



Beleidsondersteunend onderzoek: risico-analyse van chytridiomycose in Vlaanderen



Opdrachtgever: Agentschap voor Natuur en Bos, Muriel Vervaeke

Opdrachttuitvoerder: Universiteit Gent, Wouter Beukema, Mark Blooi, Elin Verbrugghe, Alex Laking, Frank Pasmans, An Martel

Projectduur: 02/2015-02/2018

Achtergrond

ANB startte in februari 2015 een onderzoeksproject op aan de Universiteit Gent voor een actieve bewaking en een risicoanalyse van de ziekte chytridiomycose in Vlaanderen. Deze ziekte is beperkt tot amfibieën, en wordt veroorzaakt door de schimmels *Batrachochytrium dendrobatidis* (treft kikkers, padden en salamanders) of *B. salamandrivorans* (treft enkel salamanders, maar kan ook aanwezig zijn op kikkers en padden). Het algemene doel van dit project is inzicht verkrijgen in de impact van chytridiomycose op de biodiversiteit van inheemse amfibieën en om, indien nodig, gepaste maatregelen uit te werken.

De onderzoeksvragen van dit project zijn:

1. Wat is de prevalentie in Vlaanderen:
 - van *B. dendrobatidis* infecties en ziekte bij gevoelige amfibieën;
 - van *B. salamandrivorans* infecties en ziekte bij gevoelige amfibieën;
2. Wat is de populatiedynamiek van amfibieën die als zeer gevoelig voor infectie met één van beide schimmels worden beschouwd;
3. Wat is de virulentie van de in de Vlaanderen voorkomende *B. dendrobatidis* en *B. salamandrivorans* stammen? Dit zal toelaten om in te schatten wat het risico is van de aanwezigheid van een bepaalde stam in een amfibieënpopulatie;
4. Literatuuroverzicht: voorkomen wereldwijd, plan van aanpak preventie- en controlebeheer(kosten/baten) voor *B. dendrobatidis*, *B. salamandrivorans* en van *Ranavirus* infecties;
5. Op basis van de verzamelde gegevens een advies formuleren omtrent gepaste preventie- en controlematregelen voor chytridiomycose en ranavirose in Vlaanderen.

In dit verslag worden de resultaten beschreven die werden verkregen in de periode 01/02/2015-31/01/2018.

Werkpakket 1: Prevalentie en populatiedynamiek van infecties met *B. dendrobatidis* en *B. salamandrivorans* bij vuursalamanders (*Salamandra salamandra*) en vroedmeesterpadden (*Alytes obstetricans*)

Doel

Het doel van dit werkpakket is tweeledig:

1. Het nagaan van de prevalentie van infecties met *B. dendrobatidis* en *B. salamandrivorans* bij in Vlaanderen voorkomende sentinelamfibieën (respectievelijk vroedmeesterpadden en vuursalamanders);
2. het bepalen van de populatiedynamiek van amfibieën die als zeer gevoelig voor infectie met één van beide schimmels worden beschouwd.

Methode

➤ **Monitoring van vuursalamander- en vroedmeesterpadpopulaties**

Om na te gaan in hoeverre *B. dendrobatidis* en *B. salamandrivorans* in Vlaanderen aanwezig zijn binnen populaties van de vuursalamander en vroedmeesterpad zijn, zoals bepaald in de technische bepalingen van de overeenkomst, respectievelijk 10 en 5 lokaliteiten waar deze soorten voorkomen bezocht (Figuur 1). Deze populaties zijn geselecteerd op basis van geografische spreiding, met hulp van Jeroen Speybroeck (INBO, wetenschappelijk ondersteuner van de Vlaamse amfibieënmeetnetten voor (i.o.v. ANB) opdrachthouder INBO) en Iwan Lewylle (coördinator monitoring amfibieën voor Natuurpunt).

Voor de vuursalamanders werden de monitoringsroutes binnen bosfragmenten waar vuursalamanders voorkomen al voor de start van dit project opgesteld door Jeroen Speybroeck (INBO) in het kader van het Vlaamse vuursalamandermeetnet (zie www.meetnetten.be). Om de resultaten van de huidige sampling vergelijkbaar te maken met die van het monitoringsnetwerk zijn voor zover mogelijk langs deze routes Vuursalamanders geteld, en huidswabs afgenomen. De routes werden vooraf opgesteld in Google Earth en geëxporteerd naar een GPS (Garmin GPSmap 60CSx) die in het veld als leidraad functioneerde om het traject te kunnen volgen. In enkele gevallen (Kluisbos) werd gedeeltelijk van deze route afgeweken aangezien de vegetatie het niet toeliet om de geplande lijn te volgen, of omdat na het vervolledigen van de route nog niet genoeg huidswabs verzameld waren ('t Burreken, Smetledebos). In 2015 en 2016 werden conform met het vuursalamandermeetnet twee bezoeken in het najaar gedaan, waarin tijdens het eerste bezoek van een 30-tal dieren huidswabs af werden genomen, en tijdens beide bezoeken het aantal aanwezige dieren geteld werden. In 2017 werden de populaties een enkele keer bezocht. Deze bezoeken vonden steeds na zonsondergang tijdens regen of bij hoge luchtvochtigheid plaats, waarbij met een zaklamp naar actieve vuursalamanders werd gezocht binnen een afstand van twee meter aan beide kanten van het traject, conform met het meetnetprotocol (De Bruyn et al., 2015).

Vroedmeesterpaddenpopulaties werden steeds overdag bezocht, met uitzondering van Neerijse in 2015, dat 's nachts bezocht werd. Zoals vooraf vastgesteld, werden de geselecteerde populaties van de vroedmeesterpad een enkele keer bezocht, waarin aantallen larven in voortplantingswaters geteld werden. Deze larven werden gevangen met behulp van een groot net (55 x 70 cm groot en 60 cm diep, met een steel van 2 meter) waarmee op iedere lokaliteit het voortplantingswater in een enkele keer of na een beperkt aantal scheppen volledig bemonsterd kon worden. Alle larven werden vervolgens in een bak verzameld, geteld, en van 30 dieren werden mondsdabs afgenomen. Deze tellingen geven een representatieve schets van de populatiegrootte aangezien voortplantingswaters in vier van de vijf lokaliteiten beperkt zijn tot een enkel of twee nabijgelegen wateren, die volledig met een net bemonsterd kunnen worden (Rijkkel, Groot-Loon, Neerijse, Sint-Genesius-Rode). In Neerijse werd een poeltje van 1 x 2 m bemonsterd, de enige plek in de groeve waar vroedmeesterpad gevonden werd. In

de overige poelen was *Pelophylax cf bedriagae* in grote aantallen aanwezig. In 's Gravensvoeren werden twee aan elkaar grenzende wateren bemonsterd.

Materialen die gebruikt werden tijdens de monitoring of het afnemen van huidswabs (netten, laarzen, eventuele aquaria/verzamelbakken voor larven) werden steeds na een bezoek besproeid met Virkon S, om verspreiding van een eventuele besmetting te voorkomen. Naderhand werden deze materialen gedroogd, alvorens ze opnieuw te gebruiken.

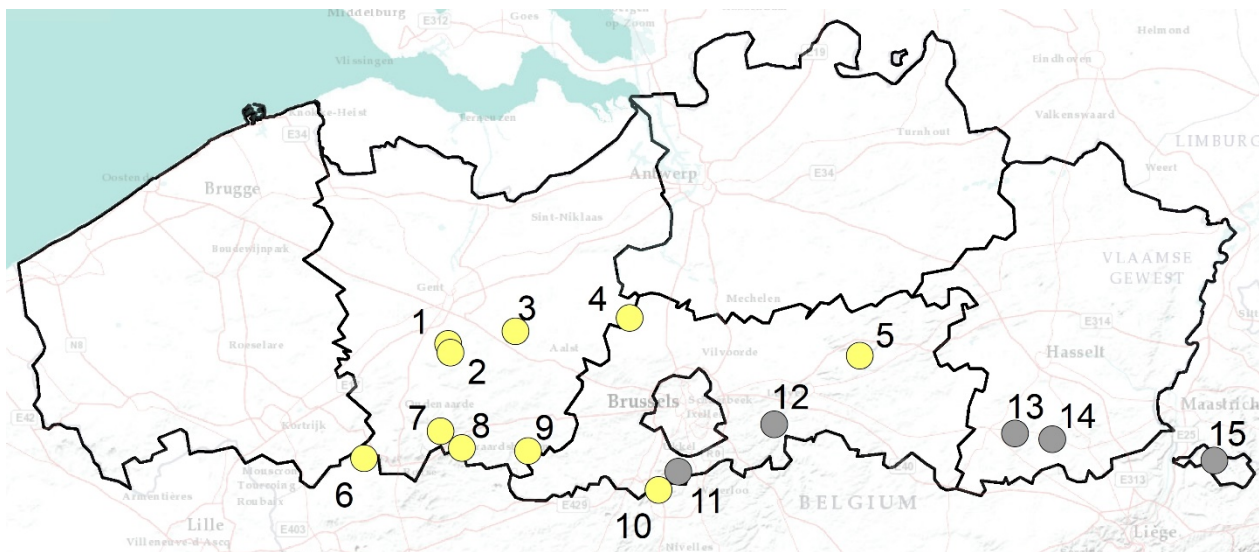
➤ **Afnemen van huidswabs**

De aanwezigheid van *B. dendrobatidis* op kikkerlarven concentreert zich op de monddelen, waar de schimmel zich hecht aan de uit keratine bestaande tandrijen. In gemetamorfoseerde kikkers, padden en salamanders is *B. dendrobatidis* aanwezig op de huid. Om deze schimmel aan te tonen werden er 'swabs' verzameld, bestaande uit een steriele wattenstaaf waarmee over de monddelen of huid van de bemonsterde amfibieën werd gestreken. Het afnemen van huidswabs gebeurde steeds volgens eerder vastgestelde protocollen (e.g. Spear et al., 2004; Brem et al., 2007; Spitzen-van der Sluijs et al., 2010). Alle aangetroffen dieren werden gehanteerd met poedervrije vinylhandschoenen, die er voor zorgen dat de eventuele besmetting niet verspreid wordt tussen verschillende individuen.

Larven van de vroedmeesterpad werden eerst verzameld in een klein aquarium zodat het totaal aantal geteld kon worden, waarna deze stuk voor stuk geswabt en teruggezet werden in het water van herkomst. Het uiteinde van de wattenstaaf werd voorzichtig tegen de monddelen aangedrukt, en enkele keren rondgedraaid. Indien de larven zeer klein waren (bv. Rijkel 2015) werden de dieren niet bemonsterd aangezien de monddelen van jonge larven zeer kwetsbaar zijn. Juveniele en adulte vroedmeesterpadden en vuursalamanders werden steeds in de hand met de onderzijde naar boven gehouden, waarna enkele keren over de buik, onderzijde van de poten en keel werd gewreven met de swab. In alle gevallen werd de soort en herkomst vermeld op de swab. De verzamelde swabs werden na afname koel bewaard, en opgeslagen in een diepvries indien deze niet onmiddellijk geanalyseerd werden.

➤ **Analyse van aanwezigheid *B. dendrobatidis* en *B. salamandrivora*s**

DNA werd uit de swabs geëxtraheerd met behulp van PrepMan Ultra. Vervolgens werd een *B. dendrobatidis* en *B. salamandrivora*s specifieke duplex qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) toegepast om mogelijk aanwezig DNA van deze schimmels te detecteren en te kwantificeren (Blooi et al., 2013). Deze techniek maakt het mogelijk specifieke organismen of ziekteverwekkers op te sporen door DNA te detecteren dat een hoge mate van variabiliteit vertoont. In een reeks van verhittings- en afkoelingscycli werden de twee strengen van al het aanwezige DNA gescheiden, en de target in het DNA opgezocht. Indien deze target zich ergens in het DNA bevindt, wijzend op aanwezigheid van *B. dendrobatidis* of *B. salamandrivora*s, wordt dit specifieke deel van het DNA vermeerderd. Door het koppelen van een fluorescente marker aan de te vermeerderen DNA targets zal bij elke vermeerderingsstap een toenemend fluorescent signaal meetbaar zijn. De mate van fluorescentie correleert daarom met de hoeveelheid aanwezig DNA.



Figuur 1: Overzicht van de bemonsterde vuursalamander- (geel) en vroedmeesterpad- (grijs) populaties.

Legende: 1: Nerenbos (Luisdonk); 2: Heilig Geestgoed; 3: Smetledebos; 4: Buggenhoutbos; 5: Kasteel van Horst; 6: Kluisbos; 7: 't Burreken; 8: Hayesbos; 9: Raspaillebos; 10: Hallerbos; 11: Sint-Genesius-Rode; 12: Neerijse; 13: Rijkel; 14: Groot-Loon; 15: 's-Gravenvoeren.

Resultaten

Het aantal getelde individuen en genomen swabs zijn per locatie weergegeven in Tabel 1 (vuursalamanders) en 2 (vroedmeesterpadden).

Het streefdoel, om binnen elke populatie 30 huidswabs af te nemen, is geslaagd voor alle vuursalamanderpopulaties in 2015, 2016 en 2017.

In 2015, werden 30 swabs verzameld bij vroedmeesterpadden in Groot-Loon en 's Gravenvoeren. Door de weinig aangetroffen of te kleine larven werden in Neerijse en Rijkel minder dan 30 swabs verzameld. In Sint-Genesius-Rode werden geen larven of adulte dieren waargenomen. In 2016 werden 30 swabs verzameld in Neerijse. Door het beperkt aantal aangetroffen dieren in Groot-Loon en 's Gravenvoeren werden hier minder dan 30 swabs verzameld. In 2016 werden geen larven of adulte dieren waargenomen in Sint-Genesius-Rode en Rijkel. In 2017 werden in de 5 vroedmeesterpadpopulaties zeer weinig larven gevonden. Hierdoor konden er geen 30 swabs per populatie genomen worden.

*Tabel 1: Resultaten van de vuursalamandermonitoring.
Het aantal geobserveerde individuen en verzamelde huidswabs wordt weergegeven per jaar.*

Lokaleiteit	2015	Aantal Individuen (swabs) 2015	2016	Aantal Individuen (swabs) 2016	2017	Aantal Individuen (swabs) 2017
Nerenbos	22/09/2015	139 (30)	29/09/2016	325 (30)	10/10/2017	33 (30)
	16/10/2015	157	18/10/2016	152		
Heilig Geestgoed	22/09/2015	58 (30)	29/09/2016	64 (30)	9/10/2017	37 (30)
	21/10/2015	104	14/10/2016	102		
Kasteel van Horst	5/10/2015	170 (30)	29/09/2016	219 (30)	9/10/2017	52 (30)
	7/10/2015	61	18/10/2016	155		
Smetledebos	7/10/2015	63 (30)	17/11/2016	4 (4)	22/10/2017	15 (15)
	22/10/2015	14	20/10/2016	15 (15)	24/10/2017	15 (15)
Kluisbos	16/10/2015	32 (30)	16/09/2016	47 (30)	2/10/2017	52 (30)
	22/10/2015	9	14/10/2016	49		
Hallerbos	16/10/2015	0	18/10/2016	32 (30)		33 (30)
	21/10/2015	30 (30)	25/10/2016	5		
Buggenhoutbos	7/10/2015	50 (30)	25/09/2016	138 (30)	2/10/2017	136 (30)
	21/10/2015	105	21/11/2016	28		
Raspaillebos	5/10/2015	45 (30)	15/09/2016	46 (30)		(30)
	16/10/2015	18	25/09/2016	38		
Haeyesbos	31/05/2015	114 (30)	1/10/2016	64 (30)	10/10/2017	48 (30)
	16/10/2015	91	1/10/2016	64		
't Burreken	7/10/2015	68 (30)	12/10/2016	102 (30)	24/10/2017	16 (16)
	6/11/2015	40	21/11/2016	14	22/10/2017	14 (14)

*Tabel 2: Resultaten van de vroedmeesterpadmonitoring.
Het aantal geobserveerde individuen en verzamelde swabs wordt weergegeven per jaar.
Alle individuen zijn larven met uitzondering van *(metamorfen en adulten).*

Lokaleiteit	2015	Aantal Individuen (swabs) 2015	2016	Aantal Individuen (swabs) 2016	2017	Aantal Individuen (swabs) 2017
Neerijse	5/6/2015	10* (10)	29/9/2016	30 (30)	15/08/2017	7 (7)
	22/6/2015					
Kerkhof Rijkkel	10/8/2015	31 (18)**	15/07/2016	0 (0)	15/08/2017	12 (12)
Kerkhof Groot-Loon	10/8/2015	84 (30)	15/07/2016	24 (24)	15/08/2017	0 (0)
's Gravensvoeren	10/8/2015	50 (30)	7/07/2016	24 (24)	20/07/2017	4 (4)
Sint-Genesius-Rode	2/10/2015	0 (0)	29/09/2016	0 (0)	15/08/2017	0 (0)

*** Omdat de larven zeer klein waren werden er slechts van 18 van de gevangen larven geswabd.*

Binnen de bezochte vuursalamanderpopulaties werd *B. dendrobatidis* enkel aangetroffen in het voorjaar van 2015 op één individu in het Heilig Geestgoed in Munte (Merelbeke). Tijdens vervolgbezoeken in het najaar van 2015 en in 2016 en 2017 werden geen *B. dendrobatidis* positieve dieren meer aangetroffen, waardoor we kunnen concluderen dat de prevalentie van deze schimmel bij vuursalamanders in het Heilig Geestgoed bijzonder laag is. *B. salamandrivorans* werd tijdens de duur van dit project niet aangetroffen binnen de bezochte populaties.

In 2015 werd *B. dendrobatidis* aangetroffen binnen twee van de bezochte populaties vroedmeesterpadden. In Neerijse werden vier van de tien bemonsterde individuen (twee recent gemetamorfoseerde juvenielen en twee adulte dieren) positief bevonden, wat mogelijk kan duiden op een relatief hoge prevalentie. Nabij 's Gravensvoeren werden larven in een waterbak (8 larven) en een direct daarnaast gelegen ondiepe poel (22 larven) gevangen. Van de larven uit de waterbak werden de mondswabs van vier individuen positief bevonden voor *B. dendrobatidis*. Het is gekend dat *B. dendrobatidis* wijdverspreid is in aangrenzend Nederlands Limburg (Spitzen-van der Sluijs et al. 2014), waardoor de aanwezigheid van deze schimmel in de Voerstreek niet onverwacht is.

In 2016 werd *B. dendrobatidis* ook aangetroffen binnen twee populaties vroedmeesterpadden. Nabij 's Gravensvoeren werden 23 van de 24 bemonsterde larven positief bevonden voor deze schimmel, terwijl in Groot-Loon een van de 23 aangetroffen larven besmet was met *B. dendrobatidis*. In 2015 werd deze schimmel ook bij vroedmeesterpadden in 's Gravensvoeren aangetroffen, maar niet in Groot-Loon.

In 2017 werd *B. dendrobatidis* niet aangetroffen in de bemonsterde vroedmeesterpadlarven.

De vuursalamanders en larven, juvenielen en adulte vroedmeesterpadden die in 2015 en 2016 positief werden bevonden voor *B. dendrobatidis* vertoonden geen kenmerken van chytridiomycose en vertoonden geen klinische afwijkingen.

De populatiegrootte van de bezochte vuursalamander- en vroedmeesterpopulaties is geschat door eenmalig overdag larvenaantallen te tellen (vroedmeesterpad) en door actieve vuursalamanders te tellen tijdens regenachtige nachten (aantallen dieren zie Tabel 1 en 2). Aangezien de activiteit van vuursalamanders zeer weers- en seizoensafhankelijk is, zijn de telresultaten slechts indicatief voor de populatiegrootte.

De geobserveerde aantallen vuursalamanders in 2015 en 2016 laten vermoeden dat relatief hoge aantallen vuursalamanders voorkomen op nagenoeg alle bezochte locaties in Oost-Vlaanderen (Nerenbos, Heilig Geestgoed, Smetledebos, Buggenhoutbos, Haeyesbos, 't Burreken). Minder hoge aantallen werden waargenomen op de drie overige Oost-Vlaamse lokaliteiten (Kluisbos, Hallerbos, Raspaillebos). De enige bezochte populatie in Vlaams-Brabant nabij het Kasteel van Horst herbergt ook een abundante populatie vuursalamanders.

De geobserveerde aantallen vuursalamanders in 2017 zijn in het geval van Nerenbos, Heilig Geestgoed en Kasteel van Horst duidelijk lager dan in 2015 en 2016. Een gebrek aan regenval gedurende de gehele telperiode (september-oktober) ligt hieraan vermoedelijk ten grondslag; logistiek was het in 2017 niet mogelijk om alle vuursalamanderpopulaties te bezoeken onder ideale klimatologische omstandigheden. Het voorgaande is ook de reden dat het Burreken en Smetledebos twee maal bezocht werden, aangezien tijdens het eerste bezoek minder dan 30 dieren waargenomen werden. De aantallen vuursalamanders die in de overige populaties geteld werden, zijn in lijn met die van 2015 en 2016. Opmerkelijk is dat in het Raspaillebos relatief veel dieren geobserveerd werden. Het relatief lage aantal dieren in het Haeyesbos is opnieuw te wijten aan relatief suboptimale omstandigheden tijdens de telling. De waargenomen verschillen hoeven dus geenszins trends in populatiegrootte aan te geven.

Tijdens het project werd in de gemeente Duffel op 7 mei 2015 bij twee alpenwatersalamanders die dood in een fuik lag, een qPCR resultaat indicatief voor *B. salamandrivorans* infectie waargenomen. Het signaal van de test was “borderline” positief, wat betekent dat een waarde bekomen werd rond de detectielimiet (18 en 155 GE werden waargenomen, drempelwaarde voor detectie is 200 GE). Uit voorzorg werd dit als positief gerapporteerd. Er kon geen histopathologische bevestiging bekomen worden omwille van postmortaal verval. Deze lokatie werd bezocht en 43 stalen onderzocht (kleine watersalamander (9) en alpenwatersalamander (28) en kamsalamander ((6)). Al deze stalen waren negatief. Recente informatie (Thomas et al., 2018) toont aan dat vals positieve signalen kunnen voor komen bij dode dieren die postmortaal vervallen zijn. Er werden geen verdere meldingen gemaakt van dode dieren. We besluiten dat de zeer beperkte sterfte in Duffel zeer waarschijnlijk niet het gevolg was van een *B. salamandrivorans* infectie.

Als proxy van de populatiegrootte van vroedmeesterpaddenpopulaties werden larvenaantallen gebruikt. In Neerijse werden in 2015 enkel adulte dieren en recent gemetamorfoseerde dieren aangetroffen, wat mogelijk een resultaat kan zijn van de zeer vroeg plaatsgenomen monitoring (begin juni). Hoge aantallen larven werden waargenomen in verschillende waterbakken rond de kerk en op het kerkhof van Groot-Loon, en in een waterbak en poel nabij 's Gravensvoeren. Op beide lokaliteiten is de populatiegrootte, in vergelijking met enkele jaren terug, aan het toenemen dankzij gerichte beheersmaatregelen (Iwan Lewylle *pers. comm.*). In Rijkkel bestaat de voortplantingshabitat uit een enkele kleine waterbak op het kerkhof, waardoor de populatiegrootte hoogstwaarschijnlijk beperkt blijft. In de Kwadebeekvallei in Sint-Genesius-Rode heeft de populatie van de vroedmeesterpad een sterke daling doorgemaakt – het is niet duidelijk of recent uitgevoerde beheersmaatregelen herstel van de lokale populatie kunnen verzekeren (Iwan Lewylle *pers. comm.*). Er werden geen larven of adulte dieren van de vroedmeesterpad waargenomen in Sint-Genesius-Rode.

In 2016 werden in zandgroeve De Cock in Neerijse alle poelen geruimd in het kader van specifieke beheersmaatregelen voor het voortbestaan van de vroedmeesterpad. In een van deze poelen werd op 29/09/2016 een groot aantal larven aangetroffen, wat aangeeft dat de maatregelen succesvol zijn geweest. In vergelijking met 2015 werden minder larven waargenomen in verschillende waterbakken rond de kerk en het kerkhof van Groot-Loon, waar larven van uitheemse meerkikkers (*Pelophylax ridibundus*/ cf. *bedriagae*) zeer algemeen waren en mogelijk concurreren met die van de vroedmeesterpad. Terwijl er in 2015 toch 31 larven aangetroffen werden in Rijkkel, lijkt voortplanting dit jaar niet succesvol geweest te zijn. Tijdens onze bemonstering kwamen we in plaats van vroedmeesterpadlarven twee volwassen kamsalamanders en twee grote (totale lengte meer dan 5 cm) larven van deze laatste soort tegen; mogelijk hebben deze dieren eieren en larven van de vroedmeesterpad gepredeerd. Hoewel het aantal geobserveerde vroedmeesterpadlarven in de Voerstreek de helft is van dat van 2015, kan dit relatief lage aantal aan normale populatieschommelingen toebedeeld worden. In Sint-Genesius-Rode werden opnieuw geen vroedmeesterpadden aangetroffen.

In 2017 werden in Neerijse slechts een laag aantal vroedmeesterpadlarven gevonden. Dit duidt hoogstwaarschijnlijk niet op afname van de populatiegrootte; na de beheersmaatregelen is de vegetatie in de groeve sterk toegenomen, waardoor alle aanwezige poelen moeilijk te bemonsteren zijn. In 2017 werden in Rijkkel 12 grote larven aangetroffen. Ook was er opnieuw een volwassen kamsalamander (*Triturus cristatus*) aanwezig in de waterbak, alsmede enkele larven van de kleine watersalamander of vinpootsalamander (*Lissotriton* sp.). In 2017 werden geen larven van de vroedmeesterpad waargenomen in de waterbak nabij het kerkhof te Groot-Loon. Grote aantallen larven van uitheemse meerkikkers (*Pelophylax ridibundus*/ cf. *bedriagae*), alsmede juvenielen en adulten van deze soort waren echter wel aanwezig. In Sint-Genesius-Rode werden opnieuw geen vroedmeesterpadden aangetroffen. Hoewel het aantal geobserveerde vroedmeesterpadlarven in de Voerstreek opnieuw relatief laag is, zijn normale populatieschommelingen mogelijk verantwoordelijk. De soort is aanwezig op meerdere lokaties in de Voerstreek, waardoor beperkte voortplanting in een enkele waterbak (zie ook Methode) een beperkt beeld geeft van de trend van de soort in het gebied als geheel.

Conclusies werkpakket 1

- *B. dendrobatidis* werd aangetoond in 3 van de 5 onderzochte, Vlaamse populaties vroedmeesterpadden. De prevalentie varieert hierbij sterk, van 4 tot 96%.
- *B. dendrobatidis* werd aangetoond in één populatie vuursalamanders. De prevalentie is laag.
- De bemonsterde populaties vuursalamanders kunnen beschouwd worden als vrij van *B. salamandrivorans* infectie.
- Op basis van de bekomen veldgegevens en de analyse van de stalen is er momenteel geen aanwijzing voor de drastische afnames van de densiteit van vuursalamanders, zoals die kunnen samengaan met aanwezigheid van *B. salamandrivorans*.
- De gevonden aantallen larven vroedmeesterpadden zijn laag op alle onderzochte lokaties (<100). In de Voerstreek wordt de situatie voor de vroedmeesterpad als relatief gunstig beschouwd (Lewylle, pers. com.). Het zeer beperkt aantal vindplaatsen van de vroedmeesterpad in Vlaanderen en de waargenomen, zeer zwakke reproductie op de overige lokaties suggereren echter een precaire toestand van de vroedmeesterpad. Dit benadrukt het belang van behoudsmaatregelen en systematische opvolging voor deze soort.
- De veldgegevens uit de monitoring in dit project zijn geschikt als referentiepunt voor mogelijke, toekomstige en drastische afnames van de onderzochte populaties door toedoen van de onderzochte infectieziekten. Dit is geen vervanging voor het langdurig opvolgen van populatiedynamiek, waarvoor andere tools zoals meetnetten geschikt zijn.

Werkpakket 2: Diversiteit en virulentie van *B. dendrobatidis* en *B. salamandrivorans* stammen

Doel

Het doel van dit werkpakket is tweeledig:

1. het nagaan van de diversiteit en virulentie van de in de Vlaanderen voorkomende *B. dendrobatidis* en *B. salamandrivorans* stammen;
2. het nagaan in welke mate de inheemse amfibieën gevoelig zijn voor klinische chytridiomycose.

Methode

Het tweede hoofddoel van het project omvat isolatie, en zowel fenotypische als genotypische karakterisatie van tien in Vlaanderen voorkomende *B. dendrobatidis* isolaten.

Om deze stammen te bekomen zijn in 2015 en 2016 amfibieënpopulaties verspreid over Vlaanderen bemonsterd voor aanwezigheid van *B. dendrobatidis* en/of *B. salamandrivorans* (Figuur 2, Tabel 2). Tijdens een eerste verkenningsonderzoek werden tot 30 huidswabs afgenomen (methode zie werkpakket 1) van larven of adulte dieren en getest op aanwezigheid van *B. dendrobatidis* en/of *B. salamandrivorans* DNA met behulp van qPCR (Blooi et al., 2013). Alle stalen waren negatief voor *B. salamandrivorans*. Als na analyse bleek dat *B. dendrobatidis* voorkwam binnen de populatie werden er individuen verzameld tijdens een tweede bezoek.

De geïsoleerde stammen werden fenotypisch (sporeproductie en sporegrootte (Martel et al., 2013) en genotypisch (met behulp van lineage specifieke PCR (Laking et al., 2017) en genoomsequentieanalyse (Farrer et al., 2017)) gekarakteriseerd. Op basis van deze resultaten werden 4 stammen geselecteerd om pas gemetamorfoseerde vroedmeesterpadden te infecteren volgens het protocol beschreven in beschreven in Pasmans et al. (2013). In dit infectie-experiment werd ook de chytridiomycose-uitbraakstam uit Panama JEL 423 meegenomen. Deze stam is verantwoordelijk voor het massale verlies aan diversiteit van amfibieën in Centraal-Amerika. De dieren werden opgevolgd tot 14 weken na infectie (klinisch en met behulp van qPCR om de infectiedynamiek te bepalen). Per stam werden 6 dieren geïnfecteerd.

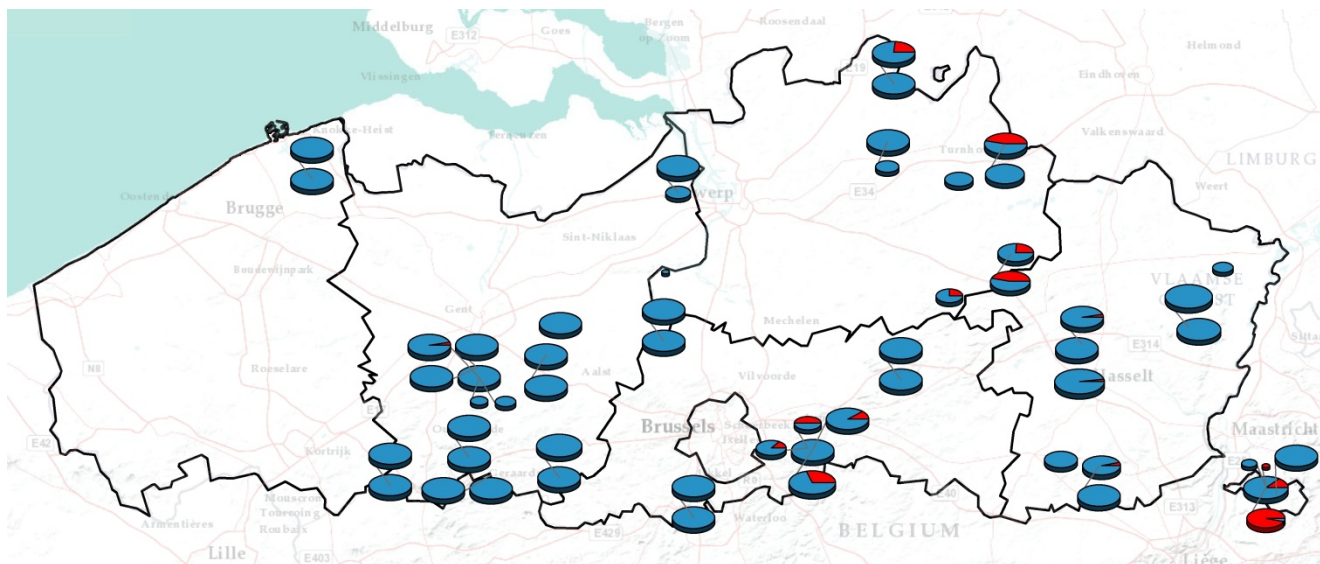
Voor alle infectie-experimenten werd uitsluitend gebruik gemaakt van in gevangenschap gekweekte, gezonde dieren.

Op basis van de resultaten van het infectie-experiment met vroedmeesterpadden werd één Belgisch isolaat (BdBe1, een isolaat dat in hoge mate *A. obstetricans* koloniseert) geselecteerd om 7 inheemse amfibieënsoorten te infecteren: vuursalamander, alpenwatersalamander, kamsalamander, knoflookpad, gewone pad, rugstreeppad en boomkikker. Ook in dit experiment werd de chytridiomycose uitbraakstam JEL 423 meegenomen. Voor elk soort werden per stam 5 dieren geïnfecteerd.

Voor de infectie-experimenten werden de dieren geïnoculeerd met 10^6 sporen/ml aq dest gedurende 24 uur. Alle dieren werden hierna individueel gehuisvest, dagelijks klinisch gecontroleerd en gevoederd met gevitaminiseerde krekels. Wekelijks werden de dieren gewogen en werd een huidswab genomen om de intensiteit van de infectie te bepalen via PCR (zie hoger).

Resultaten

De bemonsterde populaties zijn weergegeven in Figuur 2. Tijdens een vervolfbezoek werden in Zonhoven, Hoogstraten, Hulsen, Neerijse, Duffel, Arendonk, Voeren, Veerle en Olmen individuen verzameld en in het lab getest voor aanwezigheid van *B. dendrobatidis*. Niet-positieve dieren werden binnen 24 uur teruggebracht naar de plaats van herkomst. Er werden 10 Vlaamse isolaten van *B. dendrobatidis* geïsoleerd (Tabel 3).



Figuur 2: Overzicht van het totaal aantal bezochte amfibieënpopulaties die in 2015 en 2016 bemonsterd werden om prevalentie van *Batrachochytrium dendrobatidis* en/of *B. salamandrivorans* na te gaan, en stammen te isoleren.

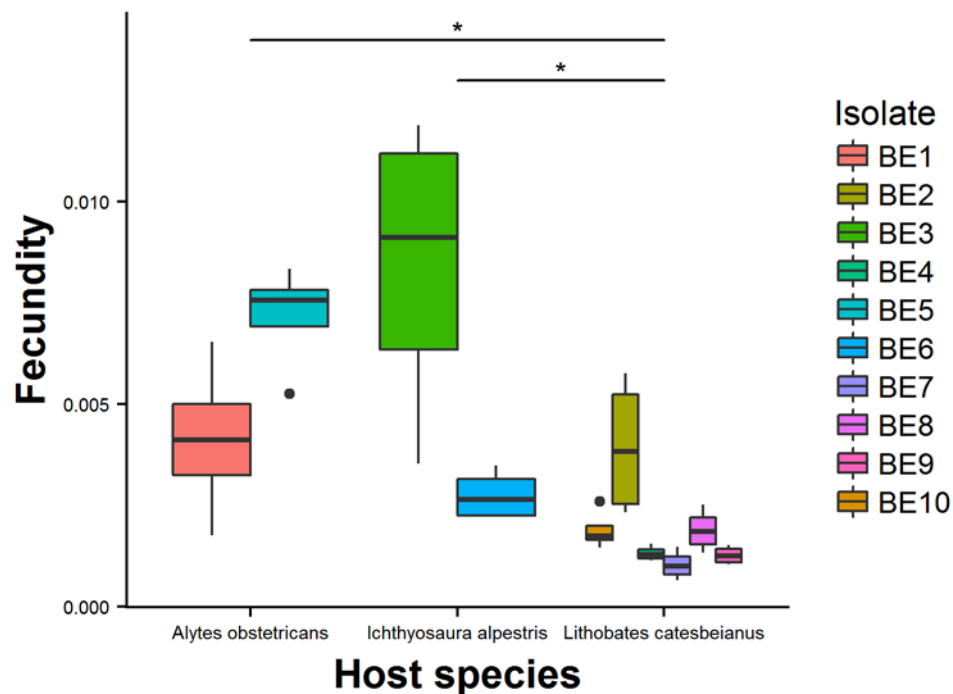
Enkel *B. dendrobatidis* werd aangetroffen.

Legende: De grootte van de blauwe cirkels varieert op basis van het aantal bemonsterde amfibieën. De mate waarin een cirkel rood is, geeft het percentage individuen weer dat besmet werd bevonden met *B. dendrobatidis*. Uit (meta)populaties die met een rode cirkel omringt worden, zijn isolaten van *B. dendrobatidis* bekomen.

Tabel 3: Locatie en coördinaten van amfibieënpopulaties waaruit stammen van *Batrachochytrium dendrobatidis* geïsoleerd werden in 2015 en 2016.

Stam	Soort	jaar	Lokaleiteit	Lat	Long
Bd BE1	<i>Alytes obstetricans</i>	2015	Neerijse	50.82	4.59
Bd BE2	<i>Lithobates catesbeianus</i>	2015	Straalmolen	51.14	5.12
Bd BE3	<i>Ichthyosaura alpestris</i>	2015	Tubeke	50.67	4.2
Bd BE4	<i>Lithobates catesbeianus</i>	2016	Arendonk	51.32	5.1
Bd BE5	<i>Alytes obstetricans</i>	2016	's Gravensvoeren	50.75	5.8
Bd BE6	<i>Ichthyosaura alpestris</i>	2016	's Gravensvoeren	50.75	5.8
Bd BE7	<i>Lithobates catesbeianus</i>	2016	Veerle (Poel 1)	51.07	4.96
Bd BE8	<i>Lithobates catesbeianus</i>	2016	Veerle (Poel 2)	51.07	4.96
Bd BE9	<i>Lithobates catesbeianus</i>	2016	Olmen (Poel 1)	51.14	5.14
Bd BE10	<i>Lithobates catesbeianus</i>	2016	Olmen (Poel 2)	51.14	5.14

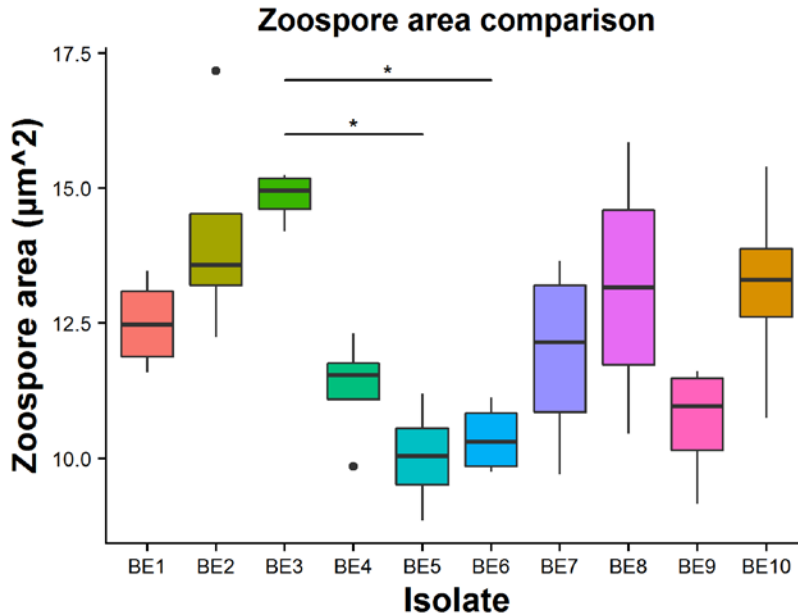
Op basis van de fenotypische kenmerken worden de isolaten in drie categorieën geklasseerd. Figuur 3 geeft een samenvatting van de sporenproductie weer. BdBE 3 en 5 produceren grote aantallen sporen na 5 dagen. Bd BE 1 en 2 produceren een gemiddeld aantal sporen. Bd BE 4, 6, 7, 8 9 en 10 zijn zeer slechte sporenproduceerders *in vitro*.



Figuur 3: Sporenproductie na 5 dagen incubatie van 10 Vlaamse B. dendrobatidis isolaten. De vruchtbaarheid werd berekend zoals beschreven in Fisher et al., 2009.

*Legende: *: statistisch significante verschillen (Kruskal-Wallis) tussen de isolaten ($H=35.497$, $df=10$, $p < 0.001$). Dunn test toonde ook significante verschillen tussen isolaten gegroepeerd per gastheer (L. catesbeianus – A. obstetricans ($p < 0.001$) en L. catesbeianus – I. alpestris ($p < 0.001$)).*

Ook bij de sporengrootte is een grote variatie te zien (Figuur 4).

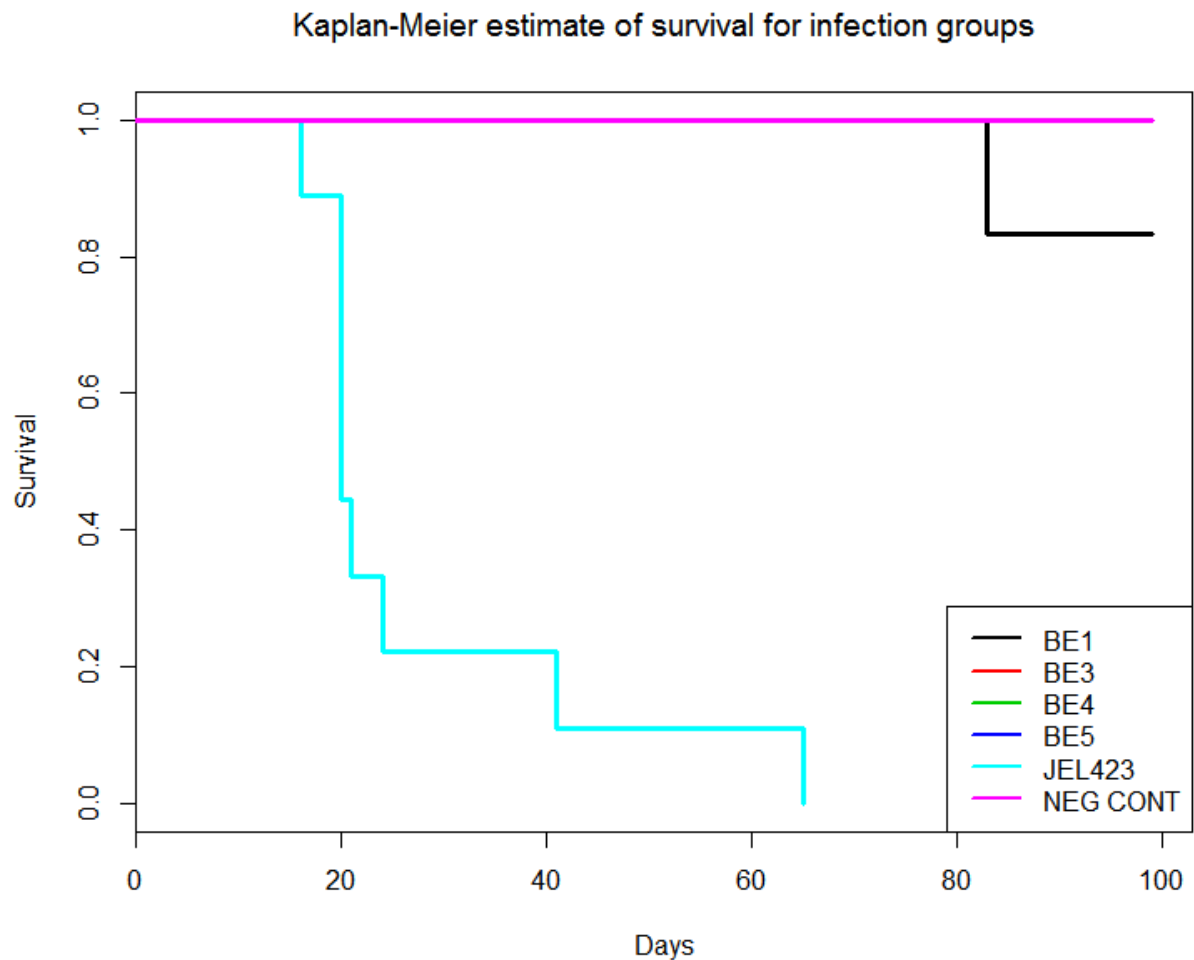


Figuur 4: Gemiddelde sporegrootte en standaardafwijking na 5 dagen incubatie voor de Belgische *B.d.* isolaten.
Legende: Significante verschillen tussen isolaten (p -waarde = <0.05) worden aangeduid door de lijnen en * (Kruskal-Wallis).

De genetische analyse toonde aan dat de 10 geïsoleerde *B. dendrobatidis* isolaten allen behoren tot de Bd-GPL-clade. Dit resultaat is via genoomsequentieanalyse bevestigd (O'Hanlon et al., in press). Sequentie-analyse levert in elk geval op dat de stammen behoren tot drie verschillende subclades binnen GPL. De stierkikkerisolaten (BdBE2, 4, 7, 8, 9 en 10) zijn genetisch zeer sterk verwant. BdBE5 en 6, respectievelijk afkomstig van een vroedmeesterpad en een alpenwatersalamander, geïsoleerd in 's Gravensvoeren zijn genetisch identiek. BdBE1 (afkomstig van een vroedmeesterpad) en BdBE3 (geïsoleerd uit een alpenwatersalamander) zijn nauw verwant.

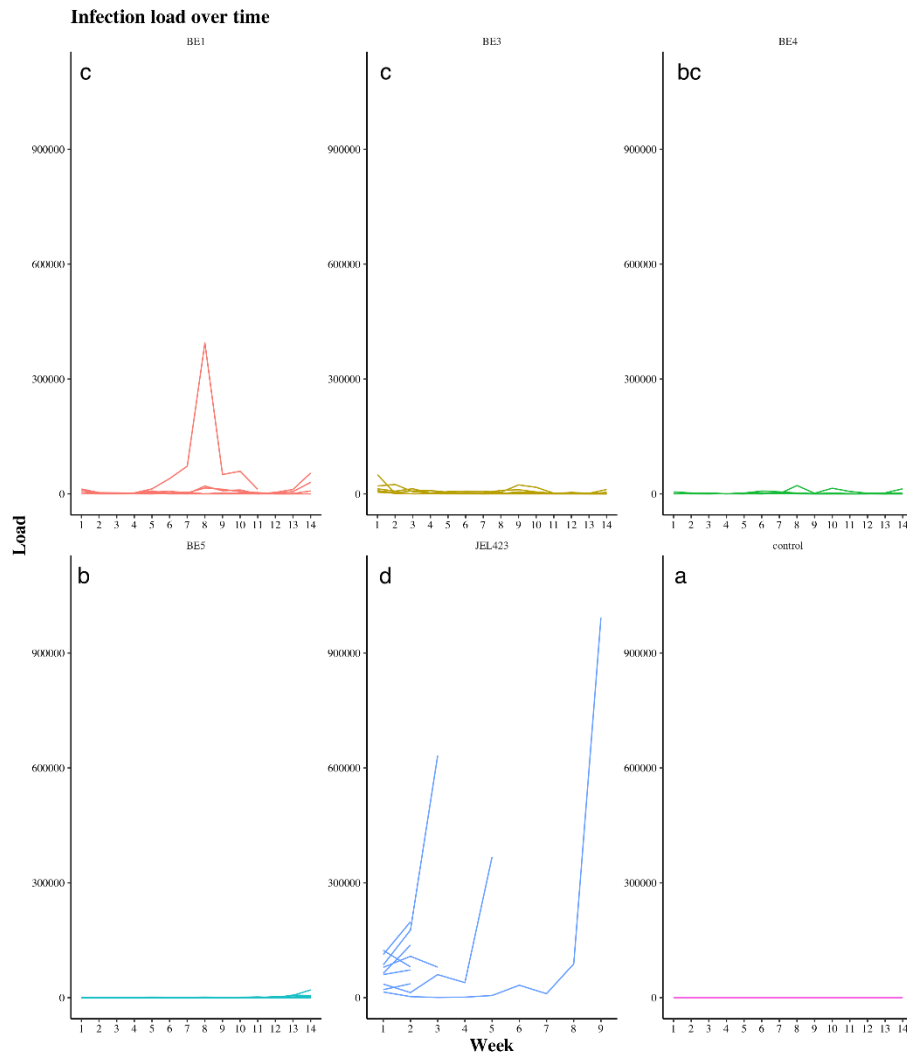
Op basis van deze resultaten werden volgende stammen geselecteerd voor het infectie-experiment met vroedmeesterpadden: Bd BE1, Bd BE3, Bd BE4 en BdBE5. Met deze stammen werd een maximale genetische diversiteit van de Vlaamse *B. dendrobatidis* lijnen in het experiment ingesloten. Bovendien werd ook JEL423 gebruikt.

Het infectie-experiment toonde aan dat de exotische uitbraakstam JEL423 zeer virulent is voor de vroedmeesterpad (Figuur 5). Alle zes dieren die met deze stam geïnfecteerd werden stierven binnen de 63 dagen na contact. De intensiteit van de infectie voor BdBE5 was opmerkelijk lager dan deze bij de andere stammen (Figuur 6). Bij de BdBE1 geïnfecteerde groep is een dier ten gevolge van chytridiomycose overleden op 83 dagen na infectie.



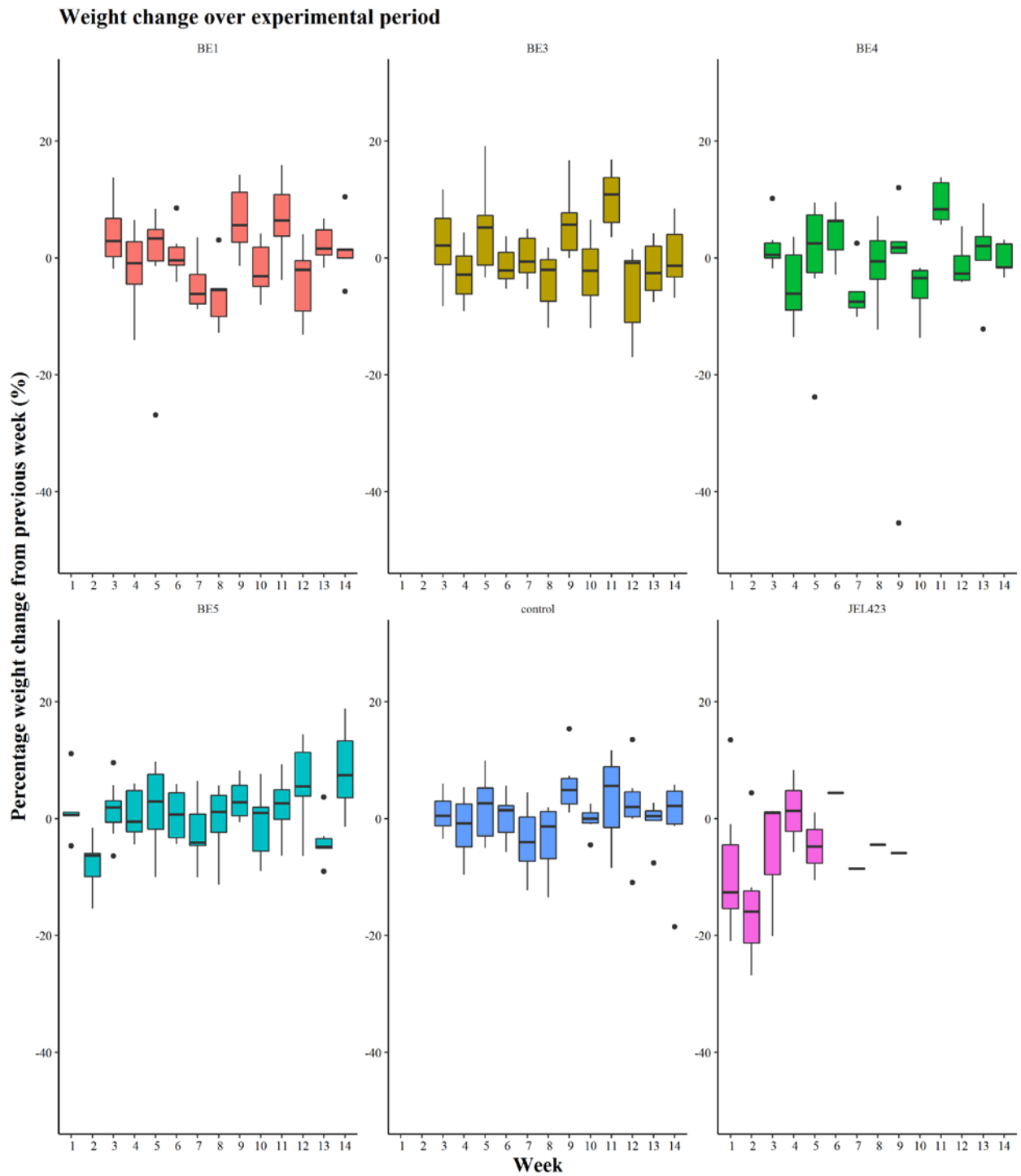
Figuur 5: Overleving van Alytes obstetricans na contact met Belgische B. dendrobatidis isolaten en JEL 423. De niet zichtbare kleuren vallen samen met de negatieve controles (NEG CONT).

De intensiteit van infectie is significant gecorreleerd met de stam (repeated measures ANOVA, F-value_(5,32) = 99.883, p-value = <0.001). De intensiteit van infectie bij de uitbraakstam JEL 423 zijn vanaf week 1 na contact hoger dan deze voor de Belgische isolaten. Onder de Belgische isolaten is er bij isolaat BE5 (afkomstig van een vroedmeesterpad) een zeer trage infectie-intensiteitopbouw .



Figuur 6: Gemiddelde *B. dendrobatidis* intensiteit van infectie en standaardafwijking in *Alytes obstetricans* na contact met Belgische *Bd* isolaten en JEL 423.
Intensiteit wordt weergegeven als het aantal genomische equivalenten (genomische eenheden van het geamplificeerde ITS gen).

De gewichtsverschillen zijn niet significant verschillend voor de verschillende groepen (repeated measures ANOVA, $F(5,38) = 13.9.60$, $p = <0.001$).



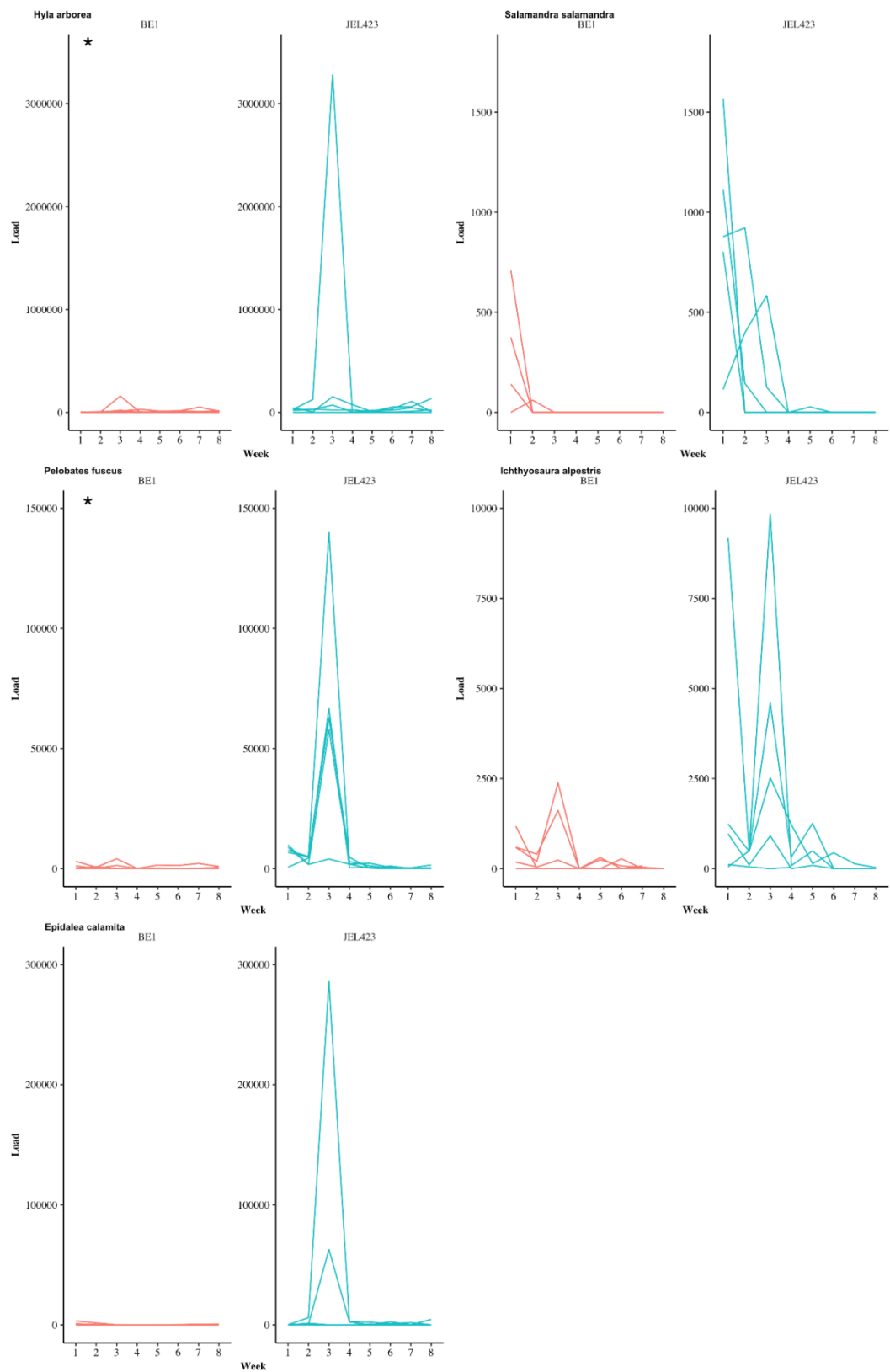
Figuur 7: Percentage gewichtsverandering in *Alytes obstetricans* na contact met Belgische *B. dendrobatidis* isolaten en JEL 423.

Vanaf week 6 na inoculatie vertegenwoordigt de boxplot bij JEL423 slechts de resultaten van één dier.

Uit het vroedmeesterpad *B. dendrobatidis* experiment werd BdBE1 geselecteerd om 7 inheemse amfibieënsoorten te infecteren: vuursalamander, alpenwatersalamander, kamsalamander, knoflookpad, gewone pad, rugstreeppad en boomkikker. Ook in dit experiment werd de chytridiomycose-uitbraakstam JEL 423 meegenomen als referentie voor een hoog virulente uitbraakstam. Per soort werden 5 dieren per stam geïnoculeerd.

Noch BdBE1, noch JEL423 konden de kamsalamanders en de gewone padden infecteren. Vuursalamanders werden met beiden stammen slechts tijdelijk (1 week voor BdBE1 en 3 weken voor JEL423) geïnfecteerd en waren allen in staat om de infectie te clearen. Infectie wordt hier gedefinieerd als een positieve huidswab vanaf 7 dagen na inoculatie. Dit resultaat bevestigt wat in het veld gezien wordt: aanwezigheid van de schimmel op vuursalamanders is schaars en zeer moeilijk (opnieuw) te detecteren.

De intensiteit van infectie met JEL423 is hoger dan deze met het Belgische isolaat Bd BE1 voor alle soorten (uitgezonderd de kamsalamander en gewone padden die niet geïnfecteerd werden na contact met beide stammen) (Figuur 8).



Figuur 8. Verloop van infectieintensiteit van Bd BE1 en JEL423 in verschillende amfibieënsoorten. De intensiteit wordt weergegeven als "load" in genomische equivalenten.

Conclusies werkpakket 2

- De hoge diversiteit in de in Vlaanderen geïsoleerde *B. dendrobatidis* isolaten is zeer onverwacht. De theorie van de “nieuwe pathogeen” dicteert een clonale verwantschap. Dit zou erop kunnen wijzen dat Bd endemisch is in Vlaanderen gedurende lange tijd. Een alternatieve uitleg is dat er meerdere introducties hebben plaatsgevonden.
- De *B. dendrobatidis* isolaten van de stierkikkers behoren tot een duidelijk afgelijnde clade die niet bij de inheemse amfibieën werd teruggevonden. Dit is in tegenspraak met de geldende theorie dat invasieve exoten zoals stierkikkers verantwoordelijk zijn voor de introductie van de huidige *B. dendrobatidis* infecties maar ondersteunt de hypothese in 1.
- In vergelijking met de exotische uitbraakstam JEL423 die als ijkpunt werd toegevoegd, kunnen de Vlaamse *B. dendrobatidis* stammen als laag virulent geklasseerd worden voor de onderzochte amfibiesoorten.
- De vroedmeesterpad is zeer gevoelig voor de exotische uitbraakstam.
- De exotische uitbraakstam kan sterk prolifereren in verschillende inheemse amfibiesoorten: boomkikker, knoflookpad, rugstreeppad en vroedmeesterpad.
- De stammen aanwezig in de invasieve stierkikkers zijn laag virulent voor de inheemse amfibieën.

Werkpakket 3: Literatuuroverzicht en eerste deeladvies

Doel

Het doel van dit werkpakket is tweeledig:

1. opmaak van een literatuuroverzicht van het voorkomen wereldwijd, plan van aanpak preventie- en controlebeheer(kosten/baten) voor *B. dendrobatidis*, *B. salamandrivora* en *Ranavirus* infecties;
2. opmaak van een advies omtrent de gepaste preventie- en controlemaatregelen voor chytridiomycose en ranavirose in Vlaanderen op basis van het literatuuroverzicht en op basis van de resultaten van werkpakketten 1 tot en met 3.

Resultaten

Het literatuuroverzicht werd opgemaakt in het Engels. De Nederlandstalige versie is toegevoegd aan dit verslag als Bijlage.

Advies omtrent de gepaste preventie- en controlemaatregelen op basis van de resultaten van werkpakketten 1 tot en met 3.

Dit onderzoek toont aan dat de epidemiologische toestand voor *B. dendrobatidis* en *B. salamandrivorans* in Vlaanderen momenteel gunstig is. Dit betekent dat er geen aanwijzingen zijn voor enerzijds *B. salamandrivorans* aanwezigheid bij vuursalamanders of anderzijds een duidelijk negatieve impact van *B. dendrobatidis* op vroedmeesterpadden.

De sterke fragmentatie van de populaties van beide soorten op het Vlaams grondgebied zou vanuit ziektestandpunt een voordeel kunnen opleveren, namelijk door reductie van transmissie. Dit werd recent aangetoond voor *B. salamandrivorans* in Nederland (Spitzen et al., in druk), waar vuursalamanders op minder dan 1 kilometer van de uitbraaksite in Bunderbos standhouden in een geïsoleerde subpopulatie. Hoewel er niet kan uitgesloten worden dat de persisterende populatie vuursalamanders in Nederland bestaat uit minder gevoelige dieren, is dit zeer onwaarschijnlijk gezien de afwezigheid van efficiënte, verworven immuun responsen bij vuursalamanders (Stegen et al., 2017).

Mogelijke bedreigingen voor deze gunstige toestand zijn:

- *B. salamandrivorans* uitbraken in nabije populaties in Wallonië en Nederland en, recent, in een populatie salamanders in gevangenschap. Het is momenteel onduidelijk hoe deze schimmel zich verspreidt. Ons onderzoek in Wallonië toont echter aan dat het verspreidingsgebied niet continu is (niet gepubliceerde gegevens), wat erop wijst dat *B. salamandrivorans* zich over grotere afstanden kan verplaatsen. Dit maakt alle Vlaamse populaties van vuursalamander kwetsbaar voor infectie.
- De kwetsbaarheid van de vroedmeesterpadpopulaties. Er werd aangetoond dat reproductie momenteel beperkt is, dat de huidige *B. dendrobatidis* stammen laag virulent zijn maar dat exotische uitbraakstammen hoge mortaliteit kunnen veroorzaken en verschillende soorten amfibieën in hoge mate kunnen koloniseren. Introductie van hoog virulente *B. dendrobatidis* stammen die meerdere soorten kunnen infecteren, gecombineerd met hoge gevoeligheid van reeds door andere factoren onder druk staande, kleine populaties aan stochastische effecten kunnen leiden tot een extinctievortex. Zeer recent werd een onverklaarbare afname van populaties vroedmeesterpadden beschreven in het nabije Pas de Calais (Arntzen et al., 2017). Deze afname betreft specifiek vroedmeesterpadden en er werd geen voor de hand liggende verklaring gevonden. Dit kan mogelijk wijzen op virulente chytridiomycose in een regio die grenst aan Vlaanderen. Een tweede mogelijke bron van introductie van exotische *B. dendrobatidis* stammen zijn geïnfecteerde amfibieën in gevangenschap. Eerder werd aangetoond dat *B. dendrobatidis* wijd verspreid is in amfibieën (vooral kikkers en padden) in gevangenschap (Spitzen et al., 2011).

Gezien beide bedreigingen een grote impact kunnen hebben op het voortbestaan van de lokale populaties vuursalamanders en vroedmeesterpadden, is het belangrijk om **de probabiliteit van introductie van *B. salamandrivorans* en hoog virulente *B. dendrobatidis* stammen te voorkomen**. Er zijn momenteel immers geen maatregelen die de impact op populatieniveau kunnen beperken in geval van een uitbraak, behalve *ex situ* behoud. Dit is echter enkel zinvol in een visie die op termijn het herstel van de natuurlijke populaties beoogt (wat onder andere inhoudt dat de bedreiging, in dit geval de virulente chytrideschimmels, geëlimineerd wordt). Concrete maatregelen zouden zich moeten richten op:

- ⊙ reductie van de kans op introductie van virulente chytriden;
- ⊙ verkleinen van de kans op verlies van populaties en zelfs verlies van soorten in Vlaanderen indien virulente chytriden geïntroduceerd worden.

De volgende maatregelen dragen hiertoe bij:

⊙ **Reductie van de kans op introductie van virulente chytriden:**

- Het behoud van hygiënemaatregelen voor activiteiten in amfibieënhabitats, zoals momenteel van kracht en geïmplementeerd door ANB in het kader van de *B. salamandrivorans* dreiging. De nadruk zou hierbij moeten liggen op grondige reiniging en ontsmetting van materialen tussen verschillende amfibieënpopulaties. Bioveiligheidsmaatregelen hebben een impact die breder is dan enkel die van de infectieziekten in dit project.
- Alle activiteiten die het verplaatsen van amfibieën betreffen (relocatie, herintroductie, versterking) kunnen enkel doorgaan indien de te verplaatsen dieren klinisch gezond zijn en vrij van tenminste beide chytriden. In het geval zieke of dode dieren worden waargenomen, dient de oorzaak van de ziekte of sterfte onderzocht te worden.
- Het bevorderen van een 'clean trade' programma voor potentiële gastheren van *B. salamandrivorans* met als doel dat salamanders in gevangenschap vrij moeten zijn van infectie. Momenteel zijn geen infecties bekend van salamanders in gevangenschap met *B. salamandrivorans* in Vlaanderen. Vroegtijdige detectie en succesvolle eliminatie van *B. salamandrivorans* bij salamanders in gevangenschap is mogelijk. Het aansporen van liefhebbers om hun dieren te laten controleren, om alle inkomende dieren in quarantaine te plaatsen en te laten testen kan hiertoe bijdragen. Dit onderstreept het belang van het blijvend informeren van het publiek.
- Het bevorderen van een 'clean trade' programma voor potentiële gastheren van *B. dendrobatidis* met als doel dat amfibieën in gevangenschap vrij moeten zijn van infectie met virulente *B. dendrobatidis* stammen. Voor *B. dendrobatidis* kan verwacht worden dat dit wijd verspreid aanwezig is in amfibieën in gevangenschap, bijvoorbeeld bij frequent gehouden pijlgifkikkers (Dendrobatidae). Hierbij is het wel niet duidelijk of er hoog virulente stammen circuleren en wat de grootte is van deze potentiële bron van infectie. Deze hoog virulente stammen zijn momenteel niet eenduidig te identificeren met een eenvoudige techniek maar behoren wel allemaal tot de GPL-clade. Virulente uitbraken van chytridiomycose bij kikkers in gevangenschap komen regelmatig voor (Martel, Pasmans, pers. observ.). Door het ontbreken van informatie, lijkt het wenselijk dat het voorzorgsprincipe gehanteerd wordt en dat tenminste de afwezigheid van GPL-stammen (en bij voorkeur alle stammen) van *B. dendrobatidis* in amfibieën in gevangenschap aan te raden is. Vroegtijdige detectie en succesvolle eliminatie van *B. dendrobatidis* uit amfibieën in gevangenschap is mogelijk. Het aansporen van liefhebbers om hun dieren te laten controleren, om alle inkomende dieren in quarantaine te plaatsen en te laten testen kan aanbevolen worden. Dit onderstreept eveneens het belang van het blijvend informeren van het publiek.
- Het bevorderen van een 'clean trade' is vooral zinvol in een breder, Europees kader (beperken van de introductie van "emerging infectious diseases" via de handel in dieren en planten). Het stimuleren van maatregelen op Europees niveau (bv. quarantaine en ingangscontrole van amfibieën bij import) wordt sterk aangemoedigd.

⊙ **Reductie van de kans op biodiversiteitsverlies in het geval van introductie van virulente chytriden**

- Kleine populaties met beperkte genetische diversiteit hebben een aanzienlijk hoger risico op uitsterven door stochastische effecten (bv. in dit geval introductie van een virulente chytride). Een voorbeeld hiervan is het uitsterven de kleine populatie vuursalamanders van de populatie “Putberg” in Nederland (Spitzen, pers. med.). Het bevorderen van grote en genetisch diverse populaties wordt daarom sterk aanbevolen. Dit zou gepaard moeten gaan met een grondige genetische screening en opvolging van de Vlaamse vuursalamanderpopulaties en, waar mogelijk, het invoeren en onderhouden van gepaste beheersmaatregelen (optimaliseren landhabitat en voortplantingswateren).

Meetnetten en beheersplannen zijn in dit opzicht bijzonder zinvol, maar basiskennis omtrent genetische diversiteit en demografie van bv. de Vlaamse vuursalamanderpopulaties ontbreekt. Dergelijke achtergrondkennis is bovendien ook van belang bij eventueel opzetten van een *ex situ* kweekprogramma, waarbij we in Vlaanderen (in tegenstelling tot in Nederland) nog over de mogelijkheid beschikken deze informatie te verzamelen voordat uitbraken de inheemse populaties decimeren. De twee amfibiesoorten die in dit project werden voorgesteld (vuursalamander en vroedmeesterpad) lijken uitstekend geschikt als meest relevante sentinelsorten op basis van hun interactie met beide chytriden. Voor beide soorten wordt dan ook continuïteit in meetnet en beheersplan aanbevolen. Het ontbreken van een Vlaams meetnet vroedmeesterpad moet dan ook als een belangrijk tekort gezien worden. Populatiemonitoring draagt in belangrijke mate bij tot vroege detectie van ziektes en is een cruciaal onderdeel in een “early warning system”.

- Om een snelle respons mogelijk te maken is een “early warning system” belangrijk, gericht op een snelle detectie van een populatie-afname, ziekte of sterfte bij amfibieën. Passieve ziekte surveillance lijkt het meest efficiënt (alle gekende uitbraken van *B. salamandrivorans* werden via passieve ziektesurveillance gedetecteerd, geen enkele via actieve surveillance, Martel & Pasmans *pers. comm.*). Met passieve ziektesurveillance wordt bedoeld dat stalen enkel onderzocht worden op aanwezigheid van specifieke ziekteverwekkers als er daartoe sterke aanwijzingen zijn (bv. het vinden van dode dieren in het veld). Met actieve ziektesurveillance wordt bedoeld dat dieren systematisch onderzocht worden op aanwezigheid van specifieke ziekteverwekkers, ook als er geen aanwijzingen voor infectie zijn.

Een early warning system bestaat uit de volgende componenten:

- informeren van alle stakeholders die activiteiten in amfibiehabitats uitvoeren (inclusief het brede publiek), noodzaak van het zo breed mogelijk verspreiden van informatie, aanmoedigen van citizen science;
- oprichting van een meldpunt en inzameling van kadavers/stalen;
- mogelijkheid tot snelle diagnostiek.

- Een snelle respons vereist het opstellen van een specifiek emergency action plan in het geval door chytride veroorzaakte ziekte en sterfte wordt opgemerkt. Het gewestelijk-federaal Belgisch actieplan voor chytridiomycose werd met dat doel opgemaakt in 2017.

Het is zinvol dit emergency action plan voor zowel de vroedmeesterpad als de vuursalamander te ontwikkelen, waar mogelijk in een breder kader en in samenwerking met andere regio's en landen. Een dergelijk plan moet kaderen in een bredere visie van lange termijn en duurzaam behoud en tot doel hebben op lange termijn maximale genetische diversiteit van de Vlaamse vroedmeesterpad en vuursalamander populaties *in situ* te behouden.

Momenteel zijn geen maatregelen beschikbaar die *in situ* de impact van chytridiomycose succesvol kunnen beperken (Garner et al., 2016). *Ex situ* maatregelen hebben een direct effect maar dienen enkel overwogen te worden indien gekoppeld aan uiteindelijke duurzame reïntroductie, met eliminatie van de chytridedreiging. Dit laatste is momenteel niet mogelijk.

Een cruciale-tot op heden nog onbeantwoorde-vraag is of *B. salamandrivorans* spontaan verdwijnt als de gevoelige gastheren grotendeels geëlimineerd zijn. De index uitbraak in Bunderbos die dateert van 2010 is nu, april 2018, nog steeds actief (op 9/4/2018 werd de ziekte gediagnosticeerd bij een volwassen mannetje in Bunderbos).

Een evidence based aanpak wordt aanbevolen. Hoewel niet geadviseerd wordt te wachten met het invoeren van bovenstaande beschreven maatregelen, is bijkomende informatie noodzakelijk om deze maatregelen bij te sturen en te ondersteunen waar nodig en het welslagen van een controleprogramma te bevorderen:

- Informatie over de genetica van de Vlaamse populaties vuursalamanders en vroedmeesterpadden. Deze informatie is nodig voor het inschatten van de effectieve populatiegrootte maar ook om na te gaan of zich bijzondere behoudsentiteiten op Vlaams grondgebied bevinden (m.a.w.: moeten we specifiek bepaalde populaties behouden). Dit draagt in grote mate bij tot het ontwikkelen van grote, diverse populaties en tot het opstellen van relevante emergency action plans (zie hoger).
- Informatie over populatiedynamiek en demografie, eventueel van een selectie van meest 'waardevolle' populaties.
- Informatie over het belang van amfibieën in gevangenschap als bron van virulente *B. dendrobatidis* stammen voor de inheemse amfibieën. Het belang van dit reservoir bestaat uit een combinatie van de grootte van het reservoir (aantal besmette locaties), de prevalentie van de virulente pathogeen en de waarschijnlijkheid van overdracht naar wilde amfibieën (combinatie van verschillende factoren zoals infectie intensiteit, gedrag van de houder, kans op ontsnappen enz). Momenteel is er geen informatie beschikbaar over bijvoorbeeld het aantal liefhebbers met amfibieën, aantallen dieren in gevangenschap, prevalentie en intensiteit van *B. dendrobatidis* infecties en virulentie van circulerende stammen.
- Op langere termijn moeten maatregelen worden uitgewerkt voor de duurzame bestrijding van virulente chytridiomycose in de natuur. Deze heeft bij voorkeur als resultaat eradicatie van de pathogeen. Het alternatief is het terugdringen van de pathogeen tot een endemische staat, in evenwicht met de gastheer (ie: reductie van virulentie van de pathogeen, reductie van gastheer gevoeligheid en/of omgevingsmanipulatie die de kiem-gastheer interactie wijzigt). Een "proof of concept" zou aanleiding moeten geven tot een bestrijdingsprotocol in het geval van introductie van virulente chytriden.

Dankwoord

ANB dankt de onderzoeksgroep van An Martel en Frank Pasmans voor de goede uitvoering van het onderzoekproject en voor de goede samenwerking.

Er gaat eveneens veel dank aan Tim Adriaens (INBO), Mieke Hoogewijs (Provincie Antwerpen), Dominique Verbelen (Natuurpunt), Iwan Lewylle (Natuurpunt), Kris Meeuws (Natuurwerk), Stefaan Neiryck, Jeroen Speybroeck (INBO), Koen Steenhoudt, Bert Vandebosch (Hyla) en Thomas Vandenberghe voor de hulp met het lokaliseren van amfibieënpopulaties, assistentie tijdens veldwerk en het regelen van gebiedsvergunningen.

Bijlage 1: Literatuuroverzicht Ranavirose en Chytridiomycose: recente ontwikkelingen, risicoanalyse in België en mogelijke strategieën voor de preventie en controle van verdere verspreiding

Referenties (zie het literatuuroverzicht in bijlage 1 voor de volledige referentielijst)

- Arntzen J.W., Abrahams C., Meilink W.R.M., Iosif R., Zuiderwijk A. 2017. Amphibian decline, pond loss and reduced population connectivity under agricultural intensification over a 38 year period. *Biodiversity and Conservation* 26: 1411-1430.
- De Bruyn L., Speybroeck J., Maes D., De Knijf G., Onkelinx T., Piesschaert F., Pollet M., Truyens P., Van Calster H., Westra T., Quataert P. 2015. Monitoringsprotocol vuursalamander. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, No INBO.R.2015.10186299.
- Blooi M., Pasmans F., Longcore J. E., Spitzen- van der Sluijs A. M., Vercammen F., Martel A. 2013. Duplex Real-Time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples. *Journal of Clinical Microbiology* 51: 4173-4177.
- Brem F., Mendelson III J. R., Lips K. R. 2007. Field-Sampling Protocol for *Batrachochytrium dendrobatidis* from Living Amphibians, using Alcohol Preserved Swabs. Version 1.0 (18 July 2007). Electronic document accessible at <http://www.amphibians.org> Conservation International, Arlington, Virginia, USA.
- Farrer R.A., Martel A., Verbrugghe E., Abouelleil A., Ducatelle R., Longcore J.E., James T.Y., Pasmans F., Fisher M.C., Cuomo C.A. 2017. Genomic innovations linked to infection strategies across emerging pathogenic chytrid fungi. *Nature Communications* 8, 14742, DOI: 10.1038/ncomms14742.
- Fisher M.C., Bosch J., Yin Z., Stead D.A., Walker J., Selway L., Brown A.J., Walker L.A., Gow N.A., Stajich J.E., Garner T.W. 2009. Proteomic and phenotypic profiling of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* shows that genotype is linked to virulence. *Molecular Ecology*, 18(3), 415-429.
- Garner T.W., Schmidt B.R., Martel A., Pasmans F., Muths E., Cunningham A.A., Weldon C., Fisher M.C., Bosch J. 2016. Mitigating amphibian chytridiomycoses in nature. *Philosophical Transactions of the Royal Society B- Biological Sciences*, 371, 1709.
- Laking A.E., Ngo H.N., Pasmans F., Martel A., Nguyen T.T. 2017. *Batrachochytrium salamandrivorans* is the predominant chytrid fungus in Vietnamese salamanders. *Scientific Reports* 7, 44443, DOI: 10.1038/srep44443
- O'Hanlon S.J., Rieux A., Farrer R.A., Rosa G.M., Waldman B., Bataille A., Kosch T.A., Murray K.A., Brankovics B., Fumagalli M., Martin M.D., Wales N., Alvarado-Rybak M., Bates K.A., Berger L., Böll S., Brookes L., Clare F., Courtois E.A., Cunningham A.A., Doherty-Bone T.M., Ghosh P., Gower D.J., Hintz W.E., Höglund J., Jenkinson T.J., Lin C.F., Laurila A., Loyau A., Martel A., Meurling S., Miaud C., Minting P., Pasmans F., Schmeller D., Schmidt B.R., Shelton J.M.G., Skerratt L.F., Smith F., Soto-Azat C., Spagnoletti M., Tessa G., Toledo L.F., Valenzuela-Sánchez A., Verster R., Vörös J., Webb R.J., Wierzbicki C., Wombwell E., Zamudio K.R., Aanensen D.M., James T.Y., Gilbert M.T.P., Weldon C., Bosch J., Balloux F., Garner T.W.J., Fisher M.C. 2018. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science*, In press.
- Pasmans F., Van Rooij P., Blooi M., Tessa G., Bogaerts S., Sotgiu G., Garner T.W.J., Fisher M.C., Schmidt B.R., Woeltjes T., Beukema W., Bovero S., Adriaensen C., Oneto F., Ottonello D., Martel A., Salvidio S. 2013. Resistance to chytridiomycosis in European plethodontid salamanders of the genus *Speleomantes*. *Plos One* 20(5):e63639.
- Spear R., Berger L., Skerratt L. F., Alford R., Mendez D., Cashins S., Kenyon N., Hauselberger K., Rowley J. 2004. Hygiene protocol for handling amphibians in field studies, Amphibian Diseases Group, James Cook University, Townsville.
- Spitzen-van der Sluijs A. M., Zollinger R., Bosman W., van Rooij P., Clare F., Martel A., Pasmans F. 2010. *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians in the Netherlands and Flanders (Belgium). Stichting RAVON, Nijmegen, the Netherlands.
- Spitzen-van der Sluijs A., 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(3): 419-423.
- Spitzen-van der Sluijs A. M., Martel A., Hallmann C.A., Bosman W., Garner T.W.J., 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. *Conservation Biology*: DOI: 10.1111/cobi.12281
- Stegen G., Pasmans F., Schmidt B.R., Rouffaer L.O., Van Praet S., Schaub M., Canessa S., Laudelout A., Kinet T., Adriaensen C., Haesebrouck F., Bert W., Bossuyt F., Martel A. 2017. Drivers of *Batrachochytrium salamandrivorans* mediated salamander extirpation. *Nature*, 544: 353. DOI: 10.1038/nature22059
- Thomas V., Blooi M., Van Rooij P., Van Praet S., Verbrugghe E., Grasselli E., Lukac M., Smith S., Pasmans F., Martel A. 2018. Recommendations on diagnostic tools for *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Transboundary Emerging Diseases* 65(2):e478-e488.