Samenvatting van de aanbevolen acties bij een OIZ uitbraak** (aangepast van COE, 2015).