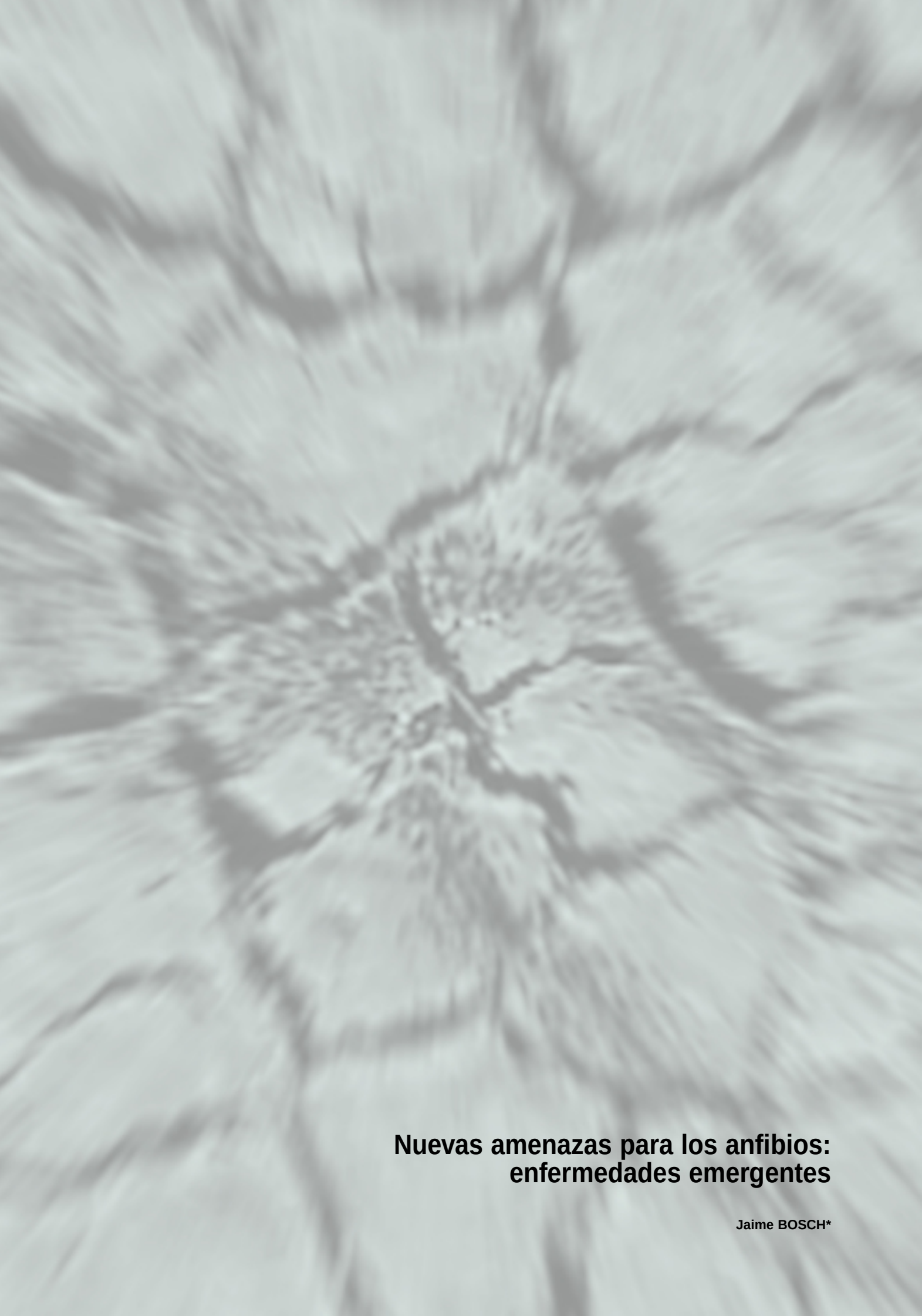




Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes

Jaime BOSCH*

MUNIBE (Suplemento/Gehigarria)	nº 16	000-000	DONOSTIA-SAN SEBASTIÁN	2003	ISSN XXXX-XXXX
--------------------------------	-------	---------	------------------------	------	----------------

Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes

GAKO-HITZAK: Anfibioen gainbehera, gaixotasunak azaleramenduan, quitridiomikosia.

KEY-WORDS: Amphibian decline, emergent diseases, chytridiomycosis

PALABRAS-CLAVE: Declive anfibios, enfermedades emergentes, quitridiomycosis.

Jaime BOSCH*

LABURPENA

Dagoeneko, mundu osoan orohar anfibioak gainbehera doazela inork ez du zatantzan jartzen. Nahiz eta beherakada horren arrazoi ohi-koenak, ezbairik gabe, beren habitataren eraldaketa eta suntsipena izan, azken urteotan anfibioen iraungipen zein gaibehera kasu enigmatikoenetan azalerratzen ari diren gaixotasunen garrantzia baieztatu da. Anfibioenak beraienak diren birus berriak eta, batez ere, quitridio onddo espezie berri bat mehatsurik larrienak bihurtu dira mundu osoko anfibio espezie askorentzat. Espainian, azken urteotan, Europako lehen quitridiomikosi kasua gertatu da eta oraindik arazo horren benetako helmene ezezaguna da. Zoritxarrez, arazoari aurre egiteko neurri eskasak daude, konpobide bakarra gaixotasunaren sakabanaketa ekiditea izanik.

SUMMARY

Nowadays, the global amphibian decline is beyond doubt. The most common causes of this decline are, clearly, the habitat alteration and destruction. However, in the last years, the significance of emergent diseases has become evident for the most puzzling cases of amphibian decline and extinction. New amphibian-specific viruses and, above all, a new species of chytrid fungus, are now the most serious threats for many amphibian species around the world. In the last years, the first European case of chytridiomycosis has appeared in Spain, and the real scope of this problem is still unknown. Unfortunately, there are few measures for dealing with this problem, and the only solution is, by now, avoiding their dispersal.

RESUMEN

Nadie duda ya a estas alturas de que los anfibios se encuentran en declive generalizado en todo el mundo. Aunque las causas más frecuentes de este declive son sin duda la alteración y destrucción de su hábitat, en los últimos años se ha podido comprobar la gran importancia de las enfermedades emergentes en los casos más enigmáticos de declives y extinciones de anfibios. Nuevos virus específicos de los anfibios y, sobre todo, una nueva especie de hongo quitridio se han convertido en las amenazas más serias para muchas especies de anfibios en todo el mundo. En España, se ha producido en los últimos años el primer caso de quitridiomycosis de Europa, y el alcance real de este problema es aún desconocido. Desgraciadamente, existen pocas medidas posibles para combatir el problema, siendo la única solución evitar su dispersión.

*Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC
José Gutiérrez Abascal 2. 28006 Madrid

INTRODUCCIÓN

El papel de los anfibios como especies bioindicadoras, especies cuyo estado de sus poblaciones puede indicar el estado de conservación del medio donde viven con bastante precisión, ha sido señalado desde hace años (BLAUSTEIN, 1994; BLAUSTEIN & WAKE, 1995). Las causas de este importante papel de los anfibios responden a algunas de sus peculiaridades biológicas más conocidas. Así, los anfibios presentan una extraordinaria dependencia con el medio donde viven, motivada por su relativa escasa movilidad. Por un lado, su doble ciclo vital, acuático y terrestre, les hace vulnerables a alteraciones producidas en ambos medios. Además, los anfibios ocupan posiciones diversas en la cadena trófica (TOFT, 1980; BLAUSTEIN *et al.*, 1994a), desde detritívoros hasta predadores, y aunque con un número de especies relativamente bajo, en muchas ocasiones representan una proporción muy importante de biomasa (BURTON & LIKENS, 1975; BEEBE, 1996). Por otro lado, la característica más importante de los anfibios que les confiere su capacidad como bioindicadores es su extraordinaria piel desnuda, muy permeable a contaminantes disueltos en el agua, la lluvia ácida o las radiaciones.

Por desgracia, el que los anfibios sean excelentes especies bioindicadoras implica que sus poblaciones pueden sufrir graves deterioros si se producen problemas ambientales, aunque estos sean poco importantes.

Los episodios de declive de poblaciones de anfibios motivados por causas evidentes, como la contaminación o destrucción del hábitat, son frecuentes desde hace muchos años. Sin embargo, mucho más reciente y preocupante es el declive de poblaciones sin causas aparentes o, mejor dicho, sin causas explicadas (WALDMAN & TOCHER, 1998; ALFORD & RICHARDS, 1997). La voz de alarma saltó en la década de los 80 cuando se constataron los primeros casos de declive de poblaciones de anfibios en áreas bien conservadas tales como espacios protegidos. Los dos casos más conocidos a nivel mundial fueron sin duda el caso del sapo dorado de Costa Rica (*Bufo periglenes*, CRUMP *et al.*, 1992) y la rana incubadora gástrica australiana (*Rheobatrachus silus*, POUNDS *et al.*, 1997). En ambos casos se trataba de especies con distribuciones muy restringidas, y cuya extinción total se produjo rápidamente sin que se llegase a entender cual había sido el motivo de su desaparición cuando sus hábitats permanecían intactos. A partir de esos dos casos, la lista de poblaciones extinguidas en todo el mundo

fue incrementándose de forma alarmante, siendo especialmente preocupante en las zonas tropicales de Centroamérica (YOUNG *et al.*, 2001) y Australia (LAURANCE *et al.*, 1996).

Sin embargo, todavía en los años 90 muchos investigadores se mostraban escépticos a admitir la naturaleza global del declive de los anfibios. Sus argumentos eran claros, no existían datos a gran escala que permitiesen asegurar con rigor científico que el declive de los anfibios era algo más que una lista, más o menos larga, de extinciones puntuales. En efecto, por curioso que pueda parecer, los anfibios son un grupo animal tradicionalmente poco estudiado comparado con otros vertebrados. Así, mientras que por ejemplo para las aves poseemos datos demográficos de poblaciones en todo el mundo desde hace muchas décadas, los datos de poblaciones de anfibios son relativamente escasos. Además del poco interés que despertaron los anfibios a los investigadores años atrás, existen razones importantes que explican la escasez de datos disponibles sobre demografía de anfibios (ver p.e. STORFER, 2003). Los anfibios son, muchas veces, especies fundamentalmente nocturnas y crípticas, por lo que son difíciles de localizar en su medio. Además, y más importante, las poblaciones de anfibios se encuentran sujetas a fuertes fluctuaciones de sus efectivos poblacionales, lo que hace muy complicado estimar su tendencia real, siendo necesario disponer de series temporales muy largas y por tanto muy costosas de obtener. Por otro lado, muchas veces el tamaño poblacional de los anfibios viene determinado fundamentalmente por el número de efectivos que son reclutados cada año después de completarse el periodo reproductivo, por lo que las condiciones ambientales (principalmente la disponibilidad de agua) influyen en gran medida en el tamaño poblacional. Además, muchas poblaciones se encuentran constituidas por metapoblaciones (ALFORD & RICHARDS, 1999): pequeños grupos de individuos con flujo genético con otros grupos y que están sometidos a frecuentes episodios de extinción natural y nueva aparición por colonización de individuos de metapoblaciones próximas. Esta estructura poblacional hace necesario conocer en profundidad todo el sistema para poder estimar con precisión el tamaño poblacional.

Sin embargo, este panorama de escepticismo sobre el declive global de los anfibios cambió cuando Houlahan *et al.* (2000) realizaron un nuevo análisis de las tendencias poblacionales de cientos de poblaciones de anfibios de todo el mundo

y con series temporales mas o menos largas de hasta 30 años. Las conclusiones de este trabajo eran claras: los anfibios están desapareciendo en todo el mundo y, sorprendentemente, el declive se está produciendo desde épocas mucho más antiguas de lo que imaginábamos (desde la década de los 50).

CAUSAS DEL DECLIVE DE LOS ANFIBIOS

Una vez que admitimos que el declive de los anfibios es un fenómeno global, es decir, que afecta a multitud de especies en todo el mundo, es necesario intentar explicar sus causas.

Las causas del declive global de los anfibios pueden dividirse en dos grandes grupos atendiendo a la naturaleza de los agentes implicados. Agentes abióticos tales como el calentamiento global de la Tierra, la lluvia ácida, el incremento de radiación ultravioleta o la contaminación, provocan sin duda el declive de poblaciones en todo el mundo.

Sin embargo, algunos declives de poblaciones de anfibios son motivados por agentes de naturaleza muy diferentes: los agentes bióticos. En muchas zonas las especies introducidas, fundamentalmente peces y cangrejos (p.e. FISHER & SHAFFER, 1996; BRADFORD, 1989; GAMRADT & KATS, 1996; GILLESPIE & HERO, 1999), pero también incluso otras especies de anfibios alóctonos como la rana toro americana (*Rana catesbeiana*; p.e. FISHER & SHAFER, 1996; HECNAR & M'CLOSKEY, 1997; LANNON *et al.*, 1994) o el sapo de la caña (*Bufo marinus*) introducido en Queensland (Australia) en 1935, depredan sobre larvas y adultos provocando extinciones poblacionales de especies autóctonas de anfibios.

Por otra parte, nuevas amenazas relacionadas con agentes bióticos han aparecido en los últimos años. En Estados Unidos por ejemplo aparecieron recientemente malformaciones espectaculares en anfibios, con una frecuencia anormalmente alta (muy superiores al 5%, el nivel máximo considerado normal; p.e. READ & TYLER, 1990, 1994). Estas malformaciones incluían infecciones en la piel, patas o dedos supernumerarios y ausencias o malformaciones de las patas traseras. Afectaron a más de 60 especies (SESSIONS & RUTH, 1990; BLAUSTEIN & JONSON, 2003), y crearon gran alarma social al ser relacionados con posibles alteraciones del medio, tales como un incremento de los niveles de radiación, que pudiesen afectar también a la población humana. En un principio se apuntaron como causas posibles de este fenómeno

no el uso desmesurado de insecticidas o fertilizantes (p.e. FORT *et al.*, 1999), u otros agentes químicos como el ácido retinoico (p.e. DEGITZ *et al.*, 2000). Sin embargo, también se ha podido comprobar que diversos trematodos (más de 40 especies de más de 30 géneros y 2 familias) parasitan a los anfibios y utilizan sus larvas como hospedadores intermediarios. De todos ellos, *Ribeiroia ondatrae* ha sido claramente asociado con la aparición de malformaciones en anfibios (JONSON *et al.*, 2002). Parece ser que los quistes internos que provocan los parásitos alteran la posición de grupos de células responsables del crecimiento y liberan además sustancias químicas que provocan un crecimiento anormal. Sin embargo, la razón última de por qué la patogénesis de estos trematodos en los anfibios se ha alterado recientemente ha sido atribuida a causas tales como la eutrofización del agua, la sustitución de masas de agua naturales por presas artificiales, o la introducción de especies alóctonas. Recientemente un estudio de campo y laboratorio ha demostrado que existe un efecto sinérgico entre concentraciones elevadas de productos químicos usados en agricultura y las malformaciones producidas por los trematodos (KIESECKER, 2002): los pesticidas provocarían una depresión inmunológica en los anfibios que serían entonces más susceptibles a los trematodos parásitos, produciéndose las llamativas malformaciones.

Además, algunos géneros de nemátodos como *Rhabdias* y *Myxozoon* se encuentran de forma inocua en los pulmones de muchos anfibios, mientras que en grandes cantidades resultan letales (WILLIAMS, 1960), invadiendo la piel, ojos y cavidades del cuerpo.

Sin embargo, los agentes bióticos más nocivos para los anfibios son, sin duda, las bacterias, los virus y los hongos. Ya desde los años 40 hubo constancia de episodios de mortalidad de anfibios relacionados con bacterias (p.e. DUSI, 1949), siendo apuntadas como posibles causantes de enfermedades de anfibios (REICHENBACH-KLINKE & ELKAN, 1965; SHOTTS, 1984). Así, la bacteria *Aeromonas hydrophila*, que se encuentra frecuentemente en el suelo y en el agua y que es considerada parte de la flora natural de los anfibios, era hace años la responsable de la "única" enfermedad de los anfibios en condiciones naturales. La enfermedad era conocida como "red leg" ("pata roja"), y se explicaba como una explosión anormal de los efectivos de esta bacteria por causas desconocidas que provocaba la aparición de



Fig. 1. Zona del Ibón de Piedrafita en Huesca, un lago de montaña donde ocurrió el único caso descrito en España de mortalidad en masa de una especie de anfibio relacionado con la enfermedad conocida como "pata roja".

síntomas claros y que motivaba frecuentemente la muerte de los animales. Los individuos afectados, larvas y adultos, presentaban graves hemorragias internas fundamentalmente en los miembros, acompañadas frecuentemente de llamativas inflamaciones. Los casos de "pata roja" aparecieron fundamentalmente en Estados Unidos y Reino Unido y, aunque en general no estaban acompañados de declives poblacionales documentados, provocaron fuertes episodios de mor-

talidad en masa (p.e. NYMAN, 1986, ver sin embargo BRADFORD, 1991). En España, hemos podido constatar un caso de "pata roja" que afectó a una población de del sapo partero común (*Alytes obstetricans*) en el pirineo oscense (MÁRQUEZ *et al.*, 1995; fig. 1). En esa ocasión, se produjo una mortalidad en masa, fundamentalmente de larvas, en dos años no consecutivos en el mismo lago de montaña. Como en muchos casos de "pata roja", los análisis de la sangre de los individuos afectados revelaron sin lugar a dudas concentraciones anormales de *A. hydrophila*, presentando estos los síntomas característicos de la enfermedad (fig. 2). Como en muchos episodios de "pata roja" la causa última del fenómeno permanece sin explicar, no encontrándose tampoco en este caso problemas de estrés ambiental (como temperaturas extremas o contaminación) que han sido apuntados por otros autores para explicar la incidencia de las bacterias (NYMAN, 1986; CAREY, 1993). De hecho, actualmente muchos patólogos creen que la bacteria *A. hydrophila* se comporta en realidad como un patógeno oportunista que se instala en individuos ya debilitados por otros agentes bióticos mucho mas problemáticos para los anfibios como son, por ejemplo, los virus (p.e. CUNNINGHAM *et al.*, 1996).

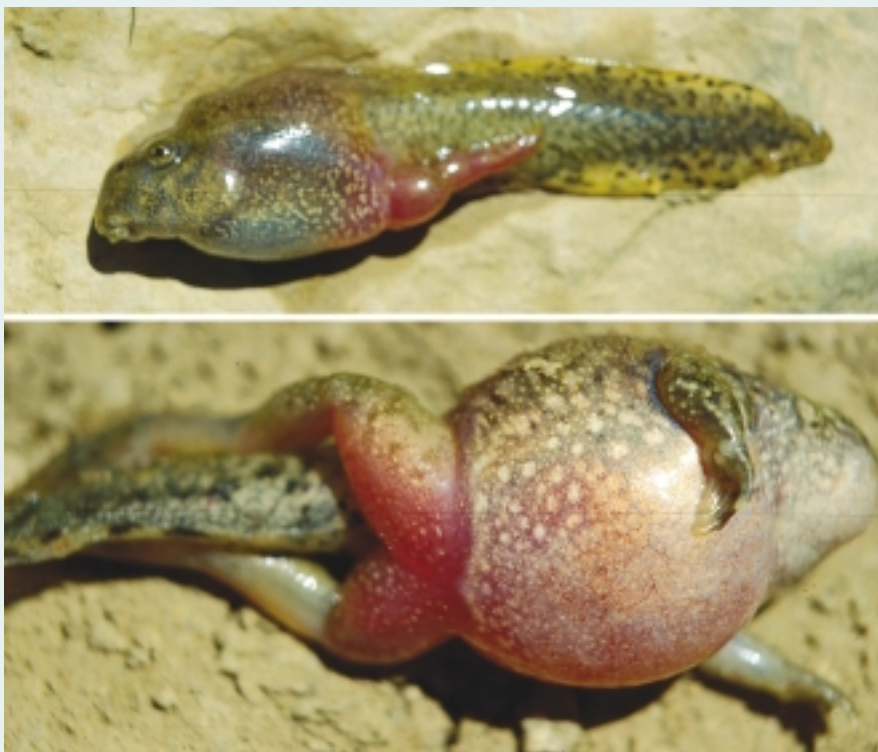


Fig. 2. Ejemplares de sapo partero común (*Alytes obstetricans*) encontrados muertos en la orilla del Ibón de Piedrafita presentando los típicos síntomas de "pata roja".

Además de esta bacteria, un patógeno de peces distribuido globalmente, el hongo *Saprolegnia ferax*, es conocido desde hace tiempo por provocar mortalidades masivas de huevos de anfibios. Muchas especies de peces que se encuentran introducidos en muchos lugares de todo el mundo son portadores habituales de este hongo, y su papel en la transmisión de este patógeno a los anfibios ha sido demostrado (KIESECKER *et al.* 2001). Sin embargo, este hongo ha sido responsabilizado sólo de forma puntual en el declive de algunas poblaciones de anfibios (BLAUSTEIN *et al.*, 1994b; KIESECKER & BLAUSTEIN, 1997). Las especies de anfibios que presentan puestas comunales serían más susceptibles de sufrir mortalidad por *S. ferax* que las especies que depositan sus puestas de forma aislada (KIESECKER & BLAUSTEIN, 1997). Además, se ha demostrado que *S. ferax* puede actuar de forma sinérgica con cambios ambientales (KIESECKER *et al.*, 2001): el aumento de los periodos secos provoca la disminución del nivel de agua de las charcas, haciendo que las puestas sufran altas exposiciones a la radiación ultravioleta que favorecen las infecciones fúngicas.

ENFERMEDADES EMERGENTES: VIRUS Y HONGOS

Aunque los anfibios presentan un alto potencial para sufrir el ataque de diversos patógenos, hasta hace poco tiempo estos no habían sido estudiados en profundidad (BLAUSTEIN *et al.*, 1994b), considerándose los episodios de mortalidad en masa de anfibios como meras anécdotas puntuales. Sin embargo, la biología de los anfibios les hace muy susceptibles a sufrir enfermedades producidas por patógenos, ya que muchos de sus hábitos de vida facilitan en gran medida la transmisión de enfermedades infecciosas. Así, por ejemplo, muchos individuos de una o varias especies de anfibios se reúnen frecuentemente en gran número durante la estación reproductiva en los sitios apropiados de puesta. Otras especies forman masas comunales de huevos, y frecuentemente sus larvas se concentran en grandes cantidades en el medio acuático.

De esta forma, cuando expertos patólogos prestaron atención a los primeros casos de declive de anfibios en áreas bien conservadas se dieron cuenta de que dichos declives sólo podían explicarse desde la perspectiva de una enfermedad infecciosa (LAURANCE *et al.*, 1996). Así, cuando no se conocía aún la causa del declive generalizado de anfibios, el caso de la zona tropi-

cal australiana fue atribuido a un supuesto virus. Sólo un organismo infeccioso específico como un virus podía explicar el patrón de dispersión del problema, con un frente claro que avanzaba rápidamente del sur al norte del país.

Surgió así la aplicación del término enfermedad emergente en el enigmático caso del declive global de los anfibios. Por enfermedad emergente se entiende una enfermedad infecciosa de reciente aparición o cuya incidencia o rango geográfico aumenta drásticamente. En los anfibios las enfermedades emergentes son producidas por virus y hongos específicos que comentaremos a continuación.

Iridovirus

Los virus que afectan a los anfibios se conocen relativamente bien desde hace muy poco (SPEARRE & SMITH, 1992) y, aunque aún no se ha podido demostrar estrictamente su relación con el declive generalizado de anfibios, si está demostrado que pueden producir mortalidades en masa muy importantes. Los iridovirus son virus con una cápsula en forma de icosaedro y un genoma de doble cadena capaz de codificar unas 100 proteínas (WILLIAMS, 1996).

Estos virus infectan de forma natural a invertebrados y vertebrados de sangre fría (peces, anfibios y reptiles). De todos los iridovirus sólo dos géneros afectan a vertebrados: *Lymphocystivirus* y *Ranavirus*. El primero está restringido a peces de agua dulce y salada, mientras que el segundo además de infectar anfibios puede afectar a peces y reptiles (GOORHA, 1995). Esta baja especificidad hace que los ranavirus sean muy difíciles de controlar, convirtiéndose muchas especies de peces en reservorios de la enfermedad o en hospedadores donde se amplifican con facilidad (MOODY & OWENS, 1994; MAO *et al.*, 1999).

Los casos de mortalidades en masa de anfibios atribuidos a estos virus se conocen desde 1965 en Estados Unidos, y la lista de países afectados crece constantemente: Croacia, Reino Unido, Canadá, Venezuela, China, Portugal, etc (p.e. CLARK *et al.*, 1968; WOLF *et al.*, 1968; HENGSTBERGER *et al.*, 1993; DRURY *et al.*, 1995; JANCovich *et al.*, 1997; ZUPANOVIC *et al.*, 1998a; BOLLINGER *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2003).

Todavía no se conocen los factores ambientales que motivan el desarrollo de los iridovirus, pero sí se sabe que son extraordinariamente resistentes, sobreviviendo en la zona afectada incluso sin

la presencia del hospedador (aunque sin multiplicarse) y en condiciones adversas (por ejemplo, pueden sobrevivir más de 90 días en agua destilada, más de 100 días en superficies secas, o más de 1000 días a temperaturas de hasta -70°C; p.e. LANGDON, 1989). Son, por desgracia, además altamente infecciosos, con una tasa de muerte del 100% (a los 4-17 días), afectando a larvas, individuos metamórficos y adultos (CLARK *et al.*, 1968; WOLF *et al.*, 1968; HYATT *et al.*, 1998).

La sintomatología de las enfermedades de los anfibios provocadas por iridovirus es complicada. Muchas veces los individuos infectados mueren sin síntomas externos evidentes que indiquen la naturaleza del problema, aunque a veces se presentan hemorragias locales y úlceras en la piel. Sin embargo, los individuos afectados presentan en general agudas necrosis en órganos internos (HYATT *et al.* 1998).

Como ya dijimos, en los casos de infección con iridovirus se producen frecuentemente además infecciones bacterianas secundarias, lo que complica la diagnosis de la enfermedad. Por ejemplo Cunningham *et al.* (1996) describen, en un caso de infección en *Rana temporaria*, individuos afectados con hemorragias en la musculatura esquelética y tractos digestivo y reproductor, junto con otros individuos afectados que presentaban úlceras en la piel y necrosis en las patas pero sin hemorragias musculares. Jancovich *et al.* (1997) describen, en individuos afectados de *Ambystoma tigrinum*, infecciones bacterianas secundarias que provocaban una rápida hiperplasia y hemorragias en la piel y en las vísceras.

Los métodos de dispersión de los iridovirus son diversos. Los propios individuos afectados llevan la enfermedad a zonas próximas con sus desplazamientos. Además, especies peste como *B. marinus*, introducido en muchas partes del mundo, se muestran poco vulnerables a la acción de estos virus y sin embargo son habituales vectores de transmisión que extienden la enfermedad (ZUPANOVIC *et al.*, 1998b).

Además, como ya señalamos, los peces infectados resultan eficaces agentes dispersantes y constituyen reservorios difíciles de controlar. Las aves también pueden llevar los virus en las patas o en el pico, y transmitir el patógeno al regurgitar comida infectada (WHITTINGTON *et al.*, 1996). Y por supuesto el hombre, con las translocaciones de puestas, larvas o adultos infectados, o mediante las redes y botas de los pescadores, puede extender la enfermedad (WHITTINGTON *et al.*, 1996).

Las epidemias de iridovirus se han producido frecuentemente en áreas degradadas, como por ejemplo charcas artificiales para el ganado en un medio muy alterado y con poca cobertura vegetal donde se concentran grandes poblaciones de anfibios (CUNNINGHAM *et al.*, 1995; WHITTINGTON & HYATT, 1997). Esto indica que, probablemente, los iridovirus están afectando a poblaciones de anfibios ya inmunodeprimidas por algún tipo de estrés ambiental. Como suele ser frecuente en otros casos de enfermedades infecciosas, las especies de anfibios con tamaños de puesta reducidos serían las más susceptibles de sufrir declives por esta causa.

Quitridios

Los quitridios son un grupo grande y muy diverso de hongos. Se conocían desde muy antiguo, pero siempre como parásitos de plantas, algas, protistas e invertebrados, y sólo recientemente han adquirido una importancia clave en el problema del declive de los anfibios.

Son cosmopolitas y ubicuos, encontrándose desde en los desiertos hasta en las selvas tropicales, aunque la mayoría prefiere hábitats acuáticos. Prefieren zonas altas y son muy sensibles a la contaminación, por lo que muchas veces han sido utilizados como especies bioindicadoras de la calidad del agua. Pueden ser coloniales o vivir aislados, y se alimentan degradando quitina, celulosa y queratina (p.e. POWELL, 1993). Como característica importante de su biología presentan esporangios sin opérculos y zoosporas con flagelos móviles.

La conexión de los quitridios con los anfibios surgió inesperadamente en 1998 a partir de individuos moribundos y muertos procedentes de Australia y Panamá (BERGER *et al.*, 1998), donde se habían venido registrando declives de poblaciones de anfibios muy bien documentadas. Estos ejemplares presentaban gran cantidad de esporangios de hongos quitridios en las capas superficiales de la piel. Se describió así una nueva especie de hongo quitridio, *Batrachochytrium dendrobatidis*, pasando a ser el primer caso de infección de hongos quitridios en los vertebrados. Curiosamente no existen diferencias morfológicas estructurales ni en el genoma (la máxima divergencia encontrada es inferior al 5%) entre los quitridios encontrados en Panamá, Australia, y los procedentes de anfibios en cautividad (BERGER *et al.*, 1998; LONGCORE *et al.*, 1999; Morehouse *et al.*, 2003), sugiriendo que se trata de una única especie.

Las zoosporas, es decir esporas dotadas de flagelos, de estos hongos se producen en el agua y pueden vivir más de 24 horas, infectando larvas y adultos (L. BERGER, datos no publicados; JONSON & SPEARE, 2003). Emplean entre 4 y 5 días desde que las zoosporas se fijan en la piel de los anfibios hasta que se producen esporangios maduros (de unos 12-20 μm ; LONGCORE *et al.*, 1999). En los anfibios adultos *B. dendrobatidis* sólo invade las partes superficiales de la piel y nunca los órganos internos, pudiendo desarrollarse de forma aislada o colonial (LONGCORE *et al.*, 1999). Los quitridios afectan fundamentalmente a los individuos ya metamorfoseados, pues precisan que la piel contenga queratina. Sin embargo, las larvas de los anfibios que entran en contacto con los quitridios quedan infectadas en la zona bucal, la única zona que presenta queratina en las primeras etapas de su ciclo vital. Apparentemente las larvas infectadas no sufren alteraciones graves, mostrando un comportamiento normal. Sin embargo, algunas larvas infectadas presentan asimetrías en la disposición de las filas de dientes, mientras que otras pierden todos los dientes, e incluso

el disco oral aparece inflamado y anormalmente enrojecido (FELLERS *et al.*, 2001). Después, cuando las larvas de los anfibios van desarrollándose la queratina se extiende por todo el cuerpo, y con ella los hongos. Como en todos los hongos quitridios, las zoosporas de *B. dendrobatidis* se producen en zoosporangios sin opérculo que desarrollan un tubo de descarga que rompe la pared del cuerpo para liberar las zoosporas (fig. 3).

Aunque algunos quitridios presentan esporas de resistencia capaces de sobrevivir durante décadas en condiciones de sequedad, parece que *B. dendrobatidis* podría ser relativamente frágil a la ausencia total de agua, aunque es capaz de existir y proliferar como saprófitos en el medio (LONGCORE *et al.*, 1999, JOHNSON & SPEARE, 2003).

La infección de estos patógenos en los anfibios produce la hiperqueratinización del estrato córneo de la piel, que pasa de los 2-5 mm. habituales a 60. Sin embargo, los síntomas de los animales enfermos son muy variables entre individuos y entre especies. En general se produce inapetencia, decoloración de la piel, excesiva mucosidad, posturas anormales, ausencia de comportamiento de huida y comportamientos extraños (por ejemplo los animales permanecen al sol sin buscar refugio), y sólo en algunas ocasiones hay síntomas evidentes como úlceras y erosión en la piel (BERGER *et al.*, 1999; PESSIER *et al.*, 1999).

La enfermedad producida por este patógeno presenta resultados fatales en los anfibios. Infecciones experimentales demuestran que ranas expuestas a 10 zoosporas no mueren, mientras que individuos expuestos a sólo 100 zoosporas mueren en 35-47 días, e individuos expuestos a 1000 zoosporas mueren en 23-38 días (BERGER *et al.*, 1999).

Aún no sabemos por qué mueren los individuos afectados, aunque existen varias hipótesis al respecto (BERGER *et al.*, 1998; PESSIER *et al.*, 1999). En primer lugar, algunos patólogos creen que la hiperplasia de la piel que lleva consigo la infección impide la respiración cutánea (de gran importancia en los anfibios), por lo que el animal terminaría por morir asfixiado. Otros investigadores creen que los hongos liberan enzimas proteolíticas u otros componentes activos que resultarían tóxicos para los anfibios. Por otro lado, podría ser la combinación de ambas hipótesis la responsable de la muerte del individuo. Finalmente, y aunque menos admitida, algunos patólogos piensan que las perforaciones de la piel que provocan los tubos de descarga provocarían un desequilibrio

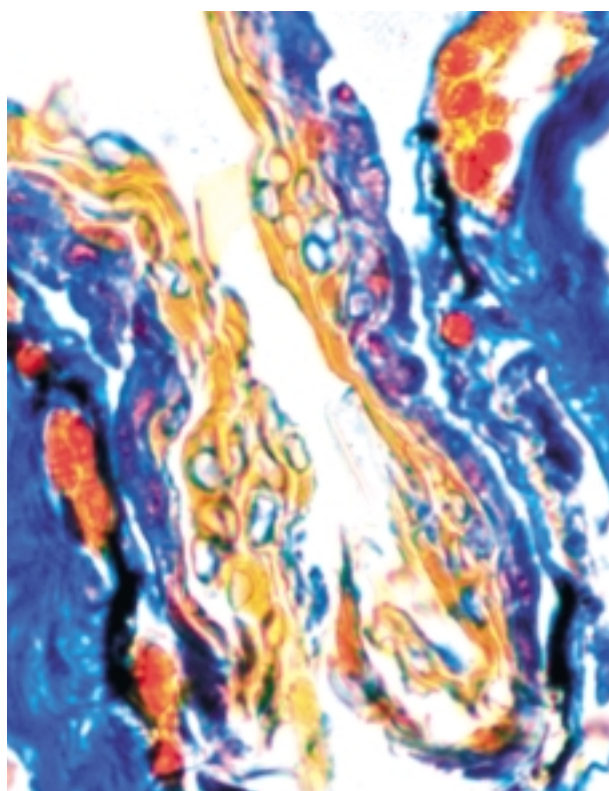


Fig. 3. Corte histológico de la capa externa de la piel de un ejemplar de sapo partero común (*Alytes obstetricans*) encontrado muerto por quitridiomycosis en el Parque Natural de Peñalara. Los esporangios vacíos del hongo, de unos 12-20 μm , pueden verse como esferas de paredes refractivas ampliamente distribuidas por todo el corte.

entre el balance hídrico y osmótico de los individuos afectados.

Por otro lado, el declive de las poblaciones afectadas por quitridios en el medio natural presenta similitudes claras. La epidemia avanza rápidamente y con un frente claro (en Australia se han estimado tasas de dispersión de unos 100 Km al año), produciéndose un declive severo en pocos meses. Sorprendentemente, el declive no va asociado a cambios drásticos en el medio, que permanece intacto. Afecta sobre todo a zonas altas de montaña y frecuentemente en zonas protegidas y bien conservadas. Los adultos mueren, así como los individuos recién metamorfoseados, mientras que las larvas permanecen vivas, aunque como ya hemos dicho, ya están infectadas. Afecta selectivamente a algunas especies de anfibios, mientras que otras especies que comparten el hábitat con las afectadas permanecen totalmente sanas. Analizando las similitudes biológicas de las especies afectadas, parece ser que las especies más susceptibles serían aquéllas más ligadas al medio acuático, y sobre todo aquéllas que se reproducen en arroyos (WILLIAMS & HERO, 1998; LIPS *et al.*, 2003b). Además, un período larvario prolongado facilitaría el contacto con las zoosporas presentes en el agua, mientras que un tamaño de puesta reducido dificultaría la recuperación de la especie afectada provocando su declive. Por otro lado, casi todas las especies afectadas ocupan nichos muy específicos y presentan distribuciones reducidas. Los quitridios no se desarrollan a temperaturas superiores a unos 23°C (por lo tanto resultan inofensivos para otros vertebrados incluido el hombre), por lo que las poblaciones infectadas se localizan en zonas no demasiado calurosas (LAURANCE *et al.*, 1996). Aunque los individuos afectados mueren irremediablemente, el patógeno permanece viable en el medio probablemente en los arroyos. Sin embargo, los quitridios sólo pueden resistir como saprófitos en zonas frescas.

Los casos de quitridiomycosis en poblaciones naturales de anfibios son cada vez más numerosos. Actualmente se encuentra presente en multitud de países de todo el mundo, aunque fundamentalmente se concentra en Australia y Centroamérica (un listado completo de los casos conocidos por áreas geográficas puede consultarse en <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/chyglob.htm>). En Australia se presenta en más de 46 especies, de las que 12 están en severo declive o se han extinguido ya (HERO & SHOO, 2003). Tres cuartas partes de las especies de anfibios de Panamá y Costa Rica están en decli-

ve, y en todos los casos los quitridios están presentes (p.e. LIPS, 1999; YOUNG *et al.*, 2001; LIPS *et al.*, 2003a, 2003b; RON *et al.*, 2003). En Estados Unidos los quitridios son responsables con seguridad del declive de, por ejemplo, *Bufo baxteri*, *B. canorus*, y *B. boreas* (MUTHS *et al.*, 2003), y recientemente se ha demostrado la conexión de los quitridios con el declive espectacular de *Rana muscosa* en California que permaneció inexplicado durante muchos años (FELLERS *et al.*, 2001). En Europa sólo existe un caso documentado de declive de anfibios por quitridiomycosis que ocurrió en la Sierra de Guadarrama (BOSCH *et al.*, 2001), aunque nuevos casos en el pirineo aragonés están siendo descritos actualmente (J. BOSCH & M. C. FISHER, datos no publicados).

Aunque como ya hemos dicho la enfermedad fue descrita en 1998, el análisis de individuos procedentes de colecciones científicas indica su existencia al menos desde los años 70 (p.e. GREEN & KAGARISE SHERMAN, 2001). Pero, ¿cuál es la causa de que en los últimos años se esté produciendo una incidencia tan notable de la enfermedad? La respuesta general es que se ha producido un cambio reciente en el balance entre el hospedador y el patógeno. Este cambio se ha podido producir por dos motivos. En primer lugar, el hongo ha podido ser introducido en las zonas afectadas donde antes no se encontraba presente. Alternativamente, puede ser que el hongo siempre haya estado presente en las zonas afectadas, y que en épocas recientes y motivado por ciertos factores ambientales, la virulencia del hongo haya aumentado, o bien que el sistema inmune de los anfibios se haya alterado. Sin embargo, no existen evidencias comprobadas que soporten esta última alternativa. Como ya hemos dicho, las epidemias no se asocian a cambios ambientales, y frecuentemente los declives se producen en zonas bien conservadas. Además, exhaustivos análisis han demostrado la ausencia de niveles nocivos de contaminantes en las zonas afectadas (p.e. STALLARD, 2001). Por otro lado, otros factores ambientales como el incremento de radiación ultravioleta, que presenta efectos letales comprobados en muchas especies de anfibios en todo el mundo (ver p.e. BLAUSTEIN *et al.* 2003), probablemente no sea determinante en este caso. Así, aunque existen multitud de estudios con conclusiones controvertidas, no se puede asegurar con rigor que en todas las zonas donde se han producido declives generalizados hayan padecido un incremento de radiación ultravioleta significativa (BERGER *et al.*,

1999; ver sin embargo MIDDLETON *et al.*, 2001). Además, muchas especies afectadas por la enfermedad viven en bosques profundos, son nocturnas, e incluso realizan la puesta bajo piedras, por lo que estas especies no estarían expuestas a radiaciones importantes. Al contrario, otras especies de las zonas afectadas, que por sus hábitos serían más susceptibles de padecer un incremento de la radiación, no se encuentran en declive (p.e. LIPS *et al.*, 2003b). Por otro lado, los individuos afectados por quitridiomycosis no parecen estar inmunodeprimidos, ya que no presentan problemas nutricionales y/o reproductivos ni otras infecciones oportunistas (Berger *et al.* 1998, 1999). Sin embargo, otros factores ambientales relacionados con el cambio climático sí podrían estar relacionados con la incidencia de la quitridiomycosis (BLAUSTEIN & KIESECKER, 2002) y, aunque no puedan establecerse relaciones claras (p.e. ALEXANDER & EISCHEID, 2001; CAREY *et al.*, 2001; CAREY & ALEXANDER, 2003), con seguridad algunos factores ambientales contribuyen al declive generalizado de los anfibios que de forma global sólo puede explicarse por la acumulación de causas de naturaleza muy diversa.

Por otro lado, la hipótesis de la introducción del patógeno presenta fundadas evidencias para explicar la gran incidencia de esta enfermedad. Como es bien sabido, patógenos y hospedadores coevolucionan juntos de forma que los primeros no llegan a ser letales para los segundos. Sin embargo, las altísimas tasas de mortalidad que aparecen en las infecciones por quitridios parecen indicar que los hospedadores nunca habían estado previamente en contacto con el patógeno. En realidad, son muchos los posibles vectores de transmisión del patógeno, desde especies introducidas hasta el propio hombre. Además, ya que algunas especies de anfibios son infectadas sin que se produzca mortalidad, los individuos de estas especies pueden dispersar la enfermedad. Por ejemplo en Australia los individuos de *B. marinus*, que son capaces de desplazarse muchos kilómetros, frecuentemente están infectados con hongos quitridios sin que lleguen nunca a desarrollar la enfermedad. Recientemente, algunos investigadores han señalado la posibilidad de que los quitridios que afectan a los anfibios sean originarios de África, el único continente donde no se han detectado mortalidades en masa en la naturaleza pero sí algunos casos puntuales de infecciones. Así, la dispersión de los quitridios podría haberse producido mediante individuos infectados de

Xenopus, producido en grandes cantidades en granjas africanas, y que presenta tasas de infección elevadas tanto en dichas instalaciones como en el medio natural.

Por otro lado, es bastante razonable pensar que el hombre directamente, con sus rápidos desplazamientos entre lugares remotos de todo el mundo, pueda estar llevando los quitridios de un sitio a otro. En este sentido, los propios investigadores seríamos los candidatos más probables de ser agentes dispersantes de esta enfermedad.

UN EJEMPLO PRÓXIMO DE DECLIVE DE ANFIBIOS POR HONGOS QUITRIDIOS

El caso del declive de *A. obstetricans* en el Parque Natural de Peñalara (BOSCH *et al.*, 2001) responde al típico caso de declive de poblaciones de anfibios por enfermedades emergentes. La zona, un Parque Natural de alta montaña (1640-2430 m de altitud), goza de protección desde 1930, se encuentra bien conservado y cuenta con más de 250 masas de agua susceptibles de albergar anfibios (fig. 4). Diez especies de anfibios están presentes en el Parque, y hasta hace pocos años, *A. obstetricans* era una de las más abundantes, encontrándose distribuido prácticamente por la totalidad del Parque.

El problema surgió en el verano de 1997, cuando empezaron a aparecer cientos de individuos recién metamorfoseados de la especie afectada muertos flotando en las charcas. Las mortalidades en masa se repitieron cada vez de forma más leve en 1998 y en 1999, cuando junto con Iñigo Martínez Solano y Mario García-París iniciamos el estudio del problema. Los individuos recién metamórficos muertos (más de 1000 en 1999) no presentaban ningún síntoma externo que indicase la naturaleza del problema (fig. 5), y en 1999 resultaba ya prácticamente imposible encontrar individuos adultos en el Parque. Tras un muestreo exhaustivo de todas las masas de agua del parque pudimos comprobar que las larvas habían desaparecido de más del 90% de las charcas en las que estaban presentes tan sólo algunos años atrás. *A. obstetricans* presenta muchas veces un periodo larvario prolongado y, en zonas altas de montaña como la afectada, las larvas permanecen en el agua más de 2 años hasta conseguir metamorfosearse. Por lo tanto, la inmensa mayoría de larvas que aún permanecía en las charcas en 1999 procedían de años atrás, mientras que ese año sólo un par de ejemplares de todo el Parque habrían conseguido reproducirse. Por otro lado, las larvas supervivientes no parecían estar afecta-



Fig. 4. Una imagen del Parque Natural de Peñalara, un área alpina con más de 250 masas de agua, donde tuvo lugar el primer caso conocido de quitridiomycosis de Europa.

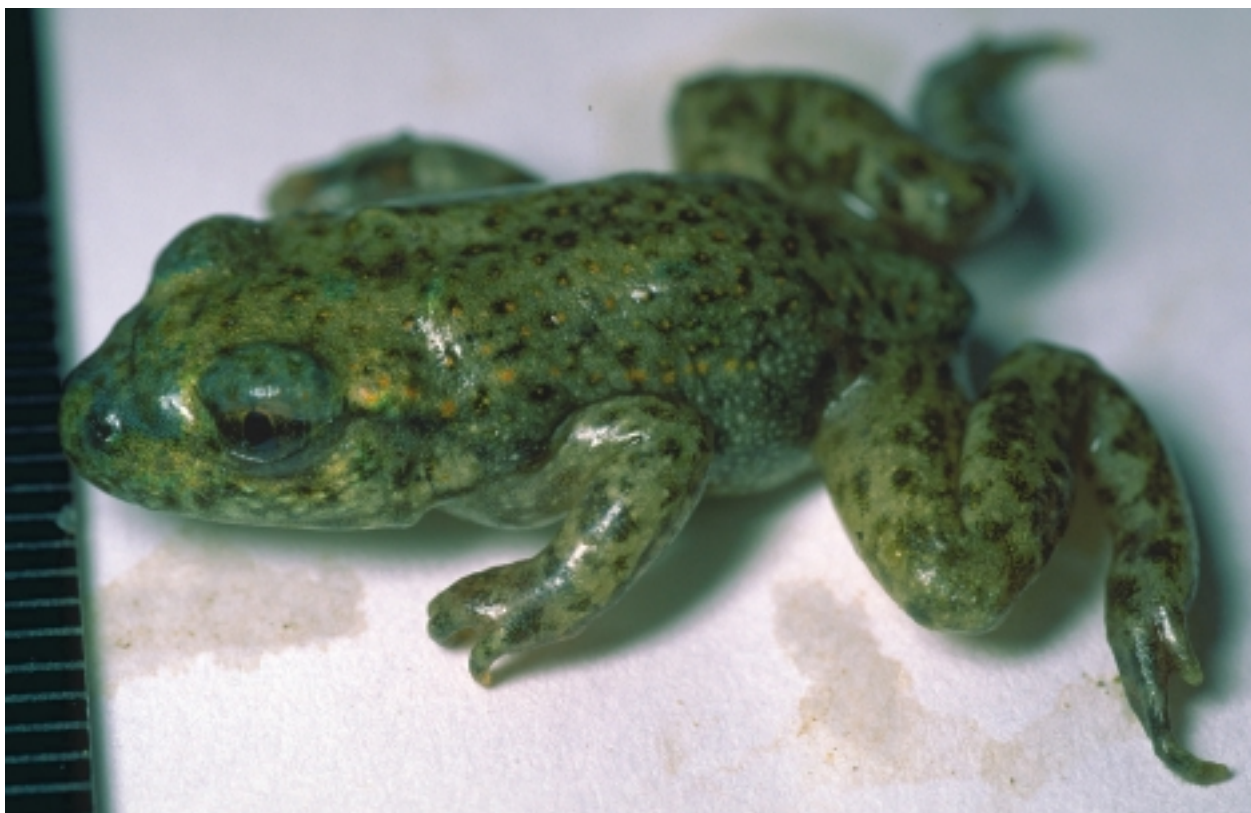


Fig. 5. Ejemplar recién metamorfoseado de sapo partero común (*Alytes obstetricans*) muerto por quitridiomycosis en el Parque Natural de Peñalara. Ningún síntoma externo indica la causa de la muerte.

das, y se comportaban normalmente. Los recién metamórficos supervivientes tampoco presentaban síntomas externos de enfermedad, y sólo alguno de ellos parecía debilitado.

Sin embargo, cuando analizamos los ejemplares encontrados muertos o moribundos al microscopio electrónico pudimos comprobar que su piel se encontraba perforada por tubos de descarga de hongos quitridios. Además, cortes histológicos pusieron de manifiesto esporangios de hongos quitridios en todos los estadios del desarrollo, confirmando el diagnóstico de la enfermedad (fig. 3).

Como en todos los casos analizados de quitridiomycosis en todo el mundo, la zona permanecía inalterada y solo se detectó un ligero incremento del pH en muchas charcas (que suele ser habitualmente ácido). Las otras 9 especies de anfibios presentes en el Parque quedaron aparentemente al margen del problema, por lo menos a gran escala. Sólo un individuo de *Bufo calamita* fue encontrado enfermo con úlceras en la piel, muriendo a las pocas horas de ser capturado (MARTÍNEZ-SOLANO *et al.*, 2003). Este ejemplar también presentó quitridios al ser analizado en el laboratorio (fig. 6). Además, desde el verano de

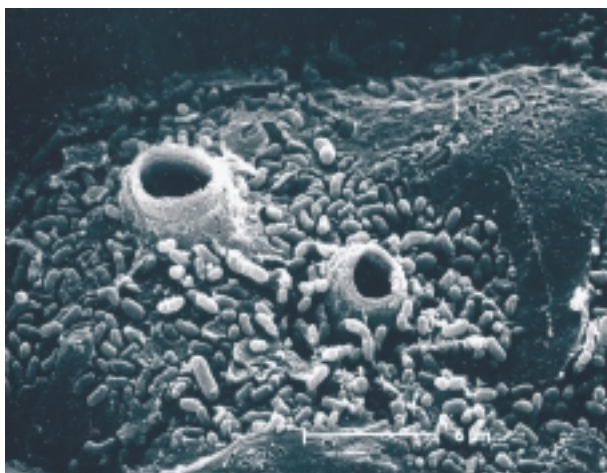


Fig. 6. Imagen del microscopio electrónico de barrido de la superficie de la piel de un ejemplar de sapo corredor (*Bufo calamita*) encontrado moribundo en el Parque Natural de Peñalara. Los tubos de descarga de los esporangios de los hongos quitridios, una vez abiertos al descargar las zoosporas, pueden verse con claridad perforando la piel del animal.

2001 se viene produciendo en la zona una mortalidad anormal de individuos de *Salamandra salamandra* que también estaría motivada por hongos quitridios (J. BOSCH & I. MARTÍNEZ-SOLANO, datos no publicados), pese a que los casos conocidos de infección en urodeltos son muy escasos (p.e. DAVIDSON *et al.*, 2003). En la actualidad, análisis moleculares han determina-

do que al menos 6 de las 9 especies presentes en la zona son portadores de hongos quitridios (J. BOSCH & M. C. FISHER, datos no publicados), aunque como decimos la mortalidad en masa sólo ha afectado hasta el momento a dos de ellas.

Como en otros muchos casos de quitridiomycosis, en el caso del parque natural de Peñalara tampoco podemos explicar por qué la epidemia afectó en primera instancia de forma dramática a sólo una especie. Probablemente, el reducido tamaño de puesta de *A. obstetricans* estaría relacionado con su acusado declive, y tal vez lo extraordinariamente prolongado de su periodo larvario explique su mayor susceptibilidad (como también ha sido señalado para *R. muscosa*; FELLERS *et al.*, 2001). Por otro lado, teniendo en cuenta que el otro único caso de mortalidad en masa de anfibios descrito en España hasta la fecha (MÁRQUEZ *et al.*, 1996) se refiere a la misma especie, tal vez los sapos parteros sean especies particularmente sensibles a las enfermedades emergentes.

En años posteriores a las mortalidades en masa siguieron apareciendo ejemplares muertos en el Parque, aunque lógicamente en pequeño número ya que el número de larvas que quedaban en las charcas era muy reducido. Además, algunos ejemplares recién metamórficos parecían sanos, y podrían haberse incorporado a las siguientes generaciones. En las temporadas de 2000 y 2001 observamos nuevas puestas en zonas del Parque donde antes habían desaparecido las larvas, y una charca artificial construida en la zona baja para potenciar la recuperación de la especie fue rápidamente colonizada por la especie con gran éxito.

La recuperación del sapo partero en Peñalara podría llegar a ocurrir de forma espontánea, aunque ayudada por los importantes esfuerzos conservacionistas llevados a cabo por las autoridades competentes, pero, en cualquier caso, serán necesarios muchos años hasta que se alcancen los niveles de efectivos presentes antes de la epidemia.

¿QUÉ PODEMOS HACER PARA DETENER LAS ENFERMEDADES EMERGENTES?

Fruto de la preocupación internacional sobre este problema, se celebró en agosto de 2000 en Cairns (Australia) el primer congreso mundial sobre enfermedades de anfibios. En esta reunión investigadores de todo el mundo elaboramos una serie de recomendaciones encamina-

das a controlar el problema de las enfermedades infecciosas de los anfibios. Un resumen de todo lo tratado en este acontecimiento puede ser consultado en <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/adms/AmpDisStrategies.pdf>.

Desgraciadamente, aunque los individuos en cautividad infectados con quitridios pueden ser eficazmente tratados con fungicidas (p.e. PARKER, 2002) o simplemente con temperaturas relativamente altas (WOODHAMS *et al.*, 2003), actualmente no se conocen métodos viables para tratar poblaciones naturales infectadas. Por lo tanto, y como en la mayoría de las enfermedades infecciosas, la mejor forma de actuación para evitar el problema es evitar su dispersión.

A modo de resumen se describen a continuación las líneas de actuación recomendadas para intentar controlar el problema según el grado de implicación de los interesados.

Para las autoridades competentes:

- Informar al gran público de la existencia de las enfermedades y de las acciones que pueden extenderlas.
- Asegurarse de que la posible cría de anfibios en cautividad se realiza en condiciones adecuadas.
- Establecer cuarentenas para las enfermedades de anfibios y métodos de desinfección en los puntos de importación/exportación de anfibios.

Para los investigadores:

- Establecer protocolos para determinar el grado de infección de las poblaciones afectadas, basados en un consenso internacional.
- Evaluar la susceptibilidad de las especies no infectadas.
- Establecer procedimientos para combatir rápidamente los brotes detectados.
- Examinar los ejemplares enfermos o muertos procedentes de comercios o de la naturaleza, y nunca devolverlos al medio.
- Evitar el posible contagio entre individuos en los estudios de campo usando guantes desechables.
- Utilizar recipientes individuales y previamente esterilizados para almacenar temporalmente los individuos capturados si el estudio lo requiere.
- Desinfectar todo el equipo de campo (incluyendo las botas) después de cualquier actividad siguiendo los siguientes puntos (ver p.e. BRUNNER & SESTERHENN, 2001 y JONSON *et al.*, 2004 para más detalles):

1. Lavar el equipo en el sitio de estudio para eliminar los restos de materia orgánica.
2. Aplicar una solución desinfectante durante al menos 1 minuto (lejía al 0.4% o etanol al 70% para quitridios y cloro activo al 5% para iridovirus).
3. Dejar secar el equipo al sol el mayor tiempo posible.

Para el gran público:

- No introducir especies alóctonas (peces, crustáceos, anfibios, etc).
- No translocar larvas, metamórficos o individuos adultos de ninguna especie de anfibio autóctono.

BIBLIOGRAFÍA

- ALEXANDER, M. A. & EISCHEID, J. K.
2001 Climate variability in regions of amphibian declines. *Conservation Biology*, 15: 930-942.
- ALFORD, R. A. & RICHARDS, S. J.
1997 Lack of evidence for epidemic disease as an agent in the catastrophic decline of Australian rainforest frog. *Conservation Biology*, 11: 1026-1029.
- ALFORD, R. A. & RICHARDS, S. J.
1999 Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30: 133-165.
- BEEBE, T. J. C.
1996 *Ecology and Conservation of Amphibians*. Chapman & Hall. New York.
- BERGER, L., SPEARE, R., DASZAK, P., GREEN, D. E., CUNNINGHAM, A. A., GOGGIN, C. L., SLOCOMBE, R., RAGAN, M. A., HYATT, A. D., MCDONALD, K. R., HINES, H. B., LIPS, K. R., MARANTELLI, G. & PARKES, H.
1998 Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95: 9031-9036.
- BERGER, L., SPEARE, R. & HYATT, A.
1999 Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. En: CAMPBELL, A. (Ed.) *Declines and Disappearances of Australian frogs*. *Environmental Australia*, Canberra, pp. 23-33.

- BLAUSTEIN, A. R.
1994 Chicken Little or Nero's fiddle? A perspective on declining amphibian populations. *Herpetologica*, 50: 85-97.
- BLAUSTEIN, A. R., HOKIT, D. G., O'HARA, R. K. & HOLT, R. A.
1994b Pathogenic fungus contribute to amphibian losses in the Pacific North-West. *Biological Conservation*, 67: 251-254.
- BLAUSTEIN, A. R. & JOHNSON, P. T. J.
2003 The complexity of deformed amphibians. *Frontiers in Ecology and Environment*, 1: 87-94.
- BLAUSTEIN, A. R. & KIESECKER, J. M.
2002 Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters*, 5: 597-608.
- BLAUSTEIN, A. R., ROMANSIC, J. M. & KIESECKER, J. M.
2003 Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, 9: 123-140.
- BLAUSTEIN, A. R. & WAKE, D. B.
1995 The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American*, 272: 52-57.
- BLAUSTEIN, A. R., WAKE, D. B. & SOUSA, W.
1994a Amphibian declines: judging the stability, persistence, and susceptibility of local populations to local and global extinction. *Conservation Biology*, 8: 60-71.
- BOLLINGER, T. K., MAO, J., SCHOCK, D., BRIGHAM, R. M. & CHINCHAR, V. G.
1999 Pathology, isolation and preliminary molecular characterization of a novel iridovirus from tiger salamanders in Saskatchewan. *Journal of Wildlife Diseases*, 35: 413-429.
- BOSCH, J., MARTÍNEZ-SOLANO, I. & GARCÍA-PARÍS, M.
2001 Evidence of a chytrid fungus infection in the decline of the midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of Central Spain. *Biological Conservation*, 97: 331-337.
- BRADFORD, D. F.
1989 Allotopic distribution of native frogs and introduced fishes in high Sierra Nevada lakes of California: implication of the negative effect of fish introductions. *Copeia*, 1989: 775-778.
- BRADFORD, D. F.
1991 Mass mortality and extinction in a high-elevation population of *Rana muscosa*. *Journal of Herpetology*, 25: 174-177.
- BRUNNER, J. & SESTERHENN, T.
2001 Disinfection of *Ambystoma tigrinum* virus (ATV). *Froglog* 48
- BURTON, T. M. & LIKENS, G. E.
1975 Salamander populations and biomass in the Hubbard Brook Experimental Forest, New Hampshire. *Copeia*, 1975: 541-546.
- CAREY, C.
1993 Hypothesis concerning the causes of the disappearance of boreal toads from the mountains of Colorado. *Conservation Biology*, 7: 355-362.
- CAREY, C. & ALEXANDER, M. A.
2003 Climate change and amphibian declines: is there a link? *Diversity and Distributions*, 9: 111-121.
- CAREY, C., HEYER, W. R., WILKINSON, J., ALFORD, R. A., ARNTZEN, J. W., HALLIDAY, T., HUNGERFORD, L., LIPS, K. R., MIDDLETON, E. M., ORCHARD, S. A. & RAND, A. S.
2001 Amphibian declines an environmental change: use of remote-sensing data to identify environmental correlates. *Conservation Biology*, 15: 903-913.
- CLARK, H. F., BRENNAN, J. C., ZEIGEL, R. F. & KARZON
1968 Isolation and characterization of viruses from the kidneys of *Rana pipiens* with renal adenocarcinoma before and after passage in red eft (*Triturus viridescens*). *Journal of Virology*, 2: 629-640.
- CRUMP, M. L., HENSLEY, F. & CLARK, K.
1992 Apparent declines of the Golden toad: underground or extinct? *Copeia*, 1992: 413-420.
- CUNNINGHAM, A. A., LANGTON, T. E. S., BENNETT, P. M., LEWIN, J. F., DRURY, S. E. M., GOUGH, R. E. ET AL.
1995 Investigations into unusual mortalities of the common frog (*Rana temporaria*) in Britain. Proceedings of the 5th International Colloquium on the Pathology of reptiles and amphibians. The Netherlands, 1995.
- CUNNINGHAM, A. A., LANGTON, T. E. S., BENNETT, P. M., LEWIN, J. F., DRURY, S. E. N., GOUGH, R. E. & MACGREGOR, S. K.
1996 Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B Biological Sciences*, 351: 1539-1557.
- DAVIDSON, E. W., PARRIS, M., COLLINS, J. P., LONGCORE, J. E., PESSIER, A. P. & BRUNNER, J.
2003 Pathogenicity and transmission of chytridiomycosis in tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia*, 2003: 601-607.

- DEGITZ, S. J., KOSIAN, P. A., MAKYNEN, E. A., JENSEN, K. M. & ANKLEY, G. T.
2000 Stage- and species-specific development toxicity of all-trans retinoic acid in four native North American ranids and *Xenopus laevis*. *Toxicological Sciences*, 57: 264-274.
- DRURY, S. E. N., GOUGH, R. E. & CUNNINGHAM, A. A.
1995 Isolation of an iridovirus-like agent from common frogs (*Rana temporaria*). *Veterinary Record*, 137: 72-73.
- DUSI, J. L.
1949 The natural occurrence of "Red leg", *Pseudomonas hydrophila* in a population of American toads *Bufo americanus*. *Ohio Journal of Sciences*, 49: 70-71.
- FELLERS, G. M., GREEN, D. E. & LONGCORE, J. E.
2001 Oral chytridiomycosis in the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*). *Copeia*, 2001: 945-953.
- FISHER, R. N. & SHAFFER, H. B.
1996 The decline of amphibians in California's Great Central Valley. *Conservation Biology* 10: 1387-1397.
- FORT, D. J., PROPST, T. L., STOVER, E. L., HELGEN, J. C., LEVEY, R. B., GALLAGHER, K. & BURKHART, J. G.
1999 Effects of pond water, sediment, and sediment extracts from Minnesota and Vermont, USA, on early development and metamorphosis of *Xenopus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18: 2305-2315.
- GAMRADT, S. C. & KATS, L. B.
1996 Effect of introduced crayfish and mosquito fish on California Newts. *Conservation Biology*, 10: 1155-1162.
- GILLESPIE, G. & HERO, J. M.
1999 Potential impacts of introduced fish and fish translocations on Australian amphibians. En: CAMPBELL A. (Ed.) *Declines and Disappearances of Australian frogs*. Environmental Australia. Canberra, pp. 131-144.
- GOORHA, R.
1995 Family Iridoviridae. *Archives of Virology (Suppl.)*, 10: 85-99.
- GREEN, D. E. & KAGARISE, S. C.
2001 Diagnostic histological findings in Yosemite toads (*Bufo canorus*) from a die-off in the 1970's. *Journal of Herpetology*, 35: 92-103.
- HECNAR, S. J. & M'CLOSKEY, R. T.
1997 Changes in the composition of a ranid frog community following bullfrog extinction. *American Midland Naturalist*, 137: 145-150.
- HENGSTBERGER, S. G., HYATT, A. D., SPEARE, R. & COUPAR, B. E. H.
1993 Comparison of epizootic haematopoietic necrosis and Bohle iridoviruses, recently isolated Australian iridoviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*, 15: 93-107.
- HERO, J. M. & SHOO, L.
2003 Conservation of amphibians in the old world tropics. Defining unique problems associated with regional fauna. En: SEMLITSCH R. D. (Ed.) *Amphibians Conservation*. Smithsonian Books. Washington, pp. 70-84.
- HOULAHAN, J. E., FINDLAY, C. S., SCHMIDT, B. R., MEYER, A. H. & KUZMIN, S. L.
2000 Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*, 404: 752-755.
- HYATT, A. D., PARKES, H. & ZUPANOVIC, Z.
1998 Identification, characterization and assessment of Venezuelan viruses for potential uses as biological control agents against the cane toad (*Bufo marinus*) in Australia. Report to the Australian Federal Government and Environment Australia, 1998
- JANCOVICH, J. K., DAVIDSON, E. W., MORADO, J. F., JACOBS, B. L. & COLLINS, J. P.
1997 Isolation of a lethal virus from the endangered tiger salamander *Ambystoma tigrinum stebbinsi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 31: 161-167.
- JOHNSON, M. L., BERGER, L., PHILIPS, L. & SPEARE, R.
2004 In vitro evaluation of chemical disinfectants and physical techniques against the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 00: 00-00.
- JOHNSON, M. L. & SPEARE, R.
2003 Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 922-925.
- JOHNSON, P. T. J., LUNDE, K. B., THURMAN, E. M., RIRCHIE, E. G., WRAY, S. N., SUTHERLAND, D. R., KAPFER, J. M., FREST, T. J., BOWERMAN, J. & BLAUSTEIN, A. R.
2002 Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the Western United States. *Ecological Monographs*, 72: 151-168.
- KIESECKER, J. M., BLAUSTEIN, A. R. & BELDEN, L. K.
2001 Complex causes of amphibian population declines. *Nature*, 410: 681-684.

- KIESECKER, J. M.
2002 Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99: 9900-9904.
- KIESECKER, J. M. & BLAUSTEIN, A. R.
1997 Influences of egg laying behaviour on pathogenic infection of amphibian eggs. *Conservation Biology*, 11: 214-220.
- KIESECKER, J. M., BLAUSTEIN, A. R. & MILLER, C. L.
2001 Transfer of a pathogen from fish to amphibians. *Conservation Biology*, 15: 1064-1070.
- LANGDON, J. S.
1989 Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in red-fin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *Journal of Fish Diseases*, 12: 295-310.
- LANNON, M. J., LANG, K., WALTZ, T. & PHILLIPS, G. S.
1994 An altered amphibian assemblage: Dickinson County, Iowa, 70 year after Frank Blanchard's survey. *American Midland Naturalist*, 131: 311-319.
- LAURANCE, W. F., MCDONALD, K. R. & SPEARE, R.
1996 Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs. *Conservation Biology*, 10: 406-413.
- LIPS, K. R.
1999 Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in western Panama. *Conservation Biology*, 13: 117-125.
- LIPS, K. R., GREEN, D. E. & PAPENDICK, R.
2003a Chytridiomycosis in wild frogs from Southern Costa Rica. *Journal of Herpetology*, 37: 215-218.
- LIPS, K. R., REEVE, J. D. & WITTERS, L. R.
2003b Ecological traits predicting amphibian population declines in Central America. *Conservation Biology*, 17: 1078-1088.
- LONGCORE, J. E., PESSIER, A. P. & NICHOLS, D. K.
1999 *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91: 219-227.
- MÁRQUEZ, R., OLMO, J. L. & BOSCH, J.
1995 Recurrent mass mortality of larval midwife toads *Alytes obstetricans* in a lake in the Pyrenean Mountains. *Herpetological Journal*, 5: 287-289.
- MARTÍNEZ-SOLANO, I., BOSCH, J. & GARCÍA-PARÍS, M.
2003 Demographic trends and community stability in a montane amphibian assemblage. *Conservation Biology*, 17: 238-244.
- MAO, J., GREEN, D. E., FELLERS, G. & CHINCHAR, V. G.
1999 Molecular characterization of iridoviruses isolated from sympatric amphibians and fish. *Virus Research*, 63: 45-52.
- MIDDLETON, E. M., HERMAN, J. R., CELARIER, E. A., WILKINSON, J. W., CAREY, C. & RUSIN, R. J.
2001 Evaluating ultraviolet radiation exposure with satellite data at sites of amphibian declines in Central and South America. *Conservation Biology*, 15: 914-929.
- MOODY, N. J. G. & OWENS, L.
1994 Experimental demonstration of the pathogenicity of a frog virus. Bohle iridovirus for a fish species, barramundi *Lates calcarifer*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 18: 95-102.
- MOREHOUSE, E. A., JAMES, T. Y., GANLEY, A. R., VILGALYS, R., BERGER, L., MURPHY, P. J. & LONGCORE, J. E.
2003 Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Molecular Ecology*, 12: 395-403.
- MUTHS, E., CORN, P. S., PESSIER, A. P. & GREEN, D. E.
2003 Evidence for disease-related amphibian decline in Colorado. *Biological Conservation*, 110: 357-365.
- NYMAN, S.
1986 Mass mortality in larval *Rana sylvatica* attributable to the bacterium, *Aeromonas hydrophilum*. *Journal of Herpetology*, 20: 196-201.
- PARKER, J. M., MIKAELIAN, I., HAHN, N. & DIGGS, H. E.
2002 Clinical diagnosis and treatment of epidermal chytridiomycosis in African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Comparative Medicine*, 52: 265-268.
- POUNDS, J. A., FOGDEN, M. P. L., SAVAGE, J. M. & GORMAN, G. C.
1997 Tests of null models for amphibian declines on a tropical mountain. *Conservation Biology*, 11: 1307-1322.
- PESSIER, A. P., NICHOLS, D. K., LONGCORE, J. E. & FULLER, M. S.
1999 Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11: 194-199.

- POWELL, M. J.
1993 Looking at mycology with a Janus face: A glimpse at chytridiomycetes active in the environment. *Mycologia*, 85: 1-20.
- READ, J. L. & TYLER, M. J.
1990 The nature and incidence of post-axial, skeletal abnormalities in the frog *Neobatrachus centralis* Parker at Olympic Dam, South Australia. *Transactions and Proceedings of the Royal Society of South Australia*, 144: 213-217.
- READ, J. L. & TYLER, M. J.
1994 Natural levels of abnormalities in the trilling frog (*Neobatrachus centralis*) at the Olympic Dam Mine. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 53: 25-31.
- REICHENBACH-KLINKE, H. & ELKAN, E.
1965 *The principal diseases of lower vertebrates. Diseases of Amphibians*. T.F.H. Publication. Hong Kong.
- RON, S. A., DUELLMAN, W. E., COLOMA, L. A. & BUSTAMANTE, M. R.
2003 Population decline of the jambato toad *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. *Journal of Herpetology*, 37: 116-126.
- SESSIONS, S. K. & RUTH, S. B.
1990 Explanation for naturally occurring supernumerary limbs in amphibians. *Journal of Experimental Zoology*, 254: 38-47.
- SHOTTS, E. B.
1984 Aeromonas. En: HOFF, G. L., FRYE, F. L. & JACOBSON, E. R. (Ed.). *Diseases of Amphibians and Reptiles*. Plenum Press. New York.
- SOARES, C., DE MATOS, A. A., ARNTZEN, J. W., CARRETERO, M. & LOUREIRO, A.
2003 Amphibian mortality in a National Park in the North of Portugal. *Froglog*, 56
- SPEARE, R. & SMITH, J. R.
1992 An iridovirus-like agent isolated from the ornate burrowing frog *Limnodynastes ornatus* in northern Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 14: 51-57.
- STALLARD, R. F.
2001 Possible environmental factors underlying amphibian decline in eastern Puerto Rico: analysis of U.S. government data archives. *Conservation Biology*, 15: 943-953.
- STORFER, A.
2003 Amphibian declines: future directions. *Diversity and Distributions*, 9: 151-163.
- TOFT, C. A.
1980 Resource partitioning in amphibians and reptiles. *Copeia*, 1980: 121.
- WALDMAN, B. & TOCHER, M.
1998 Behavioral ecology, genetic diversity and declining amphibian populations. En: CARO, T. M. (Ed.) *Behavioral Ecology and Conservation Biology*. Oxford University Press. Oxford.
- WHITTINGTON, R. J., KEARNS, C., HYATT, A. D., HENGSTBERGER, S. & RUTZOU, T.
1996 Spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch (*Perca fluviatilis*) in Southern Australia. *Australian Veterinary Journal*, 73: 112-124.
- WHITTINGTON, R. J. & HYATT, A. D.
1997 Diagnosis and prevention of epizootic haematopoietic necrosis virus infection. *Proceeding of the National Research Institute of Aquaculture International Workshop: new approaches to viral diseases of aquatic animals*. Kyoto, Japan. National Research Institute of Aquaculture, 1997.
- WILLIAMS, R. W.
1960 Observation of the live history of *Rhabdias sphaerocephala* Goodey 1924 from *Bufo marinus* L., in the Bermuda Islands. *Journal of Helminthology*, 34: 93-98.
- WILLIAMS, T.
1996 The iridoviruses. *Advances in Virus Research*, 41: 345-412.
- WILLIAMS, S. E. & HERO, J. M.
1998 Rainforest frogs of the Australian Wet Tropics: guild classification and the ecological similarity of declining species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 265: 597-602.
- WOLF, K., BULLOCK, G. L., DUNBAR, C. E., QUIMBY, M. C.
1968 Tadpole edema virus: a viscerotropic pathogen for anuran amphibians. *Journal of infectious diseases*, 118: 253-262.
- WOODHAMS, D. C., ALFORD, R. A. & MARANTELLI, G.
2003 Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55: 65-67.

YOUNG, B. E., LIPS, K. R., REASER, J. K., IBÁÑEZ, R., SALAS, A. W., CEDEÑO, J. R., COLOMA, L. A., SANTIAGO, R., LA MARCA, E., MEYER, J. R., MUÑOZ, A., BOLAÑOS, F., CHAVES, G. & ROMO, D.

2001 Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology*, 15: 1213-1223.

ZHANG, Q. Y., LI, Z. Q. & GUI, J. F.

1999 Studies on morphogenesis and cellular interactions of *Rana grylio* virus in an infected fish cell line. *Aquaculture*, 175: 185-197.

ZUPANOVIC, Z., MUSSO, C., LOPEZ, G., LOURIERO, C-L., HYATT, A. D., HENGSTBERGER, S., HENGSTBERGER, S. & ROBINSON, A. J.

1998a Isolation and characterization of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Diseases of Aquatic Organisms*, 33: 1-9.

ZUPANOVIC, Z., LOPEZ, B., HYATT, A. D., GREEN, B., BARTRAN, G., PARKES, H., HENGSTBERGER, S. & ROBINSON, A. J.

1998b Giant toads *Bufo marinus* in Australia and Venezuela have antibodies against "ranaviruses". *Diseases of Aquatic Organisms*, 32: 1-8.